

Respuesta *in vitro* de variedades de arroz a condiciones de estrés hídrico

Aymara García^{1*}, María T. Marrero² y María C. González^{3*} * Autor para correspondencia

¹ Instituto de Investigaciones de Riego y Drenaje. Avenida Camilo Cienfuegos y Calle 27 Arroyo Naranjo. Cuba. e-mail: iird@ceniai.inf.cu

² Instituto de Endocrinología

³ Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

RESUMEN

Con el objetivo de conocer la respuesta *in vitro* de dos variedades de arroz en condiciones de estrés hídrico mediante el uso de concentraciones de Polietilenglicol-6 000 (PEG-6 000) se realizó el presente estudio. Como medio de cultivo basal tanto en la formación del callo como en la regeneración de plantas se utilizaron las sales de Murashige y Skoog (MS). En el primer caso, se añadieron al medio de cultivo los reguladores del crecimiento 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6- Bencilaminopurina (BAP), mientras que para el segundo, fueron 6- Bencilaminopurina y Kinetina (Kin). En ambos, se emplearon diferentes concentraciones del agente estresante (0, 5.0, 7.5 y 10%) y se determinó su efecto sobre el potencial osmótico, la inducción y el crecimiento del callo, así como, la regeneración de plantas. Se evidenció un comportamiento diferenciado de las variedades en cuanto a su grado de tolerancia al estrés hídrico con el empleo de 5 y 7.5% del agente estresante, tanto en la formación como en las masas fresca y seca de los callos. Asimismo las concentraciones favorecieron la inducción de brotes y plantas en medio de cultivo de regeneración de plantas sin la presencia de PEG-6000; mientras que cuando se añadió al medio de cultivo inhibió completamente este proceso.

Palabras clave: callos, crecimiento, *Oryza sativa*, PEG, regeneración de plantas

ABSTRACT

The present study was carried out with the objective of determining *in vitro* response of two rice varieties to water stress conditions of water stress using concentrations of Polyethyleneglycol – 6 000 (PEG). As basal medium in calli formation and plant regeneration the salts Murashige and Skoog were used (MS). In the first case, plant growth regulators as 2,4 - Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and 6 - Bencilaminopurine (BAP) were added to culture medium, meanwhile for the second, 6 - Bencilaminopurine and Kinetin (Kin). In both, different concentrations of stressing agent were used, (0, 5.0, 7.5 and 10%), being determined their effect on osmotic potential, induction and growth of calli, as well as, plant regeneration. A differentiated behavior of varieties not only in calli formation and also in fresh and dry weight was evidenced in correspondance of its tolerance grade using 5 and 7.5% of PEG-6 000. Those concentrations favored shoot and plants induction in plant regeneration medium without the presence of PEG-6 000; meanwhile when itn was added to this kind of culture medium it inhibited this process completely.

Key words: calli, growth, *Oryza sativa*, PEG, plant regeneration

INTRODUCCIÓN

El estrés hídrico es uno de los factores que mayores daños ocasiona en el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos (Lascano *et al.*, 2001; Flexas *et al.*, 2002) y especialmente en el arroz Thanh *et al.* (1999) lo consideraron como la limitante principal de su productividad.

En Cuba, durante los últimos años se ha observado una reducción sustancial de los rendimientos del arroz *Oryza sativa* L, provocado por diferentes factores, destacándose la poca disponibilidad de agua, pues más de 100 000 ha se cultivan sin aseguramiento del riego (Socorro, 1997). Por ello, se realizan investigaciones encaminadas a la obtención y

evaluación de nuevas variedades con adaptabilidad a estas condiciones, porque este cereal reviste singular importancia en la alimentación de la población (Alfonso *et al.*, 2000; Alfonso *et al.*, 2002).

La evaluación y selección de líneas y variedades con tolerancia a déficit hídrico se ha realizado principalmente a nivel de campo, donde se han obtenido significativos resultados (Alfonso, 1998). Sin embargo, existen posibilidades a nivel de laboratorio con el empleo de agentes estresantes que permiten simular condiciones de estrés hídrico. Al respecto, entre los que se recomiendan se encuentran: manitol, sorbitol, Cloruro de sodio (NaCl) (Broetto *et al.*, 1999; Zeng y Shannon, 2000) y el polietilenglicol (PEG) (Lee y Kim, 1999; Lu y

Neumann, 1999), siendo este último el más utilizado porque permite mantener el medio experimental a valores predeterminados de potencial hídrico y es capaz de competir con las células por el agua debido a su alto peso molecular, lo cual facilita la retención del líquido y provoca de esta forma un estrés osmótico (Guía, 1998).

Por otra parte, diferentes autores han utilizado los métodos biotecnológicos, para conocer el comportamiento de variedades ante condiciones de déficit de agua ya que conllevan a una mayor economía, espacio, y mano de obra así como contribuyen a un mayor conocimiento de los procesos genéticos, bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar en plantas sometidas a estrés hídrico (Gangopadhyay *et al.*, 1997; Geetha *et al.*, 1997). Asimismo, se ha informado la obtención de variedades de arroz con tolerancia a la sequía y la salinidad (González *et al.*, 1998, 2002; Pérez *et al.*, 1998).

Conociendo las posibilidades que brindan las técnicas biotecnológicas, la problemática existente y dada la importancia que tiene para la agricultura la obtención y evaluación de líneas y variedades con tolerancia al estrés hídrico, el estudio tuvo como objetivo, determinar la respuesta *in vitro* de variedades de arroz ante condiciones de estrés hídrico simulado con concentraciones de PEG- 6 000.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En este experimento se utilizaron dos variedades de arroz con diferentes grados de tolerancia a la sequía: Jucarito-104 (J-104, Susceptible) e INCA LP-7 (LP-7, Tolerante) (Alfonso, 1998, González, 1993).

Inducción de estrés hídrico

Para la inducción de estrés hídrico se empleó el polietilenglicol (PEG- 6000) (García *et al.*, 1999) a las concentraciones de 5, 7.5 y 10%.

Efecto del agente estresante sobre el potencial osmótico, formación y crecimiento de callos

Para la formación de callos se empleó el medio de cultivo propuesto por González (1993), que contenía las sales minerales de MS (Murashige y Skoog, 1962), las vitaminas de Morell, agar Gelrite y los reguladores del crecimiento 2,4-D y BAP Bencilaminopurina al que se le añadieron las diferentes concentraciones de PEG- 6 000 (Tabla 1). Además, se utilizó una variante de medio de cultivo control en ausencia del agente estresante. El pH fue ajustado a 5.8 y los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120°C y 1.5 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Se utilizaron semillas maduras de cada variedad, que se desinfectaron con Hipoclorito de Sodio comercial al 2.5% durante 15 minutos. Se sembraron dos semillas por tubo de ensayo y se emplearon 16 por cada variante de medio de cultivo y ocho por cada variedad en estudio. Tanto la siembra como la desinfección se realizaron en condiciones de asepsia en una cabina de flujo laminar. Los cultivos se mantuvieron en ausencia de luz y a una temperatura de 27±2°C. Semanalmente se valoró la formación de callos. A los 30 días se determinó el porcentaje de inducción de callos según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ formación de callos} = \# \text{ de callos formados} / \# \text{ de semillas sembradas} \times 100$$

Asimismo se evaluó el potencial osmótico en un Osmómetro de presión de vapor y las masas fresca y seca (mg) a cinco callos por variedad y variante de medio de cultivo, excepto para los callos formados en el medio de cultivo al que se añadió la concentración de 10% de PEG-6 000, debido a que se obtuvo muy bajo porcentaje de formación de callos. Para el procesamiento de la masa seca, los callos se colocaron en una estufa a 80 °C hasta obtener una masa constante.

Regeneración de plantas

Los callos obtenidos se subcultivaron al medio de cultivo de regeneración de plantas propuesto por González (1993) que contenía las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962), las vitaminas de Morell, agar Gelrite y los reguladores del crecimiento BAP y Kinetina. Se les añadieron las diferentes concentraciones de PEG-6 000 según se muestra en la tabla 1. Se conformaron diez variantes de medios de cultivo que difirieron en cuanto a los niveles del PEG - 6 000. Se utilizaron diez frascos por tratamiento y variedad y se colocaron cuatro callos en cada uno.

Los cultivos se colocaron a la misma temperatura (27±2°C) pero bajo un fotoperíodo de 16 h luz y a los 30 días, se evaluó el porcentaje de regeneración de plantas y el número de brotes y plantas por callo.

Los experimentos desarrollados fueron replicados tres veces y se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

Los porcentajes de formación de callos y de regeneración de plantas, fueron transformados según $Y = \arccos x^{1/2}$ y posteriormente los datos obtenidos de masa fresca y seca de los callos y números de brotes y plantas por callo, se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple para efectos fijos, efectuados por variedad. Asimismo, se documentaron las diferencias significativas entre tratamientos por la prueba de rangos múltiples de Duncan (1951).

Tabla 1. Concentraciones de PEG - 6 000 (%) utilizadas para simular el estrés hídrico en las fases de formación de callos y regenerativa en dos variedades de arroz.

| Var. | PEG-6000 (%) | |
|------|--------------|--------|
| | M.F.C. | M.R.P. |
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 5 | 0 |
| 3 | 7.5 | 0 |
| 4 | 10.0 | 0 |
| 5 | 0 | 5 |
| 6 | 5 | 5 |
| 7 | 0 | 7.5 |
| 8 | 7.5 | 7.5 |
| 9 | 0 | 10.0 |
| 10 | 10.0 | 10.0 |

M.F.C. Medio de cultivo de formación de callos
M.R.P. Medio de cultivo de regeneración de plantas
Var. Variantes de medios de cultivo utilizados

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del agente estresante sobre el potencial osmótico, formación y crecimiento de callos

Entre los siete y diez días de incubación del explante en oscuridad, se inició la formación de callos en las variedades para los tratamientos control, 5 y 7.5% de PEG- 6 000; mientras que a 10% comenzó a los 15 días después de la siembra. En todas las variantes de medio de cultivo y variedades utilizadas, los callos eran compactos y de color crema.

El potencial osmótico (Figura 1) se redujo cuando se aplicaron los tratamientos de estrés hídrico excepto en la variedad J-104 al incrementarse la severidad del estrés. De igual forma se observó que para 5 y 7.5% la disminución del potencial osmótico tuvo igual magnitud. Por el contrario, la variedad LP- 7 alcanzó valores más negativos del potencial osmótico y se detectó una mayor reducción cuando las células crecieron en presencia de 7.5% de PEG.

El potencial osmótico resultó ser una variable adecuada para detectar diferencias entre los cultivares en relación con las variaciones provocadas por el PEG en el medio de cultivo, los resultados se correspondieron con el grado de tolerancia que presentan estos cultivares a la sequía. El incremento de los valores de potencial osmótico ha sido demostrado en varios cultivos y se considera como un mecanismo adaptativo al déficit hídrico (Teulat *et al.*, 1998; Zhang y Zhao, 1998).

Santos y Ochoa (1994 a y b) evaluando el efecto de concentraciones de PEG- 8 000 que causaban el 50% de la reducción del crecimiento de las células de las especies *Capsicum annuum* y *Larrea tridentata*, encontraron que el potencial osmótico en presencia

del PEG para la especie tolerante al déficit hídrico tomaba valores cada vez más negativos. Por tal motivo se consideró esta respuesta como un mecanismo de tolerancia a la sequía que permite a las células ajustarse osmóticamente y mantener la turgencia. Ello se corresponde con lo señalado por Trivedi *et al.* (1991) quienes determinaron el comportamiento de callos de trigo (*Triticum aestivum* L.) en presencia de manitol, y al mismo tiempo enfatizaron, que dicha respuesta coincidió con lo obtenido a nivel de planta completa.

Al valorar el efecto del agente estresante sobre la callogénesis (Tabla 2), se detectaron variaciones significativas en la respuesta de cada variedad. Se evidenció de manera general, una reducción en la inducción de callos en la medida que se incrementaron las concentraciones de PEG- 6 000 en el medio de cultivo. La variedad J-104 presentó los menores porcentajes de formación de callos, con valores inferiores al 58.4% en presencia del agente estresante. Por su parte, la variedad LP- 7 no mostró diferencias significativas entre las variantes control y la de 5% de PEG- 6 000, aunque esta última concentración no difirió significativamente de 7.5% y sí de 10%, concentración a la que se obtuvieron porcentajes de inducción de callos menores al 50%. Es bueno señalar que a partir de 5% se observaron diferencias en la respuesta de los cultivares teniendo como referencia a la variante control. Similares respuestas en cuanto a reducciones en la formación de callos por efecto de concentraciones de manitol también fueron observadas por Zhang *et al.* (1996) en caña de azúcar (*Saccharum* sp.) además, encontraron correlación positiva entre la resistencia de los cultivares y la tolerancia de los callos expuestos a estrés hídrico por presencia de manitol.

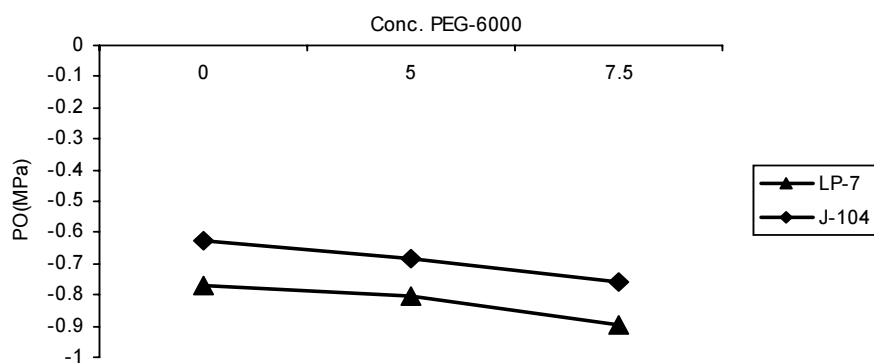


Figura 1. Comportamiento del potencial osmótico a las diferentes concentraciones de PEG-6 000 en dos variedades de arroz.

Tabla 2. Porcentajes de formación de callos de dos variedades de arroz en presencia de PEG-6 000.

| PEG -6000 (%) | LP- 7 | | J-104 | |
|---------------|---------|------|---------|------|
| | DT | DO | DT | DO |
| 0 | 80.1 a | 96.2 | 82.3 a | 97.3 |
| 5 | 73.7 ab | 91.2 | 49.9 b | 58.4 |
| 7.5 | 63.2 b | 78.2 | 36.8 c | 35.9 |
| 10.0 | 45.0 c | 49.9 | 27.6 c | 22.0 |
| ES(±) | 4.77** | | 3.21*** | |
| CV(%) | 12.8 | | 11.3 | |

DT: Datos transformados DO: Datos originales (%) ES: Error estándar CV: Coeficiente de variación. Medias con letras iguales en una columna no difieren según la prueba de rangos múltiples de Duncan * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En cuanto al crecimiento en masa fresca y seca de los callos formados ante los niveles del agente estresante se apreciaron diferencias significativas en el comportamiento de las variedades por influencia de las concentraciones de PEG- 6 000. Cabe destacarse que no se evaluó el efecto del 10% del agente estresante sobre estos indicadores, debido a los bajos porcentajes de inducción de callos. Para la masa fresca (Tabla 3), en la variedad LP- 7, no se encontraron variaciones significativas entre las variantes de medio de cultivo control y la de 5%. Sin embargo, la variedad J-104 redujo drásticamente el crecimiento de los callos a 5 y 7.5% del agente estresante, concentraciones que difirieron

significativamente entre sí. Por el contrario, para la masa seca, se apreció para la variedad LP- 7 incrementos significativos en condiciones de estrés, aunque se observaron diferencias significativas entre 5 y 7.5% de PEG- 6 000. Este comportamiento desarrollado por este cultivar permite que durante el estrés hídrico las células mantengan una determinada concentración de solutos que impidan la salida de agua a través de estas (González *et al.*, 1999). En cambio, la variedad J-104 disminuyó la masa seca de los callos a las concentraciones de PEG- 6 000 estudiadas, comportamiento que al parecer indica un síntoma de susceptibilidad.

Tabla 3. Comportamiento de las masas fresca y seca de los callos (mg) formados en presencia de PEG-6000 en las variedades de arroz en estudio.

| PEG -6000 (%) | Masa Fresca | | Masa Seca | |
|---------------|-------------|---------|-----------|---------|
| | LP - 7 | J-104 | LP - 7 | J-104 |
| 0 | 108.4 a | 128.8 a | 12.4 b | 7.9 a |
| 5.0 | 95.1 a | 60.3 b | 15.5 a | 5.9 b |
| 7.5 | 78.2 b | 46.4 c | 14.4 a | 5.8 b |
| ES(±) | 5.9** | 6.33*** | 0.99*** | 1.97*** |
| CV(%) | 16.5 | 45.4 | 27.1 | 38.1 |

ES: Error estándar CV: Coeficiente de variación

Medias con letras iguales en una columna no difieren según la prueba de rangos múltiples de Duncan * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Barakat y Abdel-Latif (1995a), realizando la selección de líneas de maíz (*Zea mays*) tolerantes a estrés hídrico, encontraron afectación en la tasa del crecimiento relativo de los callos por efecto del genotipo y de concentraciones de PEG; aunque estos mismos autores en trigo (*Triticum aestivum* L.) (Barakat y Abdel-Latif, 1995b), obtuvieron un incremento proporcional de la masa seca de callos cultivados en presencia de PEG en relación con los niveles crecientes del agente estresante empleados en el medio de cultivo.

Regeneración de plantas

Al valorar la regeneración de plantas, que se evidencia en la Figura 2, en los medios de cultivo que contenían 5.0, 7.5 y 10% de PEG- 6000, se encontró que los

callos comenzaron a cambiar de pigmentación tornándose amarillentos y de apariencia acuosa, lo cual influyó negativamente en la inducción de brotes y plantas siendo nula para todos los casos. Sin embargo, la regeneración de plantas en medios de cultivo sin PEG presentó diferente comportamiento, nótese en la Tabla 4, que para la variedad LP- 7 no existieron diferencias significativas entre las variantes uno, dos y tres. Además, los menores valores de regeneración de plantas se obtuvieron en la variante cuatro. Por el contrario, la variedad J-104 resultó la más afectada presentando mayor disminución del porcentaje de regeneración en la medida que se incrementaron las concentraciones del agente estresante en el medio de cultivo de formación de callos donde se obtuvieron valores por debajo del 14% en la variante cuatro .

Tabla 4 Porcentajes de regeneración de plantas de arroz de dos variedades en los medios de cultivo sin la presencia de PEG-6000.

| Var. | Conc. (%) PEG MFC | Conc. (%) PEG MRP | LP-7 | | J-104 | |
|------|----------------------|----------------------|---------|-------|---------|-------|
| | | | DT | DO | DT | DO |
| 1 | 0 | 0 | 90.0 a | 100.0 | 90.0 a | 100.0 |
| 2 | 5 | 0 | 90.0 a | 100.0 | 79.0 b | 94.6 |
| 3 | 7.5 | 0 | 90.0 a | 100.0 | 66.1 c | 82.8 |
| 4 | 10.0 | 0 | 77.3 b | 92.3 | 15.3 d | 13.9 |
| | | ES(±) | 3.19*** | | 5.19*** | |
| | | CV(%) | 6.3 | | 11.4 | |

M.F.C. Medio de cultivo de formación de callos M.R.P. Medio de cultivo de regeneración de plantas. DT Datos transformados DO Datos originales (%) ES: Error estándar CV: Coeficiente de variación. Medias con letras iguales en una columna no difieren según la prueba de rangos múltiples de Duncan * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

En cuanto al número de brotes y plantas por callo (Tabla 5), se detectaron diferencias significativas en la respuesta de las variedades por influencia del agente estresante. Como se aprecia al evaluar el número de brotes por callo se produjeron incrementos significativos en la variedad LP- 7 para la variante tres y en la J-104 en la variante dos. Para la primera, no se encontró comportamiento diferencial entre las variantes uno y dos; mientras que en J-104 se apreció similar respuesta en las variantes uno y tres. La respuesta de la variedad J-104 en presencia de la concentración de 5.0 % en el medio de cultivo de inducción de callos puede relacionarse a que este compuesto, a determinadas concentraciones, estimula la formación de brotes incrementando el potencial morfogénico de las células (Belyanskaya *et al.*, 1994). En relación con el número de plantas por callo en la variedad LP- 7 no se detectaron diferencias significativas entre las variantes uno, dos y tres, resultado que al parecer indicó la posibilidad del empleo de estos niveles del agente estresante en el medio de cultivo de inducción de callos para la simulación del estrés hídrico y la selección de líneas durante la fase regenerativa. Sin embargo, para la variedad J-104 no se encontraron variaciones

significativas entre las variantes dos y tres las que no superaron a la variante uno.

La regeneración de plantas *in vitro* de arroz en condiciones de estrés hídrico ha sido referida por diferentes autores. En este sentido, Jain *et al.* (1996) partiendo de callos formados en presencia de concentraciones de manitol, observaron que el empleo de 0.1 y 0.2 M de este compuesto incrementó significativamente la frecuencia de regeneración de brotes en medios de cultivo sin la presencia del agente estresante. Por el contrario, al subcultivar los callos en medios de cultivo de regeneración de plantas en presencia con concentraciones de PEG-6000 se encontró inhibición de este proceso. Posteriormente, Jain (1997) destacó la influencia no solo de este compuesto sino también de otros agentes osmóticos como sorbitol y NaCl en la expresión de la totipotencia de las células y el mejoramiento de la frecuencia de regeneración de plántulas.

Del mismo modo, Belyanskaya *et al.* (1994) estudiando la capacidad para la morfogénesis *in vitro* de clones de arroz en presencia de NaCl y PEG, encontraron que los clones resistentes a ambos

compuestos alcanzaron un alto potencial morfogénico. Por otra parte, la adición del sorbitol en el medio de cultivo para la inducción de la morfogénesis estimuló la formación de brotes y plántulas. Sin embargo, este proceso sufrió serias afectaciones por la presencia tanto de NaCl como PEG en el medio de cultivo de regeneración de plantas. Similares resultados se observan en este estudio, lo que indica que, resulta factible obtener callos en medios de cultivo con concentraciones de PEG-6000 y realizar la regeneración de plantas en ausencia de este compuesto.

Por otra parte, se ha señalado que la reducción en la regeneración de brotes puede deberse entre otras causas: a la concentración y tipo de agente estresante, al tiempo de exposición de los explantes a estas condiciones, al medio de cultivo de selección y al genotipo de la planta. Asimismo, se sugiere efectuar la selección *in vitro* de variedades tolerantes durante la fase regenerativa porque se considera que la misma es una de las más sensibles (Barakat y Abdel-Latif, 1995 a y b; Gangopadhyay *et al.*, 1997; González *et al.*, 1998).

Tabla 5 Comportamiento del número de brotes y plantas por callo de dos variedades de arroz en medio de cultivo sin la presencia de PEG-6000.

| Var. | Conc. PEG | Conc. PEG | No. de Brotes/Callo | | No. de Plantas/Callo | |
|------|-----------|-----------|---------------------|---------|----------------------|---------|
| | MFC | MRP | LP- 7 | J-104 | LP-7 | J-104 |
| 1 | 0 | 0 | 4 b | 4 b | 2 a | 2 a |
| 2 | 5.0 | 0 | 4 b | 6 a | 2 a | 1 b |
| 3 | 7.5 | 0 | 7 a | 4 b | 2 a | 1 b |
| 4 | 10.0 | 0 | 3 c | 0 c | 1 b | 0 c |
| | | ES(±) | 0.51*** | 0.47*** | 0.06*** | 0.05*** |
| | | CV(%) | 17.7 | 20.5 | 23.0 | 9.12 |

M.F.C. Medio de cultivo de formación de callos MR.P. Medio de cultivo de regeneración de plantas.
ES: Error estándar CV: Coeficiente de variación. Medias con letras iguales en una columna no difieren según la prueba de rangos múltiples de Duncan * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

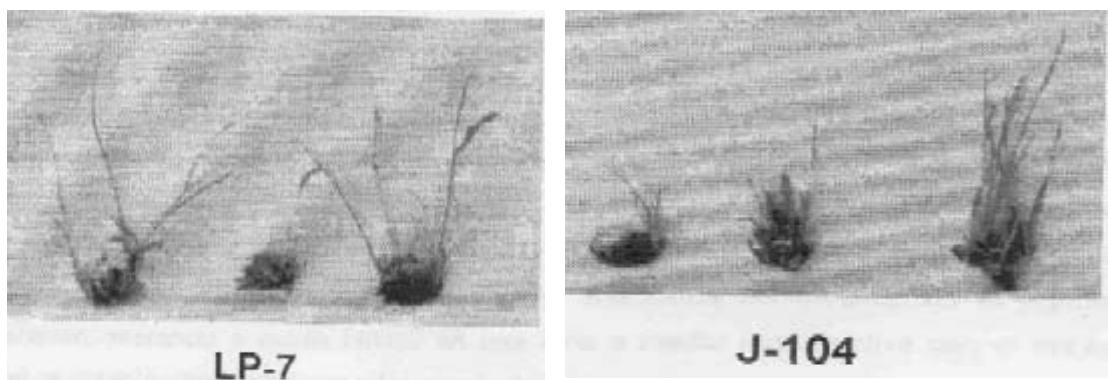


Figura 2. Regeneración de plantas a partir de callos formados en medios de cultivo con PEG-6000 de dos variedades de arroz.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que las concentraciones 5.0 y 7.5% del agente estresante PEG-6000 permitieron encontrar variaciones en la respuesta de las variedades de arroz estudiadas, tanto en la formación como en las masas fresca y seca de los callos. Asimismo, la formación de callos en presencia de estas concentraciones favoreció la inducción de brotes y plantas, mientras que la presencia del agente estresante en el medio de cultivo de regeneración de plantas inhibió completamente estos procesos. Cabe significar que con el uso de las concentraciones de PEG- 6000 anteriormente mencionados se corroboró la tolerancia de la variedad LP- 7 y la susceptibilidad de la J-104, lo cual sugiere

su empleo en la simulación de condiciones de estrés hídrico y en la discriminación de genotipos de arroz con tolerancia a déficit de agua.

REFERENCIAS

- Alfonso, R (1998) Determinación de parámetros genéticos - fisiológicos indicadores del estrés hídrico para su empleo en el mejoramiento genético del arroz (*Oryza sativa* L.) y la estabilidad varietal. Tesis IIA, Cuba
- Alfonso, R, Ramírez E y Rodríguez S (2000) Respuesta de variedades de arroz a diferentes manejos de agua como alternativa para pequeños y medianos productores. Revista Cubana de Arroz 2(1): 37-43
- Alfonso, R, Rodríguez S, Pérez R, Obiol T y Rodríguez Y (2002) Comportamiento de líneas de avanzadas de arroz para bajos insumos en cuatro localidades del país durante

- los años 2000-2001. Memorias 2^{do} Encuentro Internacional de Arroz. pp 71-73. La Habana.
- Barakat, M y Abdel-Latif TH (1995 a) *In vitro* selection for drought-tolerant lines in wheat. I Effect of polyethylene glycol on the embryogenic cultures. Alexandria - Journal of Agricultural Research 40(1): 97-112
- Barakat, M y Abdel-Latif TH (1995 b) *In vitro* selection for drought-tolerant lines in wheat. II *In vitro* characterization of cell lines and plant regeneration. Alexandria - Journal of Agricultural Research 40(3): 167-190
- Belyanskata, SL, Shamina ZB y Kucherenko LA (1994) Morphogenesis in stress resistant rice clones. Russian Journal of plant Physiology 41(4): 503-506
- Broetto, F, Malavolta E y Brasil OG (1999) Effect of salt stress on polyamine metabolism in bean cell culture. Journal of plant Nutrition 22(60): 889-900
- Duncan, D B (1951) A significance test for differences between ranked treatment in analysis of variance. Virginia J.Sci. 2: 171-189
- Flexas, J, Bota J, Escalona JM, Sampol B y Medrano H (2002) Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. Functional Plant Biology 29(4): 461-471
- Gangopadhyay, G, Basu S y Gupta S (1997) *In vitro* selection and physiological characterization of NaCl and mannitol adapted callus lines in *Brassica juncea*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 50(3): 161-169
- García, A, Florido M, Pérez I, Lara RM, González MC, Marrero MT(1999) Estabilidad de la membrana y contenido de proteínas totales en callos de arroz sometidos a estrés hídrico. Cultivos Tropicales 20 (3): 17-20
- Geetha, N, Venkatachalam P y Rao GR (1997) *In vitro* selection and plant regeneration from polyethyleneglycol adapted callus of blackgram. Current Agriculture 21(1-2): 85-88
- González, A, Martín I y Ayerbe L (1999) Barley yield in water stress conditions. The influence of precocity, osmotic adjustment and stomatal conductance. Field Crops Research 62(1): 23-34
- González, 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 ISCAH - INCA, La Habana
- González, MC, Pérez N, Cristo E, García A (1998) Resultados obtenidos en el programa de mejoramiento genético para la tolerancia al estrés hídrico y salino en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) a partir del empleo de las técnicas biotecnológicas. Programa y Resúmenes I^{er} Encuentro Internacional de Arroz, La Habana Cuba
- González, MC, Cristo E, Pérez N y Ávila J (2002) Obtención de una nueva variedad de arroz tolerante a la salinidad mediante el empleo de métodos biotecnológicos. Memorias 2do Encuentro Internacional de Arroz p:58-59. La Habana. Cuba
- Guía, Y (1998) Evaluación y selección *in vitro* para la tolerancia a la sequía de la caña de azúcar. Tesis. CNIC. 45p
- Jain, R, Jain S y Wu R (1996) Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in osmotic indica rice varieties. Plant Cell Reports 15(6): 449-454
- Jain, RK (1997) Effect of some factors on plant regeneration from indica rice cells and protoplast-a review. Indian Journal of Experimental Biology 35(4): 323-331
- Lascano, HR, Antonicelli GE, Luna CM, Melchiorre M, Gomez L, Racca RW, Trippi V y Casano L (2001) Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought field and *in vitro* studies. Australian Journal of Plant Physiology 28(11): 1095-1102
- Lee, SS y Kim JH (1999) Morphological changes, sugar content and alpha amylase activity in rice under various priming conditions. Korean Journal of Crop Science 44(2): 138-142
- Lu, Z y Neumann P (1999) Water stress inhibits hydraulic conductance and leaf growth in rice seedlings but not the transport of water via mercury-sensitive water channels in the root. Plant Physiology 120(1): 143-152
- Pérez, A, Hernández JL y Ginarte A (1998) Obtención de líneas isogénicas en el cultivo del arroz. Programa y Resúmenes I^{er} Encuentro Internacional de Arroz, La Habana Cuba
- Santos, M y Ochoa N (1994a) Effect of water stress on growth, osmotic potential and solute accumulation in cell cultures from chili pepper (a mesophyte) and creosote bush (a xerophyte). Plant Science 96: 21-29
- Santos, M y Ochoa N (1994b) PEG- tolerant cell clones of chili pepper: Growth, osmotic potential and solute accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 1-8
- Socorro, M (1997) Situación de la siembra popular de arroz. Informe presentado al MINAGRI, 4p
- Teulat, B, This D, Khairallah M, Borries C, Ragot C, Sourdille P, Leroy P, Monneveux P y Charrier A (1998) Several QTLs involved in osmotic adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.) Theoretical applied genetics 96(5): 688-698
- Thanh, ND, Zheng HG, Dong NV, Trinh LN, Ali ML y Nguyen HT (1999) Genetic variation in root morphology and microsatellite DNA loci in upland rice (*Oryza sativa* L.) from Vietnam. Euphytica 105(1): 43-51
- Trivedi, S, Galiba G, Sankhla N y Erdei L (1991) Responses to osmotic and NaCl stress of wheat varieties differing in drought and salt tolerance in callus culture. Plant Science 73: 227-232
- Zhang, HY y Zhao KF (1998) Effect of salt and water stress on osmotic adjustment of Suaeda salsa seedlings. Acta-Botanica-Sinica 40(1): 56-61
- Zhang, M, Chen R y Yu S (1996) Effect of polyamines on induction and differentiation of calluses from leaves of sugarcane under osmotic stress. Plant Physiology Communications 32(3): 175-178
- Zeng, LH y Shannon MC (2000) Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. Crop Science 40(4): 996-1003