

# **Organogénesis directa y múltiple en tejidos juveniles de guandú o gandul [Cajanus cajan (L.) Millsp.]**

**Clara Montero<sup>1</sup>, Enilda Macías<sup>1,2</sup> y Luis Wong-Vega<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología, Universidad Católica Santa María La Antigua (USMA)

<sup>2</sup>Laboratorio de Patología Especial, Caja de Seguro Social de Panamá.

*e-mail: lwong@usma.ac.pa*

---

Palabras clave:

Guandú, gandul, regeneración vegetal, cultivo in vitro, epicótilos, organogénesis, biotecnología vegetal

## **Resumen**

No obstante ser una especie de alto consumo mundial, *Cajanus cajan* es una especie muy poco estudiada a nivel biotecnológico, especialmente en lo concerniente a los cultivares que se explotan en regiones como Latinoamérica. Su estudio a través de los procedimientos de la biotecnología y de la ingeniería genética implican la necesidad de contar con protocolos eficientes y fiables para la regeneración in vitro de esta especie. En el presente trabajo, partiendo de variedades americanas, hemos podido desarrollar un protocolo que reúne estas características, en donde a partir de tejidos somáticos inmaduros de *C. cajan*, logramos inducir la formación múltiple de vástagos, los cuales son posteriormente enraizados, generando plantas vigorosas.

## **Introducción**

El guandú o gandul (*Cajanus cajan*, una fabácea) es una importante leguminosa de áreas tropicales y subtropicales, por cuanto representa un importante componente de la dieta de estas regiones. En estas zonas, el guandú o gandul (*Cajanus cajan*) es una especie interesante, por diversas razones: a) Su ciclo de vida y sus características la hacen un buen modelo para estudiar la base molecular de ciclos biológicos vegetales; b) Se emplea como agente de control biológico de malezas muy agresivas (v.gr. *Saccharum spontaneum*) y c) Es una leguminosa muy apreciada en la comida caribeña (Colombia, Panamá, Cuba, Santo Domingo, Puerto Rico)

C. cajan es una importante fuente de proteínas. Algunos autores, (Geetha et al) reportan que el contenido proteico del guandú puede ser dos veces o más superior al de varios cereales, pero al igual que otros granos, carece de algunos aminoácidos esenciales específicos. Avances recientes en la modificación genética de leguminosas podría conducir a mejorar este aspecto, así como su contenido vitamínico y factores fisiológicos adicionales tales como su contenido en pigmentos, por ejemplo. Para todo ello, es fundamental disponer de un protocolo de regeneración tisular in vitro, confiable.

Existen reportes de cultivo tisular en C. cajan, en donde se ha ensayado el potencial regenerativo de diferentes tipos de explantes de esta planta. Franklyn et al (1) reportan la regeneración de plantas de *Cajanus cajan* por vía organogénica, a partir de explantes provenientes de ejes embrionarios maduros. Esto autores regeneraron vástagos a partir de las regiones apicales de explantes de ejes embrionarios, después de incubación en la oscuridad por veinte días, en medio Murashige Skoog (MS) modificado, conteniendo 8.86 uM Benzylaminopurina (BAP) y 1.07 uM Ácido Naftalénacético (NAA).

La regeneración de *Cajanus cajan* por vía organogénica ha sido reportada también por Mohan y Krishnamurty (2), partiendo de segmentos cotiledonarios distales, extraídos de semillas maduras. Explantes de dos genotipos hindúes fueron cultivados en seis medios distintos, conteniendo 22.2 uM de Benzylaminopurina (BAP), 2.3 uM Kinetina (Kin) y 271 uM Ade.

La inducción múltiple de vástagos y una alta frecuencia de regeneración organogénica en plantas de *Cajanus*, a partir de explantes de semillas, ha sido reportada por Geetha et al (3). Estos autores probaron diversos tipos de explantes (epicótilo, hipocótilo, hojas, cotiledones y segmentos nodales cotiledonarios de semillas germinadas de siete días de edad) los cuales fueron cultivados con distintas concentraciones de Benzylaminopurina (BAP), Kinetina (Kin), combinaciones de BAP/Kin y otras hormonas no citokinínicas.

Anbazhagan y Ganapathi (6) reportaron la inducción de embriogénesis somática a partir de cultivos celulares de *Cajanus cajan*. Callos derivados de células producidas a partir de tejido foliar, generaron embriones somáticos, a partir de inducción en medio semisólido MS, suplementado con 4.52 uM 2,4-Ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D). La mayoría de las células modificadas por la acción hormonal evolucionaron hasta la fase de proembriones esféricos. Evolución subsiguiente de este tejido provocó embriones en distintas fases: globular, corazón y torpedo.

Como puede apreciarse, la práctica totalidad de este trabajo ha sido realizado utilizando cultivares provenientes de la India. Muchos de los protocolos reportados en la literatura sobre esta especie, reportan contradicciones y necesitan ser validados o adaptados en otras variedades explotadas fuera del subcontinente indio, tales como las cultivadas en América Latina.

## **Materiales y Métodos**

### **a) Material vegetal**

El material vegetal utilizado en este estudio provino inicialmente de dos cultivares (cv. Criollo, cv. Peruano). En pruebas preliminares el cv. Peruano mostró mejor respuesta a los tratamientos de asepsia y germinación. Por esta razón, fue el cultivar seleccionado para continuar con el estudio. Las semillas maduras de *C. cajan* se seleccionaron, según su apariencia sana, en especial, aquellas con tegumento pigmentado (moteado) y de tamaño uniforme. Los tratamientos de asepsia empelados sobre esta semillas ya han sido descritos (Montero et al, 2004). La eficacia de cada tratamiento primario y secundario fue evaluada cada día, considerándose positiva la ausencia de signos externos de crecimiento de fitopatógenos (ni sobre el material vegetal, ni sobre el medio de cultivo) por inspección visual o estereomicroscópica, al término de la experiencia que fue de dos semanas. El criterio de selección que se tuvo en cuenta fue la germinación y desarrollo de las plántulas a los 7 días de sembrada la semilla. Si alguna planta gozaba de buen desarrollo pero presentaba contaminación no se contaba como positiva. Igualmente si alguna semilla germinada estaba libre de contaminación pero presentaba un desarrollo notoriamente deficiente o ausente, se descartaba.

### **b) Ensayos de regeneración organogénica de *Cajanus cajan* a partir de primordios foliares, epicótilos, nodos, hipocótilos y raíces.**

Semillas de *C. cajan* cv. Peruano fueron desinfectadas según el procedimiento seleccionado y descrito y germinaron en medio MS básico sin modificaciones a 23°C + 1 con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad. Al cabo de 7 días de incubación se recolectaron 30 plántulas y se disectaron cinco tipos diferentes de explantes a partir de ellas: primordios foliares, epicótilos, nodos, hipocótilos y raíces. Dichos explantes se reesterilizaron nuevamente con la mezcla de agrimicin, carbamato y benlate al 0.3% cada uno, por un minuto y se sembraron, cinco explantes por frasco, en tres medios de cultivo a saber: MS enriquecido con BAP 9mM + ANA 1.5mM, MS enriquecido con BAP 5mM + 2,4-D 1 mM y MS enriquecido con BAP 7.5 mM + IBA 1.4 mM. Los explantes se incubaron por 21 días en oscuridad, al cabo de los cuales fueron transferidos a un régimen de 16/8 horas luz/ oscuridad, esperando la aparición de vástagos. Una vez que los vástagos aparecieron y presentaron algún crecimiento, se disectaron eliminándose el tejido calloso y con necrosis. Los vástagos fueron trasladados a medio MS básico para elongación. 21 días después se pasaron a medio MSR (MS enriquecido con 2.4mM de IBA), para inducir raíces. Aquellas plantas que desarrollaron raíces se pasaron inicialmente a una jarra Magenta con vermiculita, por 4 semanas, luego pasaron a una mezcla de vermiculita y tierra en proporción 1:1, para su aclimatación.

### **c) Regeneración organogénica mediante formación de vástagos múltiples y regeneración de plantas.**

Semillas de *C. cajan* esterilizadas por el método de asepsia establecido en el procedimiento anterior, se germinaron en medio MS básico. Al cabo de 7 días de incubación a 23+1 °C se recolectaron 60 plántulas y se disectaron en cinco tipos de explantes: primordios foliares, epicótilos, nodos, hipocótilos y raíces. Los explantes se reesterilizaron nuevamente con la mezcla antiséptica descrita por un minuto y se sembraron en MS complementado con BAP 2mg/L (8.7 uM). Los explantes se dividieron en dos grupos para su incubación 30 en oscuridad absoluta y 30 en un

régimen de 16/8 horas luz/ oscuridad , durante lapsos de cuatro semanas, al cabo de las cuales se observó formación de vástagos múltiples. Los vástagos generados fueron transferidos a medio MS enriquecido con BAP 1 $\mu$ M + ANA 1  $\mu$ M, por cuatro semanas más, permaneciendo en las mismas condiciones de oscuridad y luz/oscuridad, en que habían sido incubadas inicialmente. Posteriormente, dichos vástagos ya elongados, de más o menos tres centímetros de largo, fueron escindidos y llevados a medio MS complementado con 0.2 mg/L de IBA para enraizamiento, y se incubaron en las condiciones iniciales de luz/oscuridad. Aquellas plantas que desarrollaron raíces se pasaron a envases de Magenta con vermiculita, por 4 semanas, luego pasaron a una mezcla de vermiculita y tierra en proporción 1:1. para su aclimatación.

#### d) Diseño estadístico para los experimentos

Los experimentos se diseñaron de diferentes formas dependiendo del objetivo que se buscaba en cada uno de ellos. De esta forma, en el experimento para determinar el método de asepsia, las semillas fueron asignadas al azar a los tres tratamientos, en un diseño factorial con dos factores, A, correspondiente a los medios de germinación a tres niveles y B correspondiente al método de asepsia, a cuatro niveles. El segundo estudio se diseñó con la finalidad primordial de detectar en cual de los explantes se podía generar la mayor cantidad de vástagos. Se planteó la hipótesis, que en uno de tres medios diferentes de cultivo, se presentaría la mayor cantidad a partir de, al menos, uno de los cinco diferentes explantes. Igualmente se compararon diferentes tipos de explantes juveniles para identificar aquel con mayor potencial organogénico, generando la mayor cantidad de retoños. Así mismo, se ensayaron diversas formulaciones de medio y de fitohormonas y se compararon contra variaciones en condiciones de exposición a luz y oscuridad. Todos los estudios se llevaron a cabo a un nivel de confianza de  $\alpha = 0.05$  ó 5%. Se realizaron análisis de varianza para los diferentes datos obtenidos utilizando el programa estadístico SPSS versión 11.5. Para comparar las medias de los tratamientos que fueron aplicados, se realizó una prueba de comparación múltiple de Duncan al nivel de probabilidad de 0.05. En el caso de la comparación de tratamientos con un control la realizó la prueba de Dunnet a un nivel de significancia de 0.05. Se realizaron pruebas de homogeneidad de varianzas y se realizaron transformaciones de raíz cuadrada para estabilizar la varianzas y cumplir con los supuestos de los modelos empleados. Para confirmar los supuestos del modelo se generaron las gráficas correspondientes a los residuos y pronosticados, donde se observaba la normalidad y aleatorización de los datos.

## **Resultados**

Los ensayos efectuados para inducir la formación organogénica directa de vástagos demostraron que la formulación de medio MS complementado con BAP 9 $\mu$ M + ANA 1.5 $\mu$ M resultó ser la más eficiente, siendo los primordios foliares el tipo de explante que rindió los mejores resultados. Los demás explantes, epicótilos, hipocótilos y raíces, formaron callos que tomaron rápidamente un color marrón o chocolate y posteriormente murieron. Los nodos formaron en los primeros 21 días un 10% vástagos, pero posteriormente estos vástagos se transformaron en tejido calloso, por lo que no fueron considerados dentro de este estudio.

	<b>Formación de callo %</b>	<b>Formación de vástagos %</b>
<b>Primordios foliares</b>	51.3	16.53
<b>Epicótilos</b>	90.0	0.0
<b>Nodos</b>	91.0	6.5
<b>Hipocótilos</b>	99.7	0.0
<b>Raíz</b>	90.3	0.0

Tabla 1. Porcentaje de formación de callo y vástagos por explante a los 63 días en el medio 1.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>21 DIAS</b>	<b>42 DIAS</b>	<b>63 DIAS</b>
1	10.0	8.7	1.0
2	0.0	0.0	0.0
3	30.0	28.7	28.7

Tabla 2. Promedio del porcentaje de nodos que formaron brote a los 21,42 y 63 días de cultivadas "in vitro" en diferentes medios de cultivo.

La incubación de los primordios foliares en condiciones de oscuridad no resultó en una mayor formación de vástagos. Empero, transcurridos los 21 días de incubación en oscuridad, un traslado a un régimen de fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad condujo a un incremento en la formación de vástagos a partir de los 42 días de cultivo. El crecimiento observado en todos los casos reportados fue de  $2 \pm 1$  cm, previo a su traspaso a medio de enraizamiento.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>21 DIAS</b>	<b>42 DIAS</b>	<b>63 DIAS</b>
1	3.3	20.0	26.7
2	0.0	25.7	25.7
3	10.0	54.3	54.3

Tabla 3. Promedio del porcentaje de primordios foliares que formaron vástagos a los 21, 42 y 63 días de cultivadas "in vitro" en los medios 1,2 y 3.

Medios:

1. MS complementado con BAP 9 $\mu$ M + ANA 1.5 $\mu$ M
2. MS complementado con BAP 5 $\mu$ M + 2,4-D 1 $\mu$ M
3. MS complementado con BAP 7.5  $\mu$ M + IBA 1.4 $\mu$ M

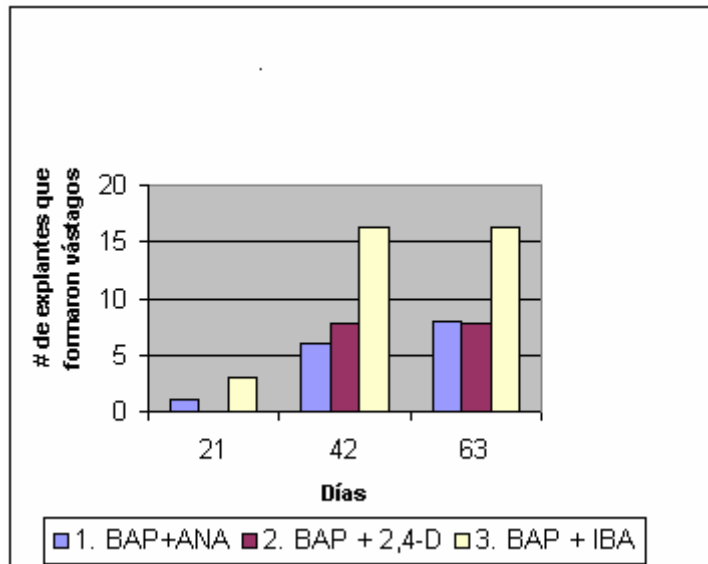


Tabla 4. Formación de vástagos en los medios 1,2 y 3 a partir de primordios foliares.

Después de 63 días, los vástagos provenientes de primordios foliares generados fueron transferidos a medio MS y MSR (MS + IBA 2.4  $\mu$ M). A los 10 días de incubación en medio MS basal, alrededor de un 13.3% de los vástagos presentó la formación de raíces adventicias; mientras que en el otro tratamiento ensayado (medio MSR) la inducción de raíces fue más lenta pero relativamente mayor: 22 días después, un 25 % de los vástagos transferidos había formando raíces. Empero, se observaron irregularidades en cuanto al vigor de las plantas enraizadas en ambos tipos de medio durante lapsos posteriores a la transferencia (datos bajo examen).

	Formación de callo %	Formación de vástagos %
<b>Primordios foliares</b>	54.7	39.3
<b>Epicótilo</b>	61.3	0.0
<b>Nodos</b>	29.0	27.7
<b>Hipocótilo</b>	53.0	0.0
<b>Raíz</b>	50.0	0.0

Tabla 5. Porcentaje de formación de callo y vástagos por explante a los 63 días en el medio 3.

Paralelamente, se ensayó la formación de vástagos en medio MS complementado con BAP 7.5  $\mu$ M + IBA 1.4 $\mu$ M. Del total de explantes sembrados se recuperó un 10 % de formación de vástagos a partir de primordios foliares, a los 21 días de incubación. En este medio, los nodos cotiledonares presentaron un 30% de formación de vástagos. Los epicótilos, hipocótilos y raíces formaron únicamente callos.

Luego de 63 días los vástagos provenientes de primordios foliares se pasaron a medio MS basal, con el fin de provocar su elongación, para lo cual se les incubó durante 8 días más en medio basal MS y luego fueron transferidos a medio MSR, en donde a los 25 días de incubación se observó formación de raíces en un 18% de los explantes originales y un 66% con crecimiento o formación de vástagos nuevos. De estos, aquellos que presentaron raíces fueron transferidos a vermiculita, por espacio de cuatro semanas y posteriormente a tierra. De esta experiencia se obtuvo un rendimiento relativamente bajo (3%) de plantas regeneradas *in vitro* vía organogénesis directa. Este experimento se realizó nuevamente, en tres repeticiones, obteniéndose los resultados que se observan en la tabla siguiente:

Medio	1			2			3		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
<b>Primordios foliares</b>	14	0	10	19	4	0	25	10	4
<b>NODOS</b>	0	1	0	0	0	0	11	11	8

Tab.6 Número de explantes que formaron vástagos a partir de primordios foliares en los medios 1, 2 y 3.

Se observó que en el tratamiento 3 es mayor el promedio de retoños, tanto en el explante 1 (primordios foliares), como en el 2 (nodos). La prueba de comparación múltiple de Duncan mostró que la media del tratamiento 3 es significativamente diferente al 1 y 2 estos dos últimos son iguales.

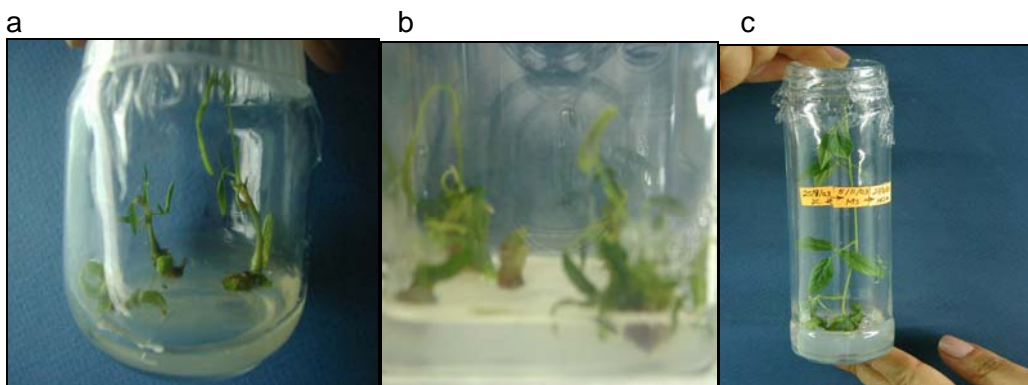


Figura 1.  
a. Nodos en tratamiento A.  
b. Nodos en tratamiento C.  
c. Primordios foliares en tratamiento C.

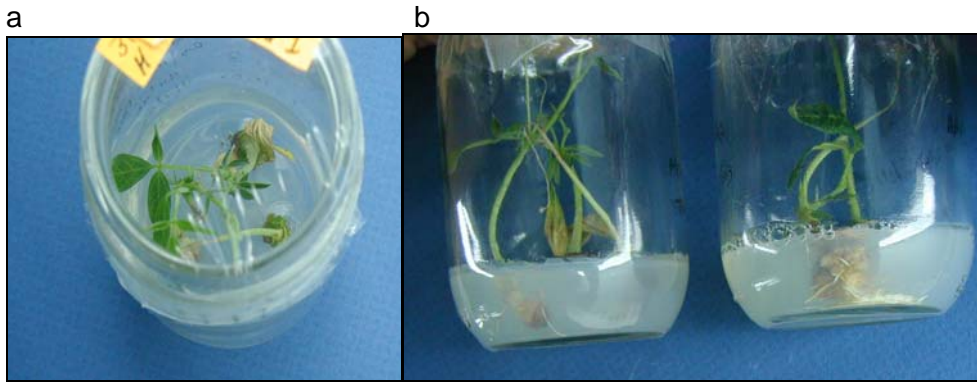


Figura 2.

- a. Primordios foliares en medio A.  
b. Vástagos obtenidos a partir de primordios foliares incubados en medio A, enraizados.

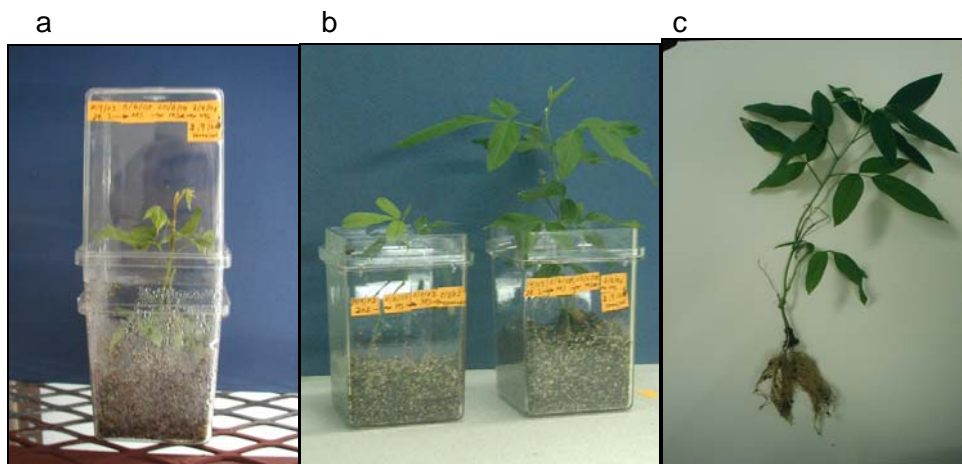


Figura 3

- a y b. Plantas regeneradas a partir de primordios foliares incubados en el Tratamiento C en fase de aclimatación.  
c. Planta completamente regenerada.

En base a los resultados de las experiencias preliminares, se efectuaron ensayos de regeneración organogénica mediante formación de vástagos múltiples. Para ello, los explantes fueron divididos en dos tratamientos: uno, bajo incubación en oscuridad y otro, bajo régimen de luz-oscuridad. Se utilizaron los cinco tipos de explantes previamente mencionados, obteniéndose los resultados siguientes:

LUZ	NODOS			EPICÓTILO			HIPOCÓTILO			PRIMORDIOS FOLIARES			RAIZ		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Callo	8.30	0.0	0.0	25.0	100	76.6	41.6	66.6	56.6	50.0	75.0	100.0	50.0	16.6	0.16
	25.0	33.3	50.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	80.0	0.0	0.0	0.0
Brote															
OSCURIDAD	NODOS			EPICÓTILO			HIPOCÓTILO			PRIMORDIOS FOLIARES			RAIZ		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Callo	8.30	6.6	13.3	66.6	40.0	43.0	66.6	8.35	53.0	100.0	80.0	100.0	16.6	23.0	4.0
	41.6	53.3	26.66	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	66.6	33.3	86.66	0.0	7	0.0
Brote															

Tabla 7. Comparación de tratamientos oscuridad vs. fotoperíodo 16/8

En condiciones de incubación en oscuridad, la formación de callos fue mayor para la mayoría de los explantes ensayados. La formación de vástagos se observó principalmente en los primordios foliares y en nodos. El análisis de varianza a un nivel de significancia del 5% concluyó que el modelo utilizado para el experimento fue adecuado ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, se confirmó que no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos luz (1) y oscuridad (2), sobre la aparición de vástagos; en cambio si hubo diferencia en cuanto al número de vástagos que formaban los diferentes tipos de explantes ( $p < 0.05$ ). La prueba de Duncan de rangos múltiples mostró que los explantes 4 (primordios foliares) y 1 (nodos), son los más apropiados para obtener vástagos. A partir de estos ensayos se hicieron nuevas réplicas, pero se trabajó solamente con primordios foliares por ser los explantes que presentaron una mejor respuesta.

Luz	Nodos %	Epicótilos %	Hipocótilos %	P.F. %	Raíz %
Callo	2.77	67.2	54.9	75.0	22.3
Vástago	36.1	0	2.77	26.7	0
Oscuridad	Nodos %	Epicótilos %	Hipocótilos %	P.F. %	Raíz %
Callo	9.4	49.9	42.65	93.3	36.2
Vástago	40.52	0	0	62.2	0

Tabla 8. Porcentajes de formación de brote y callo vs. tipos de explante (P.F.= primordio foliar)

Réplica	Formación de callo %			Formación de vástagos %		
	1	2	3	1	2	3
Primordios foliares	82	87	83	30	37	35

Tabla 9. Porcentaje de formación de brotes y callos, en primordios foliares

La inducción de eventos de organogénesis múltiple se obtuvo mediante incubación de estos explantes en medio MS complementado con BAP 2mg/L (8.7  $\mu$ M). La inducción de vástagos se observó después de 21 días de incubación en oscuridad, con un promedio de  $3 \pm 1$  vástagos por explante tratado. Al cabo de 4 semanas los vástagos múltiples alcanzaron una longitud de  $4 \pm 1$  cm cada uno, pero presentaban una apariencia clorótica. Los vástagos recuperaron su vigor al pasarlos a condiciones de 16/8 horas luz/oscuridad e incubarlos en medio MS suplementado con IBA 5.8  $\mu$ M para enraizamiento, formando también nuevas hojas y raíces. En este último medio, alrededor de un 50% de los vástagos tratados formaron raíces.

Para corroborar estos resultados, ambos dos tratamientos (oscuridad y régimen de luz/oscuridad) se aplicó una prueba de comparación de medias o t-Student para muestras independientes. Se observó que el promedio del número de vástagos es diferente en los tratamiento de luz y oscuridad, a un nivel de confianza del 5%.

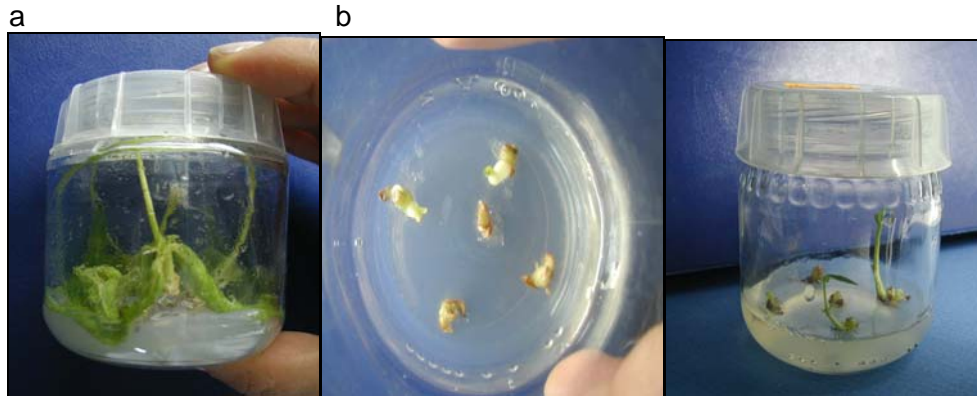


Figura 4.  
a. Primordios foliares incubados en luz  
b. Nodos incubados en luz  
c. Nodos incubados en oscuridad.

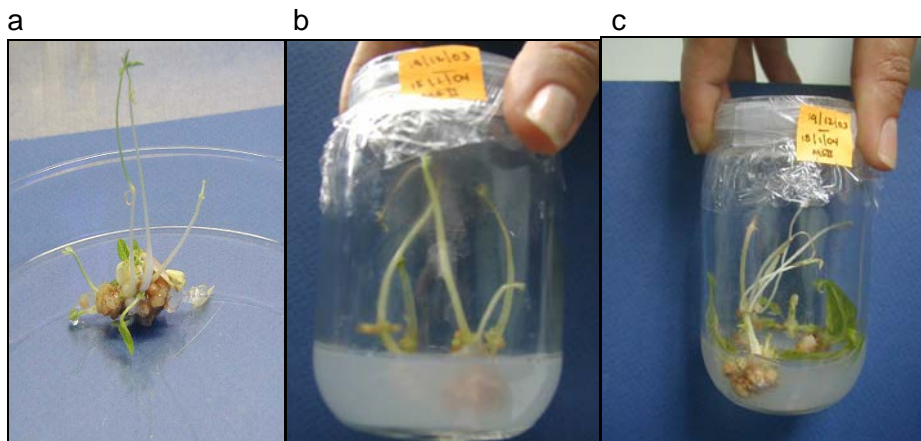
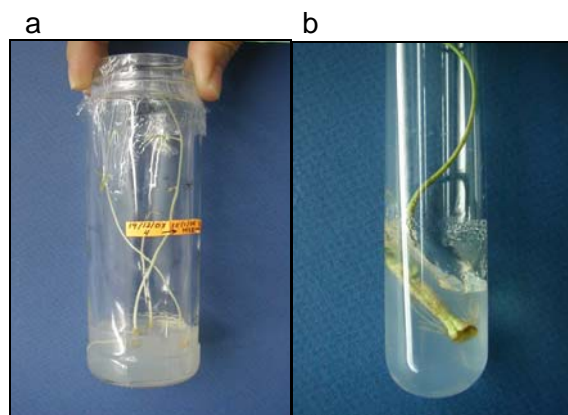


Figura 5  
a, b y c. Formación de vástagos múltiples a partir de primordios foliares incubados en oscuridad



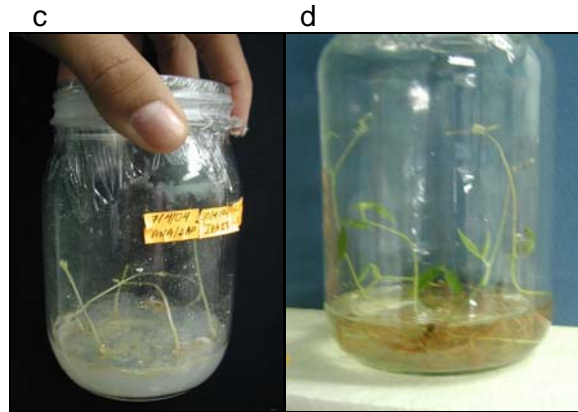


Figura 6

- a. Vástagos elongados en medio con BAP y ANA
- b. Formación de las primeras raíces en medio con IBA
- c. Vástagos en medio con IBA para enraizamiento
- d. Vástagos en medio MS líquido para preadaptación a suelo.

## Discusión

Los experimentos con explantes provenientes de cultivares americanos de *Cajanus cajan* han demostrado que es posible su regeneración eficiente por vía organogénica directa, principalmente a partir de tejido foliar inmaduro. Empero, nuestros resultados parecen contradecir lo reportado por ciertos autores (Franklyn et al, Mohan y Krishnamurti) en cuanto al tipo de tejido susceptible a esta inducción.

Aún cuando en las experiencias aquí reseñadas se ha logrado la generación de callos a partir de una diversidad de tejidos in maduros de guandú, los mismos no han sido capaces de generar vástagos (organogénesis indirecta). En experiencias adicionales con tejido maduro (datos no mostrados) hemos conseguido generar callos pro-embriogénicos, utilizando combinaciones de BAP y 2,4-D, sin avanzar más allá de este estadio. Los tejidos foliares inmaduros (primordio foliar, plúmula) presentan una alta respuesta ante la inducción callogénica y organogénica (en el primer caso, casi del orden del 100% y en el segundo, poco más del 66%, datos no mostrados).

Los nodos cotiledonares y los primordios foliares presentan una rápida respuesta organogénica directa, obviando la etapa de formación de callos, ante la incubación con fitohormonas, pasando a formar yemas y vástagos individuales (BAP 9mM + ANA 1.5mM) o múltiples (MS complementado con BAP 2mg/L (8.7 uM)). La incubación de dichos vástagos en este último medio provoca la inducción de organogénesis directa (vástagos múltiples). Los vástagos separados e incubados individualmente presentan una respuesta rápida al tratamiento hormonal de enraizamiento (MS suplementado con IBA 5.8  $\mu$ M). Los primordios foliares sujetos a tratamiento con hormonas e incubados en oscuridad, presentan una alta respuesta organogénica, generando vástagos múltiples. Las plantas originadas por organogénesis múltiple a partir de epicótilos enraízan y crecen como plantas vigorosas (regeneración con viabilidad completa).

## **Agradecimientos**

Los autores desean expresar su agradecimiento al Dr. Pedro V. Him, investigador del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, por sus valiosos consejos y asesoría técnica Ad Hoc. Igualmente desean reconocer el apoyo financiero de la Universidad Católica Santa María La Antigua, que solventó este proyecto a partir de los recursos asignados a la Dirección de Investigación y a su Laboratorio de Biotecnología.

## **Bibliografía**

- "Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of pigeonpea (*Cajanus cajan*)", por Abnazhgan, V.R. y Ganapathi, A. (1999). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 179-184.
- "Thidiazouron-induced shoot regeneration in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.)", por Eapen, S., Tivarekar, S. and George, L. (1998), en *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53 (3) 217-220.
- "Factors affecting regeneration of pigeon pea", por Franklyn, G., Jeyachandran, R. and Ignacimuthu, S. (2000), en *Plant Growth Regulation* 30 (1): 31-36.
- "High frequency induction of multiple shoots and plant regeneration from seedling explants of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.), Geetha, N., Venkatachalam, P., Prakash, V. and Lakshmi Sita, G. In press.
- "Plant Regeneration in pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp) by organogenesis, por Mohan, M.L. y Krishnamurthy, K.V. (1998), en *Plant Cell Reports*, 17 (9): 705-710.
- "Efecto diferencial de tres tratamientos de asepsia en *Cajanus cajan*", por Montero, Clara, Enilda Macías y Luis Wong-Vega (2004), *Invest. pens. crit.* (1): 23-27
- "Agrobacterium mediated transformation of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) and development of transgenic plants via organogenesis, por Geetha, N., Venkatachalam, P., Prakash, V. and Lakshmi Sita, G. (2000) *Plant Biotechnology*, in press.
- "Plant regeneration via somatic embryogenesis in pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp)", por Sreenivasu, K., Malik, S.K., Anada Kumar, P. and Sharma, R.P. (1998), en *Plant Cell reports* 17 (4): 294-297.