

# **UTILIZACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES PARA ESTUDIOS DE TOLERANCIA A ESTRÉS EN PLANTAS.**

**MSc. Leticia Fuentes Alfonso<sup>1</sup>, Lic. Yunel Pérez Hernández<sup>1</sup>, MSc. Silvia Alemán García<sup>1</sup>, Dr. Anesio Mesa Sardiñas<sup>2</sup>, Dr. Sergio González Suárez<sup>3</sup>.**

*1. Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas,  
Autopista a Varadero km 3 1/2, Matanzas, Cuba*

*2. Estación Experimental “Indio Hatuey”, Perico, Matanzas,  
Cuba*

*3. Facultad de Biología Universidad de La Habana, J y 25,  
Ciudad de La Habana, Cuba*

## **Resumen.**

En el presente trabajo se reflejan algunas experiencias y consideraciones sobre el empleo de las técnicas de cultivo de células y tejidos vegetales para estudios de respuesta a condiciones de estrés salino en plantas. Entre las alternativas para los estudios de tolerancia a este tipo de estrés abiótico, el cultivo de tejidos vegetales brinda la posibilidad de evaluar un mayor número de muestras en un espacio más reducido y con condiciones controladas, ya sea utilizando la fase de callo para la obtención de líneas celulares y/o regenerantes tolerantes a salinidad, o la regeneración de plantas a partir de yemas axilares para comparar variedades de una misma especie o como alternativa para estudios sobre los mecanismos fisiológicos y genéticos que intervienen en la respuesta de las plantas al estrés.

*Palabras claves: estrés salino, plantas, callos.*

---

## **I. Introducción.**

El deterioro de los suelos por diferentes causas como erosión, salinidad y la escasez de agua le imponen un reto a la agricultura moderna, la cual tiene que dirigir sus esfuerzos hacia la producción de más alimentos en condiciones más difíciles. La salinización de los suelos es uno de los principales estreses abióticos que afectan la producción agrícola. El estrés salino cambia las respuestas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las plantas. En el nivel molecular esta respuesta se manifiesta como cambios en la expresión de los genes (Fabre y Planchón, 2000, Maggio, 2002).

Autores como Zhu (2001) refieren la posible existencia de genes de tolerancia a la salinidad en la mayoría de las plantas, motivado por el origen común de las especies vegetales a partir de ancestrales que habitaron el medio marino. Aunque solo se expresen en plantas halófitas, pudiera inducirse la expresión de los mismos en otras plantas en condiciones selectivas adecuadas, pues es necesario un proceso previo de adaptación a esas condiciones. Sin embargo, Zhu (2002) refiere que la respuesta de las plantas a la salinidad depende de la activación de un complejo sistema de vías de defensa que han dificultado los programas de mejora a esta condición.

En general el cultivo de tejido de plantas ha sido propuesto como una herramienta útil, rápida y económica para la evaluación de la tolerancia a salinidad, a través de la generación de brotes por vía organogénica a partir de explantes de hojas y ápices caulinares (Mercado et al., 2000).

Desde las etapas tempranas del cultivo de tejidos y la multiplicación *in vitro*, uno de los métodos propuestos para la mejora de tolerancia ha sido la selección o adaptación de suspensiones celulares o callo bajo condiciones de salinidad y el aprovechamiento de la variación somaclonal para posterior regeneración de plantas con mayor tolerancia (Dix y Street, 1975; Nabors et al., 1980). En la actualidad son múltiples los trabajos relacionados con la temática (Sabbah y Tal, 1990; Barakat y Abdel-Latif, 1996; Lutts et al., 1999; Sibi y Fakiri, 2000; Alvarez et al., 2003), por lo prometedor de los resultados.

El proceso de selección puede ser aplicado tanto a nivel de poblaciones celulares o en plántulas regeneradas a partir de cultivos celulares con la subsiguiente selección en condiciones de campo convencionales (Barakat y Abdiel-Latif, 1996). De hecho, las técnicas de cultivos de células y tejidos vegetales permiten evaluar poblaciones muy

grandes de células y plántulas regeneradas en pequeños espacios y en ambientes mejor controlados que en ensayos de campo (Jain, 2001; Barakat et al, 2002).

Además el cultivo de callos es utilizado como una técnica *in vitro* para estudios bioquímicos y fisiológicos de la respuesta a nivel celular al estrés salino e hídrico (Liu y Van standen, 2001, Basu et al., 2002, Jantaro et al., 2003, Liu et al. 2006).

Dada la acuciante necesidad de desarrollar estrategias de mejora para la obtención de cultivares tolerantes a condiciones de salinidad tanto en cultivos destinados a la alimentación humana como en especies forrajeras o pastables, que permitirían utilizar suelos deteriorados por esta causa para la producción animal, en el presente trabajo se realiza una valoración de los principales resultados en la aplicación del cultivo de células y tejidos en estudios de tolerancia a condiciones de estrés.

## **II. Desarrollo:**

### **Estrategias para obtener variedades tolerantes a salinidad.**

De manera general existen numerosas vías para lograr la obtención de variedades tolerantes a salinidad, que van desde la selección natural de clones tolerantes a estrés salino, la mutagénesis en la búsqueda de nuevos somaclones mutantes resistente a este estrés utilizando las numerosas técnicas del cultivo *in vitro*, hasta las novedosas técnicas de la ingeniería genética para la obtención de organismos transgénicos con características halofíticas. A menudo se combinan estos métodos para lograr el propósito deseado. En particular, el avance en el empleo de estas técnicas de la biología molecular ha permitido dilucidar genes involucrados en las diferentes rutas metabólicas que con frecuencia convergen en respuestas a distintos factores estresantes como la salinidad, sequía entre otros (Zhu, 2002).

Un factor fundamental que ha limitado la mejora genética para la obtención de variedades tolerantes a salinidad ha sido el carácter poligénico de la tolerancia al estrés salino (Zhu, 2000).

Por métodos de mejora genética tradicional, como la selección natural y cruzamientos, se han obtenido variedades o líneas más productivas para condiciones de salinidad en cultivos como alfalfa, arroz, cebada, sorgo, tomate y trigo (Ashraf, 1994, Flowers y Yeo, 1995). Este proceso de mejora ha tenido éxito dependiendo de la variabilidad genética y la heredabilidad para el carácter de tolerancia del cultivo Leidi y Pardo, (2002).

El protocolo clásico de mejora incluye (Munns y James, 2003):

1. Selección de germoplasma colectado para tolerancia a salinidad.
2. Cruzamiento entre organismos tolerantes identificados con el cultivo deseado.
3. Selección de tipos de plantas deseadas que poseen tolerancia a salinidad así como otros caracteres deseados a partir de generaciones segregantes.

La obtención de una muestra amplia de germoplasma con diferencias genéticas potenciales en cuanto a tolerancia a salinidad es posible a través de colecciones internacionales que están disponibles para cualquier investigador. Sin embargo, las principales dificultades están en como medir la tolerancia a salinidad por su complejidad. Además las evaluaciones de campo son complejas por las dificultades para controlar o estandarizar los factores ambientales, requieren áreas extensas para las evaluaciones y se deben crear condiciones de trabajo que no provoquen alteraciones al suelo o al medio ambiente.

Las técnicas de cultivos de células y tejidos vegetales permiten evaluar poblaciones muy grandes de células y plántulas regeneradas en pequeños espacios y en ambientes mejor controlados que en ensayos de campo (Barakat y Abdel-Latif, 1995 a,b,; El Haris y Barakat, 1998; Jain, 2001; Barakat et al, 2002).

### **El cultivo *in vitro* como herramienta útil para la mejora en plantas**

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Jiménez, 1998). Constituye, dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos sobre fisiología y bioquímica vegetal (Kommamine et al., 1982) hasta la obtención de plantas libres de patógenos (Morel y Martin, 1955), la propagación masiva (Kitto, 1997), la conservación de germoplasma (Withers, 1985), la producción de metabolitos secundarios (Misawa, 1994), el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones, la selección *in vitro* y la ingeniería genética.

Desde las etapas tempranas del cultivo de tejidos y la multiplicación *in vitro*, uno de los métodos propuestos para la mejora de tolerancia ha sido la selección o adaptación de suspensiones celulares o de callos bajo condiciones de salinidad y el aprovechamiento de la variación somaclonal para posterior regeneración de plantas con mayor tolerancia (Dix y Street, 1975; Nabors et al., 1980).

Por otro lado, los métodos de transformación genética para la introducción de genes de interés agrícola en plantas, se han visto beneficiados también por el desarrollo del cultivo de tejidos como refieren en sus resultados Quecini et al. (2002).

### **El cultivo de callo para la selección *in vitro*.**

Pierik (1990) define al callo como un tejido tumoral, más o menos organizado, que generalmente surge sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados. En condiciones artificiales, utilizando un medio nutritivo y los reguladores del crecimiento adecuados es posible inducir la formación de callos a partir de cualquier tipo de órgano o tejido. Si resultara difícil o se precisa de un callo juvenil, se pueden utilizar embriones (inmaduros) o fragmentos de plántulas. Si el explante o fragmento vegetal utilizado para la formación del callo contiene tejido meristemático en el momento de su aislamiento, este se puede dividir de forma inmediata, sin necesidad de que ocurra un proceso de desdiferenciación como es necesario en el caso en que sólo exista tejido diferenciado en el material de partida. La desdiferenciación generalmente ocurre en el tejido parenquimático.

Después de la desdiferenciación, las células pueden empezar a dividirse de forma intensiva, bajo la influencia de algunos factores como los reguladores del crecimiento hasta que se forma un tumor que recibe el nombre de callo (Pierik, 1990). Aunque en principio un callo es un tejido no organizado y poco diferenciado se pueden encontrar tejidos diferenciados en agregados grandes de tejido calloso.

Los callos son estructuras que pueden manifestar variabilidad atendiendo a diferentes criterios de clasificación. Uno de los criterios que más se utiliza es el de Pierik, (1990) quien refiere que las diferencias pueden estar dadas en cuanto a estructura y hábitos de crecimiento, pudiendo ser fijos o libres, blandos (acuosos) o duros; y en cuanto a la coloración, desde blancos hasta coloreados, dependiendo de la especie, tipo de explante, edad y otros factores.

Cuando se precisa un callo juvenil se pueden utilizar entre otros, fragmentos de plántulas y debe tenerse en cuenta que tanto la edad del material inicial, como la posición del explante sobre la planta (que refleja el nivel de hormonas endógenas) puede tener gran influencia en procesos como la división celular y la formación de órganos y embriones. Como señalara Devlin, (1982) los niveles endógenos de reguladores del crecimiento pueden provocar efectos diferentes de acuerdo a la concentración usada. Por ejemplo, las raíces son más sensibles a las auxinas que los tallos.

En los estudios de salinidad se han utilizado diferentes explantes para la formación de callos como: embriones inmaduros a partir de la germinación de semillas desnudas (Akhtar, 2006, Raveendar, 2008, Haliloglu y Baenzinger, 2005), embriones maduros (Tang et al, 2005), discos de hojas (Hassanein, 2004), diferentes fragmentos de plantas (Fuentes et al, 2008), entre otros.

Entre los reguladores del crecimiento vegetal (RCV), los más utilizados en el cultivo de tejidos de plantas son las auxinas y las citoquininas, aunque en ocasiones también pueden ser utilizadas las giberelinas. Según Beyl, (1999) las auxinas juegan su papel en muchos procesos del desarrollo, incluyendo la elongación y expansión del tejido, la dominancia apical, la formación de raíces adventicias y la embriogénesis somática. Generalmente cuando la concentración de auxinas es baja se favorece la formación de raíces, mientras que con el aumento de la concentración ocurre la formación de callos.

Las auxinas sintéticas más utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales son el ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido-2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido-4-amino-3, 5, 6-tricloro-2-piridincarboxílico (picloram). Como auxinas naturales se encuentran el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB), el cual se clasificó como sintético durante mucho tiempo (Beyl, 1999), hasta que se demostró su síntesis natural en el olivo y el tabaco. Las concentraciones más utilizadas de las auxinas en general, oscilan entre 0.001 y 10 mg/L.

La formación de callos y/o suspensiones celulares, puede garantizarse utilizándose el 2,4-D, en algunos casos como único regulador del crecimiento como en los estudios realizados por Juárez y Carrillo-Castañeda (2003), Fahir et al., (2002), Oudija et al (2002), Quim et al, (2005) y Furrukh, (2004), o en combinaciones con otras auxinas y citoquininas (Raveendar et al, 2008). Sin embargo en determinados casos se prescinde del 2,4-D como en el estudio realizado por Hassanein (2004) quien utilizó 2mg/L de ANA con 0.2 mg/L de BAP para la formación de callos a partir de discos de hojas de

una especie susceptible a salinidad (*Lycopersicon sculentum*) y mediante el método de maduración de explantes diminutos descrito por Hassanein y Mazen (2001) en una tolerante (*Alhagi graecorum*).

El empleo de auxinas y citoquininas de manera prolongada puede producir habituación (Pierik, 1990). Este es un fenómeno por el cual, cultivos celulares que inicialmente necesitaban reguladores, después de algunos repicados necesitan menos cantidad de estas sustancias, llegando incluso a prescindir de ellas. Según Pierick (1990) esto ocurre frecuentemente en cultivos de callos, y también cuando se forman vástagos axilares por la acción de las citoquininas.

Una vez formados los callos pueden mantenerse en cultivo por tiempo indeterminado siempre que se realicen subcultivos periódicos a medio fresco. Tanto las condiciones de cultivo (iluminación y composición del medio) como el período de tiempo que se mantenga el callo mediante subcultivos sucesivos, influirán en los procesos morfogénicos y fisiológicos que se sucedan en este tejido. En los estudios realizados por Akthar, (2006) la callogénesis se afectaba con el incremento de la salinidad, sin embargo, era posible obtener callos vigorosos a partir de apariencia necrótica cuando los callos se subcultivaban de medio control a medio salino.

Otro elemento a considerar cuando se emplea la fase de callo en los estudios de tolerancia es el tipo de sal a utilizar. En la mayoría de los trabajos la sal que se añade al medio el NaCl, pero en determinados casos se utilizan otras. Según refiere Ohya (2004) la generalidad de los trabajos utilizan un rango de salinidad entre 5 y 100 mM, aunque en algunos estudios llegan a utilizar 200 mM (Furrukh, 2004, Akthar, 2006 y Quraishi et al., 2000, Tahir et al, 2002) y en casos excepcionales se han realizado evaluaciones hasta 1 M. En algunos casos las referencias se hacen en porcentajes de sal por volumen de medio utilizado (p/v) (Tomar y Punia, 2003) o en función de las conductividades eléctricas medidas a la solución del medio. Algunos estudios han utilizado hasta 15 g/L de NaCl (Oudija et al. (2002).

Algunos autores refieren la posibilidad de comparar la influencia de diferentes sales en el proceso de callogénesis como los trabajos realizados por Golner et al. (1977) en *Daucus carota* y Chen et al (1980) en *Nicotiana tabacum*, quienes llegaron incluso a emplear agua de mar artificial para acercar la presión selectiva a condiciones más reales. De igual manera Raveendar et al. (2008) utilizó como condición estresante diferentes concentraciones de agua de mar (desde 0-100 % v/v) en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D, KIN, BAP, ANA, 500 mg/l de prolina y 300 mg/L de hidrolizado de caseína. La formación de callos, fue inhibida con el 75% v/v de agua de mar, obteniéndose los mejores resultados con 2mg/L de 2,4-D en la formación de los callos, mientras que la regeneración fue exitosa para un medio MS con 2mg/L de BAP y 1 mg/L de KIN. Y el enraizamiento en el mismo medio basal sin sales.

La sensibilidad de los callos al tipo de sal puede ser variable como en callos de *Citrus* (Kochba et al, 1982), susceptibles a KCl, pero capaces de crecer en medios con otras sales como el NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y MgSO<sub>4</sub>.

### **Cultivos celulares para evaluar tolerancia al estrés**

La tolerancia a la salinidad en los organismos superiores se ha relacionado con mecanismos celulares que permiten mantener una baja concentración salina en el citosol para que sus sistemas enzimáticos puedan funcionar (Sayram y Tyagi, 2004). De acuerdo al tipo de mecanismo por medio del cual las plantas son capaces de tolerar excesos de sales en su medio, se dividen en incluidoras o excluidoras de sales. Los cambios tienen lugar en las plantas salinizadas durante su crecimiento, parecen estar asociadas con la acumulación de elementos tóxicos y/o ajustes osmóticos así como el mantenimiento de la turgencia.

La evaluación de la tolerancia a la salinidad a través de cultivos celulares, es una metodología que permite conocer el comportamiento de una planta a nivel celular cuando sus células son sometidas a este tipo de estrés, debido a que existen mecanismos que se expresan a este nivel de organización.

Varios investigadores han reportado que la selección *in vitro* de líneas celulares de plantas expuestas a ambientes salinos puede ser efectiva para lograr incrementos en la tolerancia a salinidad (Barakat & Abdel-Latif, 1996). Además, estudios a nivel celular han permitido un mejor entendimiento de los mecanismos relacionados con la tolerancia al estrés salino, ya que se precisa de espacios relativamente pequeños y tiempos cortos para la selección, así como ambientes controlados.

### **Organogénesis en condiciones de salinidad.**

La habilidad de los tejidos vegetales para formar varios órganos de novo es lo que se conoce como organogénesis (Schwarz y Beaty, 1999). Puede producirse de forma directa o pasando por una etapa de desdiferenciación total de los fragmentos vegetales de partida (explantes) y luego una rediferenciación de ese tejido que se conoce como callo.

La regeneración de brotes y/o raíces en condiciones de salinidad a partir de callos inducidos en medios con hormonas reguladoras del crecimiento, ha sido reportada por diversos autores en diferentes tipos de cultivos. Como ejemplos se pueden citar los trabajos realizados por El-Enany, (1995) en explantes de hipocótilos y cotiledones de *Lycopersicon esculentum* Mill Peto 86, Hassanein, et al. (2004) a partir de callos obtenidos a partir de una especie tolerante a estrés hídrico (*Alhagi graecorum*,) y otra sensible (*Lycopersicon esculentum* L.). Por su parte Pua *et al.* (1985) reportaron la regeneración de brotes y raíces a partir de callos de *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38, luego se sucesivos pases en medios con elevada concentración de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Pesqueira et al. (2006) con callos provenientes de híbridos entre las especies *Zea mays* L. y *Tripsacum dactyloides*.

Sin embargo es importante notar que el porcentaje de brotes formados de manera general por estos autores disminuyó significativamente en la medida que las concentraciones de las sales aumentaban en el medio de cultivo. En especies como *Vitis vinifera* Hamrouni et al. (2008) y *Lycopersicon esculentum* (Rahman y Kaul, 1989; Remagopal, 1988) se ha observado una inhibición total de la regeneración de brotes para concentraciones superiores a 80 mM de NaCl. También se ha demostrado que concentraciones superiores a la ya mencionada puede afectar otros parámetros como el peso seco, y el porcentaje de regeneración.

En el caso específico de la caña de azúcar, se han seleccionado a través de suspensiones celulares, líneas tolerantes a niveles deletereos de NaCl regenerándose así mismo con éxito, plantas tolerantes a esta condición. Zambrano et al, (2002) también refiere la obtención de subclones de interés en caña de azúcar, a partir de cultivos de células y en determinados casos la inestabilidad cromosómica detectada en los cultivos celulares se reestablece una vez regeneradas las plantas, por lo que se hace necesario diferenciar entre lo que son adaptaciones fisiológicas, mutaciones al azar y cambios heredables.

En la capacidad de regeneración de plántulas a partir de callos, líneas celulares o yemas axilares influyen factores como el genotipo, las concentraciones hormonales utilizadas y las concentraciones de la sal causante del estrés. La toxicidad por iones, el estrés osmótico y las deficiencias nutricionales por efecto de la salinidad pueden producir trastornos metabólicos que originan el estrés oxidativo (Xiong y Zhu, 2002; Zhu, 2001). Durante el estrés oxidativo aumentan las concentraciones de las especies reactivas del oxígeno (EROs) que reaccionan con un gran número de macromoléculas como los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, entre otros, que conducen a daños celulares (Hariyadi y Parkin, 1993). En estas condiciones la acumulación y movilización posterior de almidón necesaria para la formación de órganos y su posterior desarrollo (Fortes y Pais, 2000) también pudiera afectarse debido a una disminución en la actividad de enzimas involucradas en el proceso.

Por otra parte la organogénesis es un proceso que demanda elevadas cantidades de energía obtenida a partir del almidón que es catabolizado para la producción de ATP (Mangat et al., 1990). En este sentido las concentraciones tóxicas de NaCl pudieran afectar la acumulación de ATP debido a un desacoplamiento en los procesos de oxidación y fosforilación a nivel mitocondrial (Kasumov et al., 1998).

### **Indicadores bioquímicos y genéticos de tolerancia a estrés salino.**

El cultivo de tejidos vegetales ha sido ampliamente utilizado para estudios comparativos de la actividad biológica de extractos, fracciones o compuestos aislados a partir de material vegetal intacto y de aquel obtenido de material vegetal cultivado en determinadas condiciones experimentales (Sokman et al., 1999). También se ha utilizado en estudios comparativos tanto analíticos como cuantitativos de la síntesis de metabolitos secundarios entre el material vegetal intacto y el extracto de callo (Balz et al., 1999; Zhentian et al., 1999). Tona et al. (1999, 2000) y Cimanga et al. (2004) realizaron evaluaciones de la actividad antiplasmódica *in vivo* e *in vitro* de extractos alcohólicos y en diclorometano de *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae), muy utilizada por sus propiedades medicinales. Como resultados de estas experiencias se pudo corroborar la influencia de las fitohormonas en la síntesis de los metabolitos secundarios pues en determinados casos como los taninos y los alcaloides, o no se detectaron o los niveles fueron muy bajos en relación al tejido vegetal intacto.

Algunos autores han referido cambios en el contenido de proteínas solubles, carbohidratos y aminoácidos libres (Farrukh, 2004b, Fuentes et al, 2008) en los callos o cultivos celulares en condiciones de salinidad, así como en otros parámetros como la masa fresca o la masa seca que en algunos casos puede aumentar con el estrés (Furruakh, 2004b). Un elemento interesante es que en determinados valores intermedios de concentración salina los callos muestran mejor respuesta con respecto al control como en los estudios realizados por Akthar (2006) y Quarashi, (2000), para callos obtenidos en 50mM de NaCl.

Una forma de reaccionar de las plantas y callos sometidos a estrés salino para compensar las condiciones de hiperosmoticidad que impone el medio con estas características; es aumentando la síntesis y acumulación de compuestos osmóticamente activos llamados osmolitos biocompatibles (Yancey et al., 1982). El término biocompatible se le ha dado a estas sustancias en virtud de que presentan baja interferencia en el funcionamiento de las macromoléculas, incluso a elevadas concentraciones. Los osmolitos más comunes incluyen azúcares, polioles como el manitol, pinitiol (Sairam y Tyagi, 2004), sorbitol (Kuo et al., 1990), poliaminas como putrescina y espermidina (Caldevia y Caldevia, 1999; Lefevre et al., 2001) así como ácidos grasos y sus derivados.

Un osmolito que ha recibido mucha atención es la prolina. La acumulación de prolina bajo diferentes condiciones de estrés abiótico ha sido reportada en muchas especies (Delauney y Verma 1993). El papel beneficioso de la prolina en el incremento de la tolerancia a estreses abióticos en las plantas ha sido demostrado en los últimos años (Hong et al., 2000; Ronde et al., 2000). De esta forma la prolina puede ser utilizada como un marcador metabólico en relación al estrés.

Los osmolitos desempeñan dos funciones principales de protección. El mantenimiento del estado natural de las macromoléculas, evitando la inactivación de proteínas por el efecto primario de la presión osmótica y la eliminación de las misma para evadir la formación de agregados macromoleculares, que deberán ser degradados por el mayor sistema proteolítico de los organismos eucariontes que consiste en la degradación mediada por ubiquitinas en el proteoma (Ciechanover et al., 2000). Por otra parte, estos compuestos presentan la capacidad de eliminar las especies reactivas del oxígeno (Hong et al., 2000), aunque en la actualidad no están esclarecidos los mecanismos.

Otro elemento a considerar en los cultivos de callos es la composición iónica de la célula debido a los cambios en la concentración iónica que estas pueden sufrir. En estudios realizados por Zhao et al. (2004) en dos variedades de *Phragmites communis* Trin, una susceptible y una tolerante a salinidad, se detectaron alteraciones en las concentraciones de los iones ya que para los tratamientos superiores a 200 mM de NaCl el porcentaje de  $\text{Na}^+$  decreció en relación al control, mientras que el  $\text{K}^+$  y la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se incrementó en la variedad más tolerante. Como mecanismo involucrado se pudo demostrar el incremento de la actividad de la ATPasa-H en la membrana plasmática en respuesta al incremento de salinidad, así como el papel del óxido nitroso como mensajero en la inducción de resistencia a este estrés.

También se han referido cambios en la actividad de enzimas antioxidantes como las peróxidasas (PRX), catalasas (CAT) (Fuentes et al, 2008)

La transformación de plantas con genes aislados de distintos organismos ha permitido expresar caracteres relacionados con mayor tolerancia al estrés salino, como la actividad de transportadores iónicos (Apse et al., 1999), sus sistemas de regulación (Pardo et al., 1998) o sistemas enzimáticos que modifican la pared celular (Amaya et al., 1999), reducen los daños por estrés oxidativo (Roxas et al., 2000) o conducen a la síntesis de compuestos con función osmótica o protectora del metabolismo celular (Tarczynski et al., 1993).

En la actualidad se han realizado numerosos ensayos para aislar aquellos genes cuya expresión es inducida por estrés. Los genes que responden ante el estrés pueden ser

analizados por dos vías fundamentales una de ellas está basada sobre la información bioquímica relevante que puede aportar una enzima, proteína, una reacción bioquímica o un fenómeno de tipo fisiológico, la otra vía es indirecta y está basada por ejemplo, en la hibridización diferencial.

La lista de genes cuya transcripción es regulada en respuesta al estrés crece cada día. El entendimiento de los mecanismos que regulan la expresión de genes y la capacidad para transferir genes de otros organismos hacia las plantas, expandirá las formas en que las plantas podrán ser utilizadas. Para explotar todo el potencial de estos resultados, es esencial que el conocimiento sea aplicado a especies de importancia ecológica y agrícola (Sairam y Tyagi, 2004).

Las evidencias más consistentes de que existe una correlación entre la expresión elevada de enzimas antioxidantes y el incremento de la tolerancia a distintas condiciones estresantes en las plantas (Foyer y Groten, 2003), provienen de estudios con plantas transgénicas. A continuación se resumen algunos de los trabajos más relevantes en relación a este aspecto.

- La producción de plantas transgénicas portando determinados genes que proveen protección bajo condiciones de sequía ha sido extensa y las plantas fueron producidas con el objetivo de elevar la tolerancia al estrés por salinidad (Khanna-Copra y Sinha, 1998).
- Actividades enzimáticas elevadas de las enzimas SOD, ascorbato peroxidasa, catalasa y glutatión reductasa fueron reportadas por varios autores en genotipos tolerantes a estreses como altas temperaturas, sequía y salinidad (Sairam et al., 1997; Sairam et al., 1998; Sairam et al., 2000; Sairam et al., 2001).
- Un incremento en las actividades SOD, peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa fueron encontradas por varios autores en respuesta a estrés salinidad así como una elevada actividad antioxidante en especies y variedades tolerantes (Gueta-Dahan et al., 1997; Gomez et al., 1999; Hernandez et al., 1999; Hernandez et al., 2000).
- Sairam y Srivastava, (2002) reportaron comparativamente elevadas actividades de Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa en la fracción cloroplástica y Mn-SOD en la mitocondrial en genotipos tolerantes de trigo en respuesta a estrés salino.
- Estudios en plantas transgénicas de tabaco muestran que la expresión incrementada de SOD induce tolerancia a estreses abióticos como bajas temperaturas y estrés hídrico (Bohnert y Shevelera, 1998).
- En semillas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen que codifica para una peroxidasa de la pared celular, son más tolerantes al estrés salino durante la germinación, debido probablemente a una mejorada capacidad de retener el agua para la germinación como resultado de modificaciones físicas de la permeabilidad al agua en la pared (Amaya et al., 1999).
- Trabajos de transgénesis en varias especies de plantas que manifiestan una reducida actividad catalasa mostraron una elevada sensibilidad al estrés salino (Willekens et al., 1997).

- Varios trabajos sobre transgénesis en plantas han corroborado que las plantas con una supresión de las actividades de enzimas antioxidantes son hipersensibles a ataques de patógenos y condiciones de estrés abiótico (Avsian-Kretchmer, et al., 2004).
- La sobreexpresión por vía transgénica en tabaco de los genes NtGST/GPX que codifican para las enzimas glutatión-S-transferasa y glutatión peroxidasa, mejoraron la resistencia al estrés salino debido a la eliminación de las ERO y la prevención contra los daños en membrana (Roxas et al., 1997).

### **La variación somaclonal como vía para desarrollar somaclones tolerantes a salinidad**

Numerosos han sido los aportes a la mejora genética debido a la obtención de nuevos somaclones tolerantes por selección de organismos mutantes, obtenidos por variación somaclonal inducida por agentes físicos, químicos, así como compuestos hormonales como la auxina sintética 2,4-D, adicionados a medio de cultivo (Medina et al., 2007).

Por otro lado, el cultivo *in vitro* ofrece la oportunidad de una vez seleccionados aquellos somaclones con caracteres beneficiosos puedan ser reproducidos vegetativamente mediante la propagación *in vitro*, con altas probabilidades de que los somaclones obtenidos no varíen genéticamente, siempre que se ajusten las concentraciones determinadas de hormonas en el medio de cultivo.

Entre los factores que pueden influir en la aparición de esta variabilidad se encuentran el tiempo transcurrido desde el crecimiento meristemático organizado, la constitución genética del material de partida, los reguladores de crecimiento utilizados en el medio de cultivo, y la fuente de tejido. Por otra parte, se han descrito varios cambios genéticos responsables de la variación somaclonal en plantas, que incluyen cambios en el cariotipo, mutaciones génicas de los genomas nucleares y citoplasmáticos, traslocaciones, deleciones, inversiones, modificaciones en los cromosomas, reestructuraciones de genes y mutaciones no convencionales como amplificaciones y elementos trasponibles (Peschke y Phillips, 1992). Estas últimas pueden estar ocasionadas por la ocurrencia de recombinaciones mitóticas, tanto por la recombinación genética intercromátidas o intercambios intracromátidas de repeticiones invertidas, provocando pérdida o ganancia de información genética y por consiguiente, variabilidad en el número de secuencias repetidas en tándem (Phillips et al., 1994).

También se han detectado diferencias en la estabilidad genética en regenerantes, relacionadas con el tipo de explante utilizado debido a la existencia de variabilidad preexistente en las diferentes partes de la planta donora. El caso más ampliamente reconocido es la polisomatía (coexistencia de células con diferentes ploidías en el mismo tejido), la cual según lo referido por D'Amato, (1985), puede ser detectada en el 90% de las plantas. Realizando estudios en tomate, van den Bulk et al., (1990) encontró que el 58 % de los regenerantes obtenidos a partir de hipocótilos presentaban altos niveles de poliploidías, y lo relacionó con la polisomatía detectada en estos explantes a diferencia de las hojas y los cotiledones, donde apenas se observaron células no diploides.

Otros autores han hecho referencia a un mayor porcentaje de aparición de aberraciones cromosómicas asociadas a la regeneración vía organogénesis, la cual según Peschke y Phillips, (1992) involucra a varias células entre las que puede presentarse diferencias en

la dotación cromosómica. Aunque se ha demostrado que también puede ocurrir en la embriogénesis somática de algunos cultivos como la alfalfa y especies del género *Citrus* L., capaces de regenerar a partir de cultivos mixoploides (Gmitter et al., 1991).

El tiempo en cultivo también ha provocado la aparición de regenerantes con diferentes niveles de poliploidías, motivado por diferentes causas como: diferencias en los requerimientos metabólicos de los tejidos en cultivo con relación a las plantas *in vivo* y acumulación de mutaciones por un incremento en el ritmo de las divisiones celulares (Peschke y Phillips, 1992), entre otros.

En relación con la influencia del cultivo de tejidos, en estudios realizados con *S. guianensis* cv. CIAT- 2243, por Miles et al., (1991), se describieron varios cambios fenotípicos en regenerantes mantenidos en cultivos durante un año, provocados por un incremento en el número cromosómico de la especie originaria diploide a tetraploides. Aunque otros trabajos relativos al género *Stylosanthes* han descrito diferentes cambios tanto en caracteres cuantitativos (Consoli et al., 1996, Valarini et al., 1997), como cualitativos (Meijer, 1984, Godwin et al., 1987, 1990), aunque estos no han hecho referencia a posibles causas genéticas.

En cultivos como la papa (Carrasco et al., 1998), el plátano (Bauru et al., 2006, El-DougDoug, 2007), *Hevea brasiliensis* (Medina et al., 2007), se han identificado algunas variaciones al utilizar marcadores moleculares como los RAPD y los AFLPS. Por su parte Hossain et al. (2003) obtuvieron regenerantes de ají pimiento *Capsicum annuum* L.) utilizando como explantes nodos cotiledonales, cultivados en medio MS suplementado con ANA y 6-BAP, los cuales mostraban diferencias en el hábito de crecimiento de la plantas, el color del tallo, color de flor y fruto, así como la expresión de antocianinas.

En muchos casos la variabilidad genética entre donantes de explantes y regenerantes se ha podido constatar por técnicas citogenéticas (Miles et al., 1991, Cluotier y Landry, 1994, Fourré et al., 1997), marcadores moleculares de tipo PCR-RAPD (siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de ADN amplificado al azar) (Linacero et al., 2000, Hahmi et al., 1997, Isabel et al., 1993, Hossain et al. 2003), de tipo AFLP (siglas en inglés de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) al estudiar callos embriogénicos y plantas donoras de *Hevea brasiliensis* (Gutiérrez, 2002, Gutiérrez, 2004) y en *Arabidopsis thaliana* (Polanco y Ruiz, 2002).

La posibilidad de combinar los métodos selectivos con la inducción de variabilidad somaclonal puede ser una alternativa para desarrollar estrategias de trabajo encaminadas a evaluar la respuesta celular y la regeneración de plantas a estrés salino en condiciones controladas. Esta puede ser una alternativa para trabajos de mejora con especies forrajeras como *Stylosanthes guianensis* CIAT 184, perteneciente a un género en el que los trabajos de mejora por métodos tradicionales se ven afectados por bajos niveles de entrecruzamiento genético.

## **Conclusiones.**

La utilización del cultivo de tejidos vegetales para estudios de tolerancia a salinidad constituyen una herramienta alternativa tanto para estrategias de mejora de plantas a esta condición como para estudios fisiológicos y genéticos de la respuesta celular.

La posibilidad de obtención de regenerantes tolerantes a este tipo de estrés en particular y a cualquier otro en general, dependerá del genotipo de la especie utilizada, de las condiciones del medio selectivo, de los cambios genéticos que ocurran entre otros factores.

La selección de organismos tolerantes bajo estas condiciones deberá ser apoyada por estudios de marcadores bioquímicos, fisiológicos y genéticos, entre otros.

### **Bibliografía.**

- Abeyaratne, W. M., De Silva, U. N., Kumari, HMPS and Abeysiriwardena, D.S. De Z. 2004. Callus induction, plantlet regeneration and occurrence of somaclonal variation in somatic tissues of some indica rice varieties. *Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture*, 6: 1-11.
- Akhtar, N. 2006. Callogenesis response of wheat cultivars under sodium chloride salt stress. *Pak. J. of Biol. Sci.* 9(11): 209- 2096
- Alvarez, I., Tomaro, L. M. adn Bernavides, P. M. 2003. Changes in polyamines, proline and ethylene in sunflower calluses treated with NaCl. *Plant Cell Tess. Org. Cult*, 74 (1): 51-59.
- Amaya, I.; Botella, M.A.; de la Calle, M.; Medina, M.I.; Heredia, A.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M.; Quesada, M.A. & Valpuesta, V. 1999. Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Letters*. 457: 80–84.
- Apse, M.P.; Aharon, G.S.; Snedden, W.A. & Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Arabidopsis*. *Science*. 285 : 1256–1258.
- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants, *Critical Reviews in Plant Science*. 13: 17-42.
- Avsian-Kretchmer, O.; Gueta-Dahan, Y.; Lev-Yadun, S.; Gollop, R. and Ben-Hayyim, G.2004. The Salt-Stress Signal Transduction Pathway That Activates the *gpx1* Promoter Is Mediated by Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Different from the Pathway Induced by Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol*. 135 (3): 1685–1696.
- Bairu, M., Fennell, C.W. and van Staden, J. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in *Cavendish banana* (Musa AAA cv. 'Zelig'). *Scientia Horticulturae* 108: 347–351
- Barakat, M. N. and Abdel-Latif, T. h. 1996. In vitro selection of wheat callus tolerant to high leves of salt and plant regeneration. *Euphytica*, 91: 127-140.
- Barakat, M.N., Abdel-Ghany, E.K., El Rouby, M.M. and Bedair, F.A. 2002. In vitro selection of whwta callus tolerant to highlevel of abscici acid, plant regeneration and characterization by RAPD. MSci. Thesis Fac. Alex. Univ. Egypt.

- Basu, S., G. Gango Padyay and B.B. Mukherjee, 2002. Salt tolerance in rice *in vitro*: Implication of accumulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and proline. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.*, 69: 55–64
- Beyl, C.A. 1999. Getting started with tissue culture media preparation, steril technique and laboratory equipment. In: Trigiano, RN and Grey, DJ (eds). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Second Edition. CRC Press. LLC: 21-38.
- Bohnert, H.J. & Sheveleva, E. 1998. Plant stress adaptations, making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology* .1: 267–274.
- Caldevia, H.D.Q. M. and Caldevia, G.1999. Free polyamine accumulation in unstressed and NaCl stressed maize plants. *Agron. Lusit.* 47: 209–215.
- Carrasco, A. Ruiz De Galarreta, J.I. And Ritter, E. Caracterizacion morfologica, cariotipica y molecular de tres somaclones se *Solanum tuberosum* L. obtenidos mediante cultivo de protoplastos. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 13 (3): 385-391.
- Ciechanover, A.; Orian, A. & Schwartz, A.L. 2000. Ubiquitinmediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessay*. 22: 442–451.
- Cimanga, R.K., Tona, L., Luyindula, N., Mesia, K., Lusakibanza, M., Musuamba, C.T., Apers, S., De Bruyne, T., Van Miert, S., Hermans, N., Tott'e, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J. 2004. In vitro antiplasmodial activity of callus culture extracts and fractions from fresh apical stems of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae): part 2. *Journal of Ethnopharmacology* 95 399–404
- Cloutier, S. and Landry, B.S. 1994. Molecular markers applied to plant tissue culture, *In vitro Cell Dev. Biol.*, 30, 32-36.
- Consoli, L.; Vieira, M. L. C.; Lopes de Souza, C. Jr. and Garcia, A. A. F. 1996. Tissue culture effects on quantitative traits in *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae). *Brazilian Journal of Genetics*. 19 (3) : 469-474.
- D'Ammato, F. 1985. Cytogenetics of plants cell and tissue cultures and their regenerates. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* 3: 73-112.
- Delauney, A. y Verma, D.P.S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* .4: 215–223.
- Dix, P.J. y Street, H.E. 1975. Sodium chloride-resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* and *Capsicum annum*. *Plant Science Letters*. 5: 231-237.
- El-DougDoug, Kh. A., El-Harhi, H.M.S Korkar H.M. and. Taha, R.M. 2007. Detection of Somaclonal Variations in Banana Tissue Culture Using Isozyme and DNA Fingerprint Analysis *Journal of Applied Sciences Research*, 3(7): 622-627.

- El-enany, A.E. 1995. Shoot organogenesis and protein synthesis in tomato stressed cultures. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 8 (3): 137-142.
- Fabre, F. and. Planchon, C 2000. Nitrogen nutrition, yield and protein content in soybean. *Plant Sci.*, 152: 51–8
- FAO "The State of Food and Agriculture 2003-2004" Chapter 2: What is agricultural biotechnology? Section Breeding and reproducing crops and trees Subsection In vitro selection. <http://www.greenfacts.org/en/gmo/3-genetically-engineered-food/2-genetic-engineering.htm>.
- Farrukh, J. 2004a. In vitro salt tolerance in wheat. I. Growth and ions accumulation. *Intl. J. Agric. Biol.* 4: 459-461.
- Farrukh, J. 2004b. In vitro salt tolerance in wheat. I. Organic solute accumulation in callus.. *Intl. J. Agric. Biol.* 4: 462-464.
- Flowers, T.J y Yeo, A.R. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Australian Journal of Plant Physiology*. 22: 875-884.
- Fortes, A.M. y Pais, M.S. 2000. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (*Cannabaceae*): histological studies and changes in the starch content. *American Journal of Botany*. 87: 971-979.
- Fourré, J.L., Berger, P. Niquet, L. y André, P. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in *Norway spruce*: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches, *Theor. Appl. Genet.*, 94, 159
- Foyer, C. H, and Groten, K. 2003. Oxidative Stress. *Genetic Modification, Applications/Oxidative stress*. 419-430.
- Fuchs, M., González, L., Antón, R. & Díaz, E. 2000. Efecto del bicarbonato de sodio sobre el crecimiento de suspensiones celulares de caña de azúcar. *Agronomía Tropical* 50(4): 615-631.
- Fuentes, L., Pérez, Y., Domínguez, A., Mesa, A., González, S. 2008. Influencia del NaCl en parámetros bioquímicos evaluados en callos de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184. *Pastos y Forrajes*, Vol 31, no1: 35-40
- Gmitter, F. G.; Ling, X.; Cai, C. and Grosser, J. W. 1991. Colchicine- induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Sci.* 74: 135- 141.
- Godwin, I. D.; Cameron, D. F and., Gordon, G. H. 1990. Variation among somaclonal progenies from three species of *Stylosanthes*. *Austr. J. Agric. Res.* 41: 645-656.
- Godwin, I. D.; Gordon, G. H. and Cameron, D. F. 1987. Callus culture- derived somaclonal variation in the tropical pasture legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. *Plant Breeding*. 98: 220- 227.

- Gómez, J. M.; Hernández, J. A.; Jiménez, A.; del Rio, L. A. and Sevilla, F. 1999. Differential response of antioxidative systems of chloroplasts and mitochondria to long term NaCl stress of pea plant. *Free Radical Res.* (Suppl.). 31: 11–18.
- Gueta-Dahan, Y.; Yaniv, Z.; Zilinskas, B. A. and Ben-Hayyin, G. 1997. Salt and oxidative stress: Similar and specific response and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta.* 203: 460–469.
- Gutiérrez, L.G, 2002 . Embriogénesis somática en *Alnus acuminata* H.B.K y estudio de la variación somaclonal mediante marcadores moleculares”, Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Gutiérrez, L.G., 2004. Marcadores moleculares AFLP de plantas donadoras de aliso *Alnus acuminata* H.B.K., *Revista Scientia et Técnica* 25, Universidad Tecnológica de Pereira.
- Hahmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg, L. and Hammerschlag, F. 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus culture of peach. *Plant Cell Rep.*, 16, 624-627.
- Haliloglu, K. and Baenziger, P.S. 2005. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from immature embryo culture. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 14:115-160.
- Hamrouni L, Abdallah FB, Abdelly C, Ghorbel, A. In vitro culture: a simple and efficient way for salt-tolerant grapevine genotype selection. *C R Biol.* 331(2):152-63.
- Hariyadi, P. and Parkin, K.L. 1993. Chilling-induced oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Calypso) seedlings. *L. Plant Physiol*, 141: 733-738.
- Hassanein, A.M. 2004. Effect of relatively high concentration of mannitol and sodium chloride on regeneration and gene expression of stress tolerant (*Alhagi graecorum*) and stress sensitive (*Lycopersicon esculentum* L.) plant species. *Bulg. J. Plant. Physiol.* 30 (3-4): 19-36.
- Hassanein, A.M. and Mazen, A. M.A. 2001. Adventitious bud formation in *Alhagi graecorum*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 65: 31-35.
- Hernández, J. A.; Campillo, A.; Jimenez, A.; Alarcon, J. J. and Sevilla, F. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.* 141: 241–251.
- Hernández, J. A.; Jimenez, A.; Mullineaux and Sevilla, P. F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Biol.* 23: 853–862.
- Hong, Z.; Lakkineni, K.; Zhang, Z. & Verma, D.P.S. 2000. Removal of feedback inhibition of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline

- accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*. 122: 1129–1136.
- Hong, Z.; Lakkineni, K.; Zhang, Z. & Verma, D.P.S. 2000. Removal of feedback inhibition of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*. 122: 1129–1136.
- Hossain, M. A., Konisho, K., Minami, M. and Nemoto, K. 2003. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) *Euphytica* 130: 233–239.
- Isabel, N., Tremblay, L., Michaud, M., Tremblay, F.M. and Bousquet, J. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill) B.S.P., *Theor. Appl. Genet.*, 86, 81-84.
- Jain, M. 2001. Tissue cultura derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118:153-166.
- Jantaro, S., P. Maenpaa, P. Mulo and A. Incharoen Sokdi, 2003. Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically stressed cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol. Lett.*, 228: 129–35.
- Jiménez, E. 1998. Generalidades del Cultivo In Vitro. In: Perez Ponce, JN. (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. p. 369-390.
- Juárez, J. y Carrillo-Castañeda, G. 2003. Producción de biomasa y capacidad de rediferenciación en cultivos in vitro de caña de azúcar, sometidos a estrés por cloruro de sodio y kanamicina. *Biotecnología Aplicada*. 20:155-159
- Kasumov, N.A.; Abbasova, Z.I. y Gündüz, G. 1998. Effects of Salt Stress of the Respiratory Components of Some Plants. *Tr. J. of Botany*. 22: 389-396.
- Kavi Kishor, P.B.; Hong, Z.; Miao, G.H.; Hu, C.A.A. y Verma, D.P.S. 1995. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*. 108:1387-1394.
- Khanna-Chopra, R. Sinha, S.K. 1998. Prospects of success of biotechnological approaches for improving tolerance to drought stress in crop plants. *Current Science*. 74:25-34.
- Kitto, S.L. 1997. Commercial Micropropagation. *Hort Science*. 23 (6).
- Kommamine, A.; Morigaki, T.M. and Fujimura, T. 1982. Metabolism in synchronous growth and differentiation in plant tissue and cell cultures. In: *Frontiers of plant tissue culture*. Thorpe, T.A.(ed). Calgary. Canada. p. 159-168.
- Kuo, T. M.; Doehlert, D.C. y Crawford, C.G. 1990. Sugar metabolism in germinating soybean seeds. *Plant Physiol*. 93: 1514-1520.

- Lefevre, I.; Gratia, E. and Lutts, S. 2001. Discrimination between ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine levels in rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci.* 161: 943–952.
- Linacero, R., Freitas Alves, E. y Vázquez, A.M. 2000. Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 506-509.
- Liu, T. and J. Van Staden, 2001. Partitioning of carbohydrates in salt –sensitive and salt – tolerant soybean callus cultures under salinity stress and its subsequent relief. *Plant Growth Regul.*, 33: 13–7.
- Liu, T-Hong, K. Nada, C. Handa, H. Kitashiba, X-Peny Wen, X-Miny Pang and T. Moriguchi, 2006. Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of arginine decarboxylase pathway in stress response. *J. Exp Bot.*, 57: 2589–99
- Lutts, S.; Bouharmont, J. and Kinet, J.M.. 1999. Physiological characterization of salt-resistant rice (*Oryza sativa*) somaclones. *Aust. J. Bot.* 47: 830-849.
- Maggio, A., 2002. Does proline accumulation play an active role in stress –induced growth reduction. *Plant J.*, 31: 699–712
- Mangat, B.S.; Pelekis, M.K. y Casseis, A.C. 1990. Changes in the starch content during organogenesis *in vitro* cultured *Begonia rex* stem explants. *Physiologia Plantarum.* 79: 269-274.
- Medina, C., García, I., Caro, M., Aristizábal, F. A. 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 36 (1): 70-80.
- Meijer, E.G. 1984. Some Aspects of Long- Term Tissue Culture of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (*Leguminosae*). *J. Plant Physiol.* 117: 131-135.
- Mercado, J.A.; Sancho, M.A. y Jimenez, J. 2000. Assessment of *in vitro* growth of apical ítem sections and adventitious organogenesis to evaluate tolerance in cultivated tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 62: 101-106.
- Miles, J. W.; Roca, W.M. and Tabares, E. 1991. Assessment of somaclonal variation in *Stylosanthes guyanensis*. (Aubl.) Sw., a tropical forage legume. In: Roca, W. M. and Misawa, M. 1994. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. FAO agricultural services bulletin 108. 87 p.
- Morel, G. and Martin, C. 1955. Guérison de pomme de terre de maladie a virus. C. R. Acad. Sci. Paris. p. 1315-1324.
- Munns, R. and James, R.A. 2003. Screening methods for salinity tolerance: a case of study with tetraploid wheat. *Plant. And Soil.* 253, 201-218.

- Munthali, M.T., Newbury, H.J. and Ford-Lloyd, B.V. 1996. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD, *Plant Cell Rep.*, 15, 474-477.
- Nabors, M.W.; Gibbs, S.E.; Bernstein, C.S. and Meis, M.E. 1980. NaCl-tolerant tobacco plants form cultured cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 97: 13-17.
- Oudija, F. Ismail, M. and amssa, M. 2002. Effect of the concentration of NaCl on somatic embryogenesis and the regeneration capacities of wheat. *J. Afr. Crop. Sci.* 10: 211-219.
- Pardo, J.M.; Reddy, M.P.; Yang, S.; Maggio, A.; Huh, G.H; Matsumoto, T.; Coca, M.A.; Paino-D'Urzo, M.; Koiwa, H.; Yun, D.J.; Watah, A.A., Versan, R.A y Hasegawa, P.M. 1998. Stress signaling through  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proceedings National Academy of Sciences, USA*. 95: 9681-9686.
- Peschke, Virginia M. and Phillips, R. L. 1992. Genetic implication of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics*. 30: 41-75.
- Pesqueira, J.; García, M.D.; Staltari, S. y Molina, M. 2006. NaCl effects in *Zea mays* L. x *Tripsacum dactyloides* (L.) L. hybrid calli and plants. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458. Vol. 9. (3). Disponible en: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue3/full/29/index.html> [Consulta: 11 de junio 2007].
- Phillips, R. L., Kaeppler, S. M., and Olhoft, P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 5222-5226.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo in vitro de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Polanco, C. and Ruiz, M.L. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants, *Plant Science*, 162, 817-820.
- Pua, E-C.; Ragolsky, E.; Chandler, S. F. y Trevor, A. 1985. Effect of sodium sulfate on in vitro organogenesis of tobacco callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 5 (1): 55-62.
- Quecini, V.M.; de Oliveira, C.A.; Alves, A.C.; Vieira, M.L.C. 2002. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genetics and Molecular Biology*. 25 (1): 73-80.
- Quraishi, A. Tahir, F. and Rashid, H. 2000. effect of NaCl on callogenesis of *Triticum aestivum* L. *Pak. J. Agric. Res.*, 16: 28-30. Radhakrishnan, R. and Ranjithakumari, B.D. (2007). Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. cv. CO3) via half seed explant culture. *Journal of Agricultural Technology* 3(2): 287-297.
- Rahman, M.M. and Kaul, K. 1989. Differentiation of sodium chloride tolerant cell lines of tomato *Lycopersicon Mill* CV Jet star *J. Plant Physiol.* 133:710-712.

- Raveendar, S; Premkumar, A; Ignacimuthu, S. and Agastian, P. 2008. Effect of sea water on callus induction and regeneration of rice genotypes. *International Journal of Integrative Biology*, 3 (2): 92-95.
- Remagopalm, S. 1988. Sodium chloride effects on dedifferentiation and protein synthesis in root meristem cultures of two contrasting barley genotypes. *J Plant Physiol.* 132:245-249.
- Ronde, J.A.D.; Spreeth, M.H. & Cress, W.A. 2000 Effect of antisense L-pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. *Plant Growth Regulation.* 32: 13-26.
- Roxas, V.P.; Lodhi, S.A.; Garrett, D.K.; Mahan, J.R. y Allen, R.D. 2000. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant and Cell Physiology.* 41: 1229-1234.
- Sabbah, S. and Tal, M. 1990. Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and mannitol and their response to stress. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21: 119-128.
- Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long-term salt stress. *Plant Sci.* 162: 897-904.
- Sairam, R. K.; Chandrasekhar, V. and Srivastava, G. C. 2001. Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their response to water stress. *Biol. Plant.* 44: 89-94.
- Sairam, R. K.; Deshmukh, P. S. and Saxena, D. C. 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol. Plant.* 41: 384-389.
- Sairam, R. K.; Srivastava, G. C. and Saxena, D. C. 2000 Increased antioxidant activity under elevated temperature: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biol. Plant.* 43: 245-251.
- Sairam, R.K. y Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science.* 86 (3).
- Schwarz, G. and Beaty, T. 1999. In: Trigiano, R.N. and Grey, D.J. (eds.) *Plant Tissue culture. Concepts and Laboratory Exercises.* Second Edition. CRC Press LLC, EEUU:
- Sibi, M. L. and Fakiri, M. (2000). Androgénese et gynogénese, et de tolérance à la salinité Chez l'orge *Hordeum vulgare* ? *Se cheresse*, 1 (2) : 125-132.
- Sibi, M.L. and Fakiri, M. (2000). Androgénese et gynogénese sources de vitroviation et de tolérance à la salinité chez l'orge

- Sokmen, A., Jones, B.M., Erturk, M. 1999. Antimicrobial activity of extracts from the cell cultures of some Turkish medicinal plants. *Phytotherapy Research* 13, 355–357.
- Tahir, F., Rashid, H., Chaudhury, Z. and Qurashi, A. 2002. Protein estimation of embryogenic calli as a monitor of salt tolerance. *Pak. J. Agric. Res.* 17:55-56.
- Tang, Z. X., Zhang, H.Q. , Zhang, H.Y., Yang,. B.J. and Ren, Z.L. 2005. Germination and callus formation of different mature embryos of wheat in vitro culture. *J. Triticea Crops*, 25:33-36.
- Tarczynski, M.C.; Jensen, R.G. y Bohnert, H.J. 1993. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*. 259: 508-510.
- Tomar, P.C. and Punia, M.S. 2003. In vitro screening for salt tolerance of cultivar of wheat [*Triticum aestivum* (L.) Thell]. *Ann. Agric. Biol. Res.* 8: 91-92.
- Tona, L., Ngimbi, N.P., Tsakala, M., Mesia, K., Cimanga, K., Apers, S., De Bruyne, T., Pieters, L., Tott'e, J., Vlietinck, A.J. 1999. Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 68, 193–203.
- Tona, L., Mesia, K., Ngimbi, N.P., Chiriwami, B., Okond'ahoka, Cimanga, K., De Bruyne, T., Apers, S., Hermans, N., Pieters, L., Totte, J., Vlietinck, A.J., 2000. In-vivo antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus niruri*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 95, 47–57.
- Valarini, M. J.; Otsuk, I. P. and Vieira, M. L. C. 1997. Changes in N<sub>2</sub> fixation in *Stylosanthes scabra* derived from tissue culture. *Brazilian Journal of Genetics*. 20 (4): 713- 716.
- van den Bulk, R. W., Laffler, F. J. M., Lindhout, W. H. and Koornneef, M. 1990. Somaclonal variation in tomato. : Effect of explant source and comparison with chemical mutagenesis. *Theor. Appl. Genet.* 80: 817-825.
- Vicedo, A., Vicedo, Y. 2000. Relaciones entre estrés oxidativo con el catabolismo de proteínas. *Rev. Cubana Invest Biomed*, 19: 206-12.
- Willekens, H.; Chamnongpol, S.; Davey, M.; Schraudner, M.; Langebartels, C.; Van Montagu, M.; Inze, D. & Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C plants. *EMBO Journal*. 16(3): 4806–4816.
- Withers, L. A. 1985. Preservation of germplasm. *Intl. Rev. Phytology*. Suppl., 11B. p.101-136.
- Xiong, L. and Zhu, J. K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 131-139.

- Zair, I. , Chlyah, A., sabunji, K., Tittahsen, M. and Chlyah, H. 2003. salt tolerance improvement in some wheat cultivas after application of in vitro selection pressure. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73: 237-244.
- Zambrano, A., Jhonny R. Demey, J.R and González, V. 2002. Selección *in vitro* de líneas celulares de caña de azúcar resistentes a glifosato. *Agronomía Tropical* 52(2): 139-160. 2002.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y. Li, B. and Zhang, L.. 2004. Nitric Oxide Functions as a Signal in Salt Resistance in the Calluses from Two Ecotypes of Reed. *Plant Physiology*, Vol. 134, pp. 849–857, [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org).
- Zhentian, L., Jervis, J., Helm, R.F., 1999. C-glycosidic ellagitannins from white oak heartwood and callus tissues. *Phytochemistry* 51, 751–756.
- Zhu, J.K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 124: 941–948.
- Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. 6: 66–71.
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 53: 247-273.