

## Respuesta *in vitro* de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'Ica Pijao' irradiadas con diferentes dosis de radiación Gamma

Amanda Martirena-Ramírez\*, Novisel Veitía, Lourdes R. García, Raúl Collado, Damaris Torres, Leonardo Rivero, Miriam Ramírez-López \*Autora para correspondencia

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

### RESUMEN

La disminución de los rendimientos en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) a nivel mundial es debida principalmente a factores abióticos. Es por ello, que la búsqueda de variedades tolerantes constituye uno de los objetivos de los programas de mejoramiento genético en esta especie. El empleo de la mutagénesis unido a la variación somaclonal, constituye una herramienta para incrementar la variabilidad genética en el cultivo. El objetivo del presente trabajo fue determinar la respuesta *in vitro* de semillas de frijol común cultivar 'Ica Pijao' expuesto a diferentes dosis de radiación Gamma. Las dosis estudiadas fueron: 0, 80, 90, 100, 200, 300 y 400Gy. Se evaluó la germinación *in vitro* de las semillas. En la formación y multiplicación de callos, se determinó la masa fresca (g) a los 21, 42 y 63 días de cultivo. Se logró el 100% de germinación de las semillas con las dosis de radiaciones estudiadas. Sin embargo, se observaron afectaciones en la formación de callos, ya que con las dosis de 300 y 400Gy no se logró su formación. Con 80 y 90Gy se alcanzaron valores superiores de masa fresca con diferencias significativas con las dosis de 100 y 200 Gy. La regeneración de plantas se afectó, y se formaron pequeños brotes con las dosis de 80, 90, 100 y 200Gy. Los resultados mostraron que para la variedad 'Ica Pijao' dosis superiores a 90 Gy, comprometen la formación y multiplicación de callos, así como la regeneración de plantas.

Palabras clave: callo, mutaciones *in vitro*, mejoramiento genético, frijol, radiosensibilidad, variabilidad

## *In vitro* response of *Phaseolus vulgaris* L. seeds cultivar 'Ica Pijao' irradiated with different doses of Gamma radiation

### ABSTRACT

The lower yields in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) worldwide is due primarily to abiotic factors. For this reason the search for tolerant varieties is one of the objectives of the breeding programs in this species. The use of mutagenesis joined with somaclonal variation, it is a tool to increase the genetic variability in the crop. The objective of this work was to determine the *in vitro* response of common bean seeds cultivar 'Ica Pijao' exposed to different doses of Gamma radiation. The doses tested were 0, 80, 90, 100, 200, 300 and 400 Gy. It assessed the *in vitro* seed germination. In the callus formation and proliferation, we determined the fresh weight (g) at 21, 42 and 63 days of culture. 100% of seed germination was achieved with radiation doses studied. However, it were observed damages in callus formation with doses of 300 and 400 Gy. With 80 and 90Gy, higher values of fresh mass it were reached, with significant differences with doses of 100 and 200 Gy. Plants regeneration was affected and with doses of 80, 90, 100 and 200Gy young shoots were formed. The results showed that for the variety 'Ica Pijao' doses above 90 Gy, undertake callus formation and multiplication, as well as plant regeneration.

Keywords: beans, breeding, callus, *in vitro* mutations, radiosensitivity, variability

### INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es ampliamente consumido en todo el mundo. Se considera como la segunda fuente de proteína en África oriental y meridional, y la cuarta en América (Romero *et al.*, 2013). La producción de esta leguminosa, es más del doble que la

de garbanzos (*Cicer arietinum* L.), que es la segunda de las leguminosas de grano más importante en el mundo. Sin embargo, varios factores abióticos como el estrés hídrico, provoca una reducción en la producción de vainas por plantas, como resultado de la deficiencia de agua y el aborto subsiguiente de los órganos reproductivos (Campos *et al.*,

2011). Es por ello, que se hace necesario el desarrollo de investigaciones encaminadas a la obtención de nuevas variedades tolerantes a la sequía, que contribuyan al incremento de la producción de este cultivo.

La obtención de cultivares resistentes o tolerantes a través del cruzamiento tradicional en esta especie resulta difícil, debido a que el frijol común es un diploide ( $2n = 2x = 22$ ), por tanto presenta una base genética estrecha y muy estable (Mc Clean *et al.*, 2008). En este contexto, las técnicas biotecnológicas constituyen vías alternativas que pueden complementar satisfactoriamente los métodos convencionales.

La mutagénesis constituye una herramienta importante en el mejoramiento genético de los cultivos, ampliamente utilizada para generar variación genética y nuevas variedades de las plantas cultivadas. Además, está libre de las restricciones y regulaciones impuestas a los organismos genéticamente modificados (Parry *et al.*, 2009).

Los avances en cuanto al empleo de mutágenos físicos en comparación con los mutágenos químicos, están dados por la suficiente reproducibilidad de estos métodos. Las radiaciones ionizantes, en particular las radiaciones Gamma, presentan una penetración elevada y uniforme en el tejido vegetal, además, han proporcionado un gran número de mutantes útiles y continúan mostrando un elevado potencial para la mejora genética de diferentes especies de plantas. En este sentido, la combinación entre las técnicas de inducción de mutaciones y de cultivo *in vitro*, ofrece ventajas que incluyen la separación quimeras, incrementar la variabilidad, así como la eficiencia en la selección y la multiplicación rápida de nuevos genotipos (Predieri, 2001).

Según Collado *et al.* (2013), en *P. vulgaris* se han desarrollado protocolos de regeneración de plantas vía organogénesis directa e indirecta. Lo anterior, unido al empleo de radiaciones Gamma y el aprovechamiento de la variación somaclonal, permitiría incrementar la variabilidad genética en las poblaciones de este cultivo, por lo que se elevarían las probabilidades de obtener plantas con mayor tolerancia a estrés hídrico.

En la literatura científica se refiere un número reducido de trabajos donde se ha estudiado el efecto *in vitro* de las radiaciones Gamma en *P. vulgaris* (Bajaj *et al.*, 1970; Carneiro *et al.*, 1987). Sin embargo, se justifica el desarrollo de técnicas que permitan incrementos en la variabilidad genética de esta especie, como la mutagénesis causada por la exposición de tejidos vivos (semillas, callos, brotes) a la combinación de cultivo *in vitro* y radiaciones Gamma, que generen alteraciones en el material vegetal que podrían ser seleccionados en programas de mejoramiento genético.

En Cuba, se ha utilizado la inducción de mutaciones *ex vitro* en semillas de algunas variedades de leguminosas, como es el caso de la cultivar de soya Cubasoy-23, para la obtención de genotipos mejorados a condiciones ambientales adversas (Fe *et al.*, 2000). En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), también se han desarrollado investigaciones con los objetivos de evaluar germoplasma mutado y natural de frijol; establecer protocolos experimentales para estudios fisiológicos y morfológicos; así como la selección participativa de genotipos de altos rendimiento en condiciones de déficit hídrico (Miranda *et al.*, 2007). No obstante, estos trabajos no consideran el empleo del cultivo de tejidos como fuente de inducción de variabilidad genética en esta especie. De acuerdo con lo planteado anteriormente, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la respuesta *in vitro* de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'Ica Pijao' irradiadas con diferentes dosis de radiación Gamma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Se utilizaron semillas maduras de *P. vulgaris* cultivar 'Ica Pijao' cosechadas en una casa de cultivo, en el Instituto de Biotecnología de las Plantas.

### *Tratamiento mutagénico*

Las semillas se trataron en un irradiador MPX-25, con una potencia de dosis de 11.3 Gy min<sup>-1</sup>. Este se ubica en el Centro de

Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear de La Habana, Cuba (CEADEN). Se aplicaron diferentes dosis de radiación con el empleo de la fuente ( $^{60}\text{Co}$ ): 80, 90, 100, 200, 300 y 400 Gy. Como control se utilizaron semillas sin irradiar.

#### Cultivo in vitro

Una vez aplicado el tratamiento mutagénico, se procedió a la desinfección de las semillas según el protocolo propuesto por Dillen *et al.* (1997). Las semillas desinfectadas, se colocaron en un medio de cultivo de germinación que contiene las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS) 100%, 1 ml l<sup>-1</sup> de tiamina, 1.13 mg l<sup>-1</sup> de 6- Bencilaminopurina (6- BAP), 45 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 2.5 g l<sup>-1</sup> de phytigel a pH de 5.7. El material vegetal se mantuvo por tres días a 25 ± 2°C en oscuridad total.

A las semillas germinadas se les separó la testa y un cotiledón, se realizó un corte debajo del nudo cotiledonal para eliminar el hipocotilo y otro por encima de este para excluir el epicotilo, el nudo cotiledonal con un cotiledón (NC-1), se utilizó como explante.

Los explantes fueron colocados en un medio de cultivo para la formación de callos (MFC), que contiene las sales MS complementado con vitaminas B<sub>5</sub> (Gamborg *et al.*, 1968), 2.0 mg l<sup>-1</sup> de tiazuron (TDZ), 0.05 mg l<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), 3.0 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 6.0 g l<sup>-1</sup> de agar (Duchefa) (pH 5.7). El material vegetal se mantuvo a 25±2°C en la oscuridad durante siete días.

Concluido este período los explantes fueron transferidos a una cámara de cultivo, con fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad por 14 días. Los callos obtenidos se colocaron en medio de cultivo de multiplicación de callos (sales MS 100%, Vitaminas B<sub>5</sub>, 0.05m g l<sup>-1</sup> de AIA, 2% de sacarosa, 6.0 g l<sup>-1</sup> de agar, 0.04 g l<sup>-1</sup> de TDZ). El material vegetal se mantuvo a 25±2°C, con fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad durante dos subcultivos realizados cada 21 días.

Posteriormente, los callos se transfirieron a un medio de cultivo de regeneración de plantas (sales MS 100%, vitaminas B<sub>5</sub>, 3.0 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 6.0 g l<sup>-1</sup> de agar, 2.25 g l<sup>-1</sup>

de 6- BAP, con fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad por 21 días.

Se cuantificó el número de semillas germinadas y se calculó el porcentaje de germinación. Además, se determinó la masa fresca (g) de los callos a los 21, 42 y 63 días de cultivo, después de aplicado el tratamiento mutagénico. Se emplearon 1 000 semillas por tratamiento, incluyendo el control.

#### Procesamiento Estadístico

Los experimentos fueron desarrollados bajo un diseño aleatorio completamente al azar. Los análisis estadísticos fueron basados en la comparación de medias. Las diferencias entre los valores medios en los experimentos que no presentaron homogeneidad de varianza y distribución normal, fueron determinadas por los análisis no paramétricos Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. El paquete estadístico empleado fue *Statistic Packaged for Social science* (SPSS) versión 18.0 sobre Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las dosis de radiación empleadas no afectaron la germinación *in vitro* de las semillas. Independientemente de la dosis aplicada, el 100% de las semillas irradiadas de *P. vulgaris* cultivar 'Ica Pijao' germinaron. Es conocido que los rayos Gamma aumentan la activación enzimática, lo que resulta en un incremento de la tasa de división celular y puede estimular el proceso de germinación (Sjodin, 1962).

Contrario, a lo obtenido en la presente investigación, Carneiro *et al.* (1987) emplearon la inducción de radiaciones Gamma unido al cultivo de tejidos en *P. vulgaris*, pero en el cultivar 'Millonario 1732'. Estos autores refieren una disminución en el porcentaje de germinación de las semillas irradiadas con dosis entre 40-200 Gy. La mayoría de los trabajos descritos, evalúan directamente la respuesta en campo de semillas irradiadas con diferentes dosis de radiación Gamma, sin el empleo del cultivo *in vitro* como fuente de inducción de variabilidad genética.

En este sentido, Ellyfa *et al.* (2007) indicaron que al irradiar semillas de *P. vulgaris*, con

dosis de 300 y 400Gy, no encontraron afectaciones en cuanto al porcentaje de germinación con respecto al control. Los resultados del presente trabajo coinciden con lo informado por dichos autores, ya que con 400Gy no se encontraron diferencias significativas con respecto al control.

Por otra parte, estos mismos autores, emplearon dosis superiores (500, 600, 700 y 800Gy) a las utilizadas en esta investigación e indicaron que no existieron diferencias entre los tratamientos con respecto al control. Estos autores demostraron que la aplicación de dosis mayores a 400Gy en esta especie en condiciones de campo, no provocan afectaciones en el proceso de germinación.

Los resultados difieren con lo obtenido por Nasab *et al.* (2010). Estos autores describieron que al irradiar semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) con 200Gy, los porcentajes de germinación disminuyeron en comparación con el control. Ellos atribuyeron estos resultados a varias razones: (i) numerosos cambios histológicos y citológicos; (ii) disrupción y desorganización de la capa de la epidermis de la semilla, que es directamente proporcional a la intensidad de la exposición a rayos Gamma; y (iii) a la alteración de la mitosis o eliminación de la división celular en las zonas meristemáticas durante la germinación.

Al analizar el efecto de las radiaciones Gamma en la masa fresca, se encontró que todas las dosis de radiación afectaron el crecimiento de los callos con respecto al control en cada uno de los subcultivos de formación y multiplicación de callos correspondientes, a los 21, 42 y 63 días (Figura 1).

A los 21 días de cultivo todos los tratamientos presentaron una reducción en la masa fresca con diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, entre los callos provenientes de semillas irradiadas no hubo diferencias. En este periodo, los callos presentaron una coloración verde clara y menores dimensiones (Figura 2b) en comparación con el control (Figura 3a). Posteriormente, a los 42 días, existió un incremento en la masa fresca en todos los tratamientos, pero este aumento en los callos

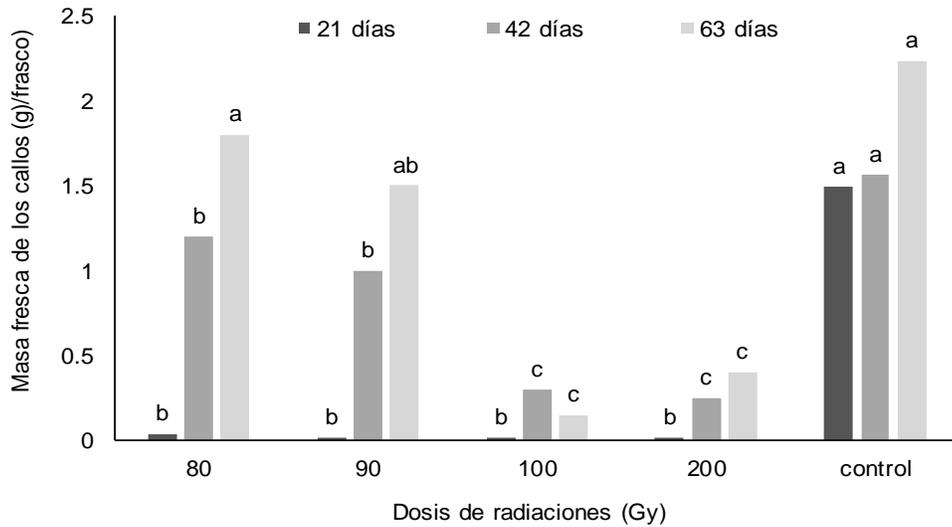
irradiados fue menor que en el control (Figura 1). A los 42 días de cultivo, los callos formados a partir de explantes derivados de semillas irradiadas con las dosis de 80 y 90Gy presentaron mayor masa fresca que los provenientes de semillas tratadas con las dosis de 100 y 200Gy (Figura 1). Los callos desarrollados a partir de semillas irradiadas con 100 y 200Gy, presentaron una coloración parda oscura, sin puntos verdes de crecimiento (Figura 2c).

A los 63 días de cultivo, los callos desarrollados de explantes irradiados con dosis de 80 y 90Gy mostraron una respuesta similar al control en cuanto a los valores de masa fresca, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Los callos, eran nodulares con una coloración verde intensa (Figura 2d).

Estos resultados demuestran que a partir de los 42 días de cultivo, se produjo un aumento progresivo del crecimiento del callo, lo cual pudo estar dado, por la disminución del efecto de la radiación y la formación de tejido nuevo. En relación con esto, Khan *et al.* (2002) observaron que la aplicación de radiaciones Gamma a las semillas disminuye la capacidad de crecimiento de los callos obtenidos a partir de estas. Los autores indicaron que en la medida que se incrementaron las dosis de irradiación en semillas, se redujo el crecimiento de los callos.

Por otra parte, con las dosis de irradiación de 300 y 400Gy no se logró la formación de callos. Ello sugiere que dosis altas de radiación provocan la inhibición del crecimiento de los callos, lo que se pudiera atribuir a la detención del ciclo celular en la fase G2 / M durante la división de las células somáticas y / o diversos daños en la totalidad del genoma (Preussa y Britta, 2003).

Contrario a lo obtenido en la presente investigación, Rahimi *et al.* (2011) indicaron que al irradiar semillas de *Brasica napus* con las dosis de 200 y 500Gy se produjo un incremento en el crecimiento. A partir de estos resultados infirieron, que dosis altas de radiación Gamma, provocaban la estimulación de la división celular o la elongación de las células, así como la alteración de los procesos metabólicos como son la síntesis de fitohormonas y ácidos nucleicos.



Letras sobre barras indican diferencias significativas entre los rangos medios para  $p < 0.05$  según la prueba de Kruskal Wallis/Mann-Whitney

Figura 1. Efecto de radiaciones Gamma sobre la masa fresca de callos obtenidos de semillas irradiadas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'Ica Pijao' a los 21, 42 y 63 días de cultivo posteriores a la irradiación.

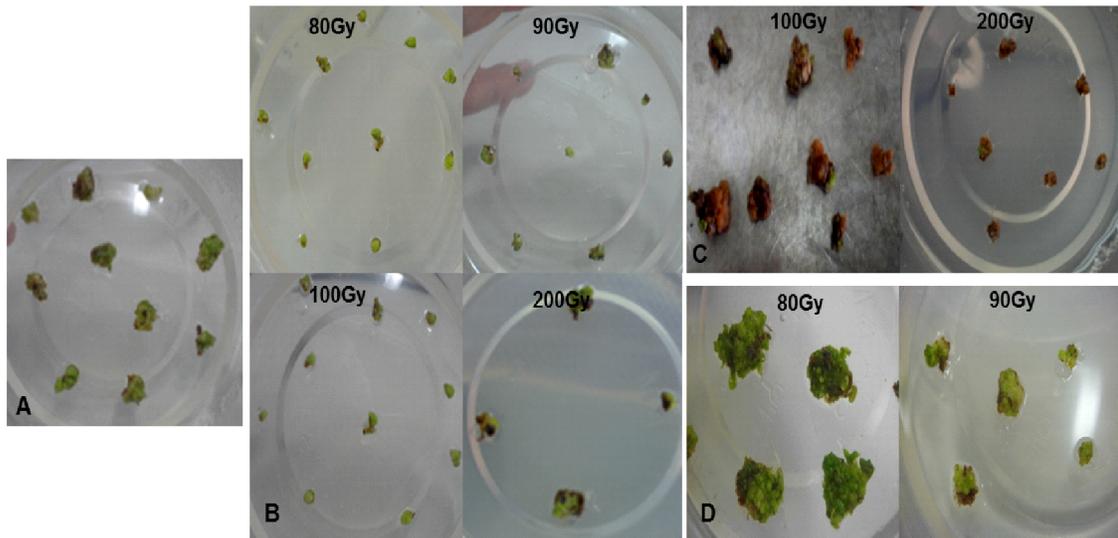


Figura 2. Callos obtenidos a partir de semillas irradiadas de *Phaseolus vulgaris* cultivar 'Ica Pijao'. A) Control (21 días), B) 21 días, C) 42 días, D) 63 días.

Otros autores como Balero *et al.* (2004) refieren el empleo de callos como explante blanco para la irradiación. Estos autores evaluaron el efecto de diferentes dosis de radiaciones Gamma (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80) en el crecimiento y la regeneración de callos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en el cuarto subcultivo. Como resultado obtuvieron que la tendencia del

crecimiento de los callos se redujo a medida que aumentó la dosis de radiación hasta la dosis de 30 Gy. En la presente investigación, los callos obtenidos de semillas irradiadas con 80Gy solo lograron un incremento en la masa fresca de 1.37g, lo cual equivale a callos con un crecimiento muy limitado, que no regeneraron.

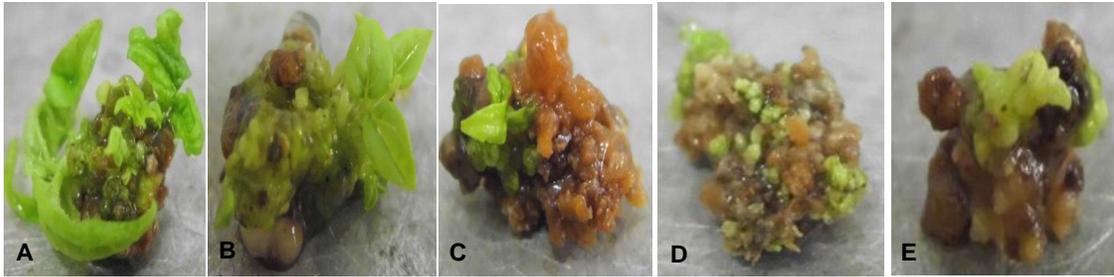


Figura 3. Brotes regenerados a partir de semillas irradiadas de *Phaseolus vulgaris* cultivar 'Ica Pijao'. A) Control, B) 80Gy, C) 90Gy, D) 100Gy, E) 200Gy.

En relación con esto, se ha informado que en el nivel de radiosensibilidad de diferentes tipos de explantes, pueden influir factores como el cultivar, las condiciones fisiológicas de las plantas u órganos a irradiar, así como la manipulación del material vegetal antes y después de la irradiación (Predieri, 2001).

Los resultados indicaron que para esta variedad de frijol común, dosis superiores a 90 Gy de radiaciones Gamma en la semilla, comprometen el crecimiento y desarrollo del callo.

La irradiación de las semillas afectó la regeneración de plantas. Los callos obtenidos a partir de semillas irradiadas, con las dosis entre 80 y 200Gy formaron pequeños brotes (Figura 3). Sin embargo, luego del segundo subcultivo, las plantas regeneradas presentaron hojas deformadas, con una coloración amarilla. Posteriormente, la mayoría de las plantas regeneradas presentaron senescencia foliar y después de transcurridas dos semanas murieron. Similares resultados han sido informados por Shukla y Data (1993), quienes encontraron que en la medida que se incrementaron las dosis de rayos Gamma (15-25 Gy) en semillas de *Chrysanthemum* J., disminuyó el crecimiento de las plantas, se presentó clorosis, menor número de hojas y de formación de raíces.

Otros autores han evaluado el efecto de diferentes dosis de rayos Gamma en otras especies. De esta manera, Bodele (2013) empleó de 1-10Gy en la regeneración de plantas de *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. Ex. Nees. Al igual que en este trabajo, las dosis más altas de rayos Gamma, tuvieron un efecto negativo sobre los

parámetros morfológicos y de crecimiento de plantas tales como: longitud del tallo, longitud de la raíz, el número de hojas y en la supervivencia.

En otra investigación, Muhamad *et al.* (2013) describieron que al irradiar brotes de *Etilingera elatior* (Jack) con diferentes dosis de rayos Gamma (10-140Gy), en la medida que se incrementaron las dosis de irradiación, los brotes presentaron cambios morfológicos en cuanto a la forma y color de las hojas. Además, observaron una disminución en la supervivencia de los explantes.

Atendiendo a los resultados, se requieren estudios de radiosensibilidad, que permitan establecer la Dosis Letal media (LD 50) y la Dosis Reductiva Media (GR 50), a emplear en los programas de mejoramiento genético *in vitro* de este cultivar, con el objetivo de obtener mutantes con tolerancia a estrés hídrico.

## CONCLUSIONES

Se determinó la respuesta *in vitro* de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar 'Ica Pijao' irradiadas con diferentes dosis de radiación Gamma. Aunque se logró la formación de callos en explantes de semillas irradiadas y estos dieron lugar a brotes, no fue posible la regeneración de plantas a partir del tejido tratado. Al menos para la variedad objeto de estudio y en las condiciones establecidas en esta investigación no fue posible definir la dosis letal media a partir del rango de dosis de irradiación empleadas. Son necesarios estudios adicionales de dosis inferiores de radiaciones Gamma para definir la dosis óptima a emplear en los programas de mejoramiento genético de esta especie.

## REFERENCIAS

- Bajaj Y, Saettler A, Adams, M (1970) Gamma irradiation studies on seeds, seedlings and callus tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. Radiation Botany 10(2):119–124
- Balero AV, Orellana P, Veitía N, Torres D (2004) Crecimiento, regeneración y radiosensibilidad de callos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido var. 'SP 70-1284') tratados con radiación gamma fuente  $^{60}\text{Co}$ . Biotecnología Vegetal 4 (3): 165-169
- Bodele Shroni K (2013) Effect of Gamma Radiation on Morphological and Growth Parameters of *Andrographis paniculata* (Burm. F) Wall. Ex. Nees. Botany 3(6): 55-57
- Campos G, García D, Pérez Y, Ramis C (2011) Respuesta de 20 variedades de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) ante el estrés por NaCl durante la germinación y en fase plantular. Biagro 23(3): 215-224
- Carneiro J, Barbosa H, Cardoso A, Vieira C (1987) The sensitivity of seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Millionario 1732 to Gamma radiation. Rev. Ceres 34: 306-312
- Collado R, Veitía N, Bermúdez-Carabaloso I, García LR, Torres D, Romero C, Rodríguez-Lorenzo JL, Angenon G (2013) Efficient *in vitro* plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars. Sci Hortic 153:109–116
- Dillen W, De Clercq J, Goossens A, Van Montagu M, Angenon G (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. Theor Appl Genet 94:151–158
- Ellyfa K, Ahmed OH, Shaharudin S, Abdul DR (2007) Gamma radiosensitivity study on Snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). International Journal of Agricultural Research 2(9): 844-848
- Fe de la C, Romero M, Ortiz R, Ponce M (2000) Radiosensibilidad de semillas de soja a los rayos Gamma  $^{60}\text{Co}$ . Cultivos Tropicales 21(2): 43-47
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspensio cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res 50:151–158
- Khan HM, Anwer M, Chaudhry ZS (2002) Dosimetry characterization of aqueous solution of brilliant green for low-dose food irradiation dosimetry. J. Radiation Physics and Chemistry 63: 713–717
- Mc Clean PE, Lavin M, Gepts P, Jackson SA (2008) *Phaseolus vulgaris*: A Diploid Model for Soybean. En: Stacey, G. (Ed.) Genetics and Genomics of Soybean pp, 55-76. Springer, Dordrech
- Miranda S, Ortiz R, Ponce M, Rosa Acosta, Rios H (2007) Selección participativa de variedades de frijol común por agricultores en Ferias de diversidad: Una alternativa para la introducción de variedades. Cultivos Tropicales 28 (4): 57-65
- Muhamad FY, Maheran AA, Mihdzar AK, Siti Khalijah D, Azmi AR (2013) *In vitro* mutagenesis of *Ettlingera elatior* (Jack) and early detection of mutation using RAPD markers. Turkish Journal of Biology 37: 716-725
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497
- Nasab SS, Sharifi-Sirchi GR, Torabi-Sirchi MH (2010) Assessment of dissimilar Gamma irradiations on barley (*Hordeum vulgare* spp.) Journal of Plant Breeding and Crop Science 2(4): 59-63
- Parry MA, Madgwick PJ, Bayon C, Tearall K, Hernandez-Lopez A, Baudo M, Rakszegi M, Hamada W, Al-Yassin A, Quabbou H, Labhilili M, Phillips A (2009) Mutation discovery for crop improvement. J. Exp. Bot 60:2817-2825
- Preussa SB, Brita AB (2003) A DNA-damage-cell induced cell cycle checkpoint in Arabidopsis. Genetics 164: 323-334
- Predieri S (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 185-210
- Rahimi MM, Bahrani A (2011) Effect of Gamma irradiation on qualitative and quantitative characteristics of Canola (*Brassica napus* L.). Middle-East J. of Sci. Res 8 (2): 519-525
- Romero A, Doval M, Sturla A, Judis A (2013) Propiedades antioxidantes de compuestos polifenólicos presentes en extractos hidroalcohólicos de soja fermentada. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina
- Shukla R, Datta SK (1993) Mutation studies on early and late varieties of garden Chrysanthemum. J. Nucl. Agric. Biol 22: 138–42
- Sjodin J (1962) Some observations in X1 and X2 of *Vicia faba* L. after treatment with different mutagens. Hereditas 48:565–573

Recibido: 08-10-2014

Aceptado: 03-12-2014