

Caracterización *in vitro* de la respuesta al NaCl en callos en las fases de multiplicación y regeneración de varios genotipos de arroz

Pedro Orellana Pérez^{1*} y Pablo Leandro Peña González². * Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km. 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: porellana@ibp.uclv.edu.cu

² Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Centro Universitario de Las Tunas. Ave. Carlos J. Finlay s/n. CP 75200. Las Tunas, Cuba. e-mail: pablo1pg@yahoo.com

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la respuesta en diferentes fases del desarrollo *in vitro* de cuatro somaclones de arroz para tolerancia a la salinidad, a distintas concentraciones de NaCl. Los somaclones utilizados para el estudio fueron: 'IAC-25', 'IAC-26', 'R-13-K1-1-10', 'R-20-K1-1-2', como control tolerante a la salinidad se empleó la variedad 'Pokkali' y como susceptible la variedad 'MI-48'. Se encontró una respuesta diferencial para la tolerancia a la salinidad entre los genotipos tolerantes y susceptibles en dependencia de la concentración de NaCl en el crecimiento del callo y la regeneración de plantas. De acuerdo con el comportamiento en los experimentos realizados, el somaclon más tolerante en niveles hasta 1.5% *in vitro* de NaCl en ambas fases de desarrollo, fue el 'IAC-25', con un comportamiento similar a la variedad 'Pokkali'. El resto de los somaclones, presentaron bajos niveles de tolerancia en comparación con la variedad resistente. En la fase de multiplicación del callo se requirieron dos subcultivos consecutivos en el medio de cultivo que contenía NaCl para obtener una clara expresión diferencial entre genotipos tolerantes y susceptibles a esta sal.

Palabras clave: callo, salinidad, niveles, somaclones, regeneración

ABSTRACT

This paper present the *in vitro* response in two different development stages of four rice somaclons for the salt tolerance using five NaCl concentrations. The evaluated somaclons were: 'IAC 25', 'IAC 26', 'R 13 - K1 - 1 - 2' and 'R 20 - K1 - 1 - 2'. The varieties 'Pokkali' and 'Mi 48', were used as resistant and susceptible controls, respectively. It was find a differential reaction for tolerant and susceptible genotypes for the salt tolerance in dependence of the NaCl concentration in the callus growing and regeneration stages. The regeneration stage showed higher sensibility to NaCl concentration. According with these results, the somaclon 'IAC 25' like the 'Pokkali' variety, expressed salt tolerance until 1.5% of NaCl in both development stages. The others somaclons presented low salt tolerance levels compared with the resistant variety. In the multiplication stage of the callus two continuous subcultures on the culture media with NaCl are necessary in order to express a clear differential reaction between tolerant and susceptible genotypes to this sal.

Key words: callus, levels, regeneration, salinity, somaclons

INTRODUCCIÓN

La salinización de los suelos constituye una de las principales problemáticas de la producción arroceras de Cuba, provocando una notable reducción de los rendimientos y disminución creciente de las áreas productivas.

Existen en el país alrededor de 100 000 hectáreas dedicadas al cultivo del arroz, de las cuales más del 60% se encuentran afectadas por diferentes grados de salinización, de ellas unas 33 000 hectáreas con alto grado, localizadas en las zonas arroceras de las provincias de Granma, Pinar del Río, Santi Spíritus y Matanzas (Labrada, 1999). Es por ello que disponer de variedades de arroz con un mayor grado de tolerancia a la salinidad reviste gran importancia.

La mejora y selección genética de este carácter ha sido difícil mediante el uso de los métodos clásicos en los programas de mejoramiento genético. Una de las vías para el mejoramiento de este carácter lo constituye el empleo de técnicas biotecnológicas. Adkins (1992) planteó que la variación somaclonal puede ser una forma para generar variabilidad genética, la que unida a la selección *in vitro* puede resultar una poderosa herramienta para la obtención de variedades tolerantes a diferente estrés abióticos. Resultados de investigaciones sobre obtención de líneas celulares o somaclones tolerantes a la salinidad han sido publicados desde hace varios años, entre ellos González (1987); Krishnaraj y Screerangasamy (1993); González (1993) y Flowers y Yeo (1995). El empleo de la ingeniería genética y nuevos métodos de selección han propiciado avances más rápidos en

la obtención de genotipos tolerantes (Singh *et al.*, 2002; Omokawa y Aonuma, 2002).

Por otra parte, se ha trabajado en la determinación de marcadores morfológicos, fisiológicos y moleculares en variedades de arroz con respecto a tolerancia a la salinidad (Bohnert y Jensen, 1996; Winicov y Bastola, 1997), lo cual permite una estimación aceptable de la posible explicación genética de la tolerancia de genotipos al estrés salino.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la posibilidad de identificar genotipos de arroz tolerantes al efecto tóxico del NaCl en las fases de multiplicación y regeneración de callos y la posible relación para la respuesta en ambas fases.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas y procedimientos generales

Para este estudio se utilizaron cuatro somaclones de arroz: 'IAC-25', 'IAC-26', 'R-13-K1-1-10' y 'R-20-K1-1-2', obtenidos desde cultivo de anteras de la variedad de arroz 'Perla'. Las variedades usadas como controles fueron la 'Pokkali' como tolerante a la salinidad y la 'MI-48' como susceptible. Todos los genotipos pertenecen a la especie *Oryza sativa* L. y a la subespecie indica, excepto la variedad 'Pokkali' que pertenece a la subespecie japónica. Las semillas fueron obtenidas en la Estación Territorial de Investigación del Arroz, Vado del Yeso, Granma.

A todas las variables analizadas se les realizó la prueba de bondad de ajuste a la distribución normal (procesamiento no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov) y la prueba de homogeneidad de varianza de Cochran. Se aplicó un análisis de varianza simple y prueba de rangos múltiples de Duncan al 5% de significación; en algunos casos el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se determinaron

las correlaciones parciales utilizando la prueba de Pearson con el programa SPSS.

Estudio del crecimiento de los callos en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de NaCl durante la fase de multiplicación

Desinfección del explante: Como explantes iniciales se utilizaron semillas maduras y sin la cubierta (cáscara). Para la desinfección de estas se procedió al descascarado manual. Luego se llevó a cabo el procedimiento referido por González (1987). Por último se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril.

Inducción de callos: Para la inducción de callos se empleó el medio de cultivo basal compuesto por las sales, vitaminas y sacarosa de Murashige y Skoog (1962) en estado semisólido y la adición de 2.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D.

Se utilizaron como explantes 100 semillas por somaclon o variedad, colocándose dos semillas por tubo de ensayo de 15 x 1.5 cm, cada tubo contenía 5 ml del medio de cultivo. Para la obtención de callos los explantes se mantuvieron durante 21 días en ausencia de luz a una temperatura de 27 ± 2 °C.

Multiplicación de los callos: Al cabo de los 21 días los callos formados se subdividieron, colocando 15 callos por frasco. Cada frasco contenía 25 ml del mismo medio de cultivo y se mantuvieron en la oscuridad durante el mismo período de tiempo y a la misma temperatura señalada. Después de dos subcultivos de multiplicación, se seleccionaron los callos más compactos y friables y se seccionaron en segmentos de 3 a 4 mm para ser evaluados en el medio de cultivo con el NaCl. Se utilizaron cinco tratamientos con el mismo medio de cultivo basal con diferentes concentraciones de NaCl, incluyendo un tratamiento sin la sal (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de NaCl en el medio de cultivo MS(1962) para el estudio de la tolerancia de genotipos de arroz en la fases de multiplicación y regeneración del callo.

Tratamiento	Composición del medio de cultivo
1	MS + 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0,0 % de NaCl.
2	MS + 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 0.5 % de NaCl.
3	MS + 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 1.0 % de NaCl.
4	MS + 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 1.5 % de NaCl.
5	MS + 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D + 2.0 % de NaCl.

VARIABLES EVALUADAS

Se evaluó el crecimiento de los callos cada 96 horas según la escala propuesta por Santana (1982) hasta los 20 días, tomándose este parámetro como un indicador de tolerancia a la salinidad.

Del total de callos con grado tres o superior en la escala de Santana (1982), el 50% fueron sometidos a un segundo subcultivo en medio selectivo con la misma concentración de NaCl, determinándose igualmente el valor del crecimiento del callo.

Regeneración de plantas a partir de callos tratados con diferentes concentraciones de NaCl en la fase de multiplicación

El 50% de los callos provenientes de los que crecieron en las diferentes concentraciones de NaCl, en el primer subcultivo, fueron transferidos a un medio de cultivo para la regeneración de plantas (medio de cultivo MS suplementado con 1.5 mg.l⁻¹ de BAP) y llevados a una cámara de crecimiento de luz solar indirecta, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos que osciló entre 48.0-62.5 μ mol. m⁻². s⁻¹. El 100% de los callos con crecimiento superior a tres en la escala de Santana (1982) durante el segundo subcultivo de multiplicación fueron también transferidos al mismo medio de cultivo de regeneración. Para estos experimentos se emplearon tres frascos por tratamientos y 15 callos por frasco para cada subcultivo. Después de 20 días, en cada concentración de NaCl se evaluó el porcentaje de callos que regeneraron plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio del crecimiento de los callos en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de NaCl durante la fase de multiplicación

Crecimiento de los callos durante el primer subcultivo

El crecimiento de los callos en la fase de multiplicación se redujo en la medida que se incrementó la concentración de NaCl, mostrando la mayor afectación en la concentración de 2% (Tabla 2). Entre los genotipos se obtuvo la mejor respuesta para el somaclón 'IAC-25' y la variedad 'Pokkali' (control tolerante a la salinidad), que no mostraron diferencias entre sí para ninguna concentración. En el resto de los genotipos el comportamiento fue muy similar al genotipo susceptible ('Mi 48'). Los resultados mostraron que hasta el nivel de 1.5% de NaCl en el medio de cultivo se presentan diferencias entre los genotipos que pueden estar relacionadas con el nivel de tolerancia, pero el comportamiento fue similar al nivel de 2% donde no se produjo crecimiento de los callos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Marassi y Rapela (1989) empleando iguales concentraciones de NaCl.

Tabla 2. Valor medio del crecimiento de callos, después de 20 días en el primer subcultivo sobre el medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de NaCl en seis genotipos de arroz.

Genotipos	NaCl en el medio de cultivo (%)				
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0
IAC 25	3.80 a	3.42 a	3.12 a	2.65 a	1.73 a
IAC 26	3.75 a	2.85 c	2.68 b	1.98 b	1.62 a
R-13-K1-1-10	3.77 a	3.12 bc	2.72 b	2.03 b	1.68 a
R-20-K1-1-2	3.78 a	2.95 bc	2.85 ab	2.15 b	1.52 a
Pokkali	3.92 a	3.35 ab	3.13 a	2.58 a	1.72 a
Mi-48	3.68 a	2.97 bc	2.25 c	1.98 b	1.52 a

(a,b,c): Medias de valores con letras no coincidentes en las columnas, difieren entre sí según la prueba de rangos múltiples de Duncan (P = 0.05).

Crecimiento de los callos durante dos subcultivos consecutivos en NaCl

Al analizar el comportamiento de los callos que crecieron en las mismas concentraciones de NaCl durante dos subcultivos consecutivos (Tabla 3), se observó la misma tendencia observada en el primer subcultivo, pero las diferencias entre genotipos se encontraron a partir de la concentración de 1.0% de NaCl. Los somaclones 'IAC 25' y el 'R-20-K1-1-2' fueron los de mejor comportamiento al compararse con el control resistente, no difiriendo de este en las mayores concentraciones de NaCl. En los genotipos donde el crecimiento fue sensiblemente afectado desde 1.5% de NaCl ('IAC 26', 'R-13-K1-1-10' y 'Mi 48') este quedó prácticamente inhibido.

En los dos experimentos analizados el cultivar 'Mi 48' susceptible presentó el menor crecimiento del

callo, difiriendo significativamente del control tolerante ('Pokkali') y del somaclón 'IAC 25', lo cual indicó que este último presentó tolerancia al NaCl en esta fase del crecimiento celular.

Los resultados indicaron que al cultivar los callos en dos subcultivos consecutivos en la fase de multiplicación con NaCl, las diferencias entre genotipos tolerantes y susceptibles se expresaron de forma más evidente. Este comportamiento pudo deberse al efecto de la selección continua durante los dos subcultivos, donde las células más tolerantes presentan mayores posibilidades para multiplicarse. Estos resultados sugieren la necesidad de realizar, al menos, dos subcultivos en el medio de cultivo con el agente selectivo para que se exprese más claramente la respuesta diferencial al NaCl en esta fase y utilizar como concentración máxima, 1.5% de este agente selectivo.

El aspecto de los callos que presentaron crecimiento en el medio de cultivo sin NaCl fue de color amarillento y de características friables. Los que fueron colocados en el medio de cultivo con NaCl y no crecieron, se tornaron de pardos oscuros a negros, debido a que el tipo y grado de

pigmentación está marcadamente influenciado por factores nutricionales y ambientales. En los de mayor tasa de crecimiento (mayor que tres en la escala de Santana, 1982), se observó la formación de grupos celulares nuevos de color más blanco y friables.

Tabla 3. Valor medio del crecimiento de callo de arroz a los 20 días en el segundo subcultivo sobre un medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de NaCl.

Genotipos	NaCl en el medio de cultivo (%)				
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0 a
IAC 25	3.92 b	3.25 b	3.16 b	1.81 b	1.53 b
IAC 26	3.90 b	3.19 b	3.17 b	1.39 c	1.21 c
R-13-K1-1-10	3.89 b	3.19 b	2.81 c	1.33 c	1.19 c
R-20-K1-1-2	3.83 b	3.19 b	3.00 bc	1.65 b	1.53 b
Pokkali	4.22 a	3.47 a	3.50 a	2.06 a	1.94 a
Mi-48	3.91 b	3.17 b	1.92 d	1.35 c	1.23 c

(a,b,c): Medias de valores con letras no coincidentes en las columnas, difieren entre sí según la prueba de rangos múltiples de Duncan (P = 0.05).

Suenaga *et al.* (1982) encontraron que el crecimiento de los callos de arroz fue fuertemente retardado en concentraciones de NaCl de 1.0 a 1.5% y severamente dañado a 2.0%, no observándose crecimiento de callos a 3.0%, por lo que recomendaron utilizar la concentración de 1.5% para la selección de líneas de callos mutantes tolerantes a la salinidad.

Según Reddy y Vaidyanath (1986) las líneas resistentes a la salinidad en condiciones salinas, son capaces de mantener una relación hídrica favorable para enfrentarse a los iones potencialmente tóxicos y obtener los nutrientes requeridos a pesar del predominio de otros iones en el medio. Este fundamento, también referido por Gollidack *et al.* (2003), pudiera explicar el comportamiento de la variedad 'Pokkali' y el somaclon 'IAC 25' en este estudio. Un mecanismo a esta respuesta puede ser el que refieren Chattopadhyay *et al.* (2002), quienes descubrieron que las plantas de la variedad 'Pokkali' acumulan poliaminas superiores tales como espermidina y espermina en respuesta al estrés salino, mientras que el genotipo 'Mi 48' es incapaz de mantener esos niveles en similares condiciones.

Los resultados obtenidos evidenciaron que la tolerancia a la salinidad se expresa a nivel celular. Meredith (1984) realizando estudios intergenéricos, interespecíficos e intraespecíficos detectó diferencias en cuanto a la tolerancia a la salinidad que se reflejaban a este nivel.

Regeneración de plantas a partir de callos tratados con diferentes concentraciones de NaCl en la fase de multiplicación

En callos con un subcultivo en la fase de multiplicación

En el primer subcultivo se encontró que la concentración salina influyó en la capacidad

regenerativa, observándose una gran diferencia entre los callos tratados con NaCl y los no tratados. La capacidad regenerativa de los callos se redujo en la medida que se incrementó la concentración de NaCl, mostrando una alta afectación aun en la concentración más baja (Tabla 4). Entre los genotipos se obtuvo la mejor respuesta para el somaclon 'IAC-25' y la variedad 'Pokkali' (control tolerante a la salinidad), que no mostraron diferencias entre sí para ninguna concentración, seguidos por el somaclon 'IAC 26' con un porcentaje de regeneración inferior. Los resultados mostraron que para esta fase de desarrollo hasta el nivel de 1.5% de NaCl en el medio de cultivo, se presentan diferencias en los genotipos que parecen estar relacionadas al grado de tolerancia, pero el comportamiento es similar al nivel de 2% donde no se produjo la regeneración de plantas en ningún genotipo.

En callos con dos subcultivos consecutivos en el medio de cultivo de multiplicación

Al analizar el comportamiento de la regeneración de callos procedentes de dos subcultivos en las mismas concentraciones de NaCl (Tabla 5), se observó un comportamiento muy similar a los callos provenientes de un subcultivo, tanto en la afectación por la presencia del NaCl en el medio de cultivo, como por la respuesta de los genotipos 'IAC 25' y 'Pokkali'. Como diferencia en el comportamiento de los callos con un subcultivo, se observó que la afectación fue más drástica a partir de la concentración de 1.0% de NaCl, donde la capacidad regenerativa fue prácticamente inhibida en todos los genotipos. Para este caso, en todos los tratamientos, incluyendo el que no contenía NaCl, el porcentaje de regeneración fue relativamente más bajo al compararse con los valores obtenidos en los callos

del primer subcultivo. Este comportamiento puede explicarse por la pérdida de la capacidad regenerativa de los callos en la medida que se aumenta el número de subcultivos en muchas especies (Pérez *et al.*, 1998), lo cual se hace más notable en los callos bajo el estrés salino.

Al igual que en la fase de multiplicación del callo, el cultivar susceptible 'Mi 48' fue el más afectado, presentando el menor porcentaje de regeneración de sus callos, difiriendo significativamente del control resistente ('Pokkali') y del somaclón 'IAC 25', lo cual ratifica la tolerancia de este somaclon al NaCl.

Tabla 4. Porcentaje de callos de arroz que regeneraron plantas después de un subcultivo en el medio de cultivo que contenía diferentes concentraciones de NaCl.

Genotipos	NaCl en el medio de cultivo (%)				
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0
IAC 25	34.6 ab	11.1 a	5.2 ab	3.2 ab	0.0 a
IAC 26	32.2 bc	6.7 bc	6.7 a	2.2 bc	0.0 a
R-13-K1-1-10	33.3 ab	4.4 c	3.7 bc	0.0 c	0.0 a
R-20-K1-1-2	29.8 c	6.7 bc	2.2 c	1.4 bc	0.0 a
Pokkali	35.6 a	8.9 ab	6.7 a	4.5 a	2.0 a
Mi-48	26.7 d	4.4 c	3.2 bc	0.0 c	0.0 a

(a,b,c,d): Medias de valores con letras no coincidentes en las columnas, difieren entre sí según la prueba de rangos múltiples de Duncan (P = 0.05).

Tabla 5. Porcentaje de callos de arroz que regeneraron plantas después de dos subcultivos consecutivos en el medio de cultivo con diferentes concentraciones de NaCl.

Genotipos	NaCl en el medio de cultivo (%)				
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0 a
IAC 25	20.0 a	6.7 ab	2.2 ab	2.3 ab	0.0 a
IAC 26	19.2 ab	4.4 bc	0.0 b	0.0 b	0.0 a
R-13-K1-1-10	17.3 bc	6.7 ab	2.2 ab	0.0 b	0.0 a
R-20-K1-1-2	16.8 c	4.2 c	2.2 ab	2.2 ab	0.0 a
Pokkali	20.2 a	8.9 a	3.4 a	3.2 a	2.2 a
Mi-48	16.3 c	2.2 c	0.0 b	0.0 b	0.0 a

(a,b,c): Medias de valores con letras no coincidentes difieren, difieren entre sí según la prueba de rangos múltiples de Duncan (P = 0.05).

Los resultados indicaron que el NaCl, aun a bajas concentraciones en la fase de multiplicación del callo, afectó notablemente la capacidad regenerativa de estos aun en los genotipos tolerantes a este agente, por lo cual no es recomendable emplear la evaluación de la capacidad regenerativa como criterio de selección de tolerancia al NaCl en arroz, no obstante se encontró, que los genotipos que presentaron mayor crecimiento del callo mostraron también el mayor porcentaje de regeneración. Una correlación positiva y altamente significativa con un valor de $b = 0.826^{**}$, se encontró para la respuesta al estrés salino en ambos estados de desarrollo del callo.

Afectaciones en la disminución de la regeneración de brotes con el incremento de las concentraciones salinas han sido obtenidas por Marassi y Rapela (1989) y González (1993). Labrada (1999) recomendó que concentraciones de NaCl entre 4 mM y 10 mM pueden ser adecuadas para la obtención de callos

en genotipos tolerantes y la posterior regeneración *in vitro* de plantas de arroz.

De los callos que no regeneraron, una baja frecuencia presentó emisión de raíces sin brotes meristemáticos foliares y la mayor parte murieron. También se presentaron casos aislados de vástagos carentes de clorofila (albinos). Krishnaraj y Screerangasamy (1993) seleccionaron líneas de arroz tolerantes a la salinidad a partir de cultivo de anteras y encontraron que con el incremento de las concentraciones salinas disminuyó la sobrevivencia de los callos y aumentó la frecuencia de plantas albinas, indicando que muchas de estas variaciones fueron de carácter epigenético.

CONCLUSIONES

El crecimiento de callos durante dos subcultivos consecutivos en medios de cultivo de multiplicación

que contengan hasta 2.0% de NaCl, permitió obtener una expresión diferencial para la tolerancia a esta sal entre genotipos tolerantes y susceptibles.

El somaclon 'IAC-25' presentó tolerancia al efecto tóxico de NaCl, al compararse con la variedad resistente 'Pokkali' y la susceptible 'Mi 48'.

La fase de regeneración de callos en medios de cultivo que contenían NaCl, fue fuertemente afectada aun a bajas concentraciones tanto en genotipos tolerantes como susceptibles a esta sal.

REFERENCIAS

- Adkins, P (1992) Somaclonal variation in plant regenerates from rice callus emergence tolerance and other agronomic characters. En: Agricultural Biotechnology. Proceeding of Asia-Pacific. Conference on Agriculture Biotechnology. Beijing. p. 330-333
- Bohnert HJ, Jensen RG (1996) Metabolic engineering for increased salt tolerance ± the next step. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 661±667
- Chattopadhyay, MK, Tiwa BS, Chattopadhyay G, Bose A, Sengupta DN y Ghosh B (2002) Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiol Plant*, 116(2): 192-199
- Flowers TJ, Yeo AR (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 875-884
- Golldack D, Quigley F, Michalowski CB, Kamasani UR y Bohnert HJ (2003) Salinity stress-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa* L.) regulate AKT1-type potassium channel transcripts differently. *Plant Mol Biol*, 51(1): 71-81
- Gonzalez Cepero, MC (1993) Uso de la Variación Somaclonal en el mejoramiento genético para la tolerancia a la salinidad en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis de doctorado. ISCAH. INCA. La Habana. Cuba. 98 p.
- González Frontela, OE (1987) El cultivo de tejidos en arroz (*Oryza sativa* L.) y su empleo en el mejoramiento genético. Tesis de grado. UCLV. Santa Clara. Cuba. 27 p.
- Krishnaraj, S y Screerangasamy SR (1993) *In vitro* salt tolerance screening in longterm anther cultures of rice (*Oryza sativa* L.) variety IR-50. *Journal of Plant Physiology*. 142(6): 754-758
- Labrada MP (1999) Selección *in vitro* en condiciones salinas de líneas de arroz obtenidas a través del uso combinado de técnicas biotecnológicas y nucleares. Tesis para optar por el grado de maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, IBP. Pp. 66
- Marassi, MA 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
- Meredith, CP (1984) Selecting better crops from cultered cells. En: Gene manipulation in plant improvement. p. 503-525
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15:473-497
- Omokawa H y Aonuma S (2002) Amelioration of the salt-stressed root growth of rice and normalization of the Na⁺ distribution between the shoot and root by (S)-alpha-methylbenzyl-2-fluoro-4-methylphenylurea. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(2): 336-43
- Pérez, PJ (1998) Mejora por mutaciones y selección *in vitro*. En: Juan Pérez Ponce, Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. pag. 241-158. Santa Clara
- Reddy, PJ y Vaidyanath K (1986) *In vitro* characterization of salt stress effects and the selection of salt tolerant plants in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl. Genet*. 71: 757-760
- Santana, N (1982) Determinación de un medio para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) *in vitro*. *Cultivos Tropicales* 24: 567-577
- Singh RK, Mishra B, Chauhan MS, Yeo AR, Flowers SA y Flowers TJ (2002) Solution culture for screening rice varieties for sodicity tolerance. *The Journal of Agricultural Science*, 139: 327-333
- Suenaga, K, Abrigo M y Yoshida S (1982) Seed derived callus culture for selecting salt tolerance rice. Part I. Callus induction plant regeneration and various and visible plant traits. *IRRI Res. Paper Series* No.79
- Winicov I, Bastola DR (1997) Salt tolerance in crop plants: new approaches through tissue culture and gene regulation. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 435-449