

Callogenesis de *Heliconia collinsiana* GRIGGS *in vitro*: establecimiento, inducción y proliferación*

Callogenesis of *Heliconia collinsiana* GRIGGS *in vitro*: establishment, induction and proliferation

Eleodoro Hernández-Meneses¹, María Cristina Guadalupe López-Peralta^{2§} y Andrés Adolfo Estrada-Luna³

¹Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad (PREGEP)-Fisiología Vegetal. (doromeneses@colpos.mx). ²PREGEP-Genética. Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Tel. (595) 9520200 Ext. 1540. cristy@colpos.mx. ³CINVESTAV-Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética. (aestradaluna@yahoo.com). [§]Autora para correspondencia: cristy@colpos.mx.

Resumen

Las heliconias son plantas ornamentales cultivadas como flor de corte y maceta. En México se cultivan cada vez más en Estados que disponen de condiciones climáticas tropicales. Si bien ya es posible la propagación *in vitro* de heliconias mediante organogénesis directa, aún no se han podido establecer protocolos tanto de organogénesis como embriogénesis somática indirecta para la propagación masiva de genotipos élite. La finalidad de ésta investigación fue desarrollar un protocolo para la inducción y proliferación de callos *in vitro* en *Heliconia collinsiana*. Explantes de ápices de raíz, hoja, pecíolo y secciones transversales basales de pseudotallo se cultivaron en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 13.6, 27.1, 54.3, 81.4, 108.6 y 135.7 μM de 2,4-D, dicamba y picloram combinadas con carbón activado (0 y 0.5 g L^{-1}). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad y a las cuatro, ocho y 12 semanas se evaluó el porcentaje de inducción de callos. Únicamente las secciones transversales basales de pseudotallo indujeron callos a las 12 semanas con 81.4 (100%) y 135.7 (90%) μM de 2,4-D y picloram, respectivamente, combinados con 0.5 g L^{-1} de carbón activado. Éstos callos al subcultivarlos en 0, 4.5 y 9 μM de 2, 4-D en la etapa de proliferación respondieron diferente. Después de 16 semanas, sólo continuaron creciendo los callos inducidos con 81.4 μM de 2, 4-D en fotoperiodo de

Abstract

Heliconias are grown as ornamental plants and cut flower pot. In Mexico is increasingly grown in States with tropical climatic conditions. While it is possible *in vitro* propagation of *Heliconia* by direct organogenesis, it has not yet been able to establish protocols for both indirect organogenesis and somatic embryogenesis for mass propagation of elite genotypes. The purpose of this research was to develop a protocol for callus induction and proliferation *in vitro* in *Heliconia collinsiana*. Explants of root tips, leaf, petiole and basal cross sections of pseudostem were cultivated in the culture medium of Murashige and Skoog (1962) supplemented with 13.6, 27.1, 54.3, 81.4, 108.6 and 135.7 μM of 2,4-D, dicamba and picloram combined with activated carbon (0 to 0.5 g L^{-1}). The cultures were kept in the dark and four, eight and 12 weeks were evaluated percentage of callus induction. Only cross sections calluses induced pseudostem at the baseline at 12 weeks with 81.4 (100%) and 135.7 (90%) μM of 2,4-D and picloram, respectively, combined with 0.5 g L^{-1} of activated carbon. This callus by sub-cultivating them in 0, 4.5 and 9 μM of 2, 4-D in the proliferation stage responded differently. After 16 weeks, only the calluses induced continued to grow with 81.4 μM of 2, 4-D in photoperiod of 16 h. The callus generated with 135.7 μM of picloram got blackened at four weeks of culture in all the treatments.

Key words: activated carbon, dicamba, picloram, platanillo.

* Recibido: marzo de 2013
Aceptado: octubre de 2013

16 h. Los callos generados con 135.7 μM de picloram se ennegrecieron a las cuatro semanas de cultivo en todos los tratamientos evaluados.

Palabras clave: carbón activado, dicamba, picloram, platanillo.

Introducción

Las heliconias son plantas ornamentales tropicales cultivadas comercialmente para la producción de flores para corte, o bien, como plantas de maceta, por sus colores brillantes y formas exóticas (Criley, 2000; Loges *et al.*, 2007). El cultivo de estas plantas ornamentales en México se ha incrementado principalmente en los estados del Sur-Sureste que cuentan con las condiciones tropicales propicias para ello (Murguía *et al.*, 2007). El problema principal que presentan las heliconias para obtener plantaciones clonales es que sólo se pueden propagar mediante división de rizomas ya que sexualmente (semillas) se genera variabilidad genética, especialmente cuando se trata de variedades.

Heliconia collinsiana es una especie cultivada en México como flor de corte y al igual que otras especies y variedades presentan alto grado de hibridación natural que limita su propagación por semillas. Su inflorescencia es tipo colgante y la floración ocurre en los meses de julio a noviembre. Alcanza una altura de 3 a 4.5 m y se adapta muy bien para su cultivo en áreas con 50% de sombreado. La inflorescencia consta de 12 a 18 brácteas de color rojo brillante y cubiertas de cera blanca; el raquis es de color rojizo y su hábito de crecimiento es tipo musoide (Berry y Kress, 1991).

El uso de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* representa una herramienta eficiente para propagar genotipos élite mediante la organogénesis directa; además, las plantas obtenidas están libres de enfermedades (Marulanda-Ángel *et al.*, 2011). Los primeros estudios con esta técnica en heliconias fueron Nathan *et al.* (1992) quienes a través de yemas laterales lograron la regeneración de manera indirecta *in vitro* de *H. psittacorum* y encontraron que las plantas obtenidas produjeron más vástagos que las propagadas de forma convencional. Este mismo tipo de explante también fue eficiente para la propagación de *H. standleyi* (Sosa *et al.*, 2008). Además de estos estudios, que se han enfocado a la propagación masiva de variedades de heliconias altamente comerciales disponibles para su

Introduction

Heliconias are tropical ornamental plants grown commercially for the production of cut flowers or as potted plants for their bright colors and exotic shapes (Criley, 2000; Loges *et al.*, 2007). The cultivation of these ornamentals in Mexico has increased mainly in the South-East States that have tropical conditions (Murguía *et al.*, 2007). The main problem held by heliconias for obtaining clonal plantations that can only be propagated by rhizome division, since sexually (seeds) genetic variability is generated, especially when it comes to varieties.

Heliconia collinsiana is a species cultivated in Mexico as a cut flower and like other species and varieties have high degree of natural hybridization limiting its spread by seeds. Its inflorescence is of pendant type and flowering occurs in the months of July to November. It reaches a height of 3 to 4.5 m and is well suited for cultivation in areas with 50% shade. The inflorescence consists of 12-18 bracts of bright red and covered with white wax, the rachis is reddish in color and its growth habit is of musoide kind (Berry and Kress, 1991).

Using the techniques of plant tissue culture *in vitro* is an efficient tool to propagate elite genotypes by direct organogenesis; also the obtained plants are free of disease (Marulanda-Angel *et al.*, 2011). Early studies with this technique in heliconias were used by Nathan *et al.* (1992) who through lateral bud regeneration achieved indirectly *in vitro* *H. psittacorum* and found that the plants obtained produced more than conventionally propagated. This same type of explant was also efficient for the propagation of *H. standleyi* (Sosa *et al.*, 2008). In addition to these studies, which have focused on mass propagation of commercial varieties of heliconias highly available for cultivation in field, we have also explored the possibility of inducing somatic embryos, but up to this date it has not been achieved by establishing an efficient protocol to propagate these morphogenic ornamental by this route (Ulysses *et al.*, 2007).

This ornamental species and other phylogenetically related, failed to obtain somatic embryogenesis directly, which is why, in this investigation we sought callus induction indirectly because this phase is the dedifferentiation of somatic tissue and the subsequent acquisition of embryogenic competence. Based on these backgrounds, this study aimed to develop a protocol for callus induction and proliferation in *Heliconia collinsiana* by culturing *in vitro* from different explants in the presence of various auxins and activated carbon.

cultivo en campo, también se ha explorado la posibilidad de inducir embriones somáticos; sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado el establecimiento de un protocolo eficiente que permita propagar estas ornamentales mediante esta ruta morfogénica (Ulisses *et al.*, 2007).

En esta especie ornamental, así como en otras relacionadas filogenéticamente, no se ha podido obtener la embriogénesis somática de manera directa; es por ello, que en esta investigación se buscó la inducción de callos de forma indirecta porque esta fase constituye la dediferenciación del tejido somático y la adquisición subsecuente de competencia embriogénica. Con base en éstos antecedentes, el presente trabajo tuvo como finalidad desarrollar un protocolo para la inducción y proliferación de callos en *Heliconia collinsiana* mediante el cultivo *in vitro* a partir de diferentes explantes en presencia de varias auxinas y carbón activado.

Materiales y métodos

Material vegetal y tipos de explante

A partir de plántulas asépticas desarrolladas *in vitro* de *H. collinsiana* se obtuvieron explantes de hoja, pecíolo, ápices de raíz y secciones transversales [thin cell layer (capas finas de células)] de la base del pseudotallo. Para los explantes de hojas se cortaron segmentos de 1 cm² de la lámina central con la nervadura principal mientras que de los pecíolos se usaron secciones longitudinales de 1 cm. En los explantes de raíz se obtuvieron secciones longitudinales de 1 cm incluyendo el ápice. Para obtener las secciones transversales de pseudotallo se cortaron segmentos basales de plántulas de 10 mm de diámetro con 1-2 mm de grosor (Figura 1).

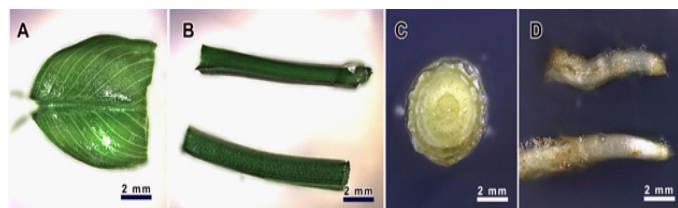


Figura 1. Explantes evaluados en la inducción de callo *in vitro* de *Heliconia collinsiana*. (A) segmento de hoja; (B) segmentos de pecíolo; (C) sección transversal basal de pseudotallo; (D) ápices de raíz.

Figure 1. Explants evaluated in callus induction *in vitro* of *Heliconia collinsiana*. (A) leaf segment; (B) petiole segments; (C) basal cross section of the pseudostem; (D) root tips.

Materials and methods

Plant material and explant types

From aseptic seedlings developed *in vitro* explants were obtained of leaf, petiole, and root tips and cross sections (thin layer of cells) in the base of the pseudostem. For the leaf explants were cut 1 cm segments with the central leaf of main rib while the petioles were used longitudinal sections of 1 cm. In the root explants were obtained 1 cm longitudinal sections including the apex. For transverse sections were cut pseudostem seedling of basal segments of 10 mm in diameter with 1.2 mm thick (Figure 1).

Medium

The basic medium used consisted of inorganic salts of Murashige and Skoog (MS, 1962) supplemented with sucrose (30 g L⁻¹) modifying the amounts of: agar (Merck®, 9 g L⁻¹), myo-inositol (200 mg L⁻¹) and thiamine (2 mg L⁻¹). The pH of the medium was adjusted to 5.7 and then used 10 mL culture flasks of 45 mL, which were sterilized by autoclaving (AESA® 300) at 121 °C and 1.5 kg cm⁻² pressure for 20 min.

Callus induction

Leaf sections, petiole, root tips and basal cross sections of pseudostem were placed in MS basic medium (1962) supplemented with 13.6, 27.1, 54.3, 81.4, 108.6 and 135.7 µM of 2,4-D (acid 2,4-dichlorophenoxyacetic Merck®), dicamba (acid, 3-6-dichloro-o-anisic, Sigma®) and picloram (acid 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic, Sigma®). Placing the explants was made by immersing them in the culture medium and retaining its polarity. 144 treatments were evaluated, resulting from the combination of four types of explants and 18 concentrations of auxin and activated carbon (0 to 0.5 g L⁻¹). The culture flasks were kept in the dark at 26 ± 2 °C for 12 weeks, making a subculture to fresh medium at six weeks. At four, eight and 12 weeks observations were made to determine the percentage of callus induction.

Proliferation of callus

Having defined the optimal hormonal conditions and the best type of explant for callus induction *in vitro* three concentrations were tested of 2, 4-D to assess its effect on the proliferation of the callus. Masses were used as explants of callus (approximately 400 mg) sown on MS medium (1962)

Medio de cultivo

El medio de cultivo básico empleado estuvo constituido por las sales inorgánicas del medio de Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con sacarosa (30 g L^{-1}), modificando las cantidades de: agar (Merck®, 9 g L^{-1}), mio-inositol (200 mg L^{-1}) y tiamina (2 mg L^{-1}). El pH del medio se ajustó a 5.7 y se sirvieron 10 mL en frascos de cultivo de 45 mL, los cuales fueron esterilizados en autoclave vertical (AESAR® 300) a 121°C y 1.5 g cm^{-2} de presión durante 20 min.

Inducción de callos

Se sembraron secciones de hoja, pecíolos, ápices de raíz y secciones transversales basales de pseudotallo en medio básico MS (1962) suplementado con 13.6, 27.1, 54.3, 81.4, 108.6 y $135.7 \mu\text{M}$ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético Merck®), dicamba (ácido 3-6-dicloro-o-anisico, Sigma®) y picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico, Sigma®). La siembra de los explantes se hizo sumergiéndolos en el medio de cultivo y conservando su polaridad. Se evaluaron 144 tratamientos, resultado de la combinación de cuatro tipos de explantes y 18 concentraciones de auxinas y carbón activado (0 y 0.5 g L^{-1}). Los frascos de cultivo se mantuvieron en condiciones de oscuridad a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 semanas y se hizo un subcultivo a medio fresco a las seis semanas. A las cuatro, ocho y 12 semanas se hicieron observaciones para determinar el porcentaje de inducción de callos.

Proliferación de callos

Una vez definidas las condiciones hormonales óptimas y el mejor tipo de explante para la inducción de callos *in vitro* se probaron tres concentraciones de 2, 4-D para evaluar su efecto en la proliferación de los callos. Como explantes se usaron masas de callos (aproximadamente 400 mg) que se sembraron en medio MS (1962) suplementado con 0, 4.5 y $9.0 \mu\text{M}$ de 2, 4-D y 0.5 g L^{-1} de carbón activado. Los cultivos se incubaron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ en condiciones de fotoperíodo de 16 horas e intensidad luminosa de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 16 semanas haciendo subcultivos a medio fresco cada cuatro semanas. A las 4, 8, 12 y 16 semanas se contabilizó el peso fresco de callo (g).

Análisis estadístico

Los experimentos se condujeron en un diseño completamente al azar en arreglo factorial. Cada tratamiento tuvo diez repeticiones (un explante por frasco). El análisis de varianza

suplemented with 0, 4.5 and $9.0 \mu\text{M}$ of 2, 4-D and 0.5 g L^{-1} of activated carbon. The cultures were incubated at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ under 16-hour photoperiod and light intensity of $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 16 weeks by subculturing to fresh medium every four weeks. At 4, 8, 12 and 16 weeks was recorded callus fresh weight (g).

Statistical analysis

The experiments were conducted in a completely randomized design with factorial arrangement. Each treatment had ten replications (one explant per bottle). Analysis of variance was performed with the SAS Statistical Analysis Package (SAS Institute, 2003) and the Tukey test ($p \leq 0.05$) was used to compare the means.

Results and discussion

Callus induction

The basal cross sections explants of pseudostem were the only ones that issued calluses. Leaf explants, petiole and root blackened and died within four weeks of cultivation. Statistical differences ($p \leq 0.05$) detected revealed that auxin type and dose of activated carbon together and their interaction had significant effects on the percentage of callus induction at four, eight and 12 weeks of culture. However, the highest effect on callus induction was produced by the type of auxin in the three periods during the assessment (40.1% of total variation).

Morphogenic capacity of the type of explant for callus induction

The cross sections of pseudostem explants were the only callus that generated morphogenic capacity to respond to callus induction at 12 weeks of culture when cultured with 2,4-D ($81.4 \mu\text{M}$) and picloram ($135.7 \mu\text{M}$) (Table 1). This ability to form callus is that in this type of fabric can be found in epidermal cells, cortical cambial, perivascular tissue and marrow as well as parenchymal cells can be routed to a specific program for *in vitro* morphogenic if they receive proper culture conditions (Teixeira da Silva, 2003). These are the same cells that may have the ability to respond to concentrations of 2,4-D and picloram and continue with the perception and transduction of signals within a morphogenic route desired (Fehér, 2005). On the contrary, leaf explants, petiole and root tips totally blackened after four weeks of *in vitro* setting four treatments therefore ineffective in the generation of callus (Figure 2).

se realizó con el paquete de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se usó para comparar las medias.

Resultados y discusión

Inducción de callos

Los explantes de secciones transversales basales de pseudotallo fueron los únicos que emitieron callos. Los explantes de hoja, pecíolo y raíz se ennegrecieron y murieron a las cuatro semanas de cultivo. Las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) detectadas revelaron que el tipo y dosis de auxina unida al carbón activado, así como su interacción, tuvieron efectos significativos en el porcentaje de inducción de callos a las cuatro, ocho y 12 semanas de cultivo. Sin embargo, el mayor efecto sobre la inducción de callos fue producido por el tipo de auxina en los tres períodos de evaluación (40.1% de la variación total).

Capacidad morfogénica del tipo de explante para la inducción de callo

Las secciones transversales de pseudotallo fueron los únicos explantes que generaron callos por lo que mostraron capacidad morfogénica para responder a la inducción de callo a las 12 semanas de cultivo cuando se cultivaron con 2,4-D (81.4 μM) y picloram (135.7 μM) (Cuadro 1). Esta capacidad para formar callos se debe a que en este tipo de tejido es posible encontrar células epidérmicas, corticales, cambiales, tejido perivascular y medular así como células de parénquima que pueden conducirse a un programa morfogénico *in vitro* específico si reciben las condiciones de cultivo adecuadas (Teixeira da Silva, 2003). Éstas mismas células son las que pueden tener la capacidad para responder a las concentraciones de 2,4-D y picloram y continuar con la percepción y transducción de señales dentro de una ruta morfogénica deseada (Fehér, 2005). Por el contrario, los explantes de hoja, pecíolo y ápices de raíz se ennegrecieron totalmente después de cuatro semanas de su establecimiento *in vitro* en todos los tratamientos evaluados, por lo que resultaron ineficaces para la generación de callos (Figura 2).

La nula respuesta obtenida con explantes de hoja y pecíolo se debe a que en estos tejidos las células no fueron capaces de adquirir actividad meristemática y por tanto no respondieron

Cuadro 1. Efecto del tipo y dosis de auxina en la inducción de callos *in vitro* (%) de *H. collinsiana* a las cuatro, ocho y 12 semanas de cultivo.

Table 1. Type and dose effect of auxin in callus induction *in vitro* (%) of *H. collinsiana* at four, eight and 12 weeks of culture.

Factor	4 semanas		8 semanas		12 semanas		
Tipo de auxina							
Dicamba	0	b	0	b	0	b	
2,4-D	5.0	a	14.2	a	18.3	a	
Picloram	5.8	a	11.7	a	16.7	a	
DMS 0.05	5.0		6.0		3.5		
Dosis auxina (μM)/Carbón activado (g L ⁻¹)							
13.6 / 0	0.0	a	0.0	b	0.0	c	
13.6 / 0.5	0.0	a	0.0	b	0.0	c	
27.1 / 0	0.0	a	0.0	b	0.0	c	
27.1 / 0.5	0.0	a	0.0	b	0.0	c	
54.3 / 0	0.0	a	0.0	b	0.0	c	
54.3 / 0.5	6.6	a	20.0	a	23.3	b	
81.4 / 0	0.0	a	0.0	b	0.0	c	
81.4 / 0.5	13.3	a	36.7	a	46.7	a	
108.6 / 0	0	a	0.0	b	0.0	c	
108.6 / 0.5	10.0	a	23.3	a	33.3	ab	
135.7 / 0	0	a	0.0	b	0.0	c	
135.7 / 0.5	13.3	a	23.3	a	36.7	ab	
DMS 0.05	13.7		16.8		15.8		

The null response obtained with leaf and petiole explants is because the cells in these tissues were not able to acquire meristematic activity and thus not responding to any of the concentrations of auxin and perished. Although any part of the plant is used as explant feasible, not all tissues have the totipotency cell to respond to external stimuli that trigger the competition to generate callus initially, and then somatic embryogenesis or organogenesis (Fehér *et al.*, 2003). Another aspect to consider is that the explants must be used in proper developmental stage. Generally young tissues should be used because they may be more likely to respond to external signals of induction and reprogramming (Deo *et al.*, 2010). In the case of root tips explants, leaf and petiole used in this study showed that this had no intrinsic ability to respond to the concentrations used 2,4-D, dicamba and picloram therefore discarded for further studies.

a ninguna de las concentraciones de auxinas y perecieron. A pesar de que cualquier parte de la planta es factible de emplearse como explante, no todos los tejidos tienen la totipotencia celular para responder a estímulos externos que disparan la competencia para generar callos, en un inicio, y posteriormente, la organogénesis o embriogénesis somática (Fehér *et al.*, 2003). Otro aspecto a considerar es que los explantes se deben utilizar en la etapa de desarrollo correcta. En general se deben usar tejidos jóvenes porque pueden ser más susceptibles de responder a las señales externas de inducción y reprogramación celular (Deo *et al.*, 2010). En el caso de los explantes de ápices de raíz, hoja y pecíolo utilizados en el presente estudio se observó que no tuvieron esa capacidad intrínseca para responder a las concentraciones utilizadas 2,4-D, dicamba y picloram por lo que se descartaron para futuros estudios.

Efecto del tipo de auxina y dosis en la inducción de callo

El 2,4-D y picloram fueron las auxinas que indujeron la formación de callos cuando se combinaron con 0.5 g L⁻¹ de carbón activado mientras que con el dicamba la respuesta fue nula (Cuadro 1). En todas las concentraciones de dicamba los explantes se ennegrecieron y por ello se descartó como auxina inductora de callo. Los callos generados con el 2,4-D fueron de consistencia compacta y de coloración blanca mientras que los producidos con el picloram fueron friables y de color amarillento. El picloram *per se* ha sido una auxina eficaz para la inducción de callo embriogénico en algunas especies como *Manihot esculenta* (Atehnkeng *et al.*, 2005) pero en otras como *Phyllanthus nodiflorus* debe ser combinado con otras auxinas (2,4-D) u otros componentes del medio de cultivo (Ahmed *et al.*, 2011).

Incluso, en *Musa* spp., especie relacionada filogenéticamente con *Heliconia*, el picloram es eficiente para la inducción de callo embriogénico en ápices de brote, superando la acción del 2,4-D (Filippi *et al.*, 2001). Por su parte, el dicamba también es una auxina que se usa en la inducción *in vitro* de callos. Aunque en el presente estudio esta auxina no promovió la inducción de callos, sí ha resultado útil en explantes de secciones longitudinales de yemas de *Musa* spp., (grupo AAA) donde 10 µM indujeron callos que después se convirtieron en estructuras embriogénicas (Filippi *et al.*, 2001). También se ha demostrado que esta auxina ha sido más eficiente para la proliferación de callos en explantes de flores masculinas inmaduras de *Musa* spp., (grupo AAA), de las variedades Lalkela y Grande Naine, más que en la inducción de los mismos (Sidha *et al.*, 2007).

Effect of auxin type and dose for callus induction

The 2,4-D and picloram were the auxins induced to callus formation when combined with 0.5 g L⁻¹ of activated carbon while the response with dicamba was null (Table 1). At all concentrations of dicamba the explants blackened and thus discarded as auxin inducing callus. Calluses generated with the 2,4-D were compact of consistency and white coloration produced while picloram were friable and yellowish. Picloram *per se* has been an effective auxin induction of embryogenic callus in some species such as *Manihot esculenta* (Atehnkeng *et al.*, 2005) but others as *Phyllanthus nodiflorus* must be combined with other auxins (2,4-D) or other components of the culture medium (Ahmed *et al.*, 2011).

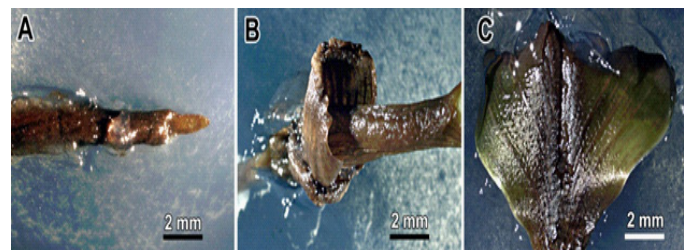


Figura 2. Respuesta observada en explantes de (A) ápices de raíz; (B) segmentos de pecíolo; y (C) hoja de *Heliconia collinsiana* en la inducción de callo *in vitro* a las cuatro semanas de cultivo en medio MS (1962) sin fitohormonas en oscuridad.

Figure 2. Response observed in explants of (A) root tips; (B) petiole segments; and (C) *Heliconia collinsiana* leaf callus induction *in vitro* after four weeks of cultivation in MS medium (1962) in darkness without phytohormones.

Even in *Musa* spp., phylogenetically related species with *Heliconia*, the picloram is efficient for embryogenic callus induction in shoot apices, overcoming the action of 2,4-D (Filippi *et al.*, 2001). Meanwhile, dicamba is also used in auxin *in vitro* induction of callus. Although this study did not promote auxin callus induction, proved to be useful in longitudinal sections explants of *Musa* spp. yolk., (AAA group) with 10 µM induced callus which later became embryogenic structures (Filippi *et al.*, 2001). It has also been shown that this has become more efficient auxin for callus proliferation explants of immature male flowers of *Musa* spp. (AAA group), varieties Grand Nain and Lalkela rather than inducing them (Sidha *et al.*, 2007).

La eficacia del 2,4-D en la inducción de callos radica en que puede actuar directamente como auxina o indirectamente modificando el metabolismo intracelular del AIA. También se le considera como un “agente estresante” inductor de respuesta (Feher *et al.*, 2003). Además, el 2,4-D es más efectivo en la inducción de la embriogénesis somática que el AIA endógeno, debido a que la auxina artificial no se puede metabolizar en las células vegetales (Stasolla *et al.*, 2004). Es por ello que en muchas especies de *Musa* ésta auxina ha sido la que mejores resultados ha brindado para el establecimiento de callos a partir de yemas florales y ápices de brotes (Jalil *et al.*, 2003; Strosse *et al.*, 2006; Smitha y Ashalatha, 2010).

Respecto al papel del carbón activado en la respuesta morfogénica, cuando se omitió del medio de cultivo la inducción de callo fue nula en todas las concentraciones y fuentes de auxinas evaluadas. Todos los explantes probados se tornaron de color café oscuro hasta ennegrecerse totalmente al término de cuatro semanas (Cuadro 2, Figura 2). Ésta respuesta dejó de manifiesto que el carbón activado es un compuesto indispensable debido a que inhibe los ácidos fenilacético y benzoico así como sus derivados y otros compuestos tóxicos incoloros (Srngsam y Kanchanapoom, 2003).

Además, juega el papel como adsorbente irreversible de compuestos inhibidores del crecimiento de los explantes en el medio de cultivo (Thomas, 2008). La nula respuesta obtenida en los explantes cultivados sin carbón activado se debe a que muchas especies vegetales son ricas en compuestos fenólicos y las heliconias no son la excepción. Después de las heridas hechas por los cortes durante la disecación de los explantes. Beyl (2005) ha señalado que, los compuestos fenólicos se oxidan por acción de polifenol oxidasas y no sólo tornan color café el tejido sino que también inhiben la actividad de varias proteínas que afectan negativamente la inducción de callo.

Un aspecto que es importante resaltar es el tiempo que tomó la inducción de callo (12 semanas) que es un lapso considerablemente superior al que se puede observar en algunas especies relacionadas filogenéticamente con *Heliconia* como *Musa* sp., y *Zingiber officinale* donde la inducción ocurre en las primeras cuatro semanas de cultivo en oscuridad (Jalil *et al.*, 2003; Strosse *et al.*, 2006; Lincy *et al.*, 2009). Éste consumo de tiempo se debe a que las heliconias son especies de hábito de crecimiento lento. En *Heliconia chartacea*, variedad ‘Sexy

The efficacy of 2,4-D in the callus induction is that it can act directly as auxin or indirectly altering the intracellular metabolism of IAA. It is also considered as a "stressor" response inducer (Fehér *et al.*, 2003). Furthermore, 2,4-D is more effective in inducing somatic embryogenesis that endogenous IAA because artificial auxin cannot metabolize in the plant cells (Stasolla *et al.*, 2004). Those is why in many species of *Musa* this auxin has showed the best results provided for the establishment of callus from flower buds and shoot apices (Khalil *et al.*, 2003; Strosse *et al.*, 2006; Smitha and Ashalatha, 2010).

Regarding the role of the activated carbon in the morphogenic response when omitted from the culture medium of callus induction was zero at all auxin concentrations and sources evaluated. All tested explants became dark brown to completely blacken the end of four weeks (Table 2, Figure 2). This response revealed that, the activated carbon is necessary because a compound that inhibits phenylacetic acid and benzoic acid derivatives thereof and other toxic colorless compounds (Srngsam and Kanchanapoom, 2003).

Plus, it plays the role as adsorbent and irreversible growth inhibiting compounds of the explants in culture medium (Thomas, 2008). The null response obtained in then explants cultured without activated carbon is because many plant species are rich in phenolic compounds and heliconias are no exception. After the wounds made by the courts during the desiccation of explants, Beyl (2005) indicated that, the phenolic compounds are oxidized by the action of polyphenol oxidases and become brown not only tissue, but also inhibit the activity of various proteins that negatively affect callus induction.

An aspect that is important to note is the time it took for the callus induction (12 weeks) which is a period substantially higher than that seen in phylogenetically related species with *Heliconia* and *Musa* sp., and *Zingiber officinale* where the induction occurs in the first four weeks of cultivation in the darkness (Khalil *et al.*, 2003; Strosse *et al.*, 2006; Lincy *et al.*, 2009). This consuming time is because the heliconias are species of slow-growing habit. In *Heliconia chartacea*, variety 'Sexy pink', Ulisses *et al.* (2007) induced callus formation in sections of the ovaries after nearly 13 weeks in the darkness with 45.5 μ M of 2,4-D but the callus appeared to be friable and yellowish and embryogenic structures were unsuccessful.

pink', Ulisses *et al.* (2007) indujeron la formación de callos en secciones de ovarios después de casi 13 semanas de cultivo en oscuridad con 45.5 μM de 2,4-D pero los callos fueron de apariencia friable y de color amarillento y no prosperaron en estructuras embriogénicas.

Interacción fuente y concentración de auxina mezcladas con carbón activado en la inducción de callo

La mejor respuesta de inducción de callos se obtuvo en secciones transversales de pseudotallo cultivadas con 81.4 μM de 2,4-D y 0.5 g L^{-1} de carbón activado. Los porcentajes fueron 40% a las cuatro semanas, 80% a las ocho semanas y 100% a las 12 semanas. Las dosis de 108.6 y 135.7 μM de 2,4-D también indujeron callos pero en proporción decreciente por lo que probablemente resultaron tóxicas para el explante. En contraste, el picloram promovió la inducción de callos de forma directamente proporcional conforme se incrementó la dosis. Alcanzó el máximo porcentaje de inducción (90%) con 135.7 μM combinado con el carbón activado después de 12 semanas de cultivo (Cuadro 2, Figura 3).

En el presente estudio el 2,4-D fue la mejor auxina para la inducción de callo en secciones transversales basales de pseudotallo de plántulas *in vitro* de *H. collinsiana* combinado con carbón activado (0.5 g L^{-1}) superando al picloram y dicamba. Ello se debe a que esta auxina se considera una molécula de señalización que juega un papel importante en la reactivación del ciclo celular y la división en células diferenciadas indispensables para la iniciación de los procesos del desarrollo. Esta reactivación del ciclo celular se alcanza por la expresión de ciertos genes de respuesta a auxina (Karami y Saidi, 2010).

Proliferación de callos

Los callos obtenidos bajo las condiciones óptimas definidas en la etapa de inducción de callo a las 12 semanas se pasaron a condiciones de fotoperíodo normal durante dos semanas manteniéndolos en el medio de cultivo suplementado con 81.4 μM de 2, 4-D y 135.7 μM de picloram. En seguida se pasaron a medio MS (1962) sin fitohormonas con la finalidad de promover la proliferación del callo. Sin embargo, todos los callos se ennegrecieron y no continuaron su crecimiento después de cuatro semanas de cultivo. Por esta razón, se evaluaron callos provenientes de 2,4-D y picloram en otras dosis de 2, 4-D (0, 4.5 y 9 μM) que se adicionaron al medio de cultivo MS (1962) y se cuantificaron sus efectos en la proliferación de los callos.

Source and auxin concentration interaction mixed with activated carbon for callus induction

The best response was obtained with callus induction in cultured pseudostem of the cross sections with 81.4 μM of 2,4-D and 0.5 g L^{-1} of activated carbon. The percentages were 40% at four weeks, 80% at eight weeks and 100% at 12 weeks. Doses of 108.6 and 135.7 μM of 2,4-D also induced callus but decreasing the proportion which probably were toxic to the explant. In contrast, picloram promoted callus induction in direct proportion as the dose increased. Reaching the highest induction rate (90%) with 135.7 μM combined with the activated carbon after 12 weeks of cultivation (Table 2, Figure 3).

In this study, the 2,4-D auxin was the better callus inductor in basal cross sections of pseudostem *in vitro* in *H. collinsiana* seedlings combined with activated carbon (0.5 g L^{-1}) with better results than picloram and dicamba. This is because this auxin is considered a signaling molecule that plays a role in the reactivation of the cell cycle and differentiated cells division necessary for the initiation of development processes. This reactivation of the cell cycle is achieved by the expression of certain genes in response to the auxin (Karami and Saidi, 2010).

Proliferation of callus

The calluses obtained under optimum conditions defined in the callus induction stage at 12 weeks were transferred to normal photoperiod condition keeping them for two weeks in culture medium supplemented with 81.4 μM of 2, 4-D and picloram with 135.7 μM . Then switched to MS medium (1962) without phytohormones in order to promote the proliferation of callus. However, all blackened calluses and continued their growth after four weeks. For this reason, we evaluated calluses from picloram, 2,4-D and other doses of 2, 4-D (0, 4.5, 9 μM) added to the culture medium MS (1962) and quantified their effects on callus proliferation.

The statistical analysis ($p \leq 0.05$) of the three evaluated treatments revealed that callus proliferation was significantly affected by the concentrations of 2, 4-D at eight, 12 and 16 weeks. The growth of callus at four weeks was not significant between the treatments. The highest growth of callus was obtained with 4.5 and 9.0 μM of 2, 4-D at 16 weeks of culture. The amount of callus recorded until this time with these auxin concentrations averaged more than 18 times the

Cuadro 2. Porcentaje de inducción de callo *in vitro* en secciones transversales basales de pseudotallo de *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) adicionado con diversas fuentes y dosis de auxinas y carbón activado (CA) después de 4, 8 y 12 semanas.

Table 2. Percentage of callus induction *in vitro* in basal cross sections of pseudostem of *Heliconia collinsiana* grown on MS medium (1962) supplemented with various sources and doses of auxin and activated carbon (CA) after 4, 8 and 12 weeks.

Auxina (µM)		C. A. (g L ⁻¹)	4 semanas		8 semanas		12 semanas	
2, 4-D	13.6	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	13.6	0.5	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	27.1	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	27.1	0.5	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	54.3	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	54.3	0.5	20.0	ab	60.0	abc	70.0	ab
	81.4	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	81.4	0.5	40.0	a	80.0	a	100.0	a
	108.6	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	108.6	0.5	0.0	b	30.0	cd	30.0	cd
	135.7	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	135.7	0.5	0.0	b	0.0	d	20.0	cd
Picloram	13.6	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	13.6	0.5	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	27.1	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	27.1	0.5	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	54.3	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	54.3	0.5	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	81.4	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	81.4	0.5	0.0	b	30.0	cd	40.0	bc
	108.6	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	108.6	0.5	30.0	a	40.0	bc	70.0	ab
	135.7	0	0.0	b	0.0	d	0.0	d
	135.7	0.5	40.0	a	70.0	ab	90.0	a
DMS 0.05			28.06		34.30		32.21	

Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). Nota: las medias de las dosis de dicamba no se muestran porque la respuesta fue nula y sus valores cero.

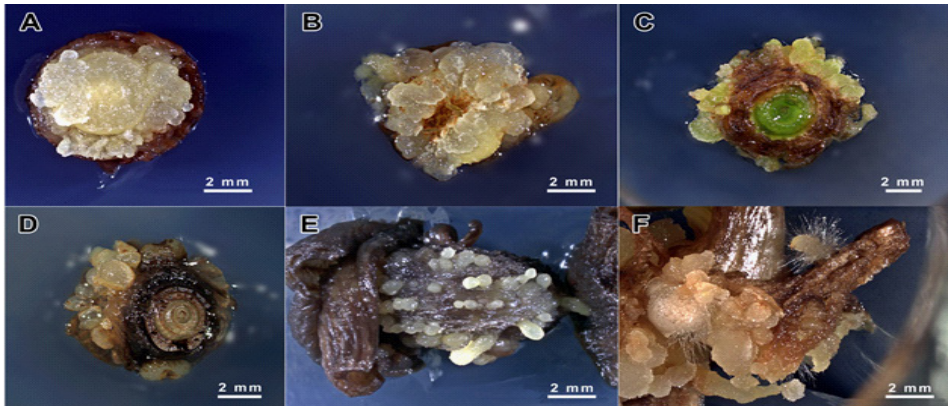


Figura 3. Inducción de callos *in vitro* en explantes de secciones transversales de pseudotallo de *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) adicionado con 0.5 g L⁻¹ de carbón activado. Callos inducidos con 81.4 µM de 2,4-D después de (A) cuatro; (B) ocho; y (C) 12 semanas de cultivo en oscuridad. Callos inducidos con 135.7 µM de picloram cultivados después de (D) cuatro; (E) ocho; y (F) 12 semanas en oscuridad.

Figure 3. Callus induction *in vitro* in cross sections of explants of *Heliconia collinsiana* grown on MS medium (1962) supplemented with 0.5 g L⁻¹ of activated carbon. Calluses induced with 81.4 µM of 2,4-D after (A) four; (B) eight; and (C) 12 weeks in the darkness. Calluses induced with 135.7 µM picloram harvested after (D) four; (E) eight; and (F) 12 weeks in darkness.

El análisis estadístico ($p \leq 0.05$) de los tres tratamientos evaluados reveló que la proliferación de callos fue afectada significativamente por las concentraciones de 2,4-D a las ocho, 12 y 16 semanas. El crecimiento de los callos a las cuatro semanas no fue significativo entre tratamientos. El mayor crecimiento de callo se obtuvo con 4.5 y 9.0 μM de 2, 4-D a las 16 semanas de cultivo. La cantidad de callo registrada hasta este tiempo con estas concentraciones de auxina fue en promedio más de 18 veces superior a la cantidad inicial sembrada (Cuadro 3). Los callos inducidos con 81.4 μM de 2,4-D y subcultivados en medio sin hormonas se tornaron de color café hasta ennegrecerse, mientras que con 4.5 y 9.0 μM de 2, 4-D se volvieron de color verde claro y continuaron creciendo después de cuatro semanas de cultivo en fotoperíodo (Figura 4). En contraste, los callos procedentes de 135.7 μM picloram se ennegrecieron y no prosperaron en ninguna de las concentraciones de 2, 4-D donde se subcultivaron.

initial amount expansion (Table 3). The calluses induced with 81.4 μM of 2,4-D and was subcultured in medium without brown hormones turned to black, while with 4.5 and 9.0 μM of 2, 4-D color turned green and continued to grow after four weeks (Figure 4). In contrast, callus from 135.7 μM of picloram blackened and did not grow any of the concentrations of 2, 4-D where subcultured.

Although in most protocols that auxin act as an inducer for effective callus proliferation is accomplished by reducing or eliminating auxin in the culture medium. In callus of *Heliconia* this behavior was not observed. In some plant species, auxins are required to continue the callus proliferation (Jiménez and Thomas, 2005) and this was the behavior observed in callus of *Heliconia collinsiana* where the removal of 2, 4-D in the culture medium caused blackening.

Cuadro 3. Crecimiento de callos (g) de *Heliconia collinsiana* en la etapa de proliferación cultivados en medio MS (1962) en fotoperíodo de 16 h.

Table 3. Callus growth (g) of *Heliconia collinsiana* in the proliferation stage cultivated on MS medium (1962) in 16 h of photoperiod.

Procedencia del callo	2, 4-D (μM)	8 semanas		12 semanas		16 semanas	
2, 4-D (81.4 μM)	0	0.0	b	0.0	b	0.0	b
	4.5	2.21	a	3.55	a	5.36	a
	9.0	2.59	a	3.80	a	5.54	a
Picloram (135.7 μM)	0	0.0	b	0.0	b	0.0	b
	4.5	0.0	b	0.0	b	0.0	b
	9.0	0.0	b	0.0	b	0.0	b
	DMS	0.5		0.7		0.8	

Medias con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

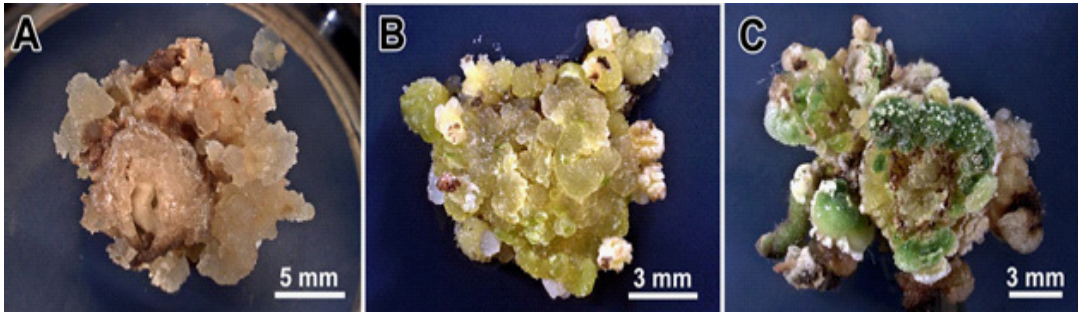


Figura 4. Proliferación de callos inducidos con 81.4 μM de 2, 4-D en secciones transversales basales de pseudotallo de *Heliconia collinsiana* subcultivados en medio MS (1962) en fotoperíodo de 16 h. (A) callos en medio sin fitohormonas a las cuatro semanas; (B) callos con 4.5 μM de 2,4-D; y (C) con 9.0 μM a las ocho semanas.

Figure 4. Callus proliferation induced with 81.4 μM of 2, 4-D in basal cross sections of pseudostem for *Heliconia collinsiana* subcultured on MS medium (1962) in 16 h photoperiod. (A) callus medium without phytohormones at four weeks; (B) callus with 4.5 μM of 2,4-D; and (C) with 9.0 μM at eight weeks.

Si bien, en la mayoría de los protocolos en los que las auxinas actúan como un inductor eficaz de los callos, su proliferación se logra con la reducción o eliminación de la auxina del medio de cultivo. En los callos de *Heliconia* no se observó este comportamiento. En algunas especies de plantas se requieren de las auxinas para continuar la proliferación de los callos (Jiménez y Thomas, 2005) y este fue el comportamiento observado en los callos de *Heliconia collinsiana*, donde la eliminación del 2, 4-D del medio de cultivo provocó el ennegrecimiento de los callos.

Aunque en los callos obtenidos con el 2,4-D sólo fue posible observar masas compactas sin el desarrollo de nódulos, que podrían ser indicadores de embriones somáticos como sucede en *Musa* (Jalil *et al.* 2008), con este protocolo se sientan las bases para, en un futuro y controlando las condiciones de fotoperiodo y componentes del medio de cultivo y hormonas, se pueda inducir la embriogénesis somática en esta especie ornamental o establecer algún programa de transformación genética.

Conclusiones

En el presente estudio fue factible inducir la formación de callos *in vitro* en explantes de secciones transversales basales de pseudotallo de *Heliconia collinsiana* cultivados en medio MS (1962) adicionado con 2,4-D (81.4 μ M) y picloram (135.7 μ M) combinado con 0.5 g L⁻¹ de carbón activado durante 12 semanas en oscuridad. Con estas concentraciones hormonales se obtuvieron 100% y 90% de inducción, respectivamente. En la etapa de proliferación, los callos generados con 81.4 M de 2, 4-D continuaron su crecimiento cuando se subcultivaron en medio MS (1962) suplementado con 4.5 y 9 μ M de 2, 4-D a las 16 semanas en fotoperiodo de 16 h. Los explantes de ápices de raíz, segmentos hoja y peciolo fueron incapaces de generar callos en ninguno de los tratamientos probados.

Literatura citada

- Ahmed, A. B.; Rao, A. S.; Rao, M. V. and Taha, R. M. 2011. Effect of picloram, additives and plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Phyllanthus nodiflora* (L.) Greene. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54:7-13.
- Atehnkeng, J.; Adetimirin, N. O. and Ng, S. Y. C. 2005. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for somatic embryogenic competence. *Afr. J. Biotechnol.* 5:1324-1329.
- Berry, F. and Kress, W. J. 1991. *Heliconia*: An identification guide. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. 335 pp.
- Beyl, C. A. 2005. Getting started with tissue culture: Media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. *In*: Robert, N.; Trigiano, K.; Dennis, D. and Gray, J. (Eds.). *Plant Development Biotechnol.* CRC PRESS LLC. 19-37 pp.
- Criley, R. A. 2000. Seasonal flowering patterns for *Heliconia* shown by grower records. *Acta Hort.* 541:159-165.
- Deo, P. C.; Tyagi, A. P.; Taylor, M.; Harding, R. and Becker, D. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific J. Natural Appl. Sci.* 28:27-40.
- Fehér, A. 2005. Why somatic plant cells start to form embryos? *In*: somatic embryogenesis. (Ed.) Mujib, A. and Samaj, J. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 85-101 pp.
- Fehér, A.; Pasternak, T. P. and Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell. Tissue Organ Culture* 74:201-228.
- Filippi, S. B.; Apezato-da-Gloria, B. and Rodríguez, A. P. M. 2001. Histological changes in banana explants, cv. Nanica (Musa spp., group AAA), submitted to different auxins for induction of somatic embryogenesis. *Rev. Bras. Bot.* 24:595-602.

Although in the calluses obtained with 2,4-D it was only possible to observe compact masses without nodule development, which could be an indicator of somatic embryos as in *Musa* (Jalil *et al.* 2008), with this protocol provides the basis to, in the future, and controlling the photoperiod conditions and culture media components and hormones can induce somatic embryogenesis in this species of ornamental or establish a genetic transformation program.

Conclusions

In the present study it was possible to induce the formation of callus *in vitro* in basal sections crosses of explants of pseudostem *Heliconia collinsiana* grown on MS medium (1962) supplemented with 2,4-D (81.4 μ M) and picloram (135.7 μ M) combined with 0.5 g L⁻¹ of activated carbon for 12 weeks in the darkness. With these hormone concentrations were obtained 100% and 90% of induction, respectively. In the proliferation stage, the callus generated 81.4 μ M of 2, 4-D continued to grow when sub-cultured on MS medium (1962) supplemented with 4.5 and 9 μ M of 2, 4-D at 16 weeks in photoperiod of 16 h. Explants root tips, leaf and petiole segments were unable to generate callus in any of the treatments tested.

End of the English version



- Jalil, M.; Chee, W. W.; Othman, R. Y. and Khalid, N. 2008. Morphological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Sci. Hort.* 117: 335-340.
- Jalil, M.; Khalid, N. and Yasmin, R. 2003. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell. Tissue Organ Culture.* 75:209-214.
- Jiménez, V. M. and Thomas, C. 2005. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. *In: Plant Cell Monogr.* (Ed.). Mujib, A. and Samaj J. Somatic embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 103-118 pp.
- Karami, O. and Saidi, A. 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol. Biol. Rep.* 37: 2493-2507.
- Lincy, A. K.; Remashree, A. B. and Sasikumar, B. 2009. Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Acta Bot. Croat.* 68:93-103.
- Loges, V. A.; Castro, C.; Costa, A. S.; Verona, A. L.; Nogueira, L. C.; Guimarães, W. N.; Castro, M. F. and Bezerra, M. 2007. The ornamental attributes of *Heliconia* for landscape design in Brazil. *Acta Hort.* 743:75-80.
- Marulanda-Ángel, M. L.; Isaza-Valencia, L. y Londoño-Giraldo, L. M. 2011. Propagación *in vitro* de *Heliconia bihai* (L.) cv. Lobster Salmón a partir de meristemos florales. *Acta Agronómica* 60:132-139.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15:473-493.
- Murguía, G. J.; Lee, H. E. y Landero, T. I. 2007. La horticultura ornamental en el estado de Veracruz, México. *Actas de Horticultura* 48:485-488.
- Nathan, M.; Goh, C. and Kumar, P. 1992. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. *HortScience* 27:450-452.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2003. SAS user's guide. Statistics. Version 9.1. SAS Inst., Cary, NC. USA. Quality, and elemental removal. *J. Environ. Qual.* 19:749-756.
- Sidha, M.; Suprasanna, P.; Bapat, V. A.; Kulkarni, U. G. and Shinde, B. N. 2007. Developing somatic embryogenic culture system and plant regeneration in banana. Bhabha At. Res. Centre (BARC) Newslett. 285:153-161.
- Smitha, P. D. and Ashalatha, N. S. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid banana cultivars (*Musa acuminata* cv. Chingan and *Musa acuminata* cv. njalipoovan) from Kerala. *Indian J. Plant Gen. Res.* 23:69-72.
- Sosa, R. F. M.; Soto, O. R.; Machado, A. P. y Hernández, P. R. 2008. Propagación *in vitro* de *Heliconia standley* Macbride. *Biotecnología Vegetal.* 1:43-50.
- Srangsam, A. and Kanchanapoom, K. 2003. Thidiazuron induced plant regeneration in callus culture of triploid banana (*Musa* spp.) 'Gros Michel', AAA group. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 25:689-696.
- Stasolla, C.; Bozhkov, P. V.; Chu, T. M.; Van, Z. L.; Egertsdotter, U. and Suárez, M. F. 2004. Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiol.* 24:1073-1085.
- Strosse, H.; Schoofs, H.; Panis, B.; Andre, E.; Reyniers, K. and Swennen, R. 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and plantains (*Musa* spp.). *Plant Sci.* 170:104-112.
- Teixeira da Silva, J. A. 2003. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *Afr. J. Biotech.* 2:683-91.
- Thomas, T. D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. Adv.* 26:618-631.
- Ulisses, C.; Camara, T.; Willadino, L. and Albuquerque, C. 2007. Induction of somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy pink and cv. Sexy Scarlet from sections of ovaries. *Ver. Brasileira Ciênc. Agrárias* 2:281-284.