

# **EFECTO DE LA SALINIDAD SOBRE LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES INMADUROS DE MAÍZ (*ZEA MAYS* L.)**

Amelia Capote, Lianne Fernández, Melba Cabrera, Heidy Penichet, Alfredo Socorro, Odalys Pérez, Ma. Julia Mendoza, Zoila Palacios y Gloria Acuña.

*Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT).*

*Calle 1 esq. 2, Stgo. de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba.*

[acapote@inifat.co.cu](mailto:acapote@inifat.co.cu)

## **RESUMEN**

Con la finalidad de establecer una metodología *in vitro* que permita diferenciar los genotipos de maíz por su respuesta al estrés salino, se determinó el efecto de cinco concentraciones (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%) de cloruro de sodio (NaCl) sobre la germinación y crecimiento de embriones inmaduros de diferentes accesiones (P 2546, P 683, Tayuyo y Oro) provenientes del Banco de Germoplasma del INIFAT. Los embriones se cultivaron en el medio MS (1962) sin reguladores del crecimiento. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación, la altura de las plántulas (cm), la longitud de las radículas (cm), el número de hojas, así como los contenidos de prolina y la conductividad eléctrica específica en hojas de las plántulas obtenidas como indicadores fisiológicos de la respuesta bajo condiciones salinas. Los resultados mostraron que las variables evaluadas fueron inhibidas con el incremento de la concentración salina hasta alcanzar una supresión total del crecimiento al 2% de NaCl. Las variables longitud de la radícula, los niveles de prolina y la conductividad eléctrica específica mostraron un comportamiento diferenciado según los genotipos y permitieron identificar a los genotipos P 2546 y P 683 como los más susceptibles y al genotipo Tayuyo como el más tolerante, por lo que pueden ser valoradas como posibles indicadores para la selección de materiales tolerantes al estrés salino.

Palabras claves: Cultivo *in vitro*, maíz, salinidad

## **ABSTRACT**

In order to establish an *in vitro* methodology to characterize maize genotypes for their resistance to salinity stress, the effect of five doses (0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%) of sodium chloride (NaCl) on germination and growth of immature embryos were determinate in differences genotypes (P 2546, P 683, Tayuyo y Oro) from Gene Bank of INIFAT. The embryos were culture on MS (1962) media without growth regulators. Germination, plant height, root length and number of leaves and proline content and electrical conductivity in leaves were determinate. Results showed that the variables evaluated were inhibited when saline concentrations increased and were observe a total suppression of growth at 2% NaCl. Root length, levels of proline and electrical conductivity showed a different behaviour among genotypes and allowed

to identify the genotypes P 2546 and P 683 as the most susceptible and the genotype Tayuyo as the most tolerant, so that they can be use as possible markers for selection of salinity tolerant genotypes.

Key words: *in vitro* culture, maize, salinity.

## INTRODUCCION

El maíz (*Zea mays*, L.) se encuentra entre las especies que con mayor frecuencia se cultivan en el trópico y constituye una importante fuente de alimentación desde la época de los aborígenes; sin embargo, en Cuba las características climáticas no son óptimas para su cultivo debido a la presencia de diversos factores bióticos y abióticos que limitan su rendimiento (Fernández *et al.*, 2004).

Entre estos últimos se consideran la sequía y la salinidad, de gran importancia si se tiene en cuenta que actualmente la superficie agrícola de Cuba está afectada en un 14% y existe otro 15% con peligros potenciales de salinización (Rivero *et al.*, 2001), lo que implica una incidencia directa en la producción de alimentos en algunas zonas del país como son las zonas costeras, el Valle de Guantánamo y el sur de las provincias de Pinar del Río y La Habana.

El maíz ha sido clasificado como uno de los cultivos más sensibles a la salinidad del suelo, con una pérdida de más del 10% en suelos con una conductividad eléctrica superior a 2,5 mS/cm, y se estima que el umbral para la reducción del crecimiento este cerca de 1,7 mS/cm (Cramer, 1994).

La introducción de variedades procedentes del CIMMYT y el uso de híbridos cubanos ha posibilitado el incremento de la producción, aunque no se cuenta con un germoplasma resistente a la sequía y la salinidad, por lo que se encuentra entre las demandas del Programa Nacional de Maíz el desarrollo de metodologías de avanzada para la obtención de genotipos tolerantes a estreses abióticos (Fernández *et al.*, 2004).

La mejora y selección genética de este carácter resulta muy difícil mediante el uso de los métodos clásicos en los programas de mejoramiento genético, por lo que se ha propuesto el empleo de técnicas biotecnológicas, las cuales posibilitan la obtención de genotipos tolerantes (Orellana y Peña, 2003).

Dentro de ellas, la variación somaclonal y la selección *in vitro* resultan una poderosa herramienta para la obtención de variedades tolerantes a diferentes estreses abióticos, por lo que han sido empleadas en varios cultivos con resultados alentadores (Tal, 1990). En Cuba, se han utilizado satisfactoriamente en la obtención de genotipos de arroz (González *et al.*, 1993) y caña de azúcar (Díaz *et al.*, 1995) tolerantes a la salinidad.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto tóxico de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) sobre la germinación y el crecimiento de embriones inmaduros, con la finalidad de establecer una metodología *in vitro* que permita diferenciar los genotipos de maíz por su respuesta al estrés salino.

## MATERIALES Y METODOS

Para este estudio se utilizaron los embriones inmaduros de cuatro accesiones de maíz (P 2546, P 683, Tayuyo y Oro) procedentes del Banco de Germoplasma del INIFAT (Tabla 1). Los embriones se cultivaron en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores del crecimiento y la adición de cloruro de sodio (NaCl) a diferentes concentraciones 0 - control, 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0%, que equivalen a conductividades eléctricas de 7,3; 14,6; 22,9 y 32,2 mmhos/cm respectivamente.

Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de 16 horas luz y a una temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 21 días. Las variables evaluadas fueron el porcentaje de germinación, la altura de las plántulas (cm), la longitud de las radículas (cm) y el número de hojas, así como los contenidos de prolina libre (Bates, 1973) y la conductividad eléctrica específica en hojas de las plántulas obtenidas en los tratamientos control, 0,5 y 1% de NaCl, como indicadores bioquímicos y fisiológicos de la respuesta bajo condiciones salinas.

Para determinar la conductividad eléctrica se tomaron discos de hojas, de masa previamente conocida, provenientes de las plántulas de maíz crecidas en medio MS en ausencia de NaCl, y se colocaron en una solución de NaCl a 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% y un control (agua destilada). Las muestras estuvieron en estas soluciones durante 22 horas, tiempo necesario para que cada material pudiera absorber la cantidad de NaCl acorde a su permeabilidad. Luego, las muestras se colocaron en agua destilada durante el tiempo requerido para que el material biológico alcanzara el equilibrio osmótico con la disolución.

**Tabla 1. Genotipos empleados, lugar de procedencia y algunas características de interés.**

Genotipo	Lugar de Procedencia	Características		
		No. de Gr.Hilera	Tipo de Grano	Color del Grano
<b>P 2546</b>	Santiago de Cuba	12-14	Semi-dentado	Amarillo-naranja
<b>P 683</b>	Ciego de Avila	12-14	Cristalino	Amarillo-naranja
<b>Tayuyo</b>	Holguín	12-14	Semi-dentado	Amarillo
<b>Oro</b>	-	12-14	Dentado	Amarillo-naranja

A estas soluciones se le evaluó la conductividad eléctrica, reportando el valor de conductividad eléctrica por unidad de masa o conductividad eléctrica específica “ $\sigma_{esp}$ ”. Estos valores se plotearon respecto a la concentración “C” de NaCl y el ajuste matemático se realizó mediante la siguiente ecuación exponencial:

$$\sigma_{esp} = Ae^{kC} \quad (2)$$

Donde A y k son constantes. A es la conductividad específica a C=0, mientras que k representa la susceptibilidad del material a incrementarse debido al aumento de C. Estos coeficientes fueron calculados mediante el ajuste lineal de los logaritmos de  $\sigma_{esp}$  respecto a C, donde k es la pendiente y ln(A) el intercepto. De este ajuste se obtuvo además el error de dispersión de k. Con estos valores se realizó una prueba “t de student” para comparar entre sí, los coeficientes k para cada variedad.

Con los valores obtenidos de las variables evaluadas en los tratamientos de 0, 0,5 y 1% de NaCl, se realizó un Análisis de Componentes Principales con el objetivo de determinar aquellos indicadores de mayor contribución a la variación obtenida y un Análisis de Conglomerado para la caracterización de los genotipos. Se empleó para ello el programa StatGraphics Plus, Versión 5.0, 1994-2000. Se calcularon los principales estadígrafos de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar y coeficiente de variación) para cada grupo formado utilizando el Programa Excel de Microsoft Office 2003.

## RESULTADOS Y DISCUSION

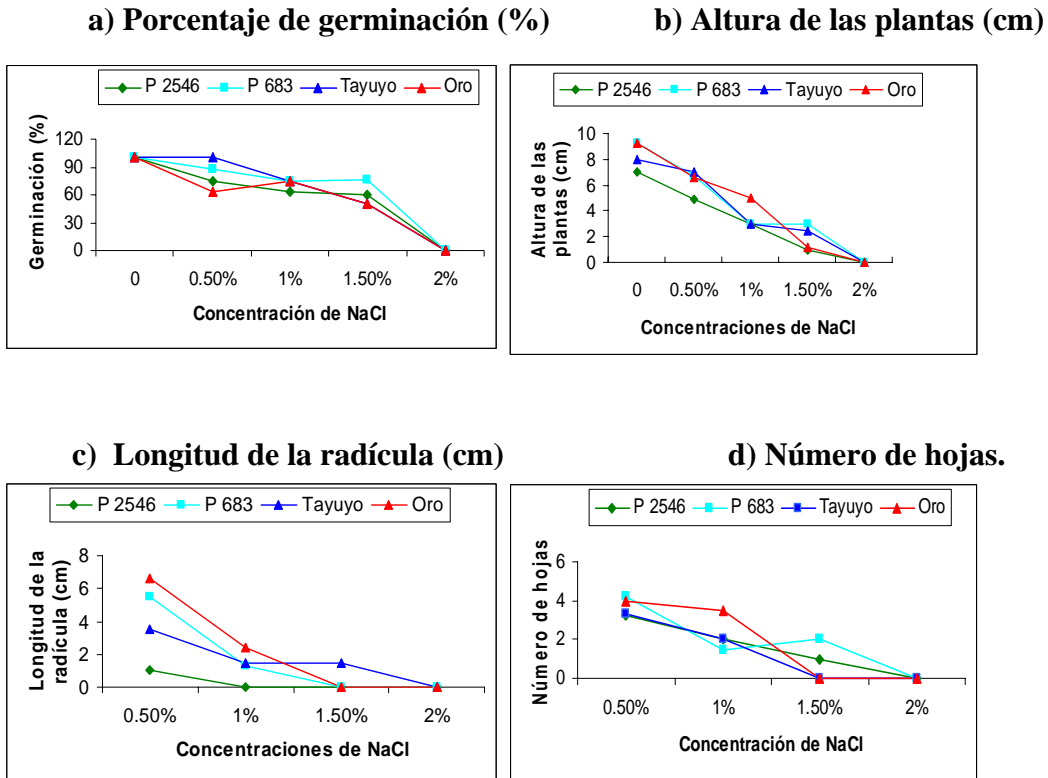
En la figura 1 se muestran las respuestas de las variables evaluadas en las diferentes concentraciones salinas y se observa que para todos los genotipos ocurre una disminución de las variables a medida que aumenta la concentración de NaCl en el medio de cultivo, hasta la completa inhibición del crecimiento a una concentración del 2%.

Los efectos negativos de las altas concentraciones salinas en el medio de cultivo han sido reportados con anterioridad por otros autores, de esta manera se ha encontrado la supresión total del crecimiento de callos de arroz a una concentración de 2% de NaCl en el medio de cultivo (Marassi y Rapela, 1989; Orellana y Peña, 2003).

Como se observó los porcentajes de germinación se mantuvieron casi estables hasta la concentración más alta, indicando que existe un cierto nivel de tolerancia a la salinidad en esta etapa, lo cual coincide con lo planteado por Mass *et al.* (1983), quienes reportaron que el maíz es tolerante a la salinidad al germinar, pero sensible en otras etapas, sobre todo en la fase de plántulas.

Resultados obtenidos anteriormente (González y Ramírez, 1999; Murillo, 2000) señalan que durante la germinación intervienen mecanismos fisiológicos, probablemente relacionados con los primeros ciclos de división celular del embrión, los cuales parecen ser más resistentes al estrés salino que los procesos fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante el crecimiento de las plántulas.

**Figura 1. Respuesta de las variables evaluadas según la concentración de NaCl.**



Las variables altura de las plantas y número de hojas muestran menor afectación resultando la concentración más alta empleada (2%) capaz de inhibir el crecimiento, mientras que la longitud de la radícula estuvo afectada a partir de una concentración del 1% de NaCl y se observó la total inhibición del crecimiento en el genotipo P 2546, mientras que los genotipos Tayuyo y Oro mostraron los mayores valores de longitud de la radícula (2,38 y 2,0 cm. respectivamente), lo cual puede estar relacionado con un mayor grado de tolerancia al estrés salino inducido.

En la tabla 2 se muestran los valores medios y los porcentajes de inhibición de las variables altura de las plantas, longitud de la radícula y número de hojas en las concentraciones de 0,5 y 1% de NaCl. Los mayores porcentajes de inhibición corresponden a la variable longitud de la radícula y las mayores afectaciones se observan en el genotipo P 2546 (93 y 100% respectivamente).

Se plantea que un mayor crecimiento del sistema radical en condiciones de estrés puede interpretarse como una respuesta de genotipos tolerantes, ya que en condiciones naturales se ha demostrado que los individuos tolerantes garantizan un crecimiento profuso del sistema radical para evadir los efectos de la presencia de sales en el suelo (Meiri, 1994), por lo que esta variable puede ser utilizada como un

indicador no destructivo para la selección de genotipos promisorios (Díaz *et al.*, 1995).

Sin embargo; no siempre esta variable es un indicador de la tolerancia, ya que Musito *et al.* (2004) no encontraron una relación directa entre la longitud de la radícula y los niveles de salinidad estudiados al evaluar diferentes genotipos de maíz, lo que ellos consideran pudo deberse a que las varianzas fenotípicas de los genotipos estudiados eran diferentes, lo cual hizo que en determinado momento se vieran favorecidos o perjudicados ante un ambiente salino.

**Tabla 2. Valores medios y porcentaje de inhibición de las variables evaluadas en dependencia de la concentración de NaCl.**

Variable s	Conc. NaCl.	Genotipos							
		P 2546		P 683		Tayuyo		Oro	
		Medi a	% Inh.	Medi a	% Inh.	Medi a	% Inh.	Medi a	% Inh.
Altura de la planta	Control	7,0	-	9,25	-	8,0	-	9,27	-
	0,5%	4,87	30,47	6,75	27	7,0	12,5	6,6	28,8
	1,0%	3,0	57,14	3,0	67,56	3,0	57,2	5,0	46,1
Longitud de la radícula	Control	15,75	-	12,0	-	10,5	-	12,75	-
	0,5%	1,0	93	5,5	54	3,5	66,7	6,6	48,23
	1,0%	0	100	1,25	89,58	2,0	80,95	2,38	81,33
Número de hojas	Control	3,5	-	3,75	-	3,25	-	3,9	-
	0,5%	3,25	7,2	4,25	-	3,33	-	4,0	-
	1,0%	2,0	42,9	1,5	60	2,0	39	3,5	10,3

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de prolina libre en los tratamientos evaluados. En general se observó que los valores de los controles (MS sin sal) son similares para todos los genotipos y ocurre un incremento de los mismos con el aumento de las concentraciones salinas. Los mayores valores de prolina libre se encontraron en las plántulas crecidas al 1% de NaCl demostrando la respuesta de estos genotipos al estrés.

De los genotipos estudiados el Tayuyo es el que presenta los mayores valores de concentración de prolina (23,50 mM/ gMF), mientras que el genotipo P 683 presenta los niveles más bajos de este aminoácido (20,91 mM/gMF). Esta respuesta diferente pudiera estar relacionada con el grado de tolerancia de los genotipos estudiados, si se

tiene en cuenta que se plantea que el contenido de este aminoácido bajo condiciones normales es muy bajo y aumenta drásticamente bajo la influencia de condiciones de estrés, por lo que se le ha asignado un importante papel en la tolerancia a las condiciones salinas (Stewart y Lee, 1974).

Estos resultados coinciden con los encontrados por Soldatini (1979), quien planteó que en las plantas de maíz sometidas a estrés ocurrió un aumento del contenido de aminoácidos libres, en valores tales que resultaron ser el doble del observado para los controles, específicamente la prolina que aumentó de 2,5 a 3,1 veces.

Se ha sugerido que la salinidad provoca una reducción del potencial hídrico y por tanto, se induce un incremento de la concentración de prolina, lo que favorece el reajuste osmótico y la estabilización celular que mantiene la turgencia foliar evitando la deshidratación y manteniendo un crecimiento adecuado (González y Labrada, 1995).

Así mismo, Ulisses *et al*, (1998) estudiando la respuesta de yemas de plátano al estrés salino encontraron que el aumento de los niveles de NaCl coincidió con el aumento en el contenido de prolina en las yemas, el cual parece contrarrestar el efecto provocado por la presencia de sales.

El estrés tiene un efecto importante sobre la bioquímica y fisiología de las plantas, siendo un ejemplo particular los cambios que ocurren en el contenido total de aminoácidos libres en las hojas, y en particular la prolina, la cual presenta una mayor susceptibilidad a aumentar sus niveles en las plantas estresadas (Katz y Tal, 1980).

**Tabla 3. Concentración de prolina libre en dependencia de los tratamientos estudiados.**

Genotipos	Concentración de NaCl (mM/ gMF)		
	Control	0.50%	1%
<b>P 2546</b>	3.30 ± 0.20	11.55 ± 0.19	21,35 ± 0,5
<b>P 683</b>	3.92 ± 0.06	7.95 ± 0.19	20.91 ± 0,1
<b>Tayuyo</b>	5.00 ± 0.30	15.40 ± 0.40	23.50 ± 0.2
<b>Oro</b>	5.30 ± 0.30	14.47 ± 0.05	21.90 ± 0.3

En la tabla 4 se muestran los valores de conductividad eléctrica específica de los genotipos estudiados. Al analizar el comportamiento exponencial de la conductividad específica respecto a la concentración de NaCl observamos que el exponente k en el genotipo P 530 es mayor respecto al resto (1,57), el cual difiere significativamente del resto ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 4. Valores de la conductividad por unidad de masa o conductividad específica “ $\sigma_{esp}$ ”(S.Kg<sup>-1</sup>) de hoja de maíz en cada variedad y tratamiento.**

Conc. de NaCL	P 2546	P 683	Tayuyo	Oro
<b>0</b>	0.54 ± 0.13	0.14 ± 0.02	0.91 ± 0.10	0.39 ± 0.05
<b>0.5 %</b>	0.48 ± 0.16	0.34 ± 0.02	1.7 ± 0.05	1.0 ± 0.2
<b>1.0 %</b>	0.68 ± 0.04	1.04 ± 0.16	2.2 ± 0.2	0.76 ± 0.02
<b>1.5 %</b>	1.42 ± 0.13	1.97 ± 0.01	2.9 ± 0.2	1.1 ± 0.2
<b>2.0 %</b>	2.32 ± 0.04	2.9 ± 0.4	5.24 ± 0.01	3.70 ± 0.04

**Coefficientes obtenidos mediante el ajuste de la ecuación.**

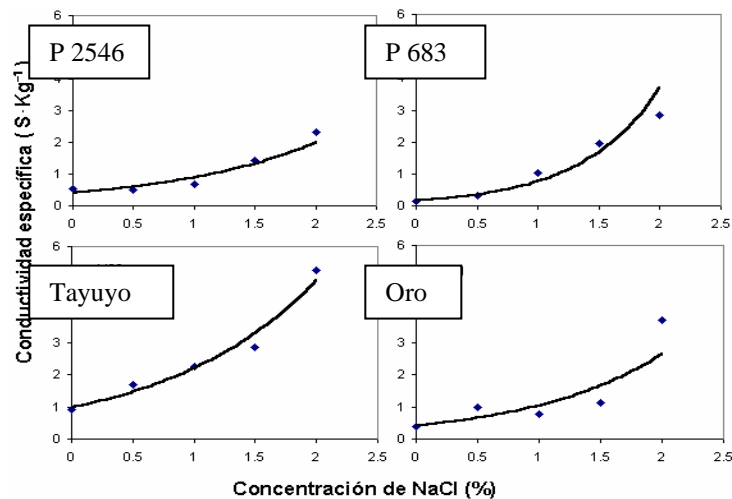
<b>k</b>	0.80	<b>1.57</b>	0.81	0.9
<b>E<sub>k</sub></b>	0.16	0.15	0.08	0.3
<b>R<sup>2</sup></b>	0.8723	0.9675	0.9703	0.7976

Esto indica que la solución que alcanzó el equilibrio osmótico con el material biológico del genotipo P 530 es más sensible a variaciones de la conductividad eléctrica por unidad de masa de tejido, respecto a las variaciones de las concentraciones de sal, mientras que en el P 208 ocurrió lo contrario. Las curvas exponenciales de  $\sigma_{esp}$  respecto a C se muestran en la figura 2.

Los resultados obtenidos en las evaluaciones de la electroconductividad por unidad de masa muestran que ante incrementos de la concentración de NaCl los tejidos correspondientes al genotipo Tayuyo mostraron mayor resistencia a la absorción de iones de sodio y cloruro por las vías simplasto y apoplasto a través de los tejidos foliares, lo que unido a los contenidos de prolina pudiera justificar cierto grado de tolerancia a la salinidad.

En el caso del genotipo P 683 los niveles de presencia de sales en sus tejidos respecto a la concentración de la disolución que causa el estrés, son mucho mayores. La curva exponencial, mostró una variación creciente mucho más abrupta respecto al Tayuyo (con un valor de k significativamente mayor), tal y como mostró el análisis estadístico, lo cual reafirma sus características de mayor susceptibilidad ante incrementos del estrés salino con relación al resto de las variedades.





**Figura 2. Dependencia de las conductividades específicas respecto a la concentración de NaCl en los genotipos utilizados**

La medición conductimétrica de la extrusión de electrolitos a través de la membrana, puede ser una expresión directa de los mecanismos de tolerancia específicos que se expresan en condiciones salinas a nivel de membrana (Díaz, 1997) y se considera la metodología más rápida, precisa y económica que puede ser utilizada como criterio para la selección de variedades tolerantes (Schmidt y González, 1998).

**Tabla 5. Resultados del Análisis de Componentes Principales.**

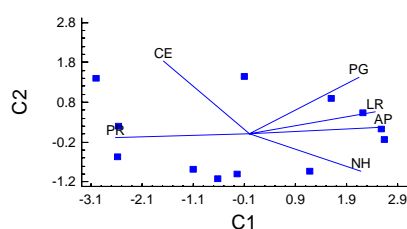
Ejes principales	C1	C2
Valores propios	4.224	1.862
Contribución a la variación total	70.411	14.362
% acumulado	70.411	<b>84.774</b>
<b>Vectores propios</b>		
<b>PG</b>	0,3772	<b>0,5510</b>
<b>AP</b>	<b>0,4648</b>	0,0690
<b>LR</b>	<b>0,4353</b>	0,2196
<b>NH</b>	0,3850	- 0,3636
<b>PR</b>	- 0,4646	- 0,0348
<b>CE</b>	- 0,2966	<b>0,7140</b>

En el análisis de componentes principales se pudo observar que la componente C1 extrajo la mayor variabilidad (70,41%) y los variables que más contribuyeron fueron la altura de las plantas (AP) y longitud de la radícula (LR). La segunda componente (C2) explicó un 14,36% de la variación total y las variables de mayores

contribuciones fueron el porcentaje de germinación (PG) y la conductividad eléctrica (CE) (tabla 5).

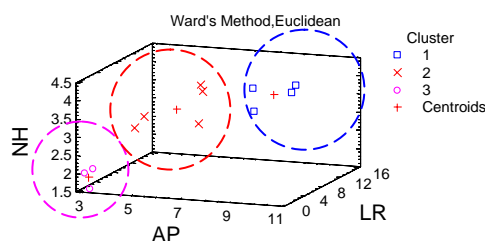
El mayor peso de las variables altura de las plantas y longitud de la radícula en la primera componente, ratifica el valor discriminatorio de estos caracteres en la clasificación de los genotipos en condiciones de estrés salino.

En la figura 3 se observa la distribución de las variables evaluadas en el plano formado por las componentes C1-C2 y la posición relativa de los genotipos con relación a ambas componentes. Se observa que a mayores valores de las variables porcentaje de germinación (PG), longitud de la radícula (LR), altura de las plantas (AP) y número de hojas (NH) corresponden menores valores de contenido de prolina libre (PR) y conductividad eléctrica (CE), lo cual ratifica el efecto de las concentraciones salinas sobre las variables estudiadas.



**Figura 3. Representación gráfica de la dispersión de los genotipos y las variables evaluadas.**

El análisis de conglomerados (fig. 4) permitió agrupar los genotipos en 3 grupos de acuerdo a la respuesta ante las concentraciones salinas estudiadas (0, 0.5 y 1% NaCl).



**Figura 4. Resultados de la agrupación según los tratamientos estudiados.**

El grupo I (33,3%) esta formado por los cuatro genotipos estudiados crecidos en medio MS sin adición de NaCl, los cuales muestran los valores más altos de altura de las plantas y longitud de las radículas (8,38 y 12,75 cm respectivamente) (tabla 5).

El grupo II agrupa 5 tratamientos para un 41,67% del total e incluye los cuatro genotipos sometidos a la concentración de 0,5% de NaCl y los valores obtenidos en el genotipo Tayuyo crecido en un medio MS con 1% de NaCl y se caracteriza por tener valores medios para todas las variables evaluadas. Estos resultados indican que este genotipo muestra menor afectación que el resto a una concentración más alta (1%), por lo que resulta ser más tolerante a las condiciones de estrés salino.

**Tabla 5. Valores promedios de las variables según los grupos formados.**

<b>Grupos</b>	<b>Estadísticos</b>	<b>PG (%)</b>	<b>AP (cm)</b>	<b>LR (cm)</b>	<b>NH</b>	<b>PR (mM/g)</b>	<b>CE (S/Kg)</b>
<b>I</b>	<b>Media</b>	<b>100</b>	<b>8.38</b>	<b>12.75</b>	<b>3.6</b>	4.38	0.495
	<b>DS</b>	0	0.94	1.91	0.24	0.80	0.27
	<b>CV</b>	0	0.11	0.14	0.06	0.18	0.56
<b>II</b>	<b>Media</b>	80.2	6.04	3.79	3.66	14.25	0.85
	<b>DS</b>	12.67	0.91	2.03	0.39	4.62	0.47
	<b>CV</b>	0.15	0.15	0.53	0.10	0.32	0.56
<b>III</b>	<b>Media</b>	74.6	3	1.08	1.83	<b>23.57</b>	<b>1.30</b>
	<b>DS</b>	0.47	0	0.82	0.23	2.20	0.64
	<b>CV</b>	0.01	0	0.76	0.12	0.09	0.49

El grupo III agrupa un total de tres tratamientos (25,0%), los cuales se corresponden a los genotipos P 2546, P 683 y Oro crecidos en medio MS suplementado con 1% de NaCl y muestran los valores mayores de contenido de prolina y conductividad eléctrica.

## CONCLUSIONES

- Con el aumento de las concentraciones salinas disminuyen las variables evaluadas (altura de las plantas, longitud de las radículas y número de hojas) y aumentan los valores de los niveles de Prolina y conductividad eléctrica.
- Las variables longitud de la radícula, niveles de prolina y la conductividad eléctrica específica mostraron un comportamiento diferenciado según los genotipos y permitieron identificarlos según su tolerancia al estrés salino.
- Los genotipos P 2546 y P 683 se mostraron como los más susceptibles y el genotipo Tayuyo como el más tolerante según su comportamiento ante las condiciones salinas impuestas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bates L.S.; Waldren R.P. y Teare I.D. (1973): Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.

- Cramer G.R. (1994): Response of maize (*Zea mays* L.) to salinity. En: Pessaraki, M. (ed.). Handbook of plant and soil stresses. New York, NY, USA, M. Dekker, 449-459.
- Díaz P.; Maribona R.H.; Korneva S.; Ruiz A.; Coto O.; Ancheta O. y Ramos M. (1995): Variación somaclonal para la tolerancia a la salinidad de la caña de azúcar. Revista GEPLACEA, 1995.
- Fernández L.; Torres M.; Sánchez M. y Rabi O. (2004): El cultivo del maíz en Cuba. En: XX Reunión Latinoamericana de Maíz. Barandiarán M.; Chávez A.; Sevilla R. y Narro T. (eds.) 11 – 14 Oct/2004, Lima-Perú, 56- 61.
- González M.C. (1993): Uso de la variación somaclonal en el mejoramiento genético para la tolerancia a la salinidad en el cultivo de arroz. Tesis en opción del Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), 1993.
- González L.M. y Labrada J. (1995): Proline content on rice seedlings growth under saline conditions. IRRRI Notes, 20 (4): 14-15.
- González L.M. y Ramírez R. (1999): La absorción de agua por las semillas de arroz a altas concentraciones salinas, como posible indicador de la tolerancia variela. Cultivos Tropicales, 20 (1): 31-34.
- Katz A. y Tol M. (1980). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Proline accumulation in callus tissue. Z. Plant Physiol. Bd. 98(5): 429-435.
- Mass E.V.; Hoffman G.L.; Chaba G.D.; Poss J.A. y Shannon M.C. (1983): Salt sensitivity of corn at various growth stages. Irrig. Sci., 4: 45-57.
- Marassi M.A. y Rapela J. (1989): Regeneración de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) a partir de callos tolerantes a NaCl. Revista de la Facultad de Agronomía. Instituto Fitotécnico Santa Catalina, Argentina, 76-79.
- Meiri A. (1994): Plant response to salinity: experimental methodology and application to the field. Under Irrigation. Processes and Management, ecological studies. No. 51.
- Murashige T. y Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15: 473- 497.
- Murillo A. (2000): Screening and classification of cowpea genotypes for salt-tolerance during germination. PHYTON, Int. J. of Exp. Bot., 67: 71- 84.
- Musito N.; Vega Ma. C. y Rodríguez J.G. (2004): Genotipos de maíz tolerantes a la salinidad; un estudio preliminar para iniciar un programa de selección. Revista Agraria- Nueva Época- Año 1, 1 (3): 18-23.
- Orellana P. y Peña P.L. (2003): Caracterización in vitro de la respuesta al NaCl en callos en las fases de multiplicación y regeneración de varios genotipos de arroz. Biotecnología Vegetal, 3 (1): 13-18.
- Rivero L.; Gálvez V.; Navarro N.; Sánchez I.; Ortiz C.; Otero L. y Hernández A. (2001): Sistema de información y monitoreo para la toma de decisiones en la lucha contra la salinización de los suelos y el deterioro del medio ambiente en cuencas hidrográficas. Taller Nacional ABIOTIC, Dic 13 y 14, Bayamo, p. 10-11.

- Schmidt A. y González V. (1998): Medición de la conductividad eléctrica en discos de hojas y estudio morfoanatómico de callos de cuatro variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) bajo condiciones de estrés salino. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología vegetal, 1-5 Junio, La Habana, pág 345.
- Soldatini G.R. (1979): Effectti in metabolici indolici da stress hídrico in priontini di mais tratate con polietilenglicol. *Agrochimica*, 23: 367-376.
- Stewart G.R. y Lee J.A. (1974). The role of proline accumulation in halophytes. *Planta* 120: 279-289.
- Tal M. (1990): Somaclonal variation for salt resistance in Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 11. Somaclonal variation in crop improvement. Bajaj, YPS (ed.), Berlin, 1990.
- Ulisses C.; Rocha P.; Albuquerque C.; Camara T.R. y Willadino L. (1998): Determinación de prolina en yemas de Plátano (*Musa* sp. Cv Nanicao- AAA) seleccionadas *in vitro* en cuanto a la tolerancia a la salinidad. Memorias del III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. 1ro al 5 de Junio, p-334.