

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TRABAJO DE DIPLOMA

Efecto del cloruro de sodio en la multiplicación *in vitro* de *Saccharum officinarum* L. en Biorreactores de Inmersión Temporal

Autor: Michael Crespo González

Tutores: Dra. C. Lourdes Yabor Cabrera

Dr. C. José Carlos Lorenzo Feijoo

Santa Clara, junio 2018

Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Efecto del cloruro de sodio en la multiplicación *in vitro* de
Saccharum officinarum L. en Biorreactores de Inmersión
Temporal

TESIS DE DIPLOMA

Autor: Michael Crespo González

Santa Clara

2018

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE DIPLOMA

Efecto del cloruro de sodio en la multiplicación *in vitro* de *Saccharum officinarum* L. en Biorreactores de Inmersión Temporal

Autor: Michael Crespo González

Tutor: Dra. C. Lourdes Yabor Cabrera*

Dr. C. José Carlos Lorenzo Feijoo*

*Centro de Bioplantas

Universidad "Máximo Gómez Báez" de Ciego de Ávila

Carretera a Morón Km 9,5, Ciego de Ávila, Cuba.

Santa Clara

2018

1. PENSAMIENTO

Si a un huevo lo rompe una fuerza externa, acaba la vida, pero si lo rompe una fuerza interna, comienza la vida. Cambia desde tu interior.

Alejandro Jodorowsky

2. DEDICATORIA

A mi abuela, mi tía, mi mamá y a Gaby.

3. AGRADECIMIENTOS

A Lourdes, por su apoyo no solo como tutora, por su comprensión y preocupación. Por su calidez y honestidad, por su dedicación aun en momentos complejos de la vida. Gracias.

A Orelvis, por guiarme desde un principio hacia el Centro de Bioplantas, y por compartir su tiempo a la aclaración de dudas y por su seguimiento durante el desarrollo de las investigaciones.

A los trabajadores del Centro de Bioplantas por llevar a cabo gran parte del trabajo experimental en momentos en los que no estaba presente. Especialmente a los de Mejoramiento Genético, a Lázaro y Julia.

A Daviel, por toda la ayuda prestada y enseñanza, por su excelente labor como profesional.

A José Carlos por sus consejos teóricos y prácticos, de gran ayuda cuando es primera vez cuando se escribe una tesis y a todo el que de una forma u otra contribuyó al fin de esta investigación.

A Katia, mi primera tutora, por enseñarme que siempre hay una buena cara para las dificultades y que con lo que tenemos siempre hay algo que se puede hacer, por su capacidad de llevar al que lo desee a dar ese viaje al misterioso y maravilloso mundo de la Bioquímica, aquello que compartimos todos los seres vivos de la Tierra y al conocimiento de nuestro sistema inmune, pero sobre todo por su actitud positiva y capacidad de suscitar sonrisas aun en los momentos serios.

A Pedro Emilio Martínez por su dedicación, interés y ayuda en la confección digital del documento.

A mis compañeros de aula, luego de estos 5 años o más para algunos, en los que compartimos un sinnúmero de momentos; unos buenos, otros no tanto, pero juntos los disfrutamos y vencimos las dificultades como un equipo de trabajo unido y gigante, con el que me gustaría trabajar muchas veces más. Han sido y son las virtudes individuales, los valores y entre ellos la honestidad, los que nos han mantenido unidos, porque son personas que ven con el corazón y me siento muy feliz de haber sido parte de un grupo tan complejo en sus individualidades como unido, esa es una enseñanza de la vida, que nos llega también a través de la Biología. Me alegra que sea cada uno de ustedes quienes, estudien, vigilen y protejan la belleza visible e invisible del planeta.

A mi familia, pilares de quien soy, por ampliar los caminos y cuidar que la curiosidad de un niño se mantuviera viva. A mis tres guardianas, mi abuela por ayudarme con todo lo que has podido y querer hacerlo aún más, a mi tío José Raúl quien ha sido como un padre para mí, a mi tía por llevarme de la mano -cuando le he dejado hacerlo..., a mi mamá por su preocupación constante y por ser también amiga, y a Gaby mi hermana prima, mi lucecita y por quien velo sus pasos. Gracias por ser prueba de que las cosas más importantes se ven con el corazón y se demuestran en momentos que pueden parecer insignificantes.

Gracias a todos.

4. RESUMEN

La caña de azúcar es la principal fuente de azúcar a nivel mundial y la productividad de sus cosechas es perjudicada por la salinidad, factor de estrés que se agrava a medida que el cambio climático genera mayor aridez y deterioro de la calidad de agua de riego. Cuba presenta un millón de hectáreas afectadas, destacando las provincias de Granma, Pinar del Río y Matanzas. En la búsqueda de alternativas para mejorar la productividad agrícola de áreas salinizadas se han propuesto varias técnicas la mayoría difíciles de implementar en zonas áridas y semiáridas por lo que es necesario la caracterización e identificación de materiales vegetales que se adapten a tales condiciones. El cultivo en biorreactores de inmersión temporal presenta ventajas en comparación a otras técnicas de micropropagación. El presente experimento se desarrolló con el objetivo de determinar algunos de los efectos del NaCl (0-200mM) en la micropropagación de caña de azúcar en BIT. A los 30 días de iniciado los cultivos se determinaron el coeficiente de multiplicación, la masa fresca de los *cluster* y niveles de aldehídos, clorofilas, carotenoides y fenoles. El contenido de fenoles solubles en el medio de cultivo también se evaluó. La adición de NaCl disminuyó el coeficiente de multiplicación y la masa fresca. A nivel bioquímico, fueron registradas diferencias significativas entre los tratamientos con NaCl, pero los efectos más notables se observaron en el aumento del contenido de carotenoides en las plantas y en los fenoles solubles excretados al medio de cultivo.

Palabras clave: Estrés salino *in vitro*; metabolitos de plantas; micropropagación; *Saccharum officinarum*

5. ABSTRACT

Sugarcane is the main source of sugar worldwide and the productivity of its crops is affected by salinity, a stress factor that worsens as climate change generates greater aridity and deterioration of the quality of irrigation water. Cuba presents one million affected hectares, highlighting the provinces of Granma, Pinar del Río and Matanzas. In the search for alternatives to improve the agricultural productivity of salinated areas, several techniques have been proposed, most of which are difficult to implement in arid and semi-arid zones, so it is necessary to characterize and identify plant materials that adapt to these conditions. Culture in temporary immersion bioreactors has advantages compared to other micro-propagation techniques. In this context, the present experiment was developed with the aim of determining some of the effects of NaCl (0-200mM) in the micro-propagation of sugarcane in BIT. Thirty days after starting the cultures, the multiplication rate, fresh mass of the *clusters* and levels of aldehydes, chlorophylls, carotenoids and phenols were determined in the plant material. The content of soluble phenols in the culture medium was also evaluated. The addition of NaCl decreased the multiplication rate and the fresh mass. At the biochemical level, significant differences were registered between the NaCl treatments, but the most notable effects were observed in the increase of the carotenoid content in the plants and in the soluble phenols excreted to the culture medium.

Keywords: *In vitro* salt stress; plant metabolites; micro-propagation; *Saccharum officinarum*

6. ÍNDICE

PENSAMIENTO	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Características generales de la caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)	5
2.2 Efecto osmótico y/o tóxico del estrés salino	6
2.3 Tolerancia de las plantas al estrés salino	9
2.3.1 Mecanismo de adaptación de las plantas a la salinidad	11
2.4 Propagación convencional e <i>in vitro</i> de la caña de azúcar	13
2.5 Biorreactores de Inmersión Temporal	17
2.6 Bioensayos para la selección temprana de la tolerancia de las plantas a la salinidad	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
Generalidades	25
3.1 Determinación del efecto del cloruro de sodio en el coeficiente de multiplicación de los brotes y en la masa fresca de los <i>clusters</i>	27
3.2 Determinación del efecto del cloruro de sodio en los niveles de malondialdehído y otros aldehídos, clorofilas a, b; carotenoides, fenoles solubles, ligados a las paredes celulares y excretados al medio de cultivo	27
4. RESULTADOS	29
4.1 Determinación del efecto del cloruro de sodio en el coeficiente de multiplicación de los brotes y en la masa fresca de los <i>clusters</i>	29
4.2 Determinación del efecto del cloruro de sodio en los niveles de malondialdehído y otros aldehídos, clorofilas a, b; carotenoides, fenoles solubles, ligados a las paredes celulares y excretados al medio de cultivo	30
5. DISCUSIÓN	33
5.1 Determinación del efecto del cloruro de sodio en el coeficiente de multiplicación de los brotes y en la masa fresca de los <i>clusters</i>	33

5.2 Determinación del efecto del cloruro de sodio en los niveles de malondialdehído y otros aldehídos, clorofilas a, b; carotenoides, fenoles solubles, ligados a las paredes celulares y excretados al medio de cultivo-----	36
6. CONCLUSIONES -----	41
7. RECOMENDACIONES -----	42
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	43

7. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es la principal fuente de azúcar a nivel mundial debido a su mayor eficiencia en la actividad fotosintética y su capacidad para almacenar sacarosa en el tallo (Valdés *et al.*, 2016), su producción en 2016 alcanzó la cifra de 1 890 millones de toneladas. En este año, Brasil fue el mayor productor de azúcar con una cifra de 768 millones de toneladas, posición que ha mantenido desde 1980 (FAOSTAT, 2017b). En los últimos diez años ha experimentado un crecimiento de las exportaciones, las que superaron los 5 millones de toneladas en 2013 (alrededor del 23 % de las exportaciones mundiales) (Valdés *et al.*, 2016, FAOSTAT, 2017a) destacando además en la producción de etanol derivado de este cultivo (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011). La India es el segundo productor a nivel mundial con 348 millones de toneladas y la República Popular China, en el tercer puesto, con 123 millones. Para la economía mundial del azúcar, el factor económico fundamental es el crecimiento constante de su consumo (alrededor del dos por ciento anual en el último decenio). Cuba ocupa el lugar 14 en la lista de países productores, presenta más de 400 mil hectáreas (ha) destinadas a este cultivo (FAOSTAT, 2017b).

En los últimos años se han demostrado cambios climáticos que han influido una marcada diferencia en la respuesta de las variedades de caña en los distintos tipos de suelos, esto se ha materializado en considerables afectaciones desde el punto de vista financiero y climatológico (Torriente, 2010), de este último la salinidad se considera el mayor estrés abiótico que perjudica la productividad y calidad de las cosechas (Hanin *et al.*, 2016), y se estima que tienda a agravarse a medida que el cambio climático genere mayor aridez y deterioro de la calidad de agua de riego conduciendo a la desertificación (Pares y Basso, 2013, Pérez-Nasser, 2017), sumando a esto se encuentran las escasas precipitaciones, la alta evaporación y el mal drenaje (Mesa, 2003). Existe una amplia distribución de los suelos salinos y salinizados a nivel mundial, destacándose que estos ocupan entre un 40-50 % de toda el área del planeta. Al respecto se ha planteado que su extensión crece a razón de 3 hectáreas (ha) por minuto (min) y que actualmente se contabilizan alrededor de 953 millones de hectáreas en diferentes regiones del mundo. Cuba, que tiene una superficie agrícola de alrededor de 7.08 millones de ha, presenta cerca de un millón de hectáreas afectadas y cerca de 1.5 millones presentan problemas potenciales de salinización (González *et al.*, 2002), destacando las provincias de Granma, Pinar del Río y Matanzas (Orellana-Pérez y Peña-González, 2003).

En la búsqueda de alternativas tendentes a mantener o mejorar la productividad agrícola de áreas salinizadas se han propuesto varias técnicas como el lavado y mantenimiento de un adecuado nivel de humedad sin embargo la escasez de agua característica de zonas áridas y semiáridas dificulta la implementación de las mismas por lo que es importante la caracterización e identificación de materiales vegetales que se adapten a tales condiciones (Pares y Basso, 2013). Tal situación, unida a los estragos que causa a la agricultura mundial, han obligado a los investigadores a desarrollar métodos sostenibles para su uso y rehabilitación, dándole especial atención al uso de especies y variedades de plantas tolerantes a la salinidad, como una de las vías económicas para incrementar la productividad de los cultivos en dichas condiciones (González *et al.*, 2002).

Los principales problemas de estrés salino son originados por sales de sodio particularmente por el cloruro de sodio cuyos efectos más importantes son el estrés osmótico, el desbalance iónico y la toxicidad que produce la acumulación de iones cloruro y sodio sobre los procesos metabólicos (Pares y Basso, 2013). El cloruro de sodio (NaCl) ha sido utilizado para simular condiciones de salinidad (Fatima *et al.*, 2015, Carloni *et al.*, 2017, Hairuddin *et al.*, 2017). El desarrollo de investigaciones sobre la automatización en la propagación de plantas, que incluyen el diseño de nuevos sistemas para la micropropagación, han permitido altos coeficientes de multiplicación, mejor comportamiento de las plántulas *ex vitro* (por un mayor metabolismo autotrófico durante la fase *in vitro*) y reducción de los costos de producción (Santos, 2008). El cultivo en inmersión temporal puede constituir una alternativa de micropropagación a corto plazo, mientras a largo plazo se logran vencer los obstáculos biológicos que permitan la obtención eficiente de plantas y embriones somáticos en biorreactores (Vilchez *et al.*, 2011).

El interés por mejorar la tolerancia de los cultivos a la salinidad ha ido creciendo en los últimos años, empleando métodos de mejora y selección tradicionales o producción de organismos modificados genéticamente (Leidi y Pardo, 2002, Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011). Orellana-Pérez y Peña-González (2003) determinaron la respuesta en diferentes fases del desarrollo *in vitro* de cuatro somaclones de arroz para tolerancia a la salinidad, a distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) y obtuvieron 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. En Brasil, la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad (CTNBio) ha aprobado ensayos de campo con caña de azúcar modificada genéticamente, que incorpora características tales como mayor rendimiento, tolerancia a la sequía, resistencia a los

insectos y tolerancia a los herbicidas (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011). Boscaiu *et al.* (2013) cuantificaron niveles de metabolitos como indicadores de tolerancia en dos especies de halófitas empleando tratamientos ascendentes en concentración con cloruro de sodio en cámaras de crecimiento controlado. Al Hassan *et al.* (2016a) por otra parte, realizaron un estudio comparativo entre dos especies de plantas ante el estrés salino en condiciones controladas en el que cuantificaron parámetros de crecimiento y marcadores bioquímicos de estrés, como pigmentos fotosintéticos, malondialdehído como indicador de estrés oxidativo y fenoles como ejemplo de antioxidantes no enzimáticos. (Chávez *et al.*, 2015) determinaron el efecto de la salinidad sobre el contenido de agua y la concentración de pigmentos, en plantas de tres variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando un suelo salino y otro no. Pérez-Nasser (2017) determinaron el contenido relativo de diferentes metabolitos en plantas de *Aloe vera* L. expuestas a estrés salino con NaCl. En trabajos de micropropagación destacan Lorenzo *et al.* (2001) quienes emplearon biorreactores de inmersión temporal para estudiar el coeficiente de multiplicación en caña de azúcar y determinaron parámetros bioquímicos como la excreción de fenoles, el número de brotes y la masa fresca.

La selección de aquellas variedades que produzcan la mayor cantidad de azúcar por unidad de área es un objetivo de trabajo prioritario para muchos países productores de azúcar, empeñados en lograr mayores beneficios económicos en la explotación del cultivo. Se requiere contar con variedades de elevado rendimiento durante diferentes épocas del año y adaptadas a las condiciones agroecológicas de cada zona, para elevar los niveles de producción (Chiang *et al.*, 2018). Son necesarios métodos de selección temprana de la tolerancia de *Saccharum officinarum* L. a la salinidad para acelerar los procesos de mejoramiento genético y reducir los costos de investigación, para lo cual es necesario encontrar marcadores de tolerancia que permita la selección de plantas resistentes.

Hipótesis

El cloruro de sodio produce cambios en la multiplicación *in vitro* y en los niveles de fenoles, aldehídos y clorofilas de la caña de azúcar en biorreactores de inmersión temporal, los que pueden servir de marcadores de tolerancia a la salinidad en los programas de mejoramiento genético.

Objetivo general

Determinar el efecto del cloruro de sodio en la multiplicación *in vitro* de la caña de azúcar en biorreactores de inmersión temporal y en algunos indicadores bioquímicos.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del cloruro de sodio en el coeficiente de multiplicación y en la masa fresca de la caña de azúcar en biorreactores de inmersión temporal.

2. Determinar el efecto del cloruro de sodio en los niveles de malondialdehído y otros aldehídos, clorofilas a, b; carotenoides, fenoles solubles, ligados a las paredes celulares y excretados al medio de cultivo de la caña de azúcar en biorreactores de inmersión temporal.

Novedad científica

Se describen algunos efectos fisiológicos y bioquímicos del cloruro de sodio en la micropropagación de la caña de azúcar (cv. C-1051-73) en biorreactores de inmersión temporal, lo que se puede utilizar como alternativa en la selección de plantas tolerantes a la salinidad en condiciones *in vitro*.

Valor práctico

Constituye un primer acercamiento a la generación de nuevos genotipos y en la selección *in vitro* de plantas de caña de azúcar con tolerancia a la salinidad en condiciones de multiplicación acelerada en biorreactores de inmersión temporal.

8. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características generales de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum* y es miembro de la tribu *Andropogoneae* de la familia *Poaceae*. Las seis especies que conforman el género *Saccharum* se denominan: *Saccharum spontaneum* L., *S. robustum* L., *S. officinarum* L., *S. barberi* Jeswiet, *S. sinense* Roxb y *S. edule* Hassk. Sin embargo, se piensa que las tres últimas especies sean de origen interespecífico y/o intergenérico natural, y probablemente debieran considerarse como un grupo hortícola (Daniels y Roach, 1987, Grassl, 1997). Los clones comúnmente cultivados provienen de cruzamientos interespecíficos realizados a principios del siglo XX entre las especies *S. officinarum* y *S. spontaneum* (Glaszmann y D'Hont, 1999). Es una gramínea tropical perenne con tallos gruesos y fibrosos que pueden llegar a medir de 3 hasta 5 metros de altura con 5 o 6 cm de grosor, se desarrolla mejor en suelos francos profundos y bien drenados, aunque se puede cultivar en cualquier tipo de suelo con pH de 5.5 a 7.8 siendo 7 el valor óptimo. El clima ideal son zonas cálidas con abundante luz solar ya que es muy eficiente en el aprovechamiento de esta, el rango de temperatura varía entre 16 a 30°C, con alturas de 0 a 1000 msnm y una precipitación mínima de 1500 mm de agua por temporada (Zuñiga, 2012).

La colección cubana está compuesta por 2 861 genotipos, de los que 275 son formas originales de diferentes especies de *Saccharum* y géneros afines, 431 son híbridos en diferentes etapas generacionales y 2 115 son híbridos comerciales (Pérez *et al.*, 1997a). Su cultivo cubre un área de más de 25.4 millones de hectáreas en más de 130 países y territorios, con una producción de más de 1800 millones de toneladas anuales (Valdés *et al.*, 2016). Se considera que la colección mundial actual está constituida por 8 550 accesiones aproximadamente con representantes de especies silvestres y cultivadas, así como, de otros géneros afines (Berding y Koike, 1987). La caña de azúcar es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial en las regiones tropicales y subtropicales y la materia prima principal para la industria azucarera (Akter *et al.*, 2016)

Fue introducida en Cuba en el año 1543, poco tiempo después del descubrimiento de América (Torriente, 2010) pero no es hasta principios del siglo XIX con la introducción de la máquina de vapor, que Cuba entra en la gran era del azúcar. En el siglo XX, con la introducción de nuevos equipos, los centrales azucareros se fueron modernizando, se construyeron algunos con nuevas tecnologías. En las primeras décadas del triunfo de la revolución cubana se producía un promedio anual de 5 millones de toneladas de azúcar, siendo el principal producto agrícola e industrial del país, llegándose a dedicar 1.5 millones ha de tierra a este cultivo (el 40 % del área total cultivada).

Después del año 2002 la situación varió, se redujo la cantidad de tierras dedicadas a este cultivo y se concentró en los suelos más productivos, existiendo actualmente alrededor de 820,000 ha para su plantación (Montes, 2010). Por lo que el Ministerio de Azúcar se vio precisado a desarrollar un profundo proceso de transformaciones (Tarea Álvaro Reynoso), encaminada a elevar la eficiencia productiva con reducción de los costos, donde la diversificación de la producción juega un papel fundamental. Se dejaron activos los ingenios más eficientes y los suelos de mayor aptitud para el cultivo, por lo que se reducen 71 centrales, los que pasaron a otras actividades agrícolas, siendo una ventaja inmediata para la economía nacional, con el consiguiente incremento de la eficiencia de la industria azucarera (Cuellar *et al.*, 2003). Desde la década del 90 se trabaja en Cuba por lograr una agricultura más ecológica u orgánica, menos dependiente de los costosos insumos de productos químicos y basada en el desarrollo científico-técnico, en aras de alcanzar una verdadera racionalidad ecológica y sustentabilidad económica. La agricultura sostenible se ha convertido en la única solución factible capaz de frenar el deterioro ambiental y garantizar la seguridad alimentaria de las presentes y futuras generaciones (Más *et al.*, 2007).

La biología reproductiva de las diversas especies de caña de azúcar no ha sido objeto de estudios importantes, ya que todas tienen una propagación vegetativa profusa. Estas se distribuyen en la naturaleza de diferentes formas, que van desde amplias extensiones aparentemente de un solo clon, hasta distribuciones complejas con un entrecruzamiento activo entre varias especies o géneros. En este cultivo, también se ha trabajado en el desarrollo de procesos de propagación *in vitro* en gran escala basados en la organogénesis y la embriogénesis somática (Peros y Bonnel, 1990, Feldmann *et al.*, 1994b, Jiménez *et al.*, 1995, Santana *et al.*, 1997, Jiménez *et al.*, 1999). Estos procesos de micropropagación tienen gran potencial y son usados en general para producir propágulos de calidad en cantidades relativamente pequeñas. También se ha utilizado la propagación *in vitro* de la caña de azúcar para el mejoramiento genético (Liu, 1981, Pérez *et al.*, 1995, Lorenzo *et al.*, 2001). El saneamiento ha sido otro de los objetivos de la micropropagación en esta especie (Mori, 1971, Lee, 1986).

2.2 Efecto osmótico y/o tóxico del estrés salino

La salinidad es un fenómeno natural característico de zonas áridas y semiáridas (Gregore *et al.*, 2012), donde la evaporación excede a la precipitación y donde la escasez de estas últimas hace necesario el riego para una producción óptima (Viegas *et al.*, 2001). Este problema lejos de ser resuelto ha empeorado desde entonces, la urbanización y la industrialización con una mayor competencia por el agua de alta calidad y la sobreexplotación de los acuíferos subterráneos aumenta la intrusión de agua salada en los pozos. Incluso el agua de buena calidad puede

contener de 100-1000 gramos de sal por m^{-3} . Con una aportación anual de $10\ 000\ \text{m}^3\cdot\text{ha}^{-1}$, se añade al suelo entre 1 y 10 toneladas de sal. Como resultado de la transpiración y la evaporación del agua, las sales solubles se acumulan en los suelos y deben ser eliminadas periódicamente por lixiviación y drenaje (Sun *et al.*, 2009). En Cuba se han desarrollado estudios acerca del efecto adverso de los procesos de salinización de los suelos. Este se evidencia en más de 1 millón de hectáreas afectadas. De ellas, no menos de 300 ha se han dañado por el riego con agua de baja calidad. Se estima que hay alrededor de 1 millón de hectáreas más en peligro de salinizarse, es decir, el 15% más del área agrícola total (Mesa, 2003). Los efectos negativos causados por este factor perjudican el crecimiento, la morfología y anatomía de la planta y provoca también la disminución del contenido de agua, azúcares y minerales (Pérez-Nasser, 2017).

El estrés salino tiene efectos bien conocidos, incluyendo deshidratación celular, la alteración del equilibrio osmótico (Chávez *et al.*, 2015), inhibición de muchas actividades enzimáticas y procesos celulares esenciales (como el procesamiento de ARN o la síntesis de proteínas), interferencia con la nutrición mineral o generación de especies reactivas del oxígeno que se traduce en estrés oxidativo (Gregore *et al.*, 2012). Dos componentes de los principales componentes que afectan el crecimiento vegetal son: el osmótico y el iónico (Hanin *et al.*, 2016). La elevada concentración salina provoca un descenso del potencial hídrico del suelo e induce al estrés hídrico en las plantas. Esto es lo que se conoce como componente osmótico de la salinidad. En cuanto al componente iónico, determinados iones son tóxicos para las glicófitas (la inmensa mayoría de las plantas cultivadas). Dentro de ellos, los más abundantes en el suelo son el cloruro (Cl^-) y el sodio (Na^+), los que interfieren en la captación de los otros iones por parte de la planta y provocan el déficit crítico de nutrientes, dando lugar a suelos estériles con cantidades de nitrógeno no óptimas (Mesa, 2003). Cuando la concentración de sal en la solución del suelo es elevada, el potencial osmótico de dicha solución es muy bajo. Por lo tanto, la salinidad reduce el potencial hídrico externo. A niveles elevados de salinidad, el potencial hídrico externo puede estar por debajo del potencial hídrico de las células provocando deshidratación osmótica. La mayor parte de las respuestas rápidas en el coeficiente de elongación de las hojas a la salinidad es atribuible a los cambios en el estado hídrico de las células (Munns y Tester, 2008).

A pesar de la esencialidad de cloruro como un nutriente para todas las plantas superiores y el sodio como nutriente mineral para muchas halófitas y algunas especies C_4 y CAM, la concentración de ambos iones en suelos salinos, supera con creces los demás nutrientes y conduce a un efecto específico en plantas no tolerantes a la salinidad. La alta concentración de

algunos de estos iones conduce a su acumulación en el tejido de la planta, produciendo toxicidad. La proporción de estos iones con respecto a otros nutrientes esenciales para las plantas pueden ser bastante elevados, causando desequilibrios nutricionales. La interacción de Na^+ /potasio (K^+), Na^+ /calcio (Ca^{2+}), Cl^- /nitrato (NO_3^-) es bien conocida. Cabe destacar, por ejemplo, la interacción Na^+/K^+ . Debido a que el Na^+ es químicamente muy parecido al K^+ por su tamaño, el Na^+ puede desplazar al K^+ en numerosos sitios donde el K^+ participa activando la funcionalidad de las enzimas y regulando la conformación de las proteínas. La presencia de Na^+ en lugar de K^+ crea problemas a nivel bioquímico (Buchanan *et al.*, 2015). La fotosíntesis se afecta debido al cierre estomático en respuesta al déficit hídrico inducido con la subsecuente reducción en la toma de dióxido de carbono (CO_2) por la planta (Vicente *et al.*, 2004).

El efecto tóxico de la salinidad queda reflejado principalmente por dos hechos que se observan en los experimentos con salinidad. Una de ellas es que las concentraciones moderadas de Na^+ , Cl^- o sulfato (SO_4^{2-}) u otros iones reducen el crecimiento o causan lesiones específicas. La otra es que soluciones iso-osmóticas de diferentes composiciones pueden provocar respuestas muy diferentes. Los genotipos difieren en estas respuestas, incluso dentro de una misma especie. La toxicidad debido a concentraciones moderadas de algunos iones de los suelos salinos es más común en las plantas leñosas. Los efectos secundarios del estrés por cloruro de sodio (NaCl) incluyen alteraciones en la absorción de K^+ , disfunción de las membranas celulares, disminución de la fotosíntesis, generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y muerte celular programada (Buchanan *et al.*, 2000). Las especies reactivas de oxígeno (ERO), también llamadas especies activas de oxígeno (EAO) son resultado de la reducción parcial del oxígeno O_2 atmosférico. Existen básicamente cuatro formas de ERO celular, oxígeno molecular singlete (1O_2), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot), cada uno con la característica vida media. Las ERO pueden ser extremadamente reactivas, especialmente el oxígeno molecular singlete y el radical hidroxilo y a diferencia del oxígeno atmosférico pueden oxidar múltiples componentes celulares como proteínas y lípidos, ADN y ARN. Las ERO se producen continuamente en el cloroplasto, mitocondria y peroxisomas y también son removidas de forma controlada en condiciones normales, sin embargo, el equilibrio entre la producción y la depuración de éstas puede ser perturbado por diversos factores entre ellos la salinidad (Gabriel *et al.*, 2013). El efecto más general del estrés salino es, al igual que otros factores de estrés abiótico, es la inhibición del crecimiento. Todas las glicófitas presentan un crecimiento óptimo en ausencia de sal; solo algunas halófitas dicotiledóneas extremas presentan generalmente alguna estimulación del crecimiento ante concentraciones moderadas de NaCl (50-250 mM), pero siempre

se observa reducción en el coeficiente de crecimiento ante altas concentraciones (Vicente *et al.*, 2004).

2.3 Tolerancia de las plantas al estrés salino

La tolerancia a la salinidad se puede definir como la capacidad de la planta para soportar los efectos de exceso de sal en el medio de crecimiento radicular, sobrevivir y producir rendimientos económicos en condiciones de estrés y se expresa como la relación entre el rendimiento de una variedad en condiciones salinas con respecto a su rendimiento en condiciones normales. Implícitamente en esta definición está la idea de que una planta puede soportar una cantidad exacta de sal sin efectos adversos. No es un valor exacto. Éste depende de muchas condiciones, límites y factores, tales como el tipo de sales en la solución del suelo, condiciones de crecimiento, la edad y la variedad de la planta (Parida y Das, 2005). Desde el punto de vista agronómico, la tolerancia a la salinidad de un cultivo concreto a una determinada salinidad del suelo, es la respuesta relativa del propio cultivo en condiciones no salinas (Hirt y Shinozaki, 2004). Se considera que la mayoría de los cultivos tolera la salinidad hasta un nivel de umbral (Khan *et al.*, 2006), definido como el valor por debajo del cual no se afecta el crecimiento del cultivo por la salinidad. En este sentido Munns (2009) refirió categorías para la clasificación de la tolerancia de los cultivos a la salinidad, considerando el umbral de cada especie y la reducción en el rendimiento con el incremento de la salinidad. Desde el punto de vista ecológico, Peleg *et al.* (2011) relacionan el término de tolerancia a la salinidad con la habilidad inherente de la planta para continuar creciendo (a una tasa reducida), aun cuando las condiciones resultan desfavorables para el mantenimiento de los procesos básicos. En este caso, se le confiere más importancia a la supervivencia de la planta.

Las plantas se dividen básicamente en dos grandes grupos en relación con la respuesta a elevadas concentraciones salinas. Las halófitas son nativas de suelos salinos, capaces de completar su ciclo de vida en este ambiente e incluyen una amplia variedad taxonómica además ocupan diversos hábitats, desde sitios extremadamente secos a temporalmente anegados o pantanos salados. Las glicófitas por otra parte son aquellas que no son capaces de tolerar la salinidad al mismo grado que las halófitas sino en condiciones moderadas (Vicente *et al.*, 2004, Taiz y Zeiger, 2006). Se ha descrito el crecimiento de diferentes especies expuestas a elevadas concentraciones de Cl⁻ en el medio externo relacionado con el de los controles no salinos, identificándose cuatro grupos fundamentales. En el grupo IA las plantas *Suaeda maritima* L. y *Atriplex nummularia* Lindl., las cuales mostraron la estimulación del crecimiento con niveles de Cl⁻ por debajo de 400 mM. El grupo IB, la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), que tolera la sal,

pero su crecimiento se retarda. El grupo II, tolera niveles de salinidad intermedios, incluye halófitas como *Festuca rubra* L. y no halófitas, como el algodón (*Gossypium* spp.) y la cebada (*Hordeum vulgare* L.). Este grupo también incluye tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y la soya (*Glycine max* L.) que son más sensibles. El grupo III, comprende especies muy sensibles a la sal, muchos árboles frutales como los cítricos (*Citrus*) y aguacate (*Persea americana* Mill.) (Greenway y Munns, 1980). La presencia de sales (especialmente NaCl) es un factor obligatorio para el ciclo de vida de la mayoría de las halófitas, debido al efecto estimulador sobre gran cantidad de procesos en este tipo de plantas (Gregore *et al.*, 2012).

En condiciones de campo, la salinidad del suelo es rara vez constante con el tiempo y uniforme en el espacio (García-Sánchez *et al.*, 2010). Dependiendo de la magnitud de la lixiviación y el drenaje, la distribución de la sal puede ser uniforme en el suelo y cambiar ligeramente con la profundidad, o puede ser altamente irregular y variar desde concentraciones de sal cerca de la superficie del suelo, que aproximadamente son iguales a la del agua de riego, a concentraciones en el fondo de la zona radicular que son varias veces mayores. La tolerancia a la salinidad de los cultivos depende también del tipo y frecuencia de riego (García-Sánchez *et al.*, 2003). A medida que el contenido de agua del suelo disminuye entre riegos, aumenta la concentración de sal. Si el agua llega a ser limitante, las plantas pueden sufrir estrés hídrico. El clima, es otro de los factores que afecta principalmente a la respuesta de las plantas a la salinidad. En general, las plantas son más sensibles a la salinidad a altas temperaturas y baja humedad relativa (Levy y Syvertsen, 2004).

La sensibilidad de los cultivos a la salinidad del suelo cambia a menudo de una etapa de crecimiento a la siguiente. Dependiendo de las especies, las plantas pueden ser más sensibles durante los primeros estadios del crecimiento vegetativo que durante la etapa reproductiva del desarrollo. En general, la germinación es la etapa más tolerante a la salinidad. La tolerancia de las variedades dentro de una misma especie puede diferir significativamente. Los árboles frutales modifican su tolerancia a la sal en función de los portainjertos (García-Sánchez *et al.*, 2005) y esto parece estar relacionado con la capacidad de los distintos portainjertos para regular la absorción y el transporte de Na⁺ y/o Cl⁻ desde la raíz a los brotes. Aunque las respuestas individuales ante la salinidad puede diferir, numerosas líneas de investigación sugieren que todas las plantas usan los mismos mecanismos de regulación y efectores para garantizar los niveles de tolerancia (Al Hassan *et al.*, 2016b) y que las diferencias descritas entre especies halófitas y glicófitas son de naturaleza cuantitativa y no cualitativa (Zhu, 2001, Vicente *et al.*, 2004). El NaCl tiene otros efectos

indirectos, algunos mediados a través de cambios en los niveles de reguladores del crecimiento de la planta; por ejemplo, el aumento inducido del ácido abscísico el que puede explicar parcialmente la alta sensibilidad de la germinación de la semilla al estrés salino, todos ellos contribuyen a la muerte de la planta si se sobrepasa el límite de tolerancia (Vicente *et al.*, 2004).

2.3.1 Mecanismo de adaptación de las plantas a la salinidad

Las plantas activan diferentes mecanismos para contrarrestar las dañinas consecuencias de la exposición a suelos con altos niveles de salinidad (Gregore *et al.*, 2012). En ambientes salinos, algunas glicófitas evitan los efectos de la salinidad limitando la absorción de iones tanto en las raíces como en los tallos, mediante la biosíntesis de osmolitos (prolina, betaína, trealosa, polioles, entre otros) o controlando el flujo de agua y transporte de iones a través de la membrana y su compartimentalización, lo cual les permite mantener y/o restablecer la homeostasis iónica (Vicente *et al.*, 2004, Pérez-Nasser, 2017) que, junto a la homeostasis osmótica son determinantes para tolerar ciertos niveles de salinidad. Las plantas responden al efecto osmótico, evitando la pérdida de agua y manteniendo el potencial de turgor para lo cual disminuyen la transpiración con el cierre de los estomas (Khokon *et al.*, 2011). En respuesta al menor potencial hídrico de la solución del suelo, las plantas deben ajustarse osmóticamente mediante la acumulación de iones inorgánicos, o mediante la síntesis de compuestos orgánicos para compensar la alta presión osmótica externa y por tanto evitar la sequía fisiológica producidas por el ambiente (Boscaiu *et al.*, 2013), con el fin de disminuir el potencial osmótico en la célula o por una combinación de ambos métodos (Lambers *et al.*, 2008, Gregore *et al.*, 2012). Existen numerosas evidencias de que estos mecanismos son compartidos por todas las plantas, tanto sensitivas como tolerantes en respuesta al estrés salino, aunque con claras diferencias cuantitativas respecto a la eficiencia con la que estas respuestas son ejecutadas, las plantas glicófitas (como la caña de azúcar) pueden tolerar condiciones suaves de salinidad y presentan una eficiencia inferior a las halófitas (Gregore *et al.*, 2012).

El equilibrio osmótico en el citoplasma se logra por un mecanismo general y conservado de respuesta ante condiciones ambientales que causan deshidratación celular como el frío, sequía, altas temperaturas o la presencia de metales pesados; es la síntesis y acumulación en el citoplasma de solutos orgánicos que no inhiben los procesos metabólicos incluso a altas concentraciones (Boscaiu *et al.*, 2013). Además de su función directa sobre el balance osmótico actúan como estabilizadores de proteínas, membranas y otras estructuras macromoleculares susceptibles a la deshidratación, así como al estrés oxidativo, son neutralizadores de especies reactivas del oxígeno (Szabados y Savouré, 2010), conocidos como osmolitos compatibles (Ahmad y Sharma, 2008, Ahmad y Prasad, 2012). Estos son los azúcares (principalmente

sacarosa y fructosa (Ahmad y Sharma, 2008), polioles (glicerina, inositol metilado), azúcares complejos (trehalosa, rafinosa) (López-Gómez y Lluch, 2012), metabolitos con carga (glicina-betaina) (Chen y Murata, 2011, Zhang *et al.*, 2011, Koyro *et al.*, 2012) y aminoácidos tales como la prolina (Ahmad y Sharma, 2010). Las halófitas pueden acumular grandes cantidades de sales inorgánicas en los orgánulos celulares (Ramanjulu y Sudhakar, 2001). Con el fin de prosperar en un medio salino las glicófitas deben sintetizar osmolitos orgánicos en mayor medida que las plantas que utilizan la sal como su principal osmolito. Este proceso tiene un costo de energía que es responsable, en parte, de la reducción del rendimiento. Algunas halófitas han desarrollado glándulas de adaptación ecofisiológicas o anatómicas (Grigore *et al.*, 2011).

La homeostasis iónica intracelular requiere el control de la absorción de iones tóxicos en el interior de las vacuolas para facilitar su compartimentación. Teniendo en cuenta que la vacuola es un compartimento esencial para la expansión celular, la acumulación de iones en este orgánulo facilita el ajuste osmótico que impulsa el crecimiento con el mínimo impacto perjudicial sobre la maquinaria del citosol y la vacuola (Taiz y Zeiger, 2006). El establecimiento de la homeostasis iónica y osmótica tras un estrés salino es esencial no sólo para prevenir la muerte celular sino también para el mantenimiento de los estados estacionarios fisiológicos y bioquímicos necesarios para el crecimiento y la finalización del ciclo de la vida. Las proporciones de Na^+ y Cl^- con otros nutrientes esenciales pueden ser muy elevadas y pueden causar deficiencias de elementos nutritivos presentes en concentraciones mucho más bajas (Ruiz *et al.*, 1997). Las necesidades de K^+ para mantener el crecimiento de la planta son más elevadas en condiciones salinas. Se ha demostrado genéticamente (Zhu, 2003) y fisiológicamente (Cuin *et al.*, 2008) que se requiere una relación favorable de K^+/Na^+ en condiciones de elevada salinidad en las células vegetales. Se ha demostrado que el incremento de la misma previene la muerte celular programada (Shabala, 2009). Por tanto, resulta crucial que la relación K^+/Na^+ en el citosol se encuentre por encima de 1,0 para la adecuada homeostasis iónica y resistencia a la salinidad (Maathuis y Amtmann, 1999, Carden *et al.*, 2003, Silva *et al.*, 2012).

Algunos autores aseguran que ante el estrés salino o sequía algunas plantas activan el metabolismo y la síntesis de proteínas para compensar las proteínas desnaturalizadas, mantener la integridad celular o reparar daños a través de la síntesis de solutos osmoprotectores. En contraste Lüttge *et al.* (1993) afirman que existen ciertas proteínas estimuladas por la salinidad que desempeñan funciones enzimáticas relacionadas con la síntesis de prolina y que algunas de estas son capaces de prevenir la entrada de iones tóxicos a partes vulnerables de la planta o

incrementar la excreción de los mismos. La prolina compensa osmóticamente los iones en la vacuola o la osmolaridad externa lo que permite el movimiento de agua desde el medio radical hasta el interior de las raíces lo que contribuye al mantenimiento de la turgencia celular. Se ha demostrado que además es protector de enzimas, estabilizador de estructuras, organelos y macromoléculas (Pérez-Nasser, 2017).

2.4 Propagación convencional e *in vitro* de la caña de azúcar

En condiciones de cultivo, las cañas son propagadas de forma agámica por estacas mediante segmentos de tallo, y la población se establece gracias a la brotación de las yemas axilares (Glaszmann y D'Hont, 1999); única forma de multiplicación practicada por el hombre para la reproducción del cultivo durante mucho tiempo, hasta que se descubrió que también se podía reproducir por medio de sus semillas, ya que éstas son fértiles, lo que permitió en 1880 iniciar en Java y Barbados las primeras multiplicaciones sexuales (Pérez *et al.*, 1997b). En Cuba este proceso de producción de semilla comercial tarda entre 32 y 36 meses desde que se siembran los bancos de semilla básica hasta que se siembran las plantaciones comerciales (Jiménez *et al.*, 1995, Freire, 2001), unido a la imposibilidad de realizar un saneamiento y diagnóstico efectivo a toda la semilla que se utiliza en el proceso (Jiménez *et al.*, 1995). Por la necesidad de contar con técnicas que permitieran mejorar la calidad de la semilla y disminuir las áreas destinadas a su producción, se acudió a formas de propagación rápidas como el método de yemas aisladas, el de estacas de una sola yema y el de trozos de tallo (Pérez y Rodríguez, 1989). La base fundamental de estas técnicas radica en el aprovechamiento de las potencialidades germinativas de cada una de las yemas del tallo (Abdallah *et al.*, 2016) a pesar de estas ventajas, en Cuba no han podido ser utilizadas comercialmente. Actualmente la propagación por estacas es la que más se emplea en la reproducción o siembra de los campos comerciales, a pesar de ser un método lento (Montes, 2010).

Los programas de mejoramiento genético y propagación masiva de esta especie requerían de métodos que permitieran la reducción del tiempo de introducción de nuevas variedades, lo que dio paso al cultivo *in vitro*, el cual facilita la aplicación de técnicas de conservación de germoplasma, de saneamiento y diagnóstico de semillas entre otros (Feldmann *et al.*, 1994a, Hernández *et al.*, 1997). Las investigaciones para la propagación *in vitro* de caña de azúcar comenzaron en Hawaii en 1961 y desde entonces se ha convertido en una metodología muy usada e importante para el mejoramiento del cultivo (Zuñiga, 2012). Entre los factores más estudiados actualmente para el incremento de la proliferación *in vitro* de plantas se encuentran: el sistema de cultivo, la densidad de cultivo y el uso de inhibidores del crecimiento. Cuando se habla de sistemas de cultivo de

plantas se refiere a tres grupos principales: el cultivo en medio semi-sólido; el cultivo en medio líquido; y al cultivo en sistemas más o menos automatizados. Desde hace varios años se tienen referencias del papel decisivo de estos factores en la respuesta morfogénica de las plantas durante la micropropagación (Jimenez, 2013).

Dentro de estas técnicas del cultivo de tejidos la producción de vitroplantas vía organogénesis, constituye la forma más utilizada para estos fines, se define como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos, utilizando medios nutritivos elaborados artificialmente (Jiménez y de Feria, 1998). En 1970 comienza la propagación masiva en Cuba para lo cual se construyeron cerca de 200 mil vitroplantas al año, sin embargo, la primera Biofábrica no se estableció hasta 1987 y para 1993 había un total de 14 de estas instalaciones distribuidas por todo el país, cuya segunda especie vegetal más reproducida es la caña de azúcar con el objetivo de rejuvenecer y sanear variedades comerciales, garantizar la introducción de variedades nacionales y disminuir los altos costos de producción masiva de plantas (Levin *et al.*, 1988), no obstante son necesarios métodos mucho más eficientes (Lorenzo *et al.*, 1999).

La introducción, empleo y mejoramiento en la automatización además de reducir los costos de producción, minimiza la manipulación del material vegetal lo que contribuye en gran medida a la calidad final de las plantas (Bernal *et al.*, 2002). Otro método es la embriogénesis somática (ES), proceso que implica la formación de embriones a partir de células vegetales (Viñas y Jiménez, 2011), que en caña de azúcar se logra incrementar los coeficientes de multiplicación, la obtención de semillas artificiales y permite el empleo de biorreactores para automatizar los procesos (Freire, 2001, Montes, 2010). Los embriones somáticos *in vitro* pueden provenir de células que pasaron por un proceso de dediferenciación, como en callos o suspensiones celulares, en lo que se conoce como ES indirecta o, sin pasar por ese proceso de dediferenciación, en lo que se denomina ES directa (Von Arnold, 2008). En este sistema se garantiza el contacto en todo momento con el material vegetal lo que favorece la absorción de nutrientes y la estimulación del coeficiente de crecimiento además del control computarizado sobre todo el proceso lo que ofrece mayores facilidades para el monitoreo y la modificación de las condiciones microambientales del biorreactor (Jiménez, 1998). No obstante, es una tecnología costosa y existe poco conocimiento sobre los parámetros reguladores de este proceso además que es limitado el número de especies en las que se reporta una embriogénesis eficiente (Viñas y Jiménez, 2011).

Las diversas técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se fundamentan en la totipotencia celular y consisten en cultivar un explante aséptico en un medio artificial de composición química definida e incubado en condiciones ambientales controladas y su objetivo final es regenerar una planta completa a partir de un explante, ya sea vía organogénesis o embriogénesis somática (Neumann *et al.*, 2009, Rangel *et al.*, 2016). Okamura (1991) informó del desarrollo de un sistema mejorado para la embriogénesis somática de la alfalfa (*Medicago sativa* L.). La técnica involucra la formación de embriones somáticos a partir de callos cultivados en medio semi-sólido. Posteriormente, los callos se pasan para medio líquido y se agitan con el objetivo de separar los embriones. Además de la separación de los embriones, el medio líquido permite la evaluación y aislamiento de los genotipos capaces de regenerarse, mediante la determinación del número de embriones formados. Después del desarrollo en medio líquido, los embriones maduros en estado de torpedo se colocan nuevamente en medio semi-sólido para la conversión en plantas. Con el uso de la secuencia semisólido-líquido-semisólido, el autor logró el aislamiento de un clon mejorado que es capaz de producir un número mayor de embriones fácilmente convertibles en plantas.

La decisión sobre qué estado físico del medio de cultivo emplear (semi-sólido o líquido) parece estar estrechamente vinculada con el cultivo en particular y el proceso de regeneración con el que se trabaje (Meker, 1977). Epp (1987) refiere que la proliferación de algunas especies de *Tillandsias* es superior en medio semi-sólido en comparación con el medio líquido. Por otra parte, Ziv y Ariel (1991) desarrollaron un sistema de cultivo para la micropropagación de helechos. En cultivos en agar, los ápices mostraron un gran crecimiento foliar, pero en medio líquido, el desarrollo de las hojas es limitado. Los cultivos en medio líquido produjeron agregados de meristemoides, los que, al separarlos mecánicamente, se desarrollaron como plantas normales después del paso a la aclimatización. Escalona *et al.* (1999), indican la superioridad del medio líquido para la proliferación de la piña en comparación con el medio semi-sólido. Otros autores han señalado las ventajas del cultivo en medio líquido para la formación de brotes (Harris y Mason, 1983), el crecimiento de los mismos (Skidmore *et al.*, 1988), y en la embriogénesis somática (Gawel y Robacker, 1990). La ausencia de gelificantes incrementa la disponibilidad de agua y sustancias disueltas para los explantes (Debergh, 1983). Por otra parte, Jiménez (1995) señala que la multiplicación de brotes de caña de azúcar es similar en los medios solidificados con agar y en los medios líquidos. Lal y Singh (1993) informan de la superioridad de los medios líquidos (agitación y estáticos) en la proliferación de la caña de azúcar en comparación con los medios gelificados. Dichos autores destacan también el incremento de la masa fresca de los explantes.

Dentro de los experimentos con medio líquido, también se refieren ventajas de la agitación en comparación con los cultivos estáticos para la micropropagación de *Ananas comosus* L. (Mathews y Rangan, 1979). Jiménez (1995), hace mención a la disminución el coeficiente de multiplicación de la caña de azúcar en subcultivos continuos en medio líquido. Por ello, el autor recomienda su uso en los últimos subcultivos de la etapa de proliferación, esto tiene un efecto adicional sobre los costos de producción porque aumenta la eficiencia de los operarios en una etapa donde se manejan grandes cantidades de plantas. Aunque el uso del medio líquido para la propagación en gran escala de plantas permite el empleo de biorreactores y la mecanización del proceso, la micropropagación comercial usa ampliamente los medios semi-sólidos. Los obstáculos principales para el uso del medio líquido son: la susceptibilidad de las plantas al estrés de corte en los biorreactores, y la hiperhidricidad de los micropropágulos obtenidos en el medio líquido (Herman, 1995, Alvarenga y Salazar, 2015). Sin embargo, una serie de investigadores tienen más éxito con los cultivos en medio líquido, algunos han diseñado aparatos automáticos para la micropropagación que eliminan las desventajas del medio líquido y otros han empleado retardantes del crecimiento para evitar la hiperhidricidad.

De las etapas de la micropropagación, la multiplicación se considera la etapa más importante del proceso, donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas. El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de brotes a partir de los propágulos establecidos. En esta etapa los brotes se separan en condiciones estériles y se cultivan nuevamente en medio fresco para inducir nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de plantas deseada. Para garantizar la máxima estabilidad genética de las plantas obtenidas *in vitro*, los brotes deben multiplicarse durante un número definido de subcultivos manteniendo un coeficiente de propagación estable a través del tiempo. A medida que aumenta el número de subcultivos existe una tendencia a incrementar el coeficiente de multiplicación. Sin embargo, después de un número determinado de “n” subcultivos, el coeficiente de multiplicación se afecta, con tendencia a disminuir, ocasionando la aparición de variaciones genéticas *in vitro*, también llamadas variaciones somaclonales (Humberto *et al.*, 2014).

Las técnicas de cultivo *in vitro* son herramientas valiosas para el desarrollo de investigaciones básicas y aplicadas como el mejoramiento genético, la conservación de germoplasma, transformación genética y producción de plantas haploides, entre otras (Rangel *et al.*, 2016). Las principales ventajas de este método, comparado con los medios tradicionales de propagación,

son: la posibilidad de multiplicación en gran escala de variedades seleccionadas con elevada pureza genética y fitosanitaria, en períodos de tiempo y espacio físico reducidos (Ángeles *et al.*, 2013), sin interrupción estacional, la rápida disponibilidad y validación de nuevos materiales obtenidos en programas de mejoramiento genético (Peres *et al.*, 2008) y la capacidad de automatización en algunas etapas del cultivo *in vitro* reduciendo la mano de obra, facilitando el escalado e incrementando la eficiencia biológica y la productividad en campo de las especies propagadas (Jimenez, 2013).

2.5 Biorreactores de Inmersión Temporal

En el ámbito del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, el término biorreactor hace referencia a equipos de características muy diferentes y no siempre se emplea con el mismo significado. Por una parte, incluye cualquier tipo de envase utilizado en la producción de biomasa, a pequeña o a gran escala independientemente de su complejidad técnica, como el cultivo en matraces Erlenmeyer, las placas Petri y otros envases de uso habitual en laboratorio. En otras ocasiones, el término alude a equipos complejos que permiten registrar y controlar parámetros físico-químicos del medio de cultivo con el fin de optimizar los crecimientos cualitativa o cuantitativamente (Jimenez, 2013). Estos biorreactores en un principio se usaron para el cultivo de microorganismos y con posterioridad se han ido adaptando para su utilización en el cultivo de tejidos vegetales y sobre todo en la producción de metabolitos secundarios (Preil, 2005). Estos sistemas presentan algunos inconvenientes como son la capacidad de intercambio gaseoso con el exterior, el porcentaje de oxígeno disuelto, el nivel de agitación y la presencia de etileno y otros gases; esto se debe a que son empleados con frecuencia envases parcial o herméticamente sellados para evitar la contaminación y deshidratación, con lo que la renovación de gases depende del paso de los mismo a través del sistema de cierre. La interrupción del flujo de gases durante unas pocas horas (h) determina la afectación de los procesos de crecimiento, desarrollo (Lowe *et al.*, 2003) y muerte celular (Jackson, 2003).

Entre ellos se encuentran tres grupos principales: biorreactores de nebulización, biorreactores de soporte fijo y sistemas de inmersión temporal. Woo y Park (1993) diseñaron un biorreactor de nebulización, este utiliza un transductor ultrasónico conectado a un nebulizador para producir una neblina que contiene la solución de nutrientes, la cual se libera en el interior del biorreactor por un flujo de aire. Robacker y Simonton (1992) describieron un aparato para el cultivo en medio líquido de *Amelanchier x grandiflora* con el uso de una computadora que variaba la exposición de los explantes al medio. Los explantes permanecían en una plataforma perforada que se encontraba fija en el fondo del recipiente de cultivo. El medio era bombeado hacia el contenedor de plantas y

extraído de acuerdo con un cronograma preestablecido. Los autores señalaron la obtención de una alta proliferación cuando los cultivos se mantuvieron continuamente en contacto con el medio en las etapas iniciales y esto se redujo con el cursar del ciclo del cultivo. La micropropagación o clonación *in vitro* permite la obtención masiva de material vegetal rejuvenecido con alta calidad genética y fitosanitaria bajo condiciones asépticas y controladas. En caña de azúcar se han realizado diversos estudios para su micropropagación; sin embargo, aun cuando los protocolos son eficientes y reproducibles, los altos costos de producción causados principalmente por la mano de obra y agentes gelificantes de los medios de cultivo, siguen representando un problema para que esta tecnología sea rentable (Caamal y Bello, 2014).

Una alternativa en la micropropagación de plantas es el empleo del Sistema de Inmersión Temporal (SIT), basados en el contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes, lo cual facilita el desarrollo de los procesos a gran escala, reduce los costos de producción y genera un aumento de la productividad del material propagado. Consiste en el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos de manera temporal a un medio de cultivo líquido en biorreactores semiautomatizados bajo condiciones asépticas y controladas; es decir, son recipientes diseñados específicamente para la producción a gran escala de estos elementos (Levin y Tanny, 2004). El cultivo en inmersión temporal puede constituir una alternativa de micropropagación a corto plazo, mientras a largo plazo se logran vencer los obstáculos biológicos que permitan la obtención eficiente de plantas y embriones somáticos en biorreactores (Alvarenga y Salazar, 2015). Para desarrollar un método de micropropagación eficiente en sistemas de inmersión temporal es esencial optimizar los parámetros técnicos para cada cultivo, siendo el tiempo y la frecuencia de inmersión los parámetros más críticos del sistema (Vilchez *et al.*, 2011). El esquema general está compuesto por dos frascos de cultivo, uno para el crecimiento de los brotes y el otro como reservorio del medio de cultivo, ambos conectados entre sí por medio de una manguera a través de la cual el medio de cultivo se mueve impulsado por la presión generada por un temporizador programable en el cual se especifica el tiempo y la frecuencia de inmersión y regulado mediante la apertura o cierre de electroválvulas (Alvarenga y Salazar, 2015).

En micropropagación utilizando biorreactores se informa de la facilidad en la producción y manejo de un mayor número de plántulas, la estimulación de la tasa de crecimiento por la aireación forzada, así como por la supresión de la dominancia apical, que induce la estimulación de crecimiento de brotes laterales, lo que representa una ganancia en cuanto a cantidad y calidad de material *in vitro* disponible, lo que adquiere aún más relevancia cuando se trabaja con especies

de difícil manejo en laboratorio, haciendo indispensable la implementación de tratamientos eficaces (Alvarenga y Salazar, 2015). La utilización de biorreactores convencionales presenta problemas relacionados básicamente con la hiperhidricidad, uno de los efectos más negativos del cultivo en medio líquido, que se pueden eliminar manejando adecuadamente los tiempos de inmersión del cultivo (Berthouly y Etienne, 2002) , razón por la cual los sistemas de inmersión temporal son alternativas convenientes para la micropropagación, estos aplican ciclos discontinuos de nutrientes, y permiten aprovechar las ventajas del medio líquido reduciendo sus inconvenientes, al reducir el contacto del material vegetal con el líquido y favorecer la aireación del mismo (Jimenez, 2013).

Probablemente el incremento en el número de brotes que se presentó con el empleo de los sistemas de inmersión temporal se relacione con el sistema de ventilación, ya que cada vez que el sistema inyecta aire al recipiente de cultivo durante la fase emergida se produce un intercambio de gases, especialmente de CO₂ y etileno que se volatilizan, estos gases inhiben la multiplicación de brotes en muchas especies; por lo que, al realizarse un mayor número de inmersiones al día se favorece la ventilación y el intercambio de gases como el etileno y el CO₂ que al acumularse limitan la multiplicación de los brotes, razón por la cual es indispensable determinar la frecuencia de inmersión adecuada para cada especie. Autores aseguran que el tiempo de la fase de inmersión es muy importante, ya que determina la tasa de absorción de nutrientes y controla la hiperhidricidad (Alvarenga y Salazar, 2015). Este parámetro es controlado por un programador conectado a la bomba neumática y a unas electroválvulas en los sistemas de inmersión completa sin renovación del medio, de esta forma se pone en contacto el líquido almacenado en el reservorio con el material vegetal localizado en otro recipiente (Berthouly y Etienne, 2002).

En gran número de especies se ha reportado la producción de mayor número de propágulos con el empleo de medios líquidos, ya que en este sistema los explantes están en contacto directo con el medio de cultivo, lo que incide en que la toma de nutrientes sea más efectiva; por otra parte, las sustancias de desecho se secretan al medio líquido por lo que afectan en menor medida al explante. En el cultivo *in vitro* en medio líquido en un biorreactor de columna de burbujeo se determinó un incremento en masa fresca de los brotes, en comparación con tratamientos utilizando matraces en agitación (Alvarenga y Salazar, 2015). Por el contrario, los cultivos en medio líquido presentan rasgos severos de este desorden fisiológico. Estos han demostrado ser una herramienta eficaz para la micropropagación de diferentes especies vegetales de importancia económica como banano (Basail *et al.*, 2012), malanga (Santos, 2008), papa (Igarza *et al.*, 2014) entre otros. En

caña de azúcar, Lorenzo *et al.* (2001) emplearon biorreactores de inmersión temporal para estudiar el coeficiente de multiplicación, además de otros parámetros bioquímicos como la excreción de fenoles al medio de cultivo, el número de brotes y la masa fresca. Los cultivos líquidos a gran escala se han usado para la micropropagación mediante organogénesis o embriogénesis somática y su uso representa una medida para disminuir los costos de producción al no emplearse agentes gelificantes (Vilchez *et al.*, 2011). El problema más importante en relación al uso de medios de cultivo líquidos es la hiperhidricidad la cual conduce a malformaciones morfológicas (Santos, 2008).

El sistema BIT[®] fue desarrollado en el Centro de Bioplantitas de Ciego de Ávila por Escalona *et al.* (1998), este sistema se basa en dos envases de capacidad variable (de 250 mL a 10 L), conectados por tubos de silicona. Mediante la aplicación de presión de aire en uno u otro sentido se hace pasar el medio líquido de un envase a otro que contiene los explantes. La inmersión temporal generalmente mejora la calidad del material vegetal respecto al obtenido con sistemas tradicionales de cultivo *in vitro*, incrementa el vigor de los tallos y aumenta la frecuencia de embriones somáticos morfológicamente normales. Muchos autores han descrito aumentos en los coeficientes de multiplicación, la supresión de los fenómenos de hiperhidricidad y mejoras en la sincronización, maduración y la oxidación en los embriones somáticos (Jimenez, 2013). Los BIT constituyen una herramienta importante para la multiplicación de la caña de azúcar, permiten la obtención de altos coeficientes de multiplicación superiores a los que se alcanzan por los sistemas tradicionales de cultivo *in vitro* con reducción de los costos de producción (Lorenzo *et al.*, 1998, Alvarenga y Salazar, 2015). Los BIT se colocan en estantes, la distribución de aire desde el compresor a los frascos es través de una conexión de equipo neumático de alta precisión. Cada piso en el estante tiene un panel de luz (blanca fluorescentes) que garantizan intensidad lumínica de 40-50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La frecuencia y el tiempo de inmersión se controlan a través de un Controlador Lógico Programable (PLC) o bien con temporizadores digitales. Según el tiempo programado, se abre una válvula y el aire proveniente del compresor impulsa el medio de cultivo hacia el frasco que contiene los explantes. Durante el período de inmersión, el flujo de aire permite el burbujeo del medio, remueve los explantes y cambia la atmósfera dentro del recipiente de cultivo. Pasado el tiempo de inmersión, se activa una segunda válvula y se regresa el medio al recipiente de almacenamiento (Humberto *et al.*, 2014).

2.6 Bioensayos para la selección temprana de la tolerancia de las plantas a la salinidad

Existen numerosas vías para lograr la obtención de variedades tolerantes a la salinidad, que van desde la selección natural de clones tolerantes a estrés salino, la mutagénesis (búsqueda de

nuevas 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, 2001). La inducción de variaciones genéticas por diferentes métodos y técnicas es una herramienta básica en manos de los mejoradores de plantas para el desarrollo de nuevos cultivares con tolerancia al estrés abiótico, resistencia a plagas y enfermedades y el mejoramiento de la calidad y el rendimiento agrícola (Bermúdez *et al.*, 2016). 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 (Ashraf y Harris, 1994). 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. 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).

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 cómo medir la tolerancia a la salinidad por su complejidad (Hanin *et al.*, 2016). Además, las evaluaciones de campo son complejas por las dificultades para controlar o estandarizar los factores ambientales y generalmente requieren áreas extensas para las evaluaciones. La selección de aquellas variedades azucareras que produzcan la mayor cantidad de azúcar por unidad de área es un objetivo de trabajo prioritario para muchos países productores de azúcar, empeñados en lograr mayores beneficios económicos en la explotación del cultivo. Actualmente se requiere contar con variedades de elevado rendimiento durante diferentes épocas del año y adaptadas a las condiciones agroecológicas de cada zona, para elevar los niveles de producción (Chiang *et al.*, 2018). Se han usado varias técnicas novedosas bajo variadas condiciones de estrés por ejemplo las altas temperaturas, para mejorar el comportamiento de plantas de maíz de zona templada a las mismas (Farzami-Sepehr y Ghorbanli, 2002). Por otra parte se ha usado la polinización *in vitro* donde se encuban las mazorcas a temperaturas entre 28 y 38 °C (Petolino *et al.*, 1992). Las plantas derivaron de granos que sobrevivieron a cada tratamiento y se evaluaron en una estación cuando las temperaturas variaron entre 26 y 32 °C durante la floración y el llenado del grano. La progenie

de la selección de las altas temperaturas produjo más granos y sufrió menos vuelco y la germinación del polen de las progenies seleccionadas fue menos afectada por las altas temperaturas. En un estudio sobre el tema, se encontró poca variabilidad genética para la tolerancia a las inundaciones en cultivares de zona templada. Los genotipos tropicales exhiben una mayor variación y nueve germoplasmas mostraron altos niveles de tolerancia que sobreviven a una inundación de cinco a seis días a 27 °C (Lemke Keyes y Sachs, 1989).

Por otra parte, en estudios recientes algunos autores informan que las modificaciones en el suplemento de nutrientes es una de las formas de reducir los efectos negativos de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas, por tanto, la tolerancia a la salinidad puede ser alterada a través de la nutrición mineral (Tabatabaei y Fakhrzad, 2008). Mientras el sodio (Na^+) resulta perjudicial para el crecimiento de las plantas, el potasio (K^+) es uno de los elementos esenciales y es requerido por la planta en grandes cantidades. Como las proteínas transportadoras de Na^+ y K^+ son comunes, el Na^+ compite con el K^+ por el influjo extracelular (Niu *et al.*, 1995, Yang *et al.*, 2009). Numerosos sistemas transportadores de K^+ presentan gran afinidad por el Na^+ , por lo que las elevadas concentraciones externas de Na^+ tiene impacto negativo en el influjo extracelular de K^+ . La aplicación exógena de K^+ para aliviar el estrés salino en las plantas ha sido bien documentada y permite la selección de genotipos más tolerantes al estrés salino (Achilea, 2002, Ramachandra y Ravishankar, 2002, Mishchenko *et al.*, 2007, Tzortzakis, 2010, Lorenzo *et al.*, 2013).

De la misma forma, está ampliamente establecido que el calcio (Ca^{2+}) disminuye la toxicidad por Na^+ en una variedad de especies (Wu y Wang, 2012). El suplemento externo de Ca^{2+} reduce los efectos tóxicos del NaCl , presumiblemente por facilitar el incremento de la selectividad K^+/Na^+ (Liu y Zhu, 1998). Elevada salinidad provoca incremento de Ca^{2+} en el citosol que es transportado tanto del apoplasto como de los compartimentos intracelulares (Knight *et al.*, 1997). Este transitorio incremento del Ca^{2+} citosólico inicia una cadena de transducción de señales del estrés que conduce a la adaptación salina. La búsqueda relacionada con la identificación de genes involucrados en proporcionar la tolerancia a la salinidad comenzó por Liu y Zhu (1998), quienes analizaron numerosos mutantes e identificaron genes SOS (del inglés *salt overly sensitive*). La ruta SOS consiste en la exclusión del exceso de iones Na^+ fuera de la célula vía contrartransporte sodio / hidronio (H^+) de la membrana citoplasmática y ayuda a recuperar la homeostasis iónica celular. El descubrimiento de los genes SOS preparó el terreno para la elucidación de la novedosa ruta que vincula la señalización del Ca^{2+} en respuesta al estrés salino (Zhu, 2001).

La acumulación de determinados metabolitos y los cambios en la actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa y la peroxidasa, se relacionan con las potencialidades de una planta para contrarrestar el efecto nocivo de la salinidad en los diferentes procesos fisiológicos y morfológicos, estos pueden servir de marcadores para la selección de plantas tolerantes (Fuentes *et al.*, 2008). Por lo tanto el incremento en la capacidad de eliminación de estas ERO por parte de la planta se considera indicador de tolerancia, mientras que la ausencia de respuesta o una disminución respecto a la del control, se considera signo de sensibilidad (Gabriel *et al.*, 2013). En estos procedimientos a menudo se emplea la Dosis Reductiva Media (DR50) (dosis que reduce el crecimiento en un 50 %) (Salazar *et al.*, 2014) y su contraparte, la Dosis Letal Media (DL50) (dosis en la que el 50% del material vegetal tratado muere) no se emplea en estos casos (Bermúdez *et al.*, 2016). Tiene innumerables aplicaciones en el campo de la ciencia como uno de los métodos más utilizados en el mundo para determinar las dosis óptimas para reducir cualquier variable dependiente al 50 % de su valor, manipulando el factor independiente. Algunas de sus aplicaciones en los últimos años fueron: el método descrito por Lorke (1983) utilizado para determinar la influencia de la colecta sobre la composición química del frijol así como la capacidad citotóxica de los péptidos generados de la hidrólisis enzimática del aislado proteico (Martínez *et al.*, 2016).

La DR50 fue utilizada además para establecer la dosis óptima de radiación a aplicarse a explantes, en la que se toma aquella capaz de permitir la supervivencia del 50% de los explantes y seguidamente, se procede al establecimiento de la DL50 en medios con Polietilenglicol (PEG 8000) para seleccionar los explantes que muestren indicios de tolerancia (Salazar *et al.*, 2014). Bolte *et al.* (2016) lo utilizaron para la evaluación letal de la sequía, empleando un umbral crítico de disponibilidad de agua en el suelo que se alcanza cuando se produce una mortalidad del 50% en las poblaciones de plántulas. Además, la dosis óptima determinada fue basada en la reducción en los parámetros de supervivencia y crecimiento para crear la máxima variabilidad con un número mínimo de mutantes indeseables. Estas dosis de mutágenos óptimas podrían ser útiles al formular el programa de mejoramiento de la mutación de cultivos para mejorar los rasgos específicos de los mismos (Kangarasu *et al.*, 2014). Debido a la complejidad de los mecanismos de tolerancia a la salinidad es importante la investigación de las respuestas al estrés salino en plantas con diferentes niveles de tolerancia, pero con similares fondos genéticos. Este enfoque puede ayudar a establecer cuáles de las respuestas observadas son generales y esenciales para la tolerancia a la salinidad, y cuáles no (Vicente *et al.*, 2004). A pesar de las investigaciones realizadas que generan infinidad de información de diversos fenómenos claves en la tolerancia al estrés, no están

totalmente dilucidados los mecanismos de acción. Las prioridades serán conocer las bases fisiológicas y bioquímicas de la respuesta de las plantas a estreses abióticos. El conocimiento de las mismas es de particular interés en el desarrollo de métodos y estrategias que conduzcan al mejoramiento de la tolerancia de estas plantas al estrés hídrico, salino, altas temperaturas y encharcamiento.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

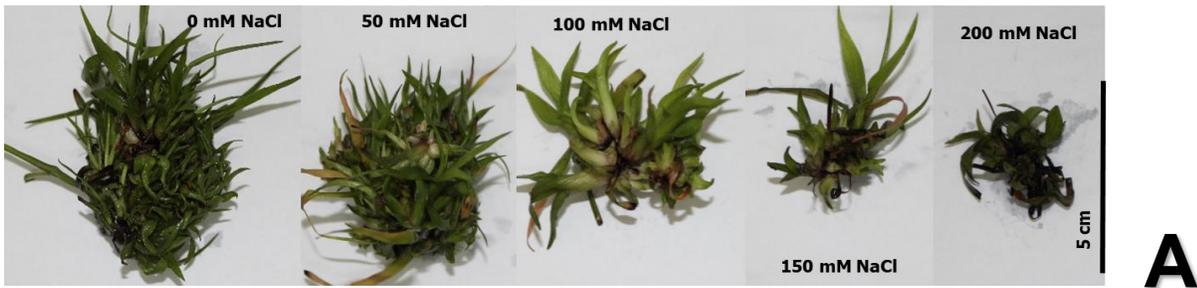
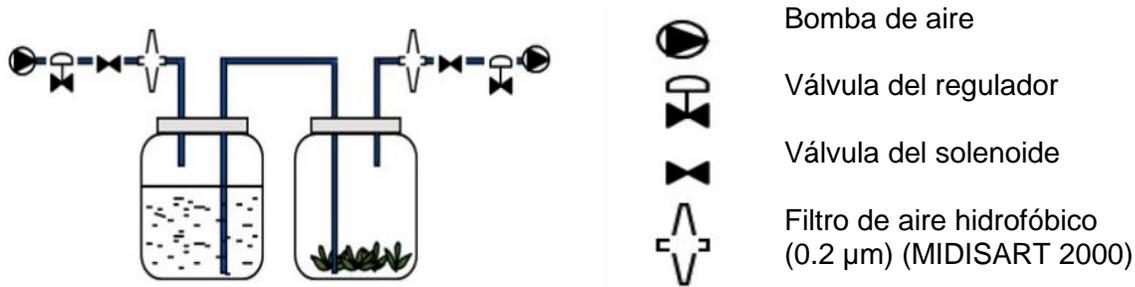
Generalidades

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Mejoramiento Genético del Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila (UNICA) donde se determinaron los efectos del NaCl (como factor de estrés abiótico y potencial inductor de metabolitos de plantas), en la micropropagación de la caña de azúcar en BIT. Los meristemas de caña de la variedad (cv. C-1051-73) procedentes de plantas cultivadas en campo se cultivaron siguiendo el protocolo de Jiménez *et al.* (1995). Las plantas de caña de azúcar cultivadas *in vitro* se subcultivaron cuatro veces para usarlas como explantes. Los subcultivos se realizaron a intervalos de 30 días. Cada determinación bioquímica partió de tres muestras independientes que fueron agrupadas (100 mg cada una) y finamente maceradas (0,1 g) en nitrógeno líquido, se mezclaron con 1,4 mL de agua destilada y se agitaron ligeramente.

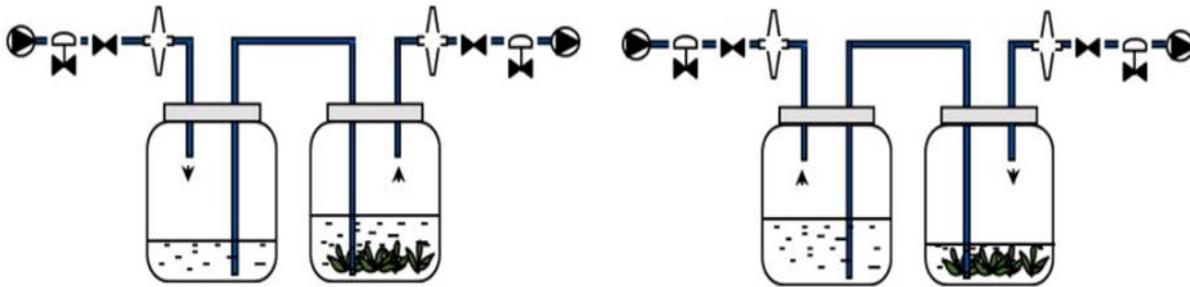
Se implementaron los BIT descritos en la Figura 1. Se utilizó el medio de cultivo empleado por Jiménez *et al.* (1995) modificado por Lorenzo *et al.* (1998) compuesto por: sales inorgánicas MS 10 mg L⁻¹ y vitaminas MS 10 mg L⁻¹; 100 mg L⁻¹ inositol (Murashige y Skoog, 1962); 30 g L⁻¹ sacarosa, 0.3 mg L⁻¹ 6-benciladenina y 1.0 mg L⁻¹ paclobutrazol. Se suplementaron con diferentes niveles de NaCl al medio de cultivo al principio del subcultivo: 0, 50, 100, 150, 200 mM. Cada tratamiento involucró tres biorreactores (5 explantes/biorreactor). Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 1 °C; 30 μmol m⁻²s⁻¹ (luz fluorescente) y fotoperíodo de 8 horas (8 h luz, 16 h oscuridad). A los 30 días, se determinó el coeficiente de multiplicación de los brotes, la masa fresca de los *clusters* y los niveles de malondialdehído (MDA), otros aldehídos, clorofilas a y b, carotenoides y compuestos fenólicos (solubles en el material vegetal, unidos a la pared celular y presentes en el medio de cultivo). Las muestras de tejido vegetal se obtuvieron de tres replicas independientes de 100 mg cada una (una por cada biorreactor). Al indicador coeficiente de multiplicación se le determinó la Dosis Reductiva Media, para lo cual se siguió la metodología empleada por Salazar *et al.* (2014).

Todos los datos de este estudio se evaluaron estadísticamente utilizando SPSS (Versión 8.0 para Windows, SPSS Inc., Nueva York, NY). Se evaluó el efecto de cinco niveles del factor salinidad en diferentes variables y se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizó un análisis de varianza One-Way (ANOVA) y un test de Tukey (p = 0,05) para localizar las diferencias estadísticas significativas. Los coeficientes globales de variación (CGV) se calcularon de la siguiente manera: (desviación estándar/promedio) * 100. En esta

fórmula, se consideraron los valores medios de los cinco niveles de NaCl comparados (tratamientos) para calcular la desviación estándar y el promedio. Por lo tanto, cuanto mayor sea la diferencia entre los cinco tratamientos comparados, mayor es el CGV (Lorenzo *et al.*, 2015). Los CGV se clasificaron como “Bajos” de 17.33 a 43.64 %, “Medios” de 43.64 a 69.94 %, y “Altos” de 69.94 a 96.25 %.



A



Paso 1: Transferencia del medio de cultivo desde el contenedor de medio de cultivo hasta el contenedor de la planta.

Paso 2: Transferencia del medio de cultivo del contenedor de la planta hasta el contenedor de medio de cultivo.

B

Figura 1. A Diseño del Biorreactor de Inmersión Temporal y brotes típicos producidos. **B** Modo de operación de un Biorreactor de Inmersión Temporal. Se efectuaron inmersiones (de 2 minutos) cada 3 horas durante 30 días.

3.1 Determinación del efecto del cloruro de sodio en el coeficiente de multiplicación de los brotes y en la masa fresca de los *clusters*

El coeficiente de multiplicación se determinó según el número de brotes. Una vez culminado el período experimental se procede a separar los brotes de cada *cluster*, para ello se empleó al personal especializado en esta operación. El conteo lo llevó a cabo la misma persona para disminuir lo más posible el error debido a la manipulación y el conteo. Para determinar la Dosis Reductiva Media (50 % de reducción del coeficiente de multiplicación) se determinó el coeficiente de multiplicación máximo para la concentración de 0 mM (dosis mínima) y el coeficiente de multiplicación mínimo para 200 mM (dosis máxima) de cada uno de los tratamientos de forma independiente. El valor donde se alcanza el 50% del coeficiente de multiplicación se calculó por la siguiente fórmula: $\text{Mín.} + ((\text{Máx.} - \text{Mín.}) / 2)$. Para determinar la masa fresca se empleó la balanza analítica SARTORIUS modelo 180227 en la cual se pesaron los *clusters* procedentes de cada BIT de forma independiente.

3.2 Determinación del efecto del cloruro de sodio en los niveles de malondialdehído y otros aldehídos, clorofilas a, b; carotenoides, fenoles solubles, ligados a las paredes celulares y excretados al medio de cultivo

Las clorofilas se cuantificaron según Porra (2002). Al material vegetal, que se maceró previamente en nitrógeno líquido, se le adicionaron 0,5 mL de acetona al 80% (v:v). Las muestras se centrifugaron (Heal Force, Neofuge 15R, immobile angle, 14086.8 x g) a 4°C durante 15 minutos. Se colectó el sobrenadante y se midió la absorbancia a 647 nm y 664 nm (RAYLEIGH, VIS-723 G). El contenido de clorofilas se expresó en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masa fresca y se calculó según las fórmulas:

$$\text{Cl a} = 12.25\text{Abs}_{664\text{nm}} - 2.55\text{Abs}_{647\text{nm}}$$

$$\text{Cl b} = 22.31\text{Abs}_{647\text{nm}} - 4.91\text{Abs}_{664\text{nm}}$$

$$\text{Cl a+b} = 17.76\text{Abs}_{647\text{nm}} + 7.34\text{Abs}_{664\text{nm}}$$

Los niveles de **carotenoides** se determinaron según Lichtenthaler (1987). El procedimiento de preparación de las muestras es muy similar al utilizado para la determinación de clorofila. Se empleó acetona al 80%(v/v), se desarrolló protegido de la luz y las muestras permanecieron a bajas temperaturas, y se midió la absorbancia a 470 nm. **El malondialdehído y otros aldehídos** se cuantificaron como se describe en Heath y Packer (1968) por el método colorimétrico basado en la reacción con ácido tiobarbitúrico: se adicionaron 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (v/v; en ácido tricloroacético 20% v/v) y las muestras se cultivaron en un baño termostataado a 100°C durante 25 minutos. Luego de enfriarlas en hielo, se centrifugaron a 756 rpm (Heal Force, Neofuge

15R, immobile angle, diámetro del rotor 18 cm) por 10 minutos. Se midió el sobrenadante en un espectrofotómetro UV visible Pharmacia LKB-Ultrospec III (A_{455} nm, A_{532} nm). La absorbancia no específica del producto de la reacción se midió a 600 nm y se sustrajo de la absorbancia máxima a 532 nm para las mediciones del malondialdehído y a 455 nm para otros aldehídos. Los resultados se expresaron en nmol g^{-1} de masa fresca.

Los **fenoles** (solubles en el material vegetal, unidos a la pared celular, y excretados al medio de cultivo) se determinaron según Gurr *et al.* (1992), se extrajeron y cuantificaron usando un espectrofotómetro (UV visible Pharmacia LKB-Ultrospec III) por el método colorimétrico basado en la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (mg equivalentes de ácido gálico por g de masa fresca); las muestras de hojas de 0,1 g se maceraron en nitrógeno líquido y luego se adicionó 0,5 mL de metanol, luego se agitaron en un *vortex* y se centrifugaron a 12000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R, immobile angle, diámetro del rotor 18 cm), durante 15 minutos. Al precipitado se le realizaron dos ciclos de extracción con metanol, con 250 mL cada uno hasta completar 1 mL de extracto, el sobrenadante se colectó y se consideró como la reacción para los fenoles solubles. El precipitado se incubó con 0,25 mL de hidróxido de sodio 2 mol L^{-1} durante 16 horas a 70°C , se adicionó 0,25 mL de ácido clorhídrico (2 mol L^{-1}) después de la incubación. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R, immobile angle, diámetro del rotor 18 cm), durante 15 minutos. El precipitado se descartó y el sobrenadante se consideró como el reservorio de los fenoles ligados a las paredes celulares.

Con el objetivo de cuantificar los niveles de fenoles solubles y ligados a las paredes celulares, 20 μL del sobrenadante se mezclaron con 980 μL de agua destilada. Se adicionaron 100 μL del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu y las muestras se incubaron durante 5 minutos. Se adicionó bicarbonato de sodio (600 μL , saturado con hidróxido de sodio 0.1 mol L^{-1}) y transcurridos 60 min, se determinó la absorbancia a 725 nm con espectrofotómetro UV visible Pharmacia LKB-Ultrospec. La excreción de compuestos fenólicos se determinó usando una modificación del procedimiento de Hoagland (1990): Se mezcló medio de cultivo (0,5 mL) con 4,5 mL de agua destilada y se añadieron 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (50 % v/v). Se agitó la mezcla, se dejó reposar durante 5 min y se añadió 1 mL de solución saturada de carbonato de sodio. La mezcla se agitó de nuevo, se dejó reposar durante 60 min y se midió la densidad óptica a 725 nm. La concentración de fenoles se expresó mg/g masa fresca de la hoja, y se determinó mediante una curva de calibración utilizando ácido gálico como patrón.

10. RESULTADOS

4.1 Determinación del efecto del cloruro de sodio en el coeficiente de multiplicación de los brotes y en la masa fresca de los *clusters*

En la Figura 2 se muestra el efecto del cloruro de sodio en el coeficiente de multiplicación y la masa fresca de la caña de azúcar. El coeficiente máximo de multiplicación (Figura 2A) fue de 33.91 (con 0 mM NaCl) y el mínimo 3.28 (con 200 mM NaCl). Aproximadamente 89.48 mM de NaCl redujo el coeficiente de multiplicación a un 50 % cuyo valor fue de 18.6. Para este parámetro se obtuvo un coeficiente global de variación de 76.00 % clasificado como “Alto” lo que indica heterogeneidad entre los datos por lo que el cloruro de sodio disminuyó la multiplicación de brotes paralelamente al incremento de la concentración. La masa fresca (Figura 2B) experimentó una reducción poco variable a concentraciones de NaCl inferiores a 100 mM aproximadamente, y una más significativa para valores superiores. El CGV fue de 60.12 % (“Medio”). Los mayores valores de masa fresca se obtuvieron en el control.

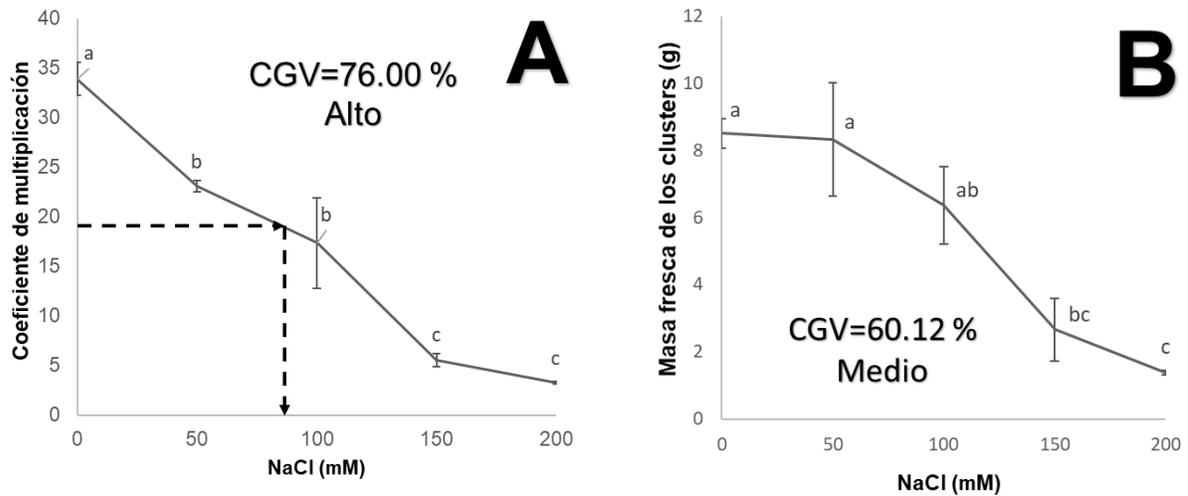
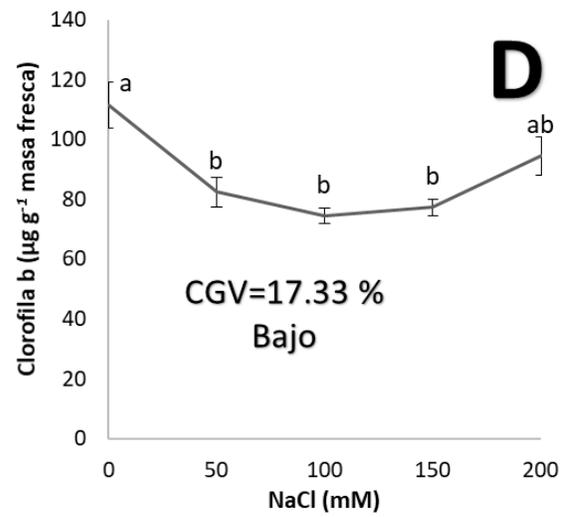
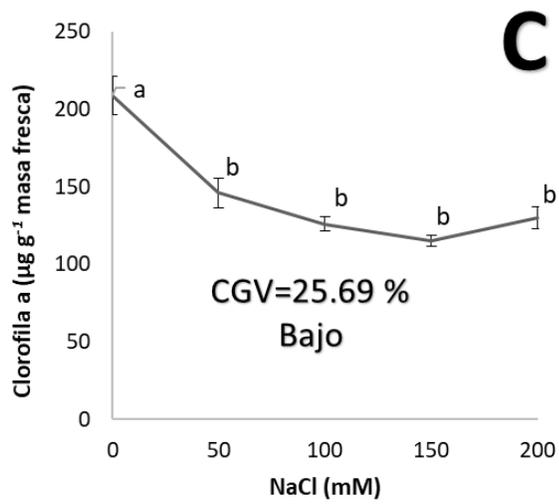
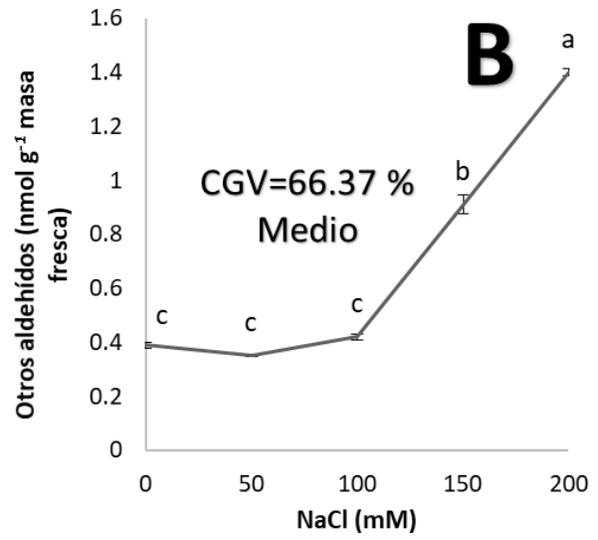
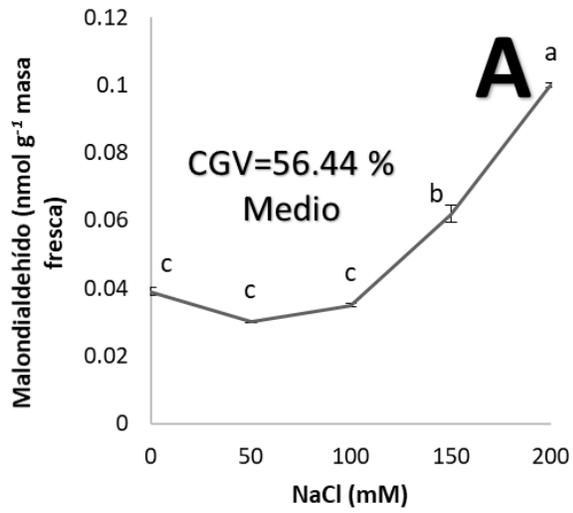


Figura 2. Efecto del cloruro de sodio en el coeficiente de multiplicación de los brotes **A** y en la masa fresca de los *clusters* **B** de la caña de azúcar durante la micropropagación en biorreactores de inmersión temporal. Los resultados con la misma letra no son estadísticamente diferentes (One-Way ANOVA, Tukey, $p > 0.05$).

4.2 Determinación del efecto del cloruro de sodio en los niveles de malondialdehído y otros aldehídos, clorofilas a, b; carotenoides, fenoles solubles, ligados a las paredes celulares y excretados al medio de cultivo

A nivel bioquímico se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos con NaCl (Figura 3) pero los “Altos” coeficientes globales de variación (CGV) solo se observaron en el contenido de carotenoides en las plantas (Figura 3E) y de los compuestos fenólicos excretados al medio de cultivo (Figura 3H). El coeficiente de multiplicación (Figura 3A) y los niveles de carotenoides (Figura 3E) y compuestos fenólicos excretados (Figura 3H) parecen estar negativamente correlacionados ante la adición de NaCl. El NaCl (0-200 mM) elevó los niveles de carotenoides de 13.5 a 79.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca (5.9 veces respecto al control); y los fenoles excretados de 7.8 a 30.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ medio de cultivo (3.8 veces respecto al control). Los indicadores bioquímicos con valores “Medios” de CGVs también se incrementaron cuando fue impuesto el estrés salino: contenido de malondialdehído (2.6 veces) (0.10 / 0.04 nmol g^{-1} masa fresca (Figura 3A); otros aldehídos (3.7 veces) (1.4 / 0.4 nmol g^{-1} masa fresca (Figura 3B) y fenoles solubles en las plantas (2.8 veces) (4.4 / 1.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ masa fresca (Figura 2F). Aunque se detectaron diferencias estadísticas significativas en los niveles de clorofila a (Figura 3C), b (Figura 3D) y fenoles ligados a las paredes celulares (Figura 3G), sus CGVs fueron “Bajos” indicando un efecto pobre del NaCl sobre los mismos.



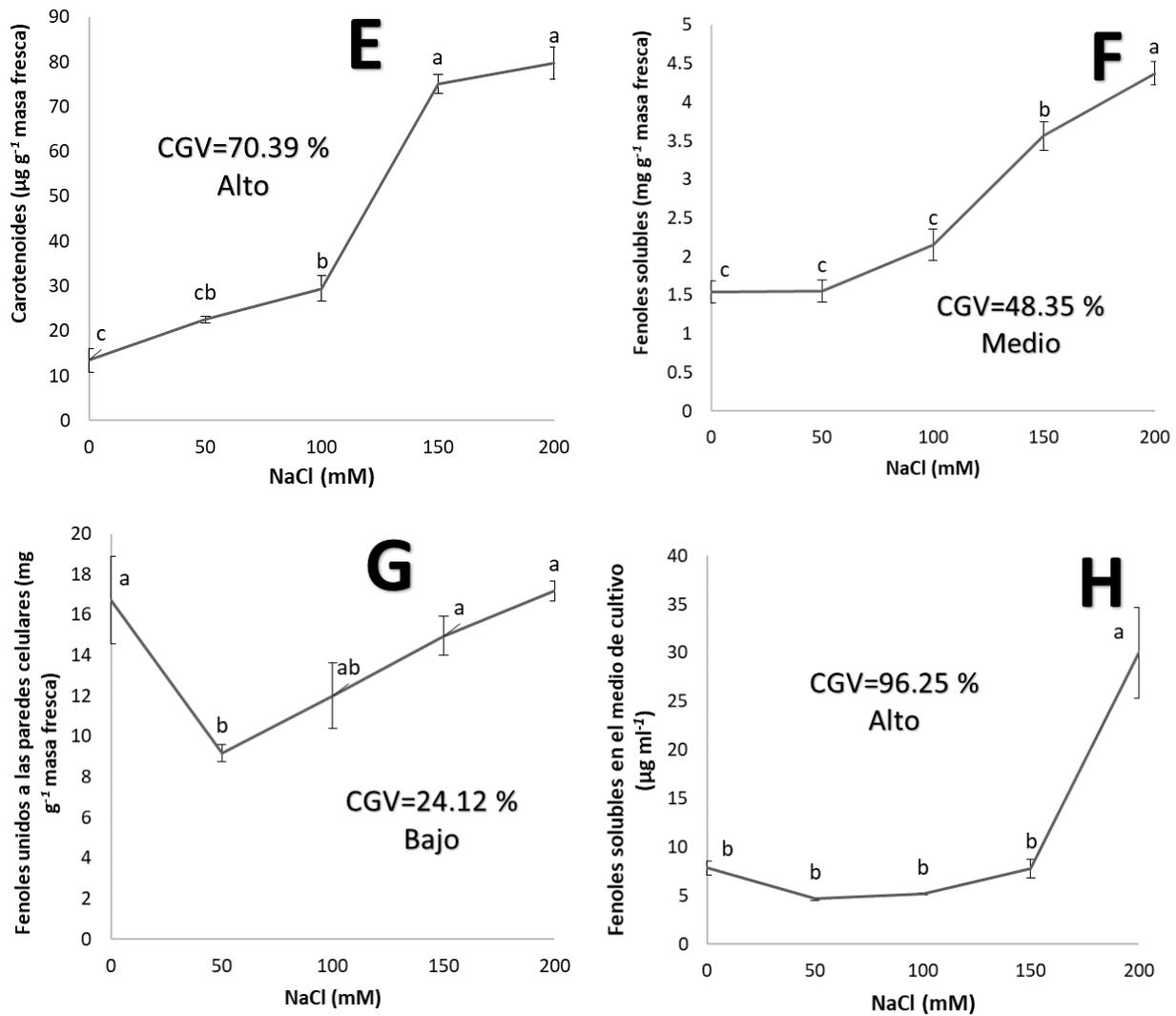


Figura 3. Efecto del cloruro de sodio en los niveles de malondialdehído **A** y otros aldehídos **B**, clorofilas a **C** y b **D**, carotenoides **E**, y fenoles solubles **F**, ligados a las paredes celulares **G** y en el medio de cultivo **H**, durante la micropropagación de la caña de azúcar en biorreactores de inmersión temporal. Los resultados con la misma letra no son estadísticamente diferentes (One-Way ANOVA, Tukey, $p > 0.05$)

11. DISCUSIÓN

5.1 Determinación del efecto del cloruro de sodio en el coeficiente de multiplicación de los brotes y en la masa fresca de los *clusters*

El coeficiente de multiplicación disminuyó en todos los tratamientos donde el material vegetal se expuso a condiciones de salinidad por NaCl; el control no tratado no mostró afectaciones. Dicha disminución ocurrió en un 50 % para una concentración de 89.48 mM NaCl. Resultados similares fueron obtenidos por Al Hassan *et al.* (2016b) quienes realizaron un estudio comparativo entre dos especies de plantas del género *Juncus* para determinar la más tolerante a la salinidad en términos de la inhibición del crecimiento mediado por NaCl, en el cual el coeficiente de multiplicación disminuyó con la salinidad paralelamente al aumento de la concentración de NaCl alcanzándose el crecimiento óptimo con ausencia de sal, lo que coincide también con Boscaiu *et al.* (2013) los que estudiaron la acumulación de prolina como marcador de tolerancia e informaron una reducción del crecimiento de alrededor del 83 % a concentraciones mayores de 300 mM. En el presente estudio la concentración máxima empleada fue 200 mM NaCl, con la cual la reducción experimentada fue de un 89 %. Este comportamiento pudiera estar relacionado con la forma en que la planta redirecciona sus recursos, precursores metabólicos y energía desde el metabolismo primario y la acumulación de biomasa, a la activación de mecanismos de defensa específicos y a potenciar la absorción de agua y nutrientes a expensas del desarrollo (Sanjuan *et al.*, 2015).

El estrés salino disminuye la toma de nutrientes (Chávez *et al.*, 2015) debido a una compleja red de interacciones que incluyen tanto la disminución en la toma de nutrientes por las raíces (en plántulas *ex vitro*) como la inhibición del transporte hasta la parte aérea (Abdelgadir *et al.*, 2005, Simón, 2012). Disminuye la densidad y apertura estomática (Huang *et al.*, 2009), y la concentración de carbohidratos energéticos como hexosas, sacarosa y almidón (Arbona *et al.*, 2005). La Dosis Reductiva Media se determinó en este parámetro debido a que es el indicador que mostró mayor sensibilidad y se considera en la micropropagación mediante biorreactores de inmersión temporal como la respuesta fisiológica más rápida de las células vegetales por las propias ventajas de este método no convencional. Es uno de los métodos más utilizados en el mundo para determinar las dosis óptimas para reducir cualquier variable dependiente al 50% de su valor, manipulando el factor independiente. Se determinó basada en la reducción en el parámetro más sensible (Coef. Multipl) para crear la máxima variabilidad con un número mínimo de mutantes indeseables. De manera que en la multiplicación acelerada de los tejidos vegetales de la caña de azúcar se reflejan los efectos directos de la salinidad. Con un valor de 89 mM NaCl,

puede ser usada para inducir estrés salino durante la micropropagación en BIT y eventualmente detectar mutantes tolerantes a la salinidad (Salazar et al., 2014).

La salinidad causa una fuerte reducción del crecimiento de la planta debido a los dos componentes del estrés salino: estrés hídrico osmóticamente inducido, (la concentración de sales en el medio afecta la toma de agua por la planta); y a la toxicidad iónica específica originada por los iones sodio y cloruro (Gregore *et al.*, 2012). La inhibición del crecimiento se ha informado para todas las especies investigadas, tanto halófitas como glicófitas (Al Hassan *et al.*, 2016b). Al provocar una alteración del balance iónico interno y muchas veces la acumulación de metabolitos orgánicos osmóticamente activos en detrimento de la síntesis de sustancias requeridas para el desarrollo celular, se afecta el metabolismo global de la planta y por ende su crecimiento. Dado que la cantidad de energía necesaria para la producción de solutos osmóticos excede grandemente los requerimientos energéticos para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, paredes celulares y otros compuestos, la energía disponible para el crecimiento es menor cuando existe estrés salino (Serpa y Calderón, 2005). Otros autores como Demirkiran *et al.* (2013) investigaron el efecto del NaCl a dos concentraciones diferentes (0; 50; 100mM) en el crecimiento *in vitro* de la cebada. Sus resultados mostraron una inhibición de la germinación de los brotes en un 85.5 % fue cuando usaron concentraciones de 100 mM de NaCl. Por otra parte, las dos concentraciones utilizadas disminuyeron el contenido de proteínas, la masa fresca y la longitud de los brotes.

En el estudio llevado a cabo por Simón (2012), la salinidad disminuyó la concentración de K^+ en hojas y la incrementó en los tallos. Refieren que este comportamiento podría estar relacionado con la inhibición competitiva del proceso de absorción de K^+ por el Na^+ , y con una alta capacidad para acumular K^+ en el tallo por una disminución del transporte hacia las hojas. La reducción en el crecimiento se le atribuye a la toxicidad del Cl^- y/o Na^+ y al desequilibrio nutricional causado por el incremento en la razón Na^+/K^+ , más que al efecto osmótico de la salinidad. La absorción y transporte del Cl^- parece ser que está menos restringido que para el Na^+ . Los altos niveles de sodio y cloruro causan un desbalance nutricional, a través de la reducción de la toma de K^+ , nitrato (NO_3^-) y fosfato (PO_4^{3-}) y el incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno, que dañan proteínas y estructuras membranosas (Gregore *et al.*, 2012). La fotosíntesis se afecta debido al cierre estomático (Khokon *et al.*, 2011) y a la disminución en la densidad estomática (Hanin *et al.*, 2016), en respuesta al déficit hídrico inducido, con la subsecuente reducción en la toma de dióxido de carbono (CO_2) por la planta, este es uno de los factores por los que ese inhibe el crecimiento y disminuye la biomasa (Vicente *et al.*, 2004). Estos elementos que provocan el desbalance de las

células vegetales y su acción conjunta pudieran también ser los causantes de la disminución del coeficiente de multiplicación y la masa fresca en la caña de azúcar (cv.C-1051-73), resultados que se incluyen en esta investigación.

La masa fresca disminuyó gradualmente a medida que la concentración de NaCl aumentó, esto se considera una respuesta característica de halófitas monocotiledóneas. La reducción en la masa fresca en paralelo con el incremento en la concentración externa de sal en relación al correspondiente control no estresado parece ser un criterio fiable para evaluar la tolerancia relativa a la salinidad en términos de acumulación de biomasa (Boscaiu *et al.*, 2013, Al Hassan *et al.*, 2016b). Por otra parte, Pérez-Nasser (2017) encontraron que el NaCl provocó la disminución en el contenido de proteínas y prolina. El estrés salino tiene efectos muy estudiados, que incluyen la deshidratación celular, la alteración del equilibrio osmótico, inhibición de muchas actividades enzimáticas y procesos celulares esenciales (como el procesamiento de ARN o la síntesis de proteínas) (Vicente *et al.*, 2004). Esta descompensación bioquímica interfiere en la nutrición mineral o generación de especies reactivas del oxígeno que se traduce en estrés oxidativo celular. La masa fresca se asocia al óptimo desarrollo de la planta y pudiera deberse a una retención más eficiente de agua (Gregore *et al.*, 2012). En plantas cultivadas bajo condiciones salinas resulta ineficiente la garantía de la economía del agua, debido a la aparición de una sequía fisiológica por la presencia de sales en el suelo. Las mismas originan potenciales hídricos muy bajos e inferiores a los de la célula y de esta forma se compromete la absorción de agua (Chávez *et al.*, 2015).

Ali y Ali (2014) trataron plantas de cebada a tres niveles de NaCl para evaluar la masa fresca, sus resultados indicaron que este parámetro y la altura de los brotes mostraron una reducción significativa (30 %) en respuesta a los niveles crecientes de dosis de cloruro de sodio. La inhibición inducida por estrés salino en el crecimiento de las plantas podría atribuirse a la toxicidad específica por iones, alteración en la homeostasis de los iones Na⁺ y Cl⁻, cierre de estomas y aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno en los cloroplastos. La disminución en la densidad y tamaño de los estomas, además de su cierre como respuesta de la planta provoca una disminución de la conductancia estomática lo cual compromete la toma de CO₂ (Khokon *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2014). Lo anterior afecta la obtención de materia requerida para la formación de biomasa, a esto se le adicionan los daños a la ultraestructura de la clorofila causado por el estrés oxidativo (Hanin *et al.*, 2016), y la reducción en la producción de fotoasimilatos (Sanjuan *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos para el cultivo de la caña de azúcar expuesta a condiciones de estrés por salinidad y micropropagadas en sistemas de inmersión temporal, indican que la

disminución en la masa fresca en correspondencia con el aumento en las concentraciones de sal podría estar relacionado con los factores discutidos en este acápite. Las plantas dedican su energía para enfrentar las condiciones de estrés, lo que afecta la acumulación de biomasa.

5.2 Determinación del efecto del cloruro de sodio en los niveles de malondialdehído y otros aldehídos, clorofilas a, b; carotenoides, fenoles solubles, ligados a las paredes celulares y excretados al medio de cultivo

Se conoce que la exposición a la salinidad induce o estimula la producción de metabolitos secundarios por las plantas, tales como fenoles, terpenos y alcaloides (Winkel-Shirley, 2002, Haghghi *et al.*, 2012, Selmar y Kleinwächter, 2013). Otros autores como Boscaiu *et al.* (2013) evaluaron el crecimiento de *Juncus acutus* L. y *Juncus maritimus* L. en condiciones controladas en cámara de crecimiento. Usaron varias concentraciones de NaCl (0-200 mM) con el fin de determinar la especie más tolerante. La mayor cantidad de metabolitos se determinaron en las plantas que mostraron mayor tolerancia a la salinidad. Ejemplares de *Catharanthus roseus* L. crecidos bajo condiciones de estrés salino mostraron niveles elevados del alcaloide vincristina (Misra y Gupta, 2006, Fatima *et al.*, 2015). En *Grevillea*, se informó un incremento significativo en la concentración de antocianina, ante la exposición a condiciones de salinidad tanto en *Grevillea ilicifolia* R.Br., tolerante a la salinidad y *Grevillea arenaria* R.Br. sensible a la salinidad (Kennedy y De Filippis, 1999).

Las plantas han desarrollado complejos mecanismos para la adaptación al estrés osmótico, iónico y oxidativo inducidos por estrés salino (Naik y Al-Khayri, 2016), este es asociado con incrementos en las concentraciones de ácido abscísico (Shafi *et al.*, 2011), prolina (Benhassaini *et al.*, 2012), glycina-betaína (Quan *et al.*, 2004), polioles, azúcares, alcoholes y en la concentración de azúcares solubles (Gurmani *et al.*, 2007), así como el contenido de clorofila (Rivelli *et al.*, 2012). El tratamiento salino en *Datura innoxia* Mill. aumentó el contenido de alcaloides totales en hojas jóvenes, y los resultados indicaron que a nivel de órgano, la acumulación del alcaloide tropano se relacionó con el crecimiento de la planta (Brachet y Cosson, 1986). La salinidad también incrementó el contenido de diamina y poliamina en *Oryza sativa* L. (Krishnamurthy y Bhagwat, 1989). Estos incrementos informados en la literatura confirman que la producción de metabolitos es un punto clave para determinar la respuesta fisiológica ante el estrés salino. Durante el presente estudio en caña de azúcar se encontraron variaciones en el contenido de algunos metabolitos, que algunos se corresponden con los informados en la literatura especializada.

El **malondialdehído** es el producto final de la peroxidación lipídica, resultado de la oxidación de los ácidos grasos insaturados (Quiñones *et al.*, 2013), proceso que hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos tras sucesivas reacciones en cadena, ocasionadas por los radicales libres generados ante situaciones de estrés (Ali y Ali, 2014), y por tanto es considerado un excelente marcador de estrés oxidativo. El estrés oxidativo usualmente es asociado al estrés salino a través de la generación de especies reactivas del oxígeno, compuestos tóxicos que oxidan los residuos de aminoácidos en las proteínas, ácidos grasos no saturados en las membranas celulares y las moléculas de ADN y que causa daño celular. En las plantas, tanto el contenido de malondialdehído como de otros aldehídos, están relacionados con procesos de estrés (Wituszynska y Karpinski, 2013). El malondialdehído, se genera por la ruptura de los ácidos grasos poliinsaturados y es un indicador del grado de peroxidación lipídica en las membranas. Es un metabolito primario de respuesta al estrés en las plantas (Dumet y Benson, 2000) y como un marcador del daño oxidativo, el aumento en su concentración indica la inducción exitosa del estrés oxidativo. La peroxidación lipídica, implica la formación y propagación de radicales lipídicos, y la eventual destrucción de las membranas, generando una variedad de productos que incluye cetonas, alcoholes, éteres y aldehídos. Meloni *et al.* (2008), para evaluar la importancia de las enzimas superóxido dismutasa y peroxidasa, y los polifenoles en la tolerancia del vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) a altas concentraciones salinas, determinaron la peroxidación de lípidos a través de la concentración de malondialdehído (MDA), encontraron que su concentración no aumentó en presencia del estrés salino debido a que la planta tiene mecanismos antioxidantes muy eficientes y se evidenció por el aumento de las actividades de dichas enzimas.

En el presente experimento, ocurre lo contrario, los niveles de este compuesto aumentaron significativamente con dosis mayores a 100 mM NaCl, lo que se relaciona con los mecanismos de peroxidación de lípidos de membrana. Esto podría ocurrir por el favorecimiento cinético de las rutas anti estrés para proteínas y ADN. Las especies reactivas del oxígeno producidas durante situaciones estresantes constituyen fuente de afectación directa a la membrana celular, por lo que un incremento en los niveles de MDA a causa de la peroxidación lipídica, resulta un síntoma relativamente inmediato de daño por estrés oxidativo (Pérez *et al.*, 2012). Por otra parte, Halliwell (2006), obtuvieron que el contenido de MDA aumentó, con diferencias significativas con respecto al control correspondiente a partir de 100 mM NaCl, lo que se corresponde exactamente con los resultados obtenidos en esta investigación.

Al Hassan *et al.* (2015), obtuvieron un incremento significativo de malondialdehído en plantas de tomate expuestas a estrés salino, en todos los tratamientos se obtuvo diferencias con relación al control. Rustage *et al.* (2015), desarrolló un experimento en el que se determinó el contenido de Malondialdehído en dos variedades de plátano expuestos a diferentes concentraciones de NaCl y en el que se obtuvo que el contenido de MDA aumentó en las dos aplicaciones para ambas variedades. En la presente investigación el aumento en la concentración de malondialdehído indica que existe un alto nivel de estrés oxidativo en las células vegetales de caña de azúcar, por lo que como respuesta antioxidante hay un incremento de carotenoides y de compuestos fenólicos.

Se ha descrito que los **compuestos fenólicos** están involucrados en la regulación del crecimiento de la planta, diferenciación celular y organogénesis. La concentración de fenoles se afecta frecuentemente por numerosos factores tanto internos como externos (Lorenzo *et al.*, 2001). La tolerancia de las plantas al estrés salino es muy dependiente de la activación de una serie de conservados mecanismos de respuesta, como el control de la homeostasis iónica y la acumulación de osmolitos específicos para asegurar el balance osmótico celular o la activación de sistemas antioxidantes. Esto ocurre para enfrentar el estrés oxidativo, donde los compuestos fenólicos poseen actividades antioxidantes bien descritas basadas en su capacidad para donar átomos de hidrógeno a radicales libres. Ellos pueden detener la oxidación de los lípidos u otras moléculas a través de la inhibición del inicio y transmisión de las reacciones de cambio de oxidación (Quiñones *et al.*, 2013). Son considerados buenos ejemplos de metabolitos antioxidantes no enzimáticos inducidos como respuesta al estrés oxidativo secundario. Al Hassan *et al.* (2016b) describieron un incremento en el contenido de flavonoides con el aumento de la salinidad. La correlación del contenido de flavonoides con la salinidad es muy débil aunque se conoce que la zona de la raíz expuesta a la salinidad incrementa la biosíntesis de flavonoides (Agati *et al.*, 2011). Serpa y Calderón (2005), obtuvieron resultados muy similares también en tomate con una reducción del 50 % en los niveles de carotenoides en todos los tratamientos con respecto al control, mientras que los niveles de fenoles aumentaron. Refieren que esto podría deberse a su mayor actividad como antioxidantes, especialmente los flavonoides. Por otra parte, la deposición en las paredes celulares es un mecanismo importante de defensa ante patógenos que causan daño a nivel de esta estructura elicitando diferentes efectores. Los resultados obtenidos en los niveles de fenoles unidos a las paredes celulares indican una pobre influencia del NaCl en su concentración lo que pudiera deberse a que en este experimento no hubo daño apreciable a nivel de la pared celular.

Al Hassan *et al.* (2016b) informan que el estrés salino indujo una reducción significativa en los niveles de pigmentos fotosintéticos en las hojas. Detectaron una reducción significativa de casi un 40 % en los niveles de **clorofilas** de las plantas tratadas con respecto a los controles. Ellos argumentan que es debido a una disminución en la síntesis de clorofilas además de su degradación por la activación de la enzima clorofilasa y la inactivación de las enzimas propias de la fotosíntesis. En las 3 semanas la clorofila a disminuyó al aumentar la concentración de sal casi la mitad de los niveles del control, bajas concentraciones de sal no presentaron un efecto significativo. La cantidad de clorofila es un indicador del proceso de fotosíntesis. Así, el hecho de que el contenido de clorofila en mg/l disminuya al aumentar la salinidad demuestra que la fotosíntesis es inhibida por incremento de la salinidad del cultivo (Serpa y Calderón, 2005).

La disminución en la fotosíntesis se asocia a bajos niveles de clorofilas totales que pueden ser el resultado del estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en caña de azúcar indican un efecto pobre del NaCl en los niveles de clorofilas lo cual puede indicar que no hubo afectaciones considerables en el metabolismo primario de los explantes en los distintos niveles de tratamiento, resultado también obtenido por Franco-Salazar y Véliz (2008) en plantas de *Opuntia ficus-indica* L. y por Chávez *et al.* (2015) en plantas de frijol en los que no hubo diferencias significativas en el contenido de clorofilas respecto al control. Además en estudios sobre la fotosíntesis en *Thellungiella sp.*, especie modelo de cultivo tolerante a la salinidad, Stepien y Johnson (2009) señalaron que la concentración de clorofila no se vio afectada significativamente. Algunos autores como García *et al.* (1997) aseguran que ante el estrés salino algunas plantas activan el metabolismo y la síntesis de proteínas, para compensar las proteínas desnaturalizadas, mantener la integridad celular y reparar daños. Stepien y Johnson (2009), en *Phaseolus vulgaris* L. la salinidad redujo la síntesis y acumulación de clorofila, relacionándose esto con la inhibición de enzimas específicas responsables de la síntesis de estos pigmentos y de la destrucción de estos y de los cloroplastos (Bautista *et al.*, 2016, Pérez-Nasser, 2017).

Además de la inhibición del crecimiento, los pigmentos fotosintéticos parecen ser marcadores de estrés fiables desde que se ha informado la disminución en el contenido de clorofilas a y b y de carotenoides en todos los tratamientos correlacionada con el grado de salinidad que afecta a las plantas. Sin embargo, en la presente investigación los niveles de **carotenoides** aumentaron con diferencias significativas ante concentraciones superiores a 100 mM de NaCl, lo que puede estar en relación con su acción antioxidante y protectora de la clorofila, debido a que su aumento a partir de esta concentración de sal, se corresponde con el registrado para el malondialdehído. Esto

podiera indicar daño oxidativo y peroxidación lipídica. Los carotenoides se encuentran de manera ubicua en plantas y han sido informados como actores vitales en la mitigación de efectos adversos de la salinidad en el crecimiento y metabolismo vegetal (Rawia *et al.*, 2011). Ejemplo de esta relación directa entre el nivel de salinidad y concentración de carotenoides, son los resultados de Borghesi *et al.* (2011), quienes informaron que el estrés salino puede conducir a incrementos similares o superiores de carotenoides y antocianinas en el fruto de tomate. Esto se compara con los logrados por la ingeniería genética; por tanto, esto representa una opción con potencial de explotación considerable de los suelos salinos para obtener tomates con niveles mayores de metabolitos secundarios. Asimismo, en brotes de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* M.) tratados con 50 y 100 mM de NaCl, la concentración de carotenoides fue dos veces más grande que las plantas control (Lim *et al.*, 2012). Otros autores como Chávez *et al.* (2015) informaron un incremento significativo en los niveles de carotenoides en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) respecto al control, lo que puede sugerir un mecanismo de adaptación a estas condiciones teniendo en cuenta el papel de los carotenoides en la protección de la molécula de clorofila, al poder reaccionar con los estados excitados de la misma y combinado con el oxígeno molecular constituir un complejo que conduce a la fotooxidación.

La concentración del NaCl que mostró mayor significación y la que provocó el 50 % de la multiplicación de los brotes de caña de azúcar, fue de 18.6 mM NaCl. Esta investigación aportará nuevos elementos a tener en cuenta a la hora de realizar estudios de tolerancia a estreses abióticos en cultivares de alta importancia económica y social. Por otra parte, desde hace algo más de una década se han venido realizando estudios con el objetivo de obtener cultivares tolerantes a las condiciones adversas producidas por el cambio climático. Ante todas estas problemáticas este trabajo constituirá una herramienta más a tener en cuenta a la hora de establecer programas de mejoramiento genético de cultivos. Incrementar adaptabilidad y producciones agrícolas es una de las tareas más importantes para el polo científico en el siglo XXI para esto el tener presente los efectos tóxicos del NaCl presentes en el tejido vegetal es de vital importancia para el mantenimiento de una seguridad alimentaria a nivel mundial.

12. CONCLUSIONES

1. El cloruro de sodio disminuyó el coeficiente de multiplicación y la masa fresca de la caña de azúcar con el aumento de la concentración de NaCl.
2. El coeficiente de multiplicación resultó ser el indicador más sensible a la salinidad, varió en todas las concentraciones probadas. La concentración que causó el 50% de la reducción fue 89.48 mM de NaCl.
3. La masa fresca experimentó una reducción significativa para valores superiores a 100 mM de NaCl.
4. Los cambios bioquímicos más significativos ocurrieron en los niveles de malondialdehído y carotenoides, con diferencias significativas a partir de 100 mM de NaCl; y en los compuestos fenólicos excretados al medio de cultivo, a partir de 150 mM de NaCl.

13. RECOMENDACIONES

1. Realizar otros estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares en la multiplicación *in vitro* de la caña de azúcar en biorreactores de inmersión temporal expuesta a condiciones de estrés por salinidad.
2. Aplicar la condición estresante determinada en este trabajo para la selección temprana de la tolerancia de caña de azúcar a la salinidad.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, M., Abdelgawad, Z. y El-Bassiouny, H. (2016) Alleviation of the adverse effects of salinity stress using trehalose in two rice varieties. *South African Journal of Botany*. 103: 275-282.
- Abdelgadir, E. M., Oka, M. y Fujiyama, H. (2005) Characteristics of nitrate uptake by plants under salinity. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 33-46.
- Achilea, O. (2002) Alleviation of salinity-induced stress in cash crops by multi-K (potassium nitrate), five cases typifying the underlying pattern. *Acta Horticulturae* 573: 43-48.
- Agati, G., Biricolti, S., Guidi, L., Ferrini, F., Fini, A. y Tattini, M. (2011) The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in *L. vulgare* leaves. *Journal of plant physiology*. 168: 204-212.
- Ahmad, P. y Sharma, S. (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil and Environment* 54: 89-99.
- Ahmad, P. y Sharma, S. (2010) Physio-biochemical attributes in two cultivars of mulberry (*M. alba*) under salt stress. *International Journal of Plant Production* 4: 79-86.
- Ahmad, P. y Prasad, M. N. V. (2012) *Environmental adaptations and stress tolerance in plants in the era of climate change* New York: Springer Science + Business Media.
- Akter, S., Alam, N. y Roy, P. K. (2016) Improvement of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. var. Isd. 39) using gamma irradiation and large scale plantlet production from M1 generation through *in vitro* culture. *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences*. 5: 1-9.
- Al Hassan, M., López-Gresa, M. P., Boscaiul, M. y Vicente, O. (2015) Effects of Salt and Water Stress on Plant Growth and on Accumulation of Osmolytes and Antioxidant Compounds in Cherry Tomato. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 43: 1-11.
- Al Hassan, M., Chaura, J., López-Gresa, M. P., Borsai, O., Daniso, E., Mayoral, O., Vicente, O. y Boscaiu, M. (2016a) Native-Invasive Plants vs. Halophytes in Mediterranean Salt Marshes: Stress Tolerance Mechanisms in Two Related Species. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1-18.
- Al Hassan, M., López-Gresa, M. P., Boscaiul, M. y Vicente, O. (2016b) Stress tolerance mechanisms in *Juncus*: responses to salinity and drought in three *Juncus* species adapted to different natural environments. *Functional Plant Biology*. 43: 949-960.
- Ali, K. y Ali, S. (2014) Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. Saudi. Arabia: Taif University.
- Alvarenga, S. y Salazar, T. (2015) Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en Biorreactores de Inmersión Temporal 36: 50-57.

- Ángeles, A., Valencia, A., Virgen, G., Ramírez, C., Paredes, L. y Hurtado, S. (2013) Determinación de la Dosis Letal (DL50) con Co⁶⁰ vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36: 381-386.
- Arbona, V., Iglesias, D. J., Jacas, Primo-Millo, E., Talon, M. y Gomez-Cadenas, A. (2005) Hydrogel substrate amendment alleviates drought effects on young citrus plants. *Plant Soil*. 270: 73-82.
- Ashraf, M. y Harris, P. J. C. (1994) *Salinity and Water stress* New York: Springer Science + Business Media, 99-110 pp.
- Basail, M., Medero, V., Otero, E., Torres, M., López, J., Cabrera, M., Santos, A., Rayas, A., Bauta, M. y Beovidez, Y. (2012) Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa spp.*, AAB). *Biotecnología Vegetal*. 1: 53 - 57.
- Bautista, I., Boscaiu, M., Lidoín, A., Llinares, J. V., Lull, C., Donat, M. P., Mayoral, O. y Vicente, O. (2016) Environmentally induced changes in antioxidant phenolic compounds levels in wild plants. *Physiol Plant*. 38: 7-15.
- Benhassaini, H., Fetati, A., Hocine, A. K. y Belkhodja, M. (2012) Effect of salt stress on growth and accumulation of proline and soluble sugars on plantlets of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* used as rootstocks. *Biotechnology Agronomic Social Environment*. 16: 159-165.
- Berding, N. y Koike, M. (1987) Morphological changes in citrus associated with relatively high concentrations of paclobutrazol. *Journal of Plant Growth Regulator*. 5: 193-197.
- Bermúdez, I., Rodríguez, M., Reyes, M., Gómez, R., Chong, B. y Rivero, L. (2016) Mutagénesis *in vitro* en suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. Grande naine (*Musa AAA*). *Biotecnología Vegetal*. 16: 103 - 111.
- Bernal, A., Occeguera, Z., Jiménez, M., Rivera, O., García, L. y de Feria, M. (2002) Use of the Temporary Immersion Systems for sugar cane vitroplants production. *Biotecnología Vegetal*. 2: 201-206.
- Berthouly, M. y Etienne, H. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 215-231.
- Bolte, A., Czajkowski, T., Cocozza, C., Tognetti, R., Miguel, M., Pšidová, E., Ditmarová, L., Dinca, L., Delzon, S., Cochard, H., Ræbild, A., Luis, M., Cvjetkovic, B., Heiri, C. y Müller, J. (2016) Desiccation and mortality dynamics in seedlings of different european beech (*Fagus sylvatica* L.) Populations under extreme drought conditions. *Plant Growth Regulation*. 17: 153-160.

- Borghesi, E., González, M. L., Escudero, M. L., Malorgio, F., Heredia, F. J. y Meléndez, A. J. (2011) Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 59: 11676-11682.
- Boscaiu, M., Lull, C., Llinares, J., Vicente, O. y Boira, H. (2013) Proline as a biochemical marker in relation to the ecology of two halophytic *Juncus* species. *Journal of Plant Ecology*. 6: 177–186.
- Brachet, J. y Cosson, L. (1986) Changes in the total alkaloid content of *Datura innoxia* Mill. subjected to salt stress. *Journal of Experimental Botany* 37: 650-656.
- Buchanan, B., Grisse, W. y Jones, R., J. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *Arab Society for Plant Protection*.
- Buchanan, B. B., Grisse, W. y Jones, R. L. (2015) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*Oxford: Wiley Blackwell.
- Caamal, H. y Bello, J. (2014) *Micropropagación de caña de azúcar (Saccharum spp.)*Estado de México, México: Colegio de Postgraduados, 5-7 pp.
- Carden, D. E., Walker, D. J., Flowers, T. J. y Miller, A. J. (2003) Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiology* 131: 676-683.
- Carlone, E., Tommasino, E., Colomba, E. L., Ribott, A., Quiroga, M., Griffa, S. y Grunberg, K. (2017) *In vitro* selection and characterization of buffelgrass somaclones with different responses to water stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1-13.
- Chávez, L., Álvarez, A., Ramírez, R., Infante, S., Licea, L., García, B., García, A. y Fonseca, M. (2015) Efecto de la salinidad sobre el contenido relativo de agua y la concentración de pigmentos en tres genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agrícola*. 42: 19-24.
- Cheavegatti-Gianotto, A., de Abreu, H. M. C., Arruda, P., Creste, S., di Ciero, L. y Aparecido, J. (2011) Sugarcane (*Saccharum x officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. *Tropical Plant Biology*. 4: 62-89.
- Chen, T. H. H. y Murata, N. (2011) Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant Cell and Environment* 34: 1-20.
- Chiang, J. C., González, V. M., Reyes, Y. y Miño, J. E. (2018) Influencia de las variedades de caña sobre la eficiencia industrial en la fábrica "14 de Julio" de Cienfuegos. *Revista Centro Azúcar*. 45: 42-43.
- Cuellar, I. A., de León, M. E., Gómez, A., Piñón, D., Villegas, R. y Santana, I. (2003) *Caña de Azúcar, paradigma de sostenibilidad*La Haban, Cuba: INICA.
- Cuin, T. A., Betts, S. A., Chalmandrier, R. y Shabala, S. (2008) A root's ability to retain K⁺ correlates with salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* 59: 2697-2706.

- Daniels, J. y Roach, B. (1987) Taxonomy and evolution. En: Heinz, D. J. (ed.). *Sugarcane Improvement through breeding*. pp. 7-84: Elsevier.
- Debergh, P. (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Plant Physiology*. 59: 270-276.
- Demirkiran, A., Marakli, S., Temel, A. y Gozukirmizi, N. (2013) Genetic and epigenetic effects of salinity on in vitro growth of barley. In: *Departament of Molecular Biology and Genetics*. Istanbul, Turkey: Istanbul University.
- Dumet, D. y Benson, E. E. (2000) The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. En: Engelmann, F. y Takagi, H. (eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. pp. 43-56. Tsukuba, Rome: JIRCAS/IPGRI.
- Epp, M. (1987) Somaclonal variation in bananas: a case study with *Fusarium wilt*. En: Persley, G. y DeLange, E. (eds.). *Banana and Plantain Breeding Strategies*. pp. 187: ACIAR.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., Fundora, Z., Borroto, G., Espinoza, D., Arias, E. y Aspiolea, M. (1998) New systems for *in vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Pineapple News*. 5: 5-7.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., Borroto, C., González, J. L. y Desjardines, Y. (1999) Pineapple micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*. 18: 743-748.
- FAOSTAT (2017a) *Top 20 Country, Export quantity of Azúcar, refinada 2013*. [En línea] Disponible desde: http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity_exports. [Consultado: 6. May 2018].
- FAOSTAT (2017b) *Top 20 Countries Production of Azúcar, caña 2016*. [En línea] Disponible desde: http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity. [Consultado: 6. May 2018].
- Farzami-Sepehr, M. y Ghorbanli, M. (2002) Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinones in callus cultures of *Rheum ribes*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 68: 171-175.
- Fatima, S., Mujib, A. y Tonk, D. (2015) NaCl amendment improves vinblastine and vincristine synthesis in *Catharanthus roseus*: a case of stress signalling as evidenced by antioxidant enzymes activities. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 121: 445-458.
- Feldmann, P., Sapotille, J., Grédoire, P. y Roff, P. (1994a) Micropropagation of sugarcane. En: Teisson, C. (ed.). *In vitro culture of tropical plants*. pp. 15-17: CIRAd.
- Feldmann, P., Sapotille, J., Grédoire, P. y Rott, P. (1994b) Micropropagation of sugarcane. En: Teisson, C. (ed.). *In Vitro Culture of Tropical Plants*. pp. 15-17. France: CIRAD.

- Franco-Salazar, V. y Véliz, J. (2008) Efectos de la salinidad sobre el crecimiento, acidez titulable y concentración de clorofila en *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. *Saber*. 20: 12-17.
- Freire, M. (2001) Nueva metodología de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido* var. C 87-51) empleando medios de cultivo líquidos. In: *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. Instituto de Biotecnología de las Plantas: Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.
- Fuentes, L., Pérez, Y., Domínguez, A., Mesa, A. R. y González, S. (2008) Influencia del NaCl en indicadores bioquímicos evaluados en callos de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184. *Pastos y Forrajes*. 31: 35-46.
- Gabriel, J., Veramendi, S., Angulo, A. y Magne, J. (2013) Respuesta de variedades mejoradas de papa (*Solanum tuberosum* L.) al estrés hídrico por sequía. *Journal of the Selva Andina Biosphere*. 1: 25-36.
- García-Sánchez, F., Porras, I. y Martínez, V. (2003) Effects of salinity and rate of irrigation on yield, fruit quality and mineral composition of 'Fino 49' lemon. *European Journal of Agronomy* 19: 427-437.
- García-Sánchez, F., Botia, P., Cámara, J. M., Cerdá, A. y Martínez, V. (2005) Uptake, transport and concentration of chloride and sodium in three citrus rootstock seedling's. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 1933-1945.
- García-Sánchez, F., Rubio, F. y Martínez, V. (2010) *Abiotic Stresses: Salinity and Drought* USA: Studium Press.
- García, A. J., Engler, S., Lyer, T. y Gerats, M. (1997) Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiology*. 115: 159-169.
- Gawel, N. y Robacker, C. (1990) Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semi-solid versus liquid proliferation media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 23: 201-204.
- Glaszmann, J. C. y D'Hont, A. (1999) Análisis molecular de la biodiversidad del germoplasma en caña de azúcar. En: Arencibia, A. y Cornide, M. T. (eds.). *Biodiversidad y Biotecnología de la Caña de Azúcar*. pp. 25-44: Cuba: Elfos Scientiae.
- González, L. M., González, M. C. y Ramírez, R. (2002) Aspectos generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. *Cultivos Tropicales*. 23: 27-37.
- Grassl, C. (1997) The origin of the sugarcane producing cultivar of *Saccharum*. *Sugar Breeding News*. 8: 8-33.
- Greenway, H. y Munns, R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*. 31: 149-190.

- Gregore, M., Villanueva, M., Boscaiu, M. y Vicente, O. (2012) Do Halophytes Really Require Salts for Their Growth and Development? An Experimental Approach. *Notulae Scientia Biologicae*. 4: 23-29.
- Grigore, M., Boscaiu, M. y Vicente, O. (2011) Assessment of the relevance of osmolyte biosynthesis for salt tolerance of halophytes under natural conditions. *European Journal of Plant Science and Biotechnology*. 5: 12-19.
- Gurmani, A. R., Bano, A. y Saleem, M. (2007) Effect of ABA and BA on growth and ion accumulation of wheat under salinity stress. *Pakistan Journal of Botany*. 39: 141-149.
- Gurr, S., McPherson, J. y Bowles, D. (1992) Lignin and associated phenolic acids in cell walls. En: Wilkinson, D. L. (ed.). *Molecular Plant Pathology*. pp. 51-56. Oxford: Oxford Press.
- Haghighi, Z., Modarresi, M. y Mollayi, S. (2012) Enhancement of compatible solute and secondary metabolites production in *Plantago ovata* Forsk. by salinity stress. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: 3495-3500.
- Hairuddin, R., Yamin, M. y Hama, S. (2017) Application methods for conventional and modern development of onion (*Allium cepa* L.) in abiotic stresses. En: Junaid, R. (ed.). *Proceeding International Conference on Natural and Social Science*. Palopo Cokroaminoto University, Makassar.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 141: 312-322.
- Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L. y Masmoudi, K. (2016) New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1787.
- Harris, R. y Mason, E. (1983) Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. *Canadian Journal of Plant Science*. 63: 311-316.
- Heath, R. y Packer, J. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125: 189-198.
- Herman, E. B. (1995) Regeneration and micropropagation: techniques, systems and media En: Herman, E. B. (ed.). *Recent Advances in Plant Tissue Culture*. pp. 29.
- Hernández, R., González, Y., Bernal, F., Igarza, Y., Sarria, Z., Pichardo, T. y Martínez, Y. (1997) *Nuevo método para el saneamiento a bacterias y virus en caña de azúcar (Saccharum sp. híbrido)*. BIOVEG'97 Ciego de Ávila, Cuba: BIOVEG'97, 20 pp.
- Hirt, H. y Shinozaki, K. (2004) *Plant Response to Abiotic Stress*. New York: Springer.

- Hoagland, R. E. (1990) *Alternaria cassiae* alters phenylpropanoid metabolism in Sicklepod (*Casia obtusifolia*). *Phytopathology*. 130: 177-187.
- Huang, X. Y., Chao, D. Y., Gao, J. P., Zhu, M. Z., Shi, M. y Lin, H. X. (2009) A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes & Development*. 23: 1805-1817.
- Humberto, J., Velázquez, C. y Jabín, J. (2014) *Manual de Micropropagación de caña de azúcar (Saccharum spp.)*. 1. Montecillo, Texcoco, Estado de México: D.R. © Colegio de Postgraduados.
- Igarza, J., De feria, M., Alvarado, Y., Pugh, T., Pérez, M., San Roman, M. y Agramonte, D. (2014) Caracterización morfo-agronómica de plantas de papa cv. "Andinita" a partir de la siembra en campo de microtubérculos obtenidos en Sistemas de Inmersión Temporal. *Bioteología Vegetal*. 14: 81-89.
- Jackson, M. B. (2003) Aeration stress in plant tissue cultures. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 96-109.
- Jiménez, E. (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido). In: *Instituto de Biotecnología de las Plantas*. Instituto de Biotecnología de las Plantas: Universidad Central de Las Villas, pp. 95.
- Jiménez, E., Pérez, J., Gil, V., Herrera, J., García, Y. y Alonso, E. (1995) Sistema para la propagación de la caña de azúcar. *Elfos Scientiae*. 11.
- Jiménez, E. (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez, J. P. (ed.). *Propagación y mejora genética de las plantas por biotecnología*. pp. 45-56. Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Jiménez, E. y de Feria, M. (1998) Empleo de biorreactores para la Propagación Masiva. En: Pérez, J. (ed.). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Universidad Central de las Villas. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Jiménez, E., Pérez, N., De Feria, M., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M., Quiala, E. y Pérez, J. C. (1999) Improved production of potato microtubers using temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59: 19-23.
- Jimenez, J. (2013) Obtención de clones de alcornoque (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática: aplicación de medios líquidos y biorreactores en la sincronización de los procesos de desarrollo y maduración de los embriones In: *ETSI Agrónomos*. Universidad Politécnica de Madrid (UPM), pp. 183.

- Kangarasu, S., Ganeshram, S. y Joel, J. (2014) Determination of Lethal Dose For Gamma Rays and Ethyl Methane Sulphonate Induced Mutagenesis In Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz.).
- Kennedy, B. y De Filippis, L. (1999) Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *Journal of Plant Physiology*. 155: 746-754.
- Khan, M. A., Shirazi, M. U., Ali, M., Mumtaz, S., Sherin, A. y Ashraf, M. Y. (2006) Comparative performance of some wheat genotypes growing under saline water. *Pakistan Journal of Botany* 38: 1633-1639.
- Khokon, M. A. R., Okuma, E., Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M. y Nakamura, Y. (2011) Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*. 34: 434-443.
- Knight, H., Trewavas, A. J. y Knight, M. R. (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant Journal* 12: 1067-1078.
- Koyro, H. W., Ahmad, P. y Geissler, N. (2012) Abiotic stress responses in plants: an overview. En: Ahmad, P. y Prasad, M. N. V. (eds.). *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change*. pp. 1-28. New York: Springer Science + Business Media.
- Krishnamurthy, R. y Bhagwat, K. (1989) Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. *Plant Physiology*. 91: 500-504.
- Lal, N. y Singh, H. (1993) Evaluation of gelling and support materials for *in vitro* shoot multiplication in sugarcane. *Sugarcane*. 2: 2-3.
- Lambers, H., Chapin III, F. S. y Pons, T. L. (2008) *Plant Physiological Ecology* Berlin: Springer.
- Lee, T. (1986) Micropropagation of sugarcane (*Saccharum spp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 10: 47-55.
- Leidi, E. O. y Pardo, J. M. (2002) Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 2: 69-90.
- Lemke Keyes, C. y Sachs, M. (1989) Genetic variation for seedling tolerance to anaerobic stress in maize germplasm [in USA]. *Maydica (Italy)*. 34: 329-337.
- Levin, R., Gava, V., Tal, B., De Nola, B. y Vasil, I. K. (1988) Automated plant tissue cultura for mass propagation. *Biotechnology*. 6: 1035-1040.
- Levin, R. y Tanny, G. (2004) Bioreactors as a low cost option for tissue culture. *Low cost options for tissue culture technology in developing countries*. pp. 106. Vienna, Austria: FAO/IAEA.

- Levy, Y. y Syvertsen, J. P. (2004) Irrigation water quality and salinity effects in citrus trees. *Horticulture Review* 30: 37-82.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol.* 148: 350-382.
- Lim, J. H., Park, K. J., Kim, B. K., Jeong, J. W. y Kim, H. J. (2012) Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. *Food Chemistry.* 135: 1065-1070.
- Liu, J. y Zhu, J. K. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280: 1943-1945.
- Liu, M. C. (1981) *In vitro* methods applied to sugarcane improvement. En: Thorpe, T. (ed.). *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture.* pp. 299-323. USA: Academic Press.
- López-Gómez, M. y Lluich, C. (2012) Trehalose and Abiotic Stress Tolerance. En: Ahmad, P. *et al.* (eds.). *Abiotic Stress Responses in Plants.* pp. 253-265. New York: Springer.
- Lorenzo, J. C., González, B., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P. y Borroto, C. (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 54: 197-200.
- Lorenzo, J. C., González, B. L., Escalona, M., Teisson, C., Castillo, R., Espinosa, P., Sánchez, M., Espinosa, D., Puentes, C., Fundora, Z., Iglesias, A., Borroto, C., Espiolea, M. E., Hernández, Z. y Capote, I. (1999) Proliferación de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Cuaderno de Fitopatología.* 26: 76-79.
- Lorenzo, J. C., Blanco, M. A., Peláez, O., González, A., Cid, M., Iglesias, A., González, B., Escalona, M., Espinosa, P. y Borroto, C. (2001) Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 65: 1-8.
- Lorenzo, J. C., Varela, M., Hernández, M., Gutiérrez, A., Pérez, A. y Loyola, O. (2013) Integrated criteria to identify the best treatment in plant biotechnology experiments. *Acta Physiologiae Plantarum.*
- Lorenzo, J. C., Yabor, L., Medina, N., Quintana, N. y Wells, V. (2015) Coefficient of variation can identify the most important effects of experimental treatments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca.* 43.
- Lorke, D. (1983) A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology.* 54: 275-287.

- Lowe, K. C., Power, J. B. y Davey, M. R. (2003) Novel approaches for regulating gas supply to plant systems *in vitro*: Application and benefits of artificial gas carries. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 39: 557-566.
- Lüttge, U., Kluge, M. y Bauer, G. (1993) *Botánica* España: McGraw-Hill Interamericana, 523 pp.
- Maathuis, F. J. M. y Amtmann, A. (1999) K⁺ Nutrition and Na⁺ Toxicity: The Basis Of Cellular K⁺/Na⁺ Ratios. *Annal of Botany* 84: 123-133.
- Martínez, G., González, L., Cariño-Cortés, R. y Bernardino-Nicanor, A. (2016) Caracterización de las Proteínas del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). In: *Departamento de Ingeniería Bioquímica*. Celaya, México: Instituto Tecnológico de Celaya.
- Más, R., Pérez, H., García, I., Pineda, E., Aday, O., Manresa, M. y Díaz, F. R. (2007) *Tecnología para la Producción de Caña de Azúcar Orgánica (Instructivo Técnico)*: Premio CITMA.
- Mathews, H. y Rangan, T. (1979) Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant *in vitro* culture of pineapple. *Scientia Horticulturae*. 11: 319-328.
- Meker, O. (1977) *In vitro* propagation of some Tillandsioideae (*Bromeliaceae*). *Acta Horticulturae*. 78: 311-319.
- Meloni, D. A., Gulotta, M. R. y Oliva, M. A. (2008) El estrés salino incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de polifenoles en Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.). *Revista de Ciencias Forestales*. 15: 27-31.
- Mesa, D. (2003) Obtención de plantas resistentes a la salinidad para los suelos salinos cubanos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 37.
- Mishchenko, N. P., Fedoreev, S. A., Bryukhanov, V. M., Zverev, Y. F., Lampatov, V. V., Azarova, O. V., Shkryl, Y. N. y Chernoded, G. K. (2007) Chemical composition and pharmacological activity of anthraquinones from *Rubia cordifolia* cell culture. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 41: 605-609.
- Misra, N. y Gupta, A. K. (2006) Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. *Journal of plant physiology*. 163: 11-18.
- Montes, J. L. (2010) Incremento de la eficiencia en la propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp. híbrido*) en sistemas de inmersión temporal. In: *Instituto de Biotecnología de las Plantas*. Santa Clara, Cuba: Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, pp. 57.
- Mori, K. (1971) Production of virus-free plants by means of meristem culture. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 6: 1-17.
- Munns, R. y Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 651-681.

- Munns, R. (2009) Strategies for crop improvement in saline soils. En: Ashraf, M. y Harris, P. J. C. (eds.). *Salinity and Water stress*. pp. 99-110. New York: Springer Science + Business Media.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*. 5: 473-497.
- Naik, P. M. y Al-Khayri, J. M. (2016) Abiotic and biotic elicitors. Role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. En: Shanker, A. K. y Shanker, C. (eds.). *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. pp. 247-277. <http://dx.doi.org/210.5772/61442>. Al-Hassa: InTech.
- Neumann, K. H., Kumar, A. y Iman, J. (2009) *Plant Cell and Tissue Culture. A Tool in Biotechnology. Basics and Application* Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P. y Pardo, J. P. (1995) Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology* 109: 735-742.
- Okamura, K. (1991) Development of an improved method for alfalfa somatic embryogenesis. *Bulletin of National Institute of Livestock and Grassland Science*. 45: 53.
- Orellana-Pérez, P. y Peña-González, P. (2003) Caracterización *in vitro* de la respuesta al NaCl en callos en las fases de multiplicación y regeneración de varios genotipos de arroz. *Bioteología vegetal*. 3: 13-18.
- Pares, J. y Basso, C. (2013) Efecto del cloruro de sodio sobre el crecimiento y estado nutricional de plantas de papaya. *Bioagro*. 26: 109-116.
- Parida, A. y Das, A. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotox. Environ. Saf*. 60: 324-349.
- Peleg, Z., Apse, M. y Blumwald, E. (2011) Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: getting closer to the field. *Advances in Botanical Research*. 57: 405-443.
- Peres, J., Henrique, F. y Everson, J. (2008) Micropropagation and estimates of banana plantlets production for Western Amazon. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43: 429-443.
- Pérez-Nasser, S. (2017) Efecto del CaCl₂ sobre el contenido de proteínas, prolina, acidez titulable, clorofila y contenido relativo de agua de *Aloe vera* expuesta a salinidad por NaCl. *Biota Colombiana*. 18: 382-390.
- Pérez, G., China, A. y Cabrera, L. (1997a) Recursos genéticos de la caña de azúcar: composición e importancia para la obtención de variedades. *Libro de Resúmenes de Medio Siglo de Investigaciones Cañeras en Cuba*.

- Pérez, G., Prada, F. y Abrahantes, I. (1997b) Origen, posición taxonómica y desarrollo del mejoramiento de la caña de azúcar en Cuba. En: Pérez, G. *et al.* (eds.). *Recursos genéticos de la caña de azúcar*. pp. 23-24.
- Pérez, G., Yanez, E., Mboghli, A., Valle, B., Sagarra, F., Aragón, C., González-Olmedo, J., Isidró, M. y Lorenzo, J. C. (2012) New Pineapple somaclonal variants: P3R5 and Dwarf American. *Journal of Plant Science*. 3: 1-11.
- Pérez, J. y Rodríguez, C. (1989) *Producción de Semillas y Propágulos* Cuba: Editorial Pueblo y Educación.
- Pérez, J., Gómez, R., Orellana, P., Gil, V., Jiménez, E., García, L., Herrera, I., Alfonso, E. y García, I. (1995) Obtención de somaclones de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) por métodos biotecnológicos. En: Estrada, M. *et al.* (eds.). *Avances en Biotecnología Moderna*. pp. 11-12. Cuba: Elfos Scientiae.
- Peros, J. y Bonnel, E. (1990) Utilisations de la culture in vitro de la canne a sucre en pathologie: cas de la striure, de la gommose et de la rouville. *Journal of Plant Diseases and Plant Protection*. 28: 44-54.
- Petolino, J., Cowen, N., Thompson, S. y Mitchell, J. (1992) Gamete selection for heat stress tolerance in maize. *Angiosperm pollen and ovules*. pp. 355-358: Springer-Verlag.
- Porra, R. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynth Res*. 73: 149-156.
- Preil, W. (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En: Hvoslef, A. K. y Preil, W. (eds.). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* pp. 1-18. Dordrecht: Springer.
- Quan, R., Shang, M., Zhang, H., Zhao, Y. y Zhang, J. (2004) Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize. *Plant Biotechnology Journal*. 2: 477-486.
- Quiñones, J., Trujillo, R., Capdesuñer, Y., Quirós, Y. y Hernández, M. (2013) Potencial de actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Theobroma cacao* L. (cacao). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 18: 201-215.
- Ramachandra, R. y Ravishankar, G. A. (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Advances in Botanical Research*. 20: 101-153.
- Ramanjulu, S. y Sudhakar, C. (2001) Alleviation of NaCl salinity stress by calcium is partly related to the increased proline accumulation in mulberry (*Morus alba* L.) callus. *Journal of Plant Biology* 28: 203-206.

- Rangel, E., Hernández, E. y Hernández, M. (2016) Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México39: 225 - 231.
- Rawia, A. E., Lobna, S., Taha, S. y Ibrahiem, M. (2011) Alleviation of adverse effects of salinity on growth, and chemical constituents of marigold plants by using glutathione and ascorbate. *Journal of Applied Sciences Research*. 7: 714-721.
- Rivelli, A., De Maria, S., Pizza, S. y Gherbina, P. (2012) Growth and physiological response of hydroponically grown sunflower as affected by salinity and magnesium levels. *Journal of Plant Nutrition*. 33: 1307-1323.
- Robacker, C. y Simonton, W. (1992) Development of a computer-controlled apparatus for micropropagation studies. *Acta Horticulturae*. 319: 585-590.
- Ruiz, D., Martínez, V. y Cerdá, A. (1997) Citrus response to salinity: Growth and nutrient uptake. *Tree Physiology* 17: 141-150.
- Rustage, A., Jain, S., Kumar, D., Shekhar, S., Jain, M., Bhat, V. y Bhalla, N. (2015) High efficiency transformation of Banana (*Musa acuminata* L. cv. Matti (AA)) for enhanced tolerance to salt and drought stress through overexpression of a peanut salinity-induced pathogenesis-related class 10 protein. *Molecular Biotechnology*. 57: 27-35.
- Salazar, E., Trujillo, I., Castro, I., Vallejo, E. y Torrealba, M. (2014) Ionizing radiation for mutation induction in *Musa AAA* for drought tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 64: 185-200
- Sanjuan, F., Ramírez, P., Sánchez, P., Sandoval, M., Livera, M., Carrillo, J. C. y Perales, C. (2015) Tolerancia de líneas nativas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a la salinidad con NaCl. *Interciencia*. 40: 704-709.
- Santana, I., Chinea, A. y Pérez, G. (1997) Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Jovellanos: medio siglo de investigaciones cañeras. *Cuba y Caña*. 2: 9-17.
- Santos, A. (2008) Multiplicación en Sistema de Inmersión Temporal del clon de malanga 'Viequera' (*Xanthosoma* spp.). In: *FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS*: Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.
- Selmar, D. y Kleinwächter, M. (2013) Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 42: 558- 566.
- Serpa, R. F. y Calderón, A. (2005) Efecto del estrés por salinidad en cuatro cepas de *Dunaliella salina* Teod. en el Perú. *Ecología Aplicada*. 4: 128-133.
- Shabala, S. (2009) Salinity and programmed cell death: unravelling mechanisms for ion specific signalling. *Journal of Experimental Botany*. 60: 709-712.

- Shafi, M., Bakht, J., Khan, M., Khan, M. y Raziuddin, M. (2011) Role of abscisic acid and proline in salinity tolerance of wheat genotypes. *Pakistan Journal of Botany*. 43: 1111-1118.
- Silva, E. N., Vieira, S. S., Ribeiro, R. V., Ponte, L. F. A., Ferreira-Silva, S. L. y Silveira, J. A. G. (2012) Contrasting physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat. *Journal of Plant Growth Regulation* 32: 159-169.
- Simón, I. (2012) Estudio de la tolerancia a la salinidad, toxicidad por boro e inundación en plantas de *Jatropha curcas* L. Universidad Miguel Hernandez de Elche, pp. 143.
- Skidmore, D., Simon, A. y Bidis, A. (1988) *In vitro* culture of shoots of *Pinus caribaea* on a liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 14: 129-136.
- Stepien, P. y Johnson, G. (2009) Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: Role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron Sink. *Plant Physiology*. 149: 1154-1165.
- Sun, J., Chen, R., Dai, S., Wang, R., Li, N. y Shen, X. (2009) NaCl-induced alternations of cellular and tissue ion fluxes in roots of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Physiology*. 149: 1141-1153.
- Szabados, L. y Saviouré, A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*. 15: 89–97.
- Tabatabaei, S. J. y Fakhrzad, F. (2008) Foliar and soil application of potassium nitrate affects the tolerance of salinity and canopy growth of perennial ryegrass (*Lolium perenne* var. Boulevard). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3: 544-550.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006) *Plant Physiology*. 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Torriente, D. (2010) Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*. 31: 19-26.
- Tzortzakis, N. G. (2010) Potassium and calcium enrichment alleviate salinity-induced stress in hydroponically grown endives. *Horticultural Science* 378: 155-162.
- Valdés, B. L., Aday, O., B, O., Rojas, L., Hernández, M., Acosta-Suárez, M., Gil, V., Rivero, L., González, A. y Oloriz, M. I. (2016) Caracterización de la respuesta de cultivares de caña de azúcar a la roya naranja en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal*. 16: 21-29.
- Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M. A., Estrelles, E., Bellés, J. M. y Soriano, P. (2004) Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of Arid Environments*. 58: 463-481.

- Viegas, R. A., Silveira, J. A., J.E, Q. y M.J.M, F. (2001) Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in Young cashew plants. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 5: 216-222.
- Vilchez, J., Albany, N., Martínez, L., Molina, M., Pirela, C., Molina, M., Alvarez, C. y Chirinos, J. (2011) Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento ex vitro de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Colombian Biotechnology*. 18: 94-102.
- Viñas, M. y Jiménez, V. M. (2011) Factores que influyen en la embriogénesis somática *in vitro* de palmas (Arecaceae). *Colombian Biotech*. 13: 229-242.
- Von Arnold, S. (2008) Somatic embryogenesis. En: George, E. F. *et al.* (eds.). *Plant propagation by tissue culture*. pp. 335-354. The Netherlands: Springer.
- Winkel-Shirley, B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 218-223.
- Wituszynska, W. y Karpinski, S. (2013) Programmed celldeath as a response to high light, UV and drought stress in plants. En: Vahdati, K. y Leslie, C. (eds.). *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. pp. 207-246. Rijeka: InTech Publisher.
- Woo, P. y Park, M. (1993) Design of a mist bioreactor for *Dianthus caryophyllus* micropropagation. *Biotechnology Techniques*. 7: 697.
- Wu, G. Q. y Wang, S. M. (2012) Calcium regulates K⁺ /Na⁺ homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.) under saline conditions. *Plant Soil and Environment* 58: 121-127.
- Yang, X., Ma, X., Yang, L., Yu, D., Qian, Y. y Ni, H. (2009) Efficacy of *Rheum officinale* liquid formulation on cucumber powdery mildew. *Crop Protection*. 28: 1031-1035.
- Zhang, K. W., N, G., L.J, L., Wang, J., Lv, S. y Zhang, J. R. (2011) Improved salt tolerance and seed cotton yield in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by transformation with betA gene for glycinebetaine synthesis. *Euphytica*. 181: 1-16.
- Zhang, L., Ma, H., Chen, T., Pen, J., Yu, S. y Zhao, X. (2014) Morphological and physiological responses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants to salinity. *PLOS ONE*.
- Zhu, J. K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. 2: 66-71.
- Zhu, J. K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 441-445.
- Ziv, M. y Ariel, T. (1991) Bud proliferation and plant regeneration in liquid-cultured philodendron treated with ancymidol and paclobutrazol. *Journal of Plant Growth Regulation*. 10: 53-57.
- Zuñiga, A. I. (2012) Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) variedad CP 73-1547. Zamorano, Honduras.