

Radiaciones ionizantes para inducción de mutaciones en *Musa* AAA para la tolerancia a sequía

Ionizing radiation for mutation induction in *Musa* AAA for drought tolerance

Efrain Salazar^{1*}, Iselen Trujillo², Luís Castro¹, Elba Vallejo¹ y María Torrealba¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Unidad de Biotecnología Agrícola. INIA-CENIAP. ²Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. Instituto de Desarrollo Científico y Tecnológico, IDECYT. *Correo electrónico: efra63@gmail.com

RESUMEN

Las musáceas tienen gran importancia nutritiva, socioeconómica y cultural; las explotaciones comerciales del rubro se ven severamente afectadas por la falta de agua. Los prolongados períodos de sequía han ocasionado el abandono del cultivo debido a la alta inversión que conlleva su riego. Para apoyar el desarrollo sustentable de comunidades rurales y favorecer el cultivo de musáceas es necesario contar con materiales tolerantes a sequía. El mejoramiento genético tradicional es dificultoso debido a la esterilidad de la mayoría de los genotipos comerciales; la inducción de mutaciones es una herramienta valiosa para tal fin, por ello es necesario determinar condiciones para obtener materiales tolerantes a sequía mediante su uso. Se estableció la dosimetría a través del uso de yemas axilares de *Musa* AAA cultivadas *in vitro*, el medio de selección determinó la DL50 con PEG 8000. Se obtuvo *in vitro* la generación M1V6, las plantas regeneradas a partir de yemas irradiadas se caracterizaron morfológica y anatómicamente, comparándolas con plantas regeneradas *in vitro* provenientes de yemas no irradiadas. Las plantas irradiadas presentaron una morfología foliar variada y diferente de las plantas no irradiadas, un porte más vigoroso, una anatomía foliar con mayor densidad de cloroplastos y mejor organización del parénquima esponjoso. Las plantas provenientes de yemas irradiadas mantuvieron su vigor y coloración al ser sometidas a condiciones simuladas de estrés hídrico, mientras que las plantas provenientes de yemas no irradiadas mostraron síntomas evidentes de estrés al tercer día de permanecer en condiciones de sequía simulada.

Palabras clave: mutaciones inducidas, cultivo *in vitro*, mejoramiento genético, tolerancia a la sequía.

ABSTRACT

Musa has great economical, nutritional, social and cultural importance. Commercial exploitations are severely affected by the lack of water, given the long drought periods that may occur. This situation has caused the abandonment of the crop due to the high investment for the implementation of irrigation. In order to support sustainable development of rural communities and favoring the production of *Musa*, it is necessary to produce drought tolerant *Musa* genotypes. Traditional breeding is difficult due to the sterility of most commercially grown genotypes. Mutation's induction is a valuable tool for such goal, being necessary to establish the conditions to obtain the drought tolerant plants with this technology. Dosimetry using *in vitro* grown *Musa* AAA buds, and the selection method using PEG 8000 were established, estimating the LD50. M1V6 generation was obtained *in vitro* and regenerated plants from irradiated buds were morphologically and anatomically characterized, and they were compared to plants regenerated from non-irradiated tissues. Irradiated plants had varied leaf morphology but different from non-irradiated plants. Also, they were more vigorous, and had a leaf anatomy with higher chloroplast density and a better organization of spongy parenchyma. Plants from irradiated buds kept their vigor and leaf color when exposed to simulated water stress conditions, while plants from non-irradiated buds showed evident symptoms of stress after the third day under simulated drought conditions.

Key words: induced mutations, *in vitro* culture, plant breeding, drought resistance.

Recibido: 24/04/14

INTRODUCCIÓN

El déficit hídrico es un proceso complejo y generalmente poco entendido, que afecta a una alta proporción de la población mundial, y ha presentado una tendencia a incrementarse de manera irregular a través del tiempo y el espacio, con efectos acumulativos y residuales (Wilhite, 2000). Cuando éste déficit se asocia con altas temperaturas, baja humedad relativa y alta radiación solar, características típicas de los países latinoamericanos y del Caribe, aumentan los niveles de evaporación y transpiración y, por tanto, aumenta el déficit de humedad en el suelo e impide y limita el crecimiento de cultivos, con la consecuente merma en la producción agrícola (Quiring y Papakryiakou, 2003; Wu *et al.*, 2004; Narasimhan y Srinivasan, 2005).

Por otro lado, la tendencia mundial de crecimiento poblacional aumenta la demanda de alimentos y bienes de primera necesidad, por lo que cada día es más apremiante el incremento de los rendimientos de la producción en las zonas actualmente cultivadas, así como, la adaptación de nuevas áreas al proceso agrícola (Chaves y Davies, 2010). En este sentido, las alteraciones climáticas asociadas a los cambios globales que se han producido en los últimos años, parecen afectar considerablemente el régimen pluviométrico en muchos países del área, generando como consecuencia una mayor frecuencia de eventos de sequías severas y prolongadas. Por lo tanto, la capacidad de producir alimentos en condiciones de baja suplencia de humedad se convierte en una necesidad prioritaria para los países latinoamericanos y del Caribe (Schaper *et al.*, 2000; Conde-Álvarez y Saldaña-Zorrilla, 2007).

En el caso de *Musa*, una de las principales limitantes que se han identificado para impulsar el cultivo de musáceas entre pequeños y medianos productores, así como productores de subsistencia, es la incidencia de plagas y enfermedades, aunado al alto requerimiento de agua por parte del cultivo.

Damour *et al.* (2012) demostraron que la baja disponibilidad de agua, en el caso de *Musa* AAA, se tradujo en un retardo y disminución en la floración para garantizar el mantenimiento del crecimiento vegetativo. Adicionalmente, Akinro *et al.* (2012) establecieron la alta susceptibilidad

de las musáceas ante el déficit hídrico durante todas las fases del crecimiento, confirmando la alta necesidad de suplencia constante de agua por parte de las musáceas comestibles.

Se hace necesario contar con genotipos tolerantes a sequía, a manera de ofrecer materiales que contribuyan al desarrollo socioproductivo de las comunidades, especialmente aquellas de bajos recursos y dedicadas a la actividad agrícola, donde *Musa* juega un papel preponderante. El cultivo de musáceas ha sido considerado prioritario para la seguridad y soberanía alimentaria, siendo utilizados en programas agrícolas destinados a pequeños y medianos productores, incluyendo los productores de subsistencia.

El cultivo de musáceas tiene un amplio potencial para expandirse hacia zonas cuya principal limitante es el estrés hídrico. Sin embargo, no existen genotipos de *Musa* AAA tolerantes al estrés hídrico, que puedan ser usados comercialmente en pequeñas unidades de producción. En tal sentido, no es posible obtener estos materiales mediante técnicas convencionales de mejoramiento, debido a que los materiales de interés son generalmente triploides y estériles (Alfaro, 2013; Tomepke *et al.*, 2004).

El uso de mutaciones inducidas ha sido exitoso en la obtención de mutantes en los distintos tipos de *Musa* (Pestana *et al.*, 2011; Jain, 2010; Roux *et al.*, 2003) además, existen protocolos eficientes de regeneración *in vitro* de musáceas comestibles (Izquierdo *et al.*, 2012; Giap *et al.*, 2012); lo que hace factible el uso de radiaciones ionizantes en tejidos meristemáticos los cuales podrían ser regenerados *in vitro*, para una selección más efectiva de plantas con tolerancia a sequía.

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar el efecto de radiaciones ionizantes en *Musa* AAA como mecanismo de inducción de mutaciones *in vitro*, con énfasis en la tolerancia a estrés hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación utilizó, para los experimentos de la fase de dosimetría, 50 plantas de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante, presentes en la

colección de germoplasma del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, (INIA-CENIAP) en Maracay. El resto de los experimentos se realizaron partiendo de 200 brotes de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante donadas por los productores de cambur de Santa Cruz de Aragua, municipio Lamas del estado Aragua.

La muestra experimental se tomó de los materiales regenerados *in vitro* en la unidad de Biotecnología del INIA-CENIAP. Para el caso de los experimentos de dosimetría y establecimiento de las pruebas de dosis letales (DL) 50 de los osmóticos, cada tratamiento contó con 30 ápices caulinares cada uno y para la producción de mutantes se trabajó con 1000 ápices caulinares sometidos a irradiación.

Seguidamente, se realizó la calibración del proceso de irradiación, estableciendo los parámetros físicos para garantizar la uniformidad de la incidencia y de la intensidad de la radiación. Para tal fin, se utilizó un tomógrafo axial Phillips, modelo CT MX-16. Se midió el grosor de los recipientes con las plantas, la distancia de focalización de la radiación, y se calibraron los parámetros físicos a fin de garantizar una radiación uniforme.

Para establecer la dosis óptima de radiación a aplicarse a los explantes, se llevó a cabo la dosimetría; con dosis de 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 Gy. Se usaron 25 brotes foliados regenerados *in vitro* por tratamiento, al tiempo de medir la supervivencia de los explantes. Se siguió un diseño completamente aleatorizado y la unidad experimental constó de 5 brotes. Como dosis óptima se tomó aquella capaz de permitir la supervivencia del 50% de los explantes (DL50).

Posteriormente, fueron irradiados 980 brotes foliados de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) con la DL50, cuyos brotes se colocaron a crecer en frascos de vidrio transparentes de 250 ml de capacidad, provistos de 10 ml de medio cultivo líquido de sales Murashige y Skoog (MS, 1962), 30 g l⁻¹ de sacarosa y 5 mg l⁻¹ de bencil adenina (BA) durante 15 días para la recuperación de los brotes irradiados (M1V0). Estos se sembraron nuevamente en el mismo medio de multiplicación para incrementar su número (M1V1) y luego en el medio de selección.

Las plantas sobrevivientes (M1V2), fueron pasadas nuevamente al medio de multiplicación para incrementar el número de brotes (M1V3). De esta forma, se procedió a cultivar alternadamente en medio de selección y la subsecuente generación en el medio de multiplicación hasta llegar a la M1V6. En cada generación se tomaron datos sobre: supervivencia de los brotes, número de brotes, longitud de brotes, coloración de los tejidos (para identificar posibles mutaciones clorofilianas). En resumen, el proceso de selección se realizó en las progenies M1V2, M1V4 y M1V6.

Para la obtención del medio de selección, se procedió inicialmente a realizar el cultivo *in vitro* de ápices caulinares en medio MS suplementado con BA 5 mg l⁻¹. Se sembraron ápices caulinares de 1 mm de longitud en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo 10 ml del medio con las sales MS, suplementado con ácido nicotínico, tiamina HCl y piridoxina (1 mg l⁻¹ c/u), inositol (100 mg l⁻¹), BA 5 mg l⁻¹ y sacarosa 30 g l⁻¹. El pH se calibró a 5,8±0,02 previo a la esterilización en autoclave. El medio de cultivo se utilizó líquido. Los tubos con el medio se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 psi de presión durante 20 min.

Los ápices caulinares, se extrajeron a partir de secciones de cormo de 1 cm³ aproximadamente. Las secciones de cormo se desinfectaron con una solución de Benlate (14,2 g l⁻¹) durante 20 min, se enjuagaron en alcohol 70% durante 2 min y posteriormente se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio 2,5% i.a. durante 10 min. El exceso de desinfectante fue eliminado con tres lavados sucesivos en agua destilada esterilizada y bajo condiciones de flujo laminar de aire estéril, se extrajeron los ápices caulinares de 1 mm de longitud y se sembraron en los tubos de ensayo con el medio líquido. Posteriormente, los brotes regenerados se cultivaron en frascos de 250 ml de capacidad con 10 ml del medio de cultivo. Los explantes se colocaron a crecer bajo luz fluorescente (16,95 W m⁻²) a 25±2 °C y un fotoperíodo de 16 h.

Seguidamente, se procedió al establecimiento de las pruebas DL50, 75 y 100 en medios con Polietilén glicol (PEG 8000), como mecanismos de selección al estrés hídrico. Para determinar las dosis, se sembraron ápices caulinares en el medio MS con 5 mg l⁻¹ BA conteniendo

0, 10, 20, 30 y 40% de PEG 8000 estudiando así la supervivencia de los explantes. En cada tratamiento se observó el oscurecimiento de los tejidos, la ubicación del oscurecimiento en el órgano afectado y la coloración del medio de cultivo. Se sembraron 10 explantes por tratamiento bajo un diseño completamente aleatorio. Las observaciones se tomaron diariamente por un lapso de 15 días. Los explantes se colocaron a crecer bajo luz fluorescente ($16,95 \text{ W m}^{-2}$) a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, y un fotoperíodo de 16 h.

La progenie M1V6 fue cultivada en un umbráculo, bajo condiciones de estrés hídrico como inicio de la caracterización final de la tolerancia a sequía. Fue realizada una evaluación morfológica de los 26 individuos seleccionados en términos de número, longitud de órganos aéreos, altura (cm), área foliar (cm^2), coloración del tallo y de las hojas, forma de las hojas y diámetro del tallo (cm).

Adicionalmente, se hicieron evaluaciones anatómicas de las hojas de plantas regeneradas a partir de brotes irradiados, comparándolas con las hojas de plantas de brotes no irradiados; en todos los casos se utilizaron plantas regeneradas *in vitro*. Para las observaciones anatómicas se fijaron los tejidos foliares en solución formaldehído, ácido acético y alcohol etílico (FAA) en la proporción 5:5:90, manteniéndolos a temperatura ambiente hasta el momento del análisis.

La preparación de la muestra se realizó según la metodología de Roth (1964), que consistió en un primer paso de la deshidratación gradual, en alcohol etílico a diferentes concentraciones: 30, 50, 70, 90, 100% y una mezcla de alcohol-Xilol (1:1). Las muestras se sumergieron durante 30 min en cada alcohol. Luego, el material vegetal se infiltró con parafina fundida a $63 \text{ }^\circ\text{C}$, haciendo 2 cambios de parafina cada 30 min, y un último cambio donde el tejido permaneció toda la noche.

Los cortes histológicos se realizaron en dos micrótomos, uno de deslizamiento marca Leica y otro de rotación marca Reichert Jung a $6 \mu\text{m}$. La tinción se realizó con una batería de coloración a base de safranina y fastgreen. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico marca Leitz y las fotografías se tomaron con una cámara digital marca Celestron. Las muestras fueron observadas con un objetivo de 40x de aumento y un ocular de 10x. Se realizaron cortes en 3 plantas de cada tipo de material. El análisis se realizó mediante descripción comparativa entre los cortes de las plantas irradiadas y las no irradiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis tomográfico de los envases de cultivo (Figura 1) permitió establecer una metodología para la irradiación efectiva de los explantes. Se determinó que desde la base de los envases, y dada la ubicación general del material vegetal dentro de los mismos, el meristema caulinar se ubica a una distancia aproximada de 2 cm por

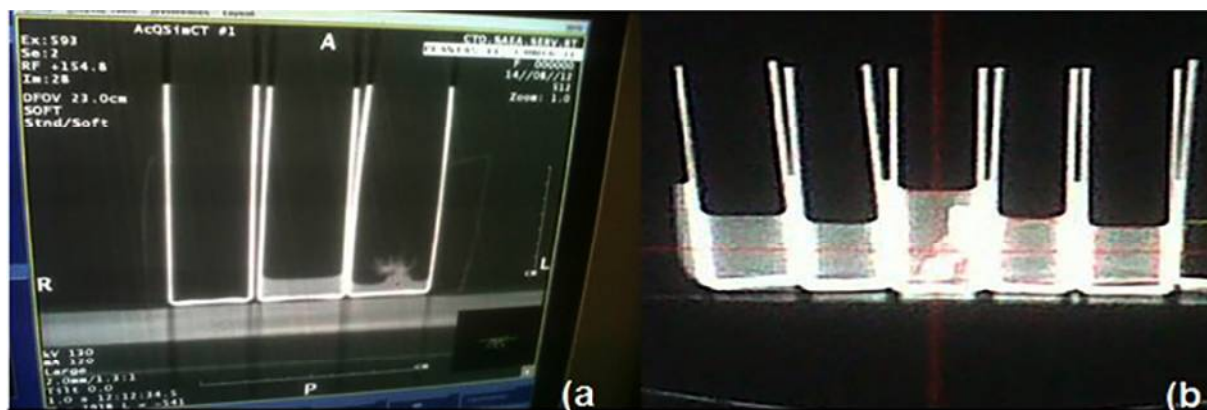


Figura 1. Diagramas tomográficos transversales de los recipientes a ser irradiados. a) De izquierda a derecha: el tubo vacío, tubo con medio de cultivo y el tubo con el material vegetal. b) Envases con 5 cm de líquido y una guía de focalización de la radiación colocada en el tubo central.

encima del borde inferior del recipiente. De igual manera, en virtud de la diferencia de tamaños de los brotes foliados, la irradiación se aplicó uniformemente en los primeros 5 cm, aplicados desde la parte inferior de los recipientes.

Los resultados de la dosimetría se presentan en el Cuadro 1. La selección se realizó de acuerdo a la DL50; el análisis de los datos mediante la prueba Shapiro y Wilk (1965) arrojó un valor $W= 0,91$; lo cual indica la distribución normal de los resultados. La prueba de Levene para homocedasticidad de la varianza produjo un valor de 0,87; lo cual prueba la homogeneidad de la misma. El Análisis de Varianza (Anavar) estableció diferencias significativas entre los tratamientos, por lo tanto las dosis empleadas fueron capaces de inducir efectos diferenciales en los tejidos.

Como puede observarse, los valores de supervivencia cercanos al 50% se orientan hacia la dosis de 30 Gy, lo cual coincide con Mishra *et al.* (2007) quienes utilizaron el mismo tipo de tejidos en *Musa* para la inducción de mutaciones. De igual modo, los resultados concuerdan con los obtenidos por Ali (2008) quien encontró que la dosis de 33,6 Gy fue la mejor para la inducción de mutaciones en *Musa* AAA. El autor reportó que el uso de irradiación con valores superiores a 40 Gy acarrea daños severos a los tejidos, ocasionando la muerte de

los explantes, lo que coincide con los resultados de la presente investigación.

Resultados similares también fueron reportados por Amorim *et al.* (2012) quienes lograron obtener mutantes de *Musa* AAB y AAAB utilizando radiaciones entre 20 y 30 Gy. Todos los resultados confirman la utilidad de las radiaciones ionizantes como herramientas ventajosas para el mejoramiento genético de musáceas. Debe tomarse en cuenta que la radiosensibilidad de los tejidos dependerá del tipo de tejido, del genotipo, del tipo de radiación, la intensidad de la misma y el tiempo de irradiación (Tulman, 1997).

Aun cuando se observó un porcentaje de supervivencia relativamente alto con la dosis de 45 Gy, los materiales que sobrevivieron presentaron una coloración verde clara y su tasa de crecimiento se vio seriamente reducida a pesar de mantenerse vivos los explantes. Esto pudiese indicar un posible efecto de latencia en el meristema de estos brotes, quizás producto del efecto directo de la irradiación. La tasa de multiplicación de las plantas se vio reducida a medida que se incrementaba la dosis de radiación, coincidiendo con los resultados encontrados por Pabón (2011) al inducir mutaciones en esquejes de *Passiflora edulis*.

La respuesta puede estar relacionada a daños parciales en el tejido meristemático,

Cuadro 1. Porcentaje de supervivencia en yemas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante cultivadas *in vitro*).

| Dosis (Gy) | Supervivencia (%) |
|------------|------------------------|
| 0 | 100±0.00 ^a |
| 15 | 92±10.95 ^a |
| 30 | 52±10.95 ^b |
| 45 | 32±17.89 ^{bc} |
| 60 | 20±14.14 ^c |
| 75 | 8±10.95 ^d |
| 90 | 0±0.00 ^e |
| 120 | 0±0.00 ^e |

Letras iguales indica la no existencia de diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Medias de Tukey a un nivel $\alpha=0,05$.

y la adaptación y posterior regeneración de estructuras dependerá de la radiosensibilidad de los tejidos, asociados a la capacidad interna de los mismos para recuperarse.

Lagoda (2012) estableció la hipótesis sobre el efecto iónico y químico que el tratamiento por irradiación podía tener sobre los tejidos. En este sentido, el efecto inicial iónico desencadenaría la formación de iones potencialmente tóxicos (p. ej. especies reactivas del oxígeno [ROS]) debido a las coaliciones entre las partículas atómicas del agente de irradiación y los átomos de los tejidos, complementándose con el efecto químico sobre las moléculas. Estos efectos están directamente relacionados con el tipo de radiación y su fuerza iónica o capacidad de impactar sobre los átomos de las células.

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos al analizar la radiosensibilidad de las yemas de *Musa* ante la incidencia de la radiación ionizante. Como se observa, hay una relación negativa entre el porcentaje de supervivencia y la dosis de irradiación. La tendencia es prácticamente lineal, ya que se tiene un coeficiente de determinación $R^2 = 0,87$; aun cuando las dosis por encima de 45 Gy presentan un efecto drástico negativo sobre la supervivencia de los brotes de *Musa in vitro*.

Kulkarniy *et al.* (2007) establecieron que la DL50 óptima para la inducción de mutaciones en yemas de *Musa* dependió del genotipo y se estimó alrededor de 30 Gy para *Musa* AAB y de 52 Gy para *Musa* AAA, recomendando el uso de un promedio de 40 Gy. En cualquiera de los genotipos, dosis por encima de 70 Gy resultaron completamente letales para los tejidos irradiados, coincidiendo con lo obtenido en el presente estudio. En el caso de suspensiones celulares, las dosis por encima de 40 Gy resultaron completamente letales, recomendándose el uso de 30 Gy como la dosis más efectiva para la inducción de mutaciones (Kulkarniy *et al.*, 2004).

A efectos de la fase masiva de irradiación, el valor seleccionado fue 30 Gy, donde los materiales que lograron sobrevivir presentaron tejidos de color verde intenso y lograron multiplicarse en condiciones *in vitro*.

El medio de selección se obtuvo mediante el cultivo *in vitro* de los brotes de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante en medios de cultivo con PEG 8000. La DL50 se obtuvo con la dosis de 2 g l^{-1} de PEG, equivalente a una concentración del 20%. Un efecto inhibitorio fue observado para la dosis de 40% de PEG sobre la morfología de las hojas, donde se notó un rápido necrosamiento de los bordes, especialmente en la zona apical (Figura 3). Con la concentración del 30% aún cuando el efecto fue menos pronunciado que

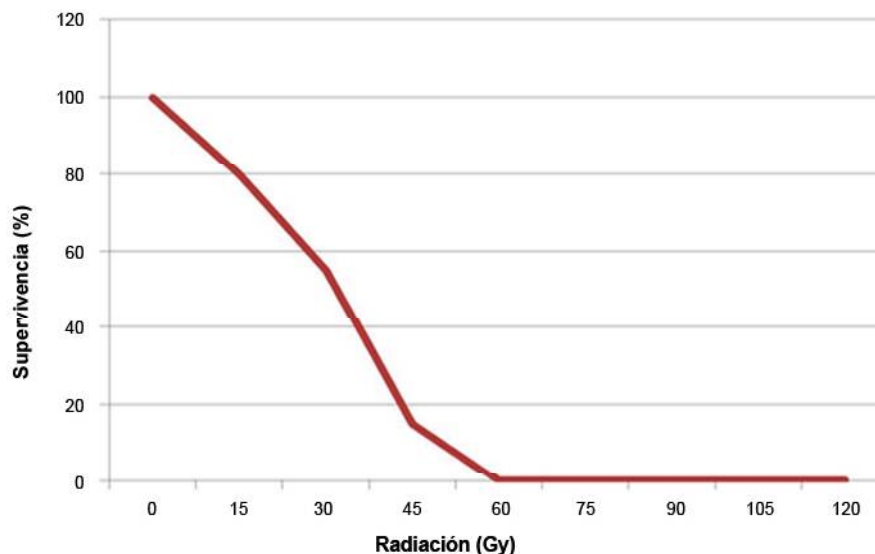


Figura 2. Porcentaje de supervivencia de yemas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) sometidas a diferentes dosis de radiación X (Gy).

con la concentración mayor, también se observó un necrosamiento de los márgenes foliares y de la zona apical pero comenzó a observarse el efecto de forma evidente a las 48 h de cultivo.

En el Cuadro 2, se presentan los resultados obtenidos para la supervivencia de los brotes foliados de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) creciendo en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de PEG para simular condiciones de estrés hídrico *in vitro*. Los datos se distribuyeron normalmente, comprobado con un índice $W=0,93$ en la prueba de Shapiro y Wilk (1965).

El análisis de varianza estableció diferencias significativas entre los tratamientos, por lo

cual la concentración de PEG causa efectos diferenciales en la supervivencia de los brotes foliados de *Musa* AAA. De igual modo, en el análisis de varianza no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las repeticiones, razón por la cual se consideraron confiables los resultados obtenidos para cada tratamiento.

Al analizar los cambios observados en la coloración del medio de cultivo, como respuesta al efecto del PEG 8000 sobre el desarrollo *in vitro* de yemas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) se evidenció que a medida que aumentó la concentración de PEG en el medio de cultivo, el proceso de oscurecimiento del



Figura 3. Explantes de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante creciendo en medios de cultivo con diferentes concentraciones de PEG 8000.

Cuadro 2. Efecto del Polietilén Glicol (PEG 8000) en la supervivencia de brotes foliados de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) cultivados *in vitro*.

| PEG (%) | % Supervivencia |
|---------|----------------------------|
| 0 | 100.00 ± 0.00 ^a |
| 10 | 92.00 ± 10.95 ^a |
| 20 | 52.00 ± 17.89 ^b |
| 30 | 28.00 ± 22.80 ^b |
| 40 | 00.00 ± 0.00 ^c |

Letras iguales significan que no hay diferencias estadísticamente significativas al aplicar la prueba de rango múltiples de Tukey ($\alpha=0,05$).

medio se incrementó. Esto implicó un mayor exudado de compuestos de naturaleza fenólica desde los tejidos, como mecanismo de defensa o de adaptación al estrés osmótico.

El medio de cultivo que contenía PEG a concentraciones iguales o superiores a 30% tomó coloraciones irreversibles desde las primeras 24 h de cultivo. En este sentido, los explantes estarían creciendo en medios con concentraciones cada vez mayores de compuestos fenólicos, los cuales, pasado un umbral crítico, se convierten en citotóxicos para el tejido.

En el Cuadro 3, se detallan los resultados de la irradiación masiva de las yemas en el presente estudio y la dinámica de multiplicación de las yemas a través de los diferentes pasos de la presente investigación. Inicialmente, se irradiaron 980 brotes foliados de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante. Los materiales fueron irradiados sumergidos en 5 ml de medio de cultivo diluido e inmediatamente posterior a la irradiación, se traspasaron a tubos de 40 x 120 mm, contenido de 10 ml del medio de multiplicación fresco. 900 explantes de los inicialmente irradiados lograron establecerse *in*

vitro y permanecer completamente verdes, sin zonas de oscurecimiento de los tejidos.

Estos materiales lograron reproducir nuevos brotes a una tasa promedio de 3,5 brotes por explante. Se notó inicialmente que algunos de los brotes irradiados, aún cuando permanecían vivos, no lograban regenerar nuevos brotes adventicios, razón por la cual se estimó que en este tipo de materiales, las zonas meristemáticas sufrieron alteraciones, que le impidieron el desarrollo de nuevos brotes, considerándose estos brotes vivos, pero en condición latente.

En la segunda fase de multiplicación, que correspondió a la progenie M1V1, se observó un efecto similar de latencia, pero en esta progenie los explantes inicialmente regenerados, tuvieron una reducción significativa de la tasa de multiplicación, donde apenas el 25% de los explantes logró producir al menos dos nuevos brotes en este ciclo. Esta condición redujo sustancialmente el número de brotes disponibles para la primera fase de selección, la cual se realizó sólo con 1000 brotes foliados.

La disminución de esta capacidad regenerativa es frecuente en los tejidos sometidos a irradiación (Pabón, 2011). Por otro lado, se debe

Cuadro. 3 Producción de explantes y porcentajes de supervivencias para las distintas progenies obtenidas en el presente estudio.

| | Material Inicial | Material Sobreviviente | % Supervivencia | Explantes Formados |
|---------------|------------------|------------------------|-----------------|--------------------|
| M1V0 | 980 | 900 | 91.84 | 2940 |
| M1V1 | 2940 | 2900 | 98.64 | 1000 |
| M1V2 | 1000 | 460 | 46.00 | 460 |
| M1V3 | 460 | 460 | 100.00 | 920 |
| M1V4 | 920 | 400 | 43.48 | 400 |
| M1V5 | 400 | 380 | 95.00 | 380 |
| M1V6 | 380 | 140 | 36.84 | 140 |
| Enraizamiento | 140 | 90 | 64.29 | 90 |
| Umbráculo | 90 | 50 | 55.56 | 50 |
| Prueba Sequia | 50 | 30 | 60.00 | 30 |
| Fisiología | 26 | 26 | 100.00 | 35 |

tomar en cuenta que al usar tejido meristemático, se incrementa la posibilidad de creación de quimeras (Robinson y Galán, 2011) por lo que es necesario tomar medidas para la eliminación o disociación de esas quimeras (Roux *et al.*, 2004). Al final del proceso de selección se trasplantaron al umbráculo 90 plantas, de las cuales sólo 50 lograron adaptarse a las condiciones de suelo. Se piensa que la adaptación de los materiales se vió afectada por la calidad del sistema radical regenerado *in vitro*, el cual puede ser el factor fundamental para que la planta pueda sobrevivir en las nuevas condiciones ambientales y de suelo.

Una vez establecidas las plantas en las condiciones de umbráculo, se suspendió el riego y se evaluó el comportamiento de las plantas provenientes de yemas irradiadas durante 15 días. En este lapso, el 40% de las plantas seleccionadas *in vitro* no lograron soportar las condiciones de sequía simuladas en el umbráculo, quedando al final de esta fase un total de 30 plantas, que mantuvieron su morfología y su coloración verde a pesar de la falta de suplencia de agua. Los explantes lograron desarrollar brotes nuevos en un período de 21 días. Con el paso del tiempo, el proceso de rebrotación pudo reducirse a 15 días. Se obtuvo un promedio de 3 yemas por explante, oscilando el valor entre 1 y 6 brotes como máximo.

Resultados similares fueron reportados para el cultivo *in vitro* de *Musa* AAA por Sierra y Shribu (2010) quienes obtuvieron una tasa de multiplicación promedio de 3 a 4 brotes por explante de *Musa* cultivado *in vitro*, al suplementar el medio de cultivo con BA a 3-4 mg l⁻¹. Los mejores resultados se obtuvieron con el uso de la hormona sola o en combinación con ácido indol acético (AIA) a razón de 0,2 mg l⁻¹.

Desde el punto de vista morfológico, las plantas de cambur regeneradas tanto a partir de yemas irradiadas como de yemas no irradiadas, se caracterizaron morfológicamente en condiciones de umbráculo, bajo riego. Las plantas fueron evaluadas tres meses posteriores a su siembra. Los resultados para el parámetro altura de la planta se presentan en el Cuadro 4.

Se comprobó la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro y Wilk (1965) arrojando un parámetro W=0,95; indicativo de la distribución normal de los datos. La prueba de Levene para homocedasticidad de las varianzas, basado en las medias muestrales, produjo un valor P= 0,35; lo cual indica la homogeneidad de las varianzas. Ambos tratamientos presentaron coeficientes de variación relativamente bajos, sugiriendo una homogeneidad alta entre los valores obtenidos para cada tipo de explante.

El análisis de varianza permitió establecer diferencias significativas entre las alturas de los dos tipos de plantas, esto indica que el material proveniente de yemas irradiadas presenta valores promedios de altura más altos que las plantas provenientes de yemas no irradiadas. Efectos similares sobre una mayor altura de plantas irradiadas fueron reportados por Álvarez *et al.* (2012) en el caso de tomate, los cuales se han relacionado con una estimulación en la producción de proteínas, especialmente al utilizar dosis bajas de irradiación (Ramírez *et al.*, 2006).

Debido a que las dos muestras eran de tamaño relativamente pequeño se decidió hacer la prueba T de Student (Student, 1908), utilizando la fórmula para muestras de igual tamaño y varianza similar. El valor de la prueba T calculada fue 4,39; se comparó con el valor tabulado para un $\alpha=0,05$ y 48 g l (t= 2,02) estableciéndose que las dos medias son

Cuadro 4. Altura (cm) de plantas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) regeneradas *in vitro* a partir de yemas axilares irradiadas y no irradiadas.

| Tipo de planta | Altura (cm) | Coefficiente de variación (%) |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Proveniente de yemas irradiadas | 23,99±3,45 ^{a*} | 14,39 |
| Proveniente de yemas no irradiadas | 20,27±2,42 ^{b*} | 12,92 |

diferentes y que efectivamente el valor de altura de las plantas provenientes de yemas irradiadas es estadísticamente superior al de las plantas no irradiadas. El efecto estimulante de dosis bajas de irradiación puede estar relacionado con la activación de sistemas isoenzimáticos que inducen la formación de sustancias fisiológicamente activas, incentivando tanto la división celular como procesos morfogénicos (Chen *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2013).

Para el caso de *Musa*, los trabajos realizados con mutantes han señalado un mayor crecimiento de las plantas testigo al compararlas con el crecimiento de las provenientes de yemas irradiadas (Bermúdez *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2003); sin embargo, los trabajos mencionados se han realizado sobre materiales de *Musa* AAB y *Musa* AAAB, ambos creciendo en condiciones de campo. En este sentido, tanto el efecto del genotipo, como la medición una vez establecidas las plantas en campo pueden tener efecto sobre la tendencia encontrada en el crecimiento de las plantas.

El estudio del grosor del pseudotallo entre los dos tipos de plantas permitió obtener los resultados que se muestran en el Cuadro 5. Como puede apreciarse, este parámetro establece que existen diferencias significativas entre los dos tipos de plantas, y que las plantas mutantes presentaron un grosor mayor que las plantas no irradiadas. Del mismo modo, al analizar el coeficiente de variación, se observa que hay una mayor variabilidad entre los materiales provenientes de plantas irradiadas, lo que significa que la distribución de valores para el diámetro del pseudotallo es más heterogénea en este tipo de plantas.

El análisis de distribución normal entre los datos, produjo un coeficiente $W=0,98$ de

acuerdo a la prueba de Shapiro y Wilk (1965), lo que establece la distribución normal de los resultados. La prueba de Levene, arroja un valor de $P=0,19$ basado en el análisis de las medias, estableciendo que para un nivel $\alpha=0,05$ las varianzas de ambas poblaciones pueden considerarse homogéneas, comprobándose los supuestos necesarios para realizar el análisis de la varianza. El análisis de varianza reportó un valor F con una $P=3,7 \times 10^{-7}$, por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y puede considerarse que las plantas mutantes son de mayor grosor. Al realizar la prueba T de Student (1908) se obtiene un valor de prueba T calculado de 3,63; el cual es mayor que el valor tabulado para $\alpha=0,01$ y 48 g l ($t= 2,4066$), corroborando la diferencia entre las medias obtenidas para el parámetro medido y confirmando la superioridad estadística de la media obtenida para el diámetro de las plantas mutantes.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Mudibu *et al.* (2012) quienes reportaron la disminución de parámetros morfométricos en mutantes de soya (*Glycine max* L.) al utilizar dosis bajas de irradiación. Del mismo modo, para el caso de *Musa*, Amorim *et al.* (2012) reportaron una disminución en los valores morfométricos de las plantas mutantes, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los mutantes y las plantas normales, a favor de estas últimas. Sin embargo, los mutantes producidos presentaron una mayor productividad y resultaron ser más precoces.

Es posible que el efecto de la irradiación sobre algunos parámetros morfométricos esté relacionado con el genotipo. En este sentido, Bidabadi *et al.* (2012) encontraron que las plantas mutantes de *Musa* presentaron mayor vigor

Cuadro 5. Diámetro del pseudotallo (cm) de plantas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) regeneradas *in vitro* a partir de yemas axilares irradiadas y no irradiadas.

| Tipo de planta | Diámetro (cm) | Coefficiente de variación (%) |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Proveniente de yemas irradiadas | 1,93±0,19 ^{a*} | 9,79 |
| Proveniente de yemas no irradiadas | 1,65±0,15 ^b | 9,00 |

*Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras según la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0,01$).

que las plantas normales y este mayor vigor ha caracterizado a los materiales tolerantes a sequía (Gopal *et al.*, 2008).

La morfología foliar fue otro parámetro examinado entre los dos grupos de plantas analizadas. Se encontró una variedad de formas de hojas entre las plantas provenientes de yemas irradiadas que presentaron además de la morfología típica de una hoja de musáceas (Figura 4a), hojas lanceoladas (Figura 4b) y hojas más elípticas (Figura 4c). De igual modo, se obtuvieron hojas con bordes lisos y hojas con bordes ondulados (Figura 4d). Las alteraciones en la morfología foliar han sido reportadas como uno de los cambios más frecuentes en el fenotipo de mutantes. Nomura *et al.* (2005) reportaron cambios en la morfología de las hojas en mutantes de tomate. En este sentido, Robles (1999) demostró que las alteraciones en la morfología foliar encontrada en *Arabidopsis thaliana* respondía a expresiones de genes directamente responsables de mecanismos de formación de las hojas.

Las diferentes modificaciones encontradas en los materiales seleccionados estuvieron posiblemente relacionadas con desrepresiones y expresiones ectópicas de genes, asociadas a la expresión constitutiva de mecanismos de defensa y a controles polares, tanto de la división como del crecimiento celular. Se han identificado 91 genes relacionados directamente con la formación de las hojas. En consecuencia es importante señalar que Kavaz *et al.* (2006) demostraron que la respuesta de tolerancia a sequía estaba estrechamente relacionada con la morfología y fisiología foliar, más que con la radical.

El análisis del área foliar se presenta en el Cuadro 6. El análisis de normalidad reveló que los datos se ajustaron a una distribución normal ($W=0,98$) (Shapiro y Wilk, 1965). De igual modo la prueba de Levene arrojó un valor $P=0,19$ basado en las medias aritméticas, lo cual demostró la igualdad de las varianzas. La distribución de los residuos siguió una tendencia positiva representada por una línea recta, con igual repartimiento de los



Figura 4. Morfología foliar de plantas de *Musa* AAA cv. Pineo Gigante regeneradas *in vitro* a partir de yemas irradiadas. a) plantas con morfología foliar normal. b) hojas lanceoladas, c) hojas elípticas y d) hojas con bordes lisos y bordes ondulados.

Cuadro 6. Área foliar (cm²) de plantas de cambur (*Musa* AAA cv. Pineo Gigante) regeneradas *in vitro* a partir de yemas axilares irradiadas y no irradiadas.

| Tipo de planta | Área foliar (cm ²) | Coefficiente de variación (%) |
|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Proveniente de yemas irradiadas | 231,87±53,1 ^{a*} | 22,91 |
| Proveniente de yemas no irradiadas | 161,03±37,0 ^b | 23,03 |

*Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras según la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha=0,01$).

mismos, corroborando esto la independencia de los errores. El análisis de varianza estableció diferencias entre los dos grupos de plantas evaluadas, con un valor P asociado al estimador F de $1,61 \times 10^{-6}$; indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de plantas estudiadas.

Desde el punto de vista del área foliar, las hojas de las plantas mutantes presentan, en promedio, mayor superficie que las hojas de las plantas normales. El coeficiente de variación establece que hay una mayor heterogeneidad de áreas foliares entre las plantas normales que el rango encontrado entre las plantas provenientes de yemas irradiadas, a pesar de tener valores más altos y tener una mayor desviación estándar.

Mayor área foliar en los mutantes, comparados con el área foliar del genotipo normal, también fue señalado por Rodríguez *et al.* (1996) en el caso de frijol. Gianoli (2004) estableció que las plantas producían fenotipos diferentes en respuesta a cambios ambientales, lo que se conoce como plasticidad fenotípica.

Estas modificaciones morfofisiológicas, representan un proceso de adaptación donde generalmente hay la selección de genes responsables del nuevo comportamiento. Loveys *et al.* (2002) establecieron que las condiciones ambientales influían sobre los procesos metabólicos que contribuían a la biosíntesis, mantenimiento y crecimiento celular. De acuerdo a su plasticidad fenotípica se expresarán atributos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos diferentes (Atkin *et al.*, 2006), lo que explicaría las diversidades de formas y tamaños encontradas en cada grupo de plantas analizadas en el presente trabajo.

De igual modo, la menor área foliar en las plantas normales podría indicar un mecanismo

adaptativo ante la falta de agua, mientras que las plantas mutantes parecen mantener sus patrones de crecimiento foliar, sin percibir el estímulo del estrés hídrico como un factor de inducción de cambio morfológico en las hojas.

Por otro lado, Lin *et al.* (2012) reportaron la influencia de genes regulados por altas temperaturas sobre el proceso de morfogénesis foliar. Los procesos relacionados con las altas temperaturas, están altamente correlacionados con los efectos del déficit hídrico, y es posible que procesos transcripcionales diferentes entre las plantas susceptibles y las tolerantes se desencadenen para la formación del área foliar.

El análisis anatómico de las hojas permitió establecer diferencias significativas entre los dos tipos de plantas analizadas. Los cortes histológicos transversales del tejido foliar se presentan en la Figura 5. Puede observarse que ambos tipos de plantas presentan en sus mesófilos un parénquima en empalizada uniestratificado.

En los tejidos de plantas provenientes de yemas irradiadas, las células de este tejido parecen estar más compactas que en el caso de los tejidos presentes en el mesófilo de las plantas provenientes de yemas no irradiadas. El parénquima en empalizada de las plantas irradiadas se observó de una coloración verde más intensa, quizás por la presencia de un mayor número de cloroplastos en estos tejidos.

Sin embargo, la principal diferencia observada entre los dos tipos de hojas analizadas, se hace más evidente en la organización del parénquima esponjoso. El mesófilo de las hojas de las plantas irradiadas presenta un parénquima esponjoso más denso que el de las plantas no irradiadas. Existe una aparente mayor cantidad de cloroplastos en las plantas irradiadas y las

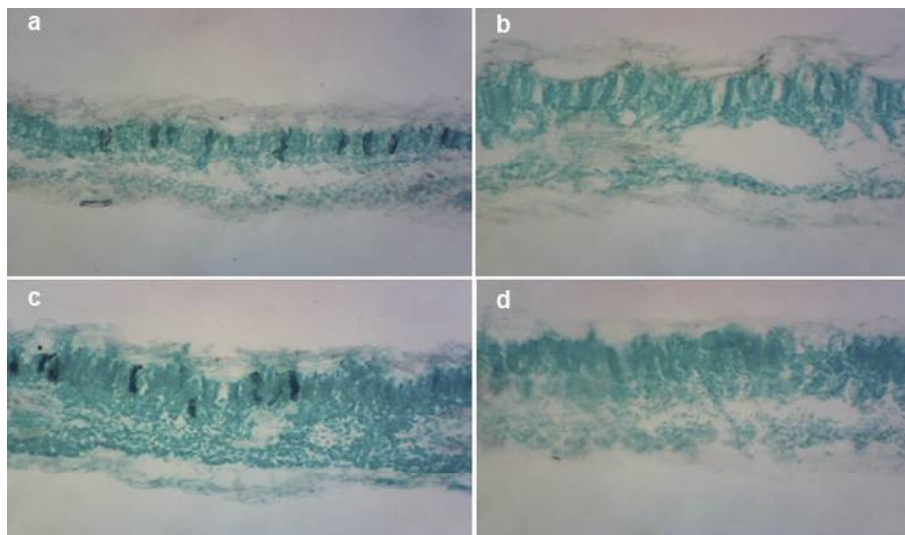


Figura 5. Cortes histológicos transversales de tejido foliar de plantas de *Musa* AAA cv. Píneo Gigante. a) y c) plantas provenientes de yemas irradiadas, b) y d) plantas provenientes de yemas no irradiadas.

células se presentan organizadas de modo más compacto, que en los tejidos de las hojas normales.

Estos resultados son opuestos a los encontrados por González (2007) en *Arabidopsis thaliana*, donde el mesófilo de las plantas mutantes era menos denso que el de las plantas normales. Sin embargo, ambos trabajos coinciden en que la epidermis de las hojas, tanto de las plantas mutantes como la de las normales, presentan el mismo tipo de estructura, tamaño de células y organización. El mantenimiento de las características estructurales de la epidermis ha sido característico en plantas de sombra, siendo más frecuentes los cambios en plantas heliófitas (Lima *et al.*, 2006).

De igual modo, no se encuentra diferencia en cuanto al espesor de las capas de parénquima, especialmente en el parénquima en empalizada. Estos resultados concuerdan con los reportados por Cabral de Melo *et al.* (2011) para mutantes de tomate, quienes resaltan la relación del espesor de los tejidos con el contenido de fotorreceptores en los mismos, especialmente de los fitocromos. En este sentido, establecen además que el espesor de los tejidos puede ser menos reducido, si las plantas crecen en condiciones de baja intensidad de irradiación.

CONCLUSIONES

Se calibró una metodología para la inducción de mutaciones *in vitro* en *Musa* AAA utilizando radiaciones ionizantes, estableciéndose que para el caso de yemas cultivadas *in vitro*, la dosis de irradiación debía ser de 30 Gy, lo cual correspondió a la DL50. La selección de materiales tolerantes en condiciones *in vitro* debe realizarse en medios de cultivo suplementados con 20% de PEG (PM= 8000), lo cual corresponde a la DL50.

Se produjo *in vitro* la progenie M1V6, la cual permitió identificar 26 individuos con respuesta de tolerancia a condiciones simuladas de estrés hídrico, tanto *in vitro* como en condiciones de umbráculo. Los materiales regenerados a partir de yemas irradiadas presentaron mayor vigor, altura, diámetro de tallo y área foliar que los materiales regenerados a partir de yemas no irradiadas.

Desde el punto de vista anatómico, las plantas regeneradas a partir de yemas irradiadas presentaron una mayor densidad de cloroplastos, así como una mejor estructuración del parénquima esponjoso. No se encontraron diferencias anatómicas en el parénquima en empalizada, el cual presentó la misma distribución de células. Por lo tanto, las radiaciones ionizantes resultaron efectivas

en la inducción de cambios en *Musa* AAA cv. Pineo Gigante para el desarrollo de genotipos con tolerancia potencial a condiciones de estrés hídrico.

LITERATURA CITADA

- Akinro, A. O.; A. A. Olufayo and P. G. Oguntunde. 2012. Crop Water Productivity of Plantain (*Musa* sp.) in a Humid Tropical Environment. *Journal of Engineering Science and Technology Review*. 5(1):19-25.
- Alfaro, F. 2013. Aislamiento y cuantificación de bacterias epifitas del filoplano de banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine) y selección de cepas quitinolíticas y glucanolíticas como potenciales antagonistas de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra. Doctoral dissertation, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 120 p.
- Ali, M. A. 2008. Optimal dose rate of gamma irradiation and EMS concentration for mutation induction on shoot tip of Banana cv. Grand Nain. *Proceedings of the 38th meeting of the NCHC*. ARC Sudan. 228-233.
- Álvarez, A.; L. Chávez-Suárez; R. Ramírez; R. Pompa y W. Estrada. 2012. Indicadores fisiológicos en plántulas de *Solanum lycopersicum* L., procedentes de semillas irradiadas con rayos X. *Biotecnología Vegetal*. 12(3):173-177.
- Álvarez, A.; L. Chávez-Suárez; R. Ramírez; R. Pompa; W. Estrada; Y. Estrada y A. Maldonado. 2013. Efecto del tratamiento de semillas con bajas dosis de rayos X en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Nucleus*. 53:14-18.
- Amorim, E. P.; R. K. N. Pestana; S. De Oliveira e A. Tullman-Neto. 2012. Caracterização agrônômica de mutantes de bananeira obtidos por meio da radiação gama. *Bragantia*, Campinas. 71(1):8-14.
- Atkin, O. K.; B. R. Loveys; L. J. Atkinson and T. L. Pons. 2006. Phenotypic plasticity and growth temperature: understanding interspecific variability. *J. Exp. Bot.* 57:267-281.
- Bermúdez, I.; P. Orellana; J. Pérez Ponce; J. Clavero; N. Veitia; C. Romero; R. Mujica y L. García. 2000. Mejoramiento del clon híbrido FHIA 21 con el uso de la mutagénesis *in vitro*. *Info Musa*. 9(1):16-19.
- Bidabadi, S. S.; S. Meon; Z. Wahab; S. Subramaniam and M. Mahmood. 2012. *in vitro* selection and characterization of water stress tolerant lines among ethyl methanesulphonate (EMS) induced variants of banana (*Musa* spp., with AAA genome). *Aust. Jour. Crop. Sci.* 6(3):567-575.
- Cabral de Melo, H.; M. E. De Castro; E. Alves y F. J. Perina. 2011. Anatomia foliar de Microtomateiros Fitocromo-Mutantes e Ultra-Estrutura de Cloroplastos. *Ciênc. Agrotec., Lavras*. 35(1):11-18.
- Chaves, M. and B. Davies. 2010. Drought effects and water use efficiency: improving crop production in dry environments. *Functional Plant Biology* 37: 3-6.
- Chen, Y. P.; Y.J. Liu; X. L. Wang; Z. Y. Ren and M. Yue. 2005. Effect of microwave and He-Ne laser on enzyme activity and biophoton emission of *Isatis indigotica*. *J. Integrat. Plant. Biol.* 47(7):849-855
- Conde-Álvarez, C. y S. Saldaña-Zorrilla. 2007. Cambio climático en América Latina y el Caribe: Impactos, vulnerabilidad y adaptación. *Revista Ambiente y Desarrollo de Centro de Investigación y Planificación del Medio Ambiente (CIPMA)*. 23(2):23-30.
- Damour, G.; H. Ozier-Lafontaine and M. Dorei. 2012. Simulation of the growth of banana (*Musa* spp.) cultivated on cover-crop with simplified indicators of soil water and nitrogen availability and integrated plant traits. *Field Crops Research*. 130:99-108.
- Gianoli, E. 2004. Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. **En:** Fisiología ecológica en plantas: mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas. Editor Hernán Marino Cabrera. Euv. Valparaíso, Chile. pp. 13-25.
- Giap, D. D.; P. N. Vinh; T. T. Tuan; N. T. H. Trang; P. N. A. Thu and T. X. Du. 2012. High-frequency shoot multiplication of laba banana (*Musa* sp.) cultured *in vitro*

- byusing light, myo-inositol and adenin sulphate. Vietnam Academy of Science and Technology. 34:(3)180-187.
- González, R. 2007. Caracterización genética y molecular de los genes RE e ICU2 de *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral presentada ante la Universidad Miguel Hernández. Elche, España. 151 p.
- Gopal, J.; K. Iwama; Y. Jitsuyama. 2008. Effect of water stress mediated through agar on *in vitro* growth of potato. *In vitro* Cell Dev Biol Plant. 44:221-228.
- Izquierdo, H.; D. M. Núñez; M. C. González and R. Proenza. 2012. Effects of applying of brassinosteroids analog spirostanoic in banana (*Musa* spp.) *in vitro* plants during acclimatization phase. *Cultivos Tropicales*. 33(1):71-76.
- Jain, S. M. 2010. *In vitro* mutagenesis in banana (*Musa* spp.) Improvement. *Acta Hort.* (ISHS). 879:605-614.
- Kavas, M.; G. Kalemantas; U. C. Ackay; A. T. Bayrak; E. Ozgur; C. Baloglu; O. Ercan; M. Yucel and H. A. Oktem. 2006. Effect on drought stress on the antioxidant system of two sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars. Proceedings of the symposium on Stress and plant biology. Integrating hierarchical levels of biological organization. 24th annual meeting ESCPB. Antwerp. 20 p.
- Kulkarni, V.; T. Ganapathi; P. Suprasanna and V. Bapat. 2007. *In vitro* Mutagenesis in Banana (*Musa* spp.) using Gamma Irradiation. In: Protocols for micropropagation of woody trees and fruits, Part 3, Jain and Haggman Eds. Springer, Dodrecht, The Netherlands. pp. 543-559.
- Kulkarni, V. M.; T. R. Ganapathi; V. A. Bapat and P. S. Rao. 2004. Establishment of cell-suspension cultures in banana cv. Grand Naine and evaluation of its sensitivity to gamma-irradiation. *Curr. Sci.* 86:902-904.
- Lagoda, P. J. L. 2012. Effects of radiation on living cells and plants. In: Plant Mutation Breeding and Biotechnology. Shu, Q. Y.; B. P. Orster and H. Nakagawa, Eds. Ediciones IAEA. Viena. pp. 123-134.
- Lima, E. C.; A. A. Alvarenga; E. M. Castro; C. V. Vieira e J. P. R. A. D. Barbosa. 2006. Aspectos fisioanatômicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. Submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Revista Árvore*, Viçosa. 30:33-41.
- Lin, L.; S.-H. Zhong; X. F. Cui; J. Li; Z.-H. He. 2012. Characterization of temperature-sensitive mutants reveals a role for receptor-like kinase SCRAMBLED/STRUBBELIG in coordinating cell proliferation and differentiation during *Arabidopsis* leaf development. *The Plant Journal*. 72(5):707-720.
- Loveys, B. R.; I. Scheurwater, T. L. Pons; A. H. Fitter and O. K. Atkin. 2002. Growth temperature influences the underlying components of relative growth rate: an investigation using inherently fast- and slow growing plant species. *Plant Cell Environ.* 25:975-987.
- Mishra, P. J.; P. Suprasanna and V. A. Bapat. 2007. Effect of Single and Recurrent Gamma Irradiation on *in vitro* Shoot Cultures of Banana. *International Journal of Fruit Science*. 7(1):47-57.
- Mudibu, J.; K. K. C. Nkongolo; A. Kalonji-Mbuyi and R. B. Kizungu. 2012. Effect of Gamma Irradiation on Morpho-Agronomic Characteristics of Soybeans (*Glycine max* L.). *American Journal of Plant Sciences*. 3:331-337.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for the rapidgrowth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.* 5:473-497.
- Narasimhan, B. and R. Srinivasan. 2005. Development and evaluation of Soil Moisture Deficit Index (SMDI) and Evapotranspiration Deficit Index (ETDI) for agricultural drought monitoring. *Agric. For. Meteorol.* 133:69-88.
- Nomura, T.; T. Kushiro; T. Yokota; Y. Kamiya; G. J. Bishop and S. Yamaguchi. 2005. The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P-450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis*. *J BiolChem.* 280:17873-17879.

- Pabón, L. A. 2011. Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de *Passiflora edulis* var *edulis*. Trabajo de investigación para optar al grado de Maestría en ciencias en biología-línea genética, presentado ante la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 105 p.
- Pestana, R. K. N.; E. P. Amorim; C. F. Ferreira.; V. B. O. Amorim; L. S. Oliveira; C. A. S. Ledo and S. O. Silva. 2011. Genetic dissimilarity of putative gamma-ray-induced 'Preciosa-AAAB-Pome type' banana (*Musa* sp.) mutants based on multivariate statistical analysis. *Genetics and molecular research*. 10(4):3976-3986.
- Quiring, M. S. and T. N. Papakryiakou. 2003. An evaluation of agricultural drought indices for the Canadian prairies. *Agric. For. Meteorol.* 118:49-62.
- Ramírez, R.; L. M. González; Y. Camejo; Y. Fernández y N. Zaldívar. 2006 Estudio de radiosensibilidad y selección de rango de dosis estimulantes de rayos X, en cuatro variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales*. 27(1):63-67.
- Robinson, J. C. y V. Galan. 2011. Plátanos y bananas. 2da Edición. Ediciones Mundiprensa C.A. Madrid. 321 p.
- Robles, P. 1999. Análisis genético de mutantes de *Arabidopsis thaliana* con alteraciones en la morfología de la hoja. Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández. Alicante, España. 160 p.
- Rodríguez, N.; L. Mora; M. Marín; D. Esparza y A. Del Villar. 1996. Análisis del desarrollo foliar del cultivo del frijol (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) variedad ojo negro y tres de sus mutantes en los alrededores de Maracaibo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 13:521-531.
- Roth, I. 1964. Microtecnia vegetal. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Imprenta Universitaria. Caracas. 88 p.
- Roux, N. S.; A. Toloza; J. Dolezel and B. Panis. 2004. Usefulness of embryogenic cell suspension cultures for the induction and selection of mutants in *Musa* spp. Ed. Jain, S. M.; R. Swennen; Leuven, Belgium. 382 p.
- Roux, N.; A. Toloza; Z. Radecki; F. J. Zapata-Arias and J. Dolezel. 2003. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Rep.* 21:483-490.
- Schaper, M.; E. Gitli; E. Villalobos; S. Rodríguez; N. Mateo; N. Martín y A. Garduño. 2000. Impactos ambientales de los cambios en la estructura exportadora en nueve países de América Latina y el Caribe. Publicaciones CEPAL P01: 123, Santiago de Chile (Chile). pp. 1980-1995.
- Shapiro, S. S. and M. B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 52(3-4):591-611.
- Sierra, Y. M. y S. Shribru. 2010. Efecto de la benciladenina y el ácido indolacético en la propagación *in vitro* de bananos (*Musa* spp. AAA). *Hombre, ciencia y tecnología*. 55:167.
- Student. 1908. The Anp probable error of a mean, *Biometrika*. 6(1):1-25.
- Tomekpe, K.; C. Jenny y J. V. Escalant. 2004. Mejoramiento genético, análisis de las estrategias de mejoramiento convencional de *Musa*. *Info Musa*. 13(2):1-6.
- Tulmann, N. A. 1997. Mutaciones en el mejoramiento de plantas de propagación sexual. Curso Internacional de Mutaciones Inducidas en el Mejoramiento de las Plantas, Monagas, Venezuela. 7 p.
- Wilhite, D. A. 2000. Drought as a natural hazard. In: *Drought: A Global Assessment*. Wilhite, D. A. (ed). Routledge Publishers, London, UK. pp. 3-18.
- Wu, H.; K. G. Hubbard and D. A. Wilhite. 2004. An agricultural drought risk assessment model for corn and soybeans. *Int. J. Climatol.* 24:723-741.