

Efecto de la salinidad en callos de variedades de trigo durante el cultivo *in vitro**

Effect of salinity on calli of wheat varieties during *in vitro* culture

Leandris Argentel Martínez^{1§}, Idalmis Fonseca Reyna¹, Jaime Garatuza Payán², Enrico Yépez González² y Jorge González Aguilera³

¹Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo, km 17 ½. Peralejo, Bayamo, Cuba. CP. 85100. (oleinismora@gmail.com, idalmisfr@gmail.com). ²Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de febrero 818 sur, Col. Centro, Cd. Obregón, Sonora, México. CP. 85000. (garatuza@itson.edu.mx, yepezglz@gmail.com). ³Embrapa Trigo. Rodovia BR 285, km 294. 99001-970 Passo Fundo - RS, Brasil. CP. 45. (j51173@yahoo.com). [§]Autor para correspondencia: oleinismora@gmail.com.

Resumen

Se estudió el efecto de la salinidad en el grado de tolerancia al estrés y la efectividad de la radioinducción de mutaciones en callos de tres variedades de trigo harinero durante el cultivo *in vitro*. El estudio se desarrolló en el centro de Ingeniería Genética Biotecnología (CIGB) de la Habana, Cuba en el período comprendido entre noviembre de 2015 a febrero de 2016 en un programa de mejora genética para tolerancia a estrés salino en fase de cultivo *in vitro*. Se evaluaron las variables permeabilidad de las membranas celulares, actividad peroxidasa, concentración de proteínas solubles y síntesis de ácido abscísico a las 24 h, 30 días y 70 días de exposición de los callos a los tratamientos, los cuales consistieron en conductividades eléctricas (CE) de 0.02, 5, 7, 9 dS m⁻¹ en el medio de cultivo. Se observó a las 24 h, un incremento de la PMC como efecto estimulante inicial de la salinidad, valores que disminuyeron conforme se incrementó la CE y el tiempo de exposición al estrés. La actividad peroxidasa se incrementó hasta los 7 dS m⁻¹ en las tres variedades pero la tendencia fue a mantenerse o disminuir cuando se incrementó CE.

Abstract

The effect of salinity on the stress tolerance degree and the radioinduction effectiveness of callus mutations of three common wheat varieties during *in vitro* culture was studied. The research was developed at the Center for Genetic Engineering Biotechnology (CIGB) of Havana, Cuba in the period from November 2015 to February 2016 in a genetic improvement program for tolerance to salt stress in *in vitro* culture phase. The variables cell permeability, peroxidase activity, soluble protein concentration and abscisic acid synthesis were evaluated at 24 h, 30 days and 70 days of callus exposure to treatments, which consisted of electrical conductivities (EC) of 0.02, 5, 7, 9 dS m⁻¹ in the culture medium. An increase in PMC was observed at 24 h as the initial salinity stimulating effect, values that decreased as the EC and the time of exposure to stress increased. Peroxidase activity increased to 7 dS m⁻¹ in all three varieties but the trend was to be maintained or decreased when CE increased. Similar response showed total soluble proteins. The concentration of ABA increased by more than 25 units in the varieties and the hypothesis of its synthesis was ruled

* Recibido: enero de 2017
Aceptado: marzo de 2017

Respuesta similar mostraron las proteínas solubles totales. La concentración de ABA aumentó en más de 25 unidades en las variedades quedando descartada la hipótesis de su síntesis a partir de pigmentos fotosintéticos y protectores. La evaluación realizada demostró el efecto positivo de la radioinducción en la tolerancia del trigo al estrés salino.

Palabras clave: *Triticum aestivum* L., ABA, callos, salinidad, trigo.

Introducción

Entre las condiciones adversas de los sistemas agrícolas del mundo la salinidad de los suelos se ha convertido en el factor abiótico de mayor impacto en la productividad de las plantas (Setter *et al.*, 2016). Actualmente más de 74% de los suelos dedicados a la agricultura a nivel mundial presenta problemas de salinidad (Zaki y Yokoi, 2016) y en muchos de los casos la conductividad eléctrica del suelo supera el índice de tolerancia de importantes especies económicas (Zhao *et al.*, 2016) como el trigo (*Triticum aestivum* L.) que constituye la base de la alimentación de más de 96.4% de la población mundial (Argentel *et al.*, 2016).

La evaluación del efecto del estrés salino en especies económicas como el trigo es de vital importancia para conocer y comprender los posibles mecanismos que éstas desarrollan en su adaptación a este factor abiótico. Sin embargo para la evaluación final y recomendación de variedades tolerantes la tarea primordial es la identificación de los principales caracteres asociados a dicha tolerancia (Argentel *et al.*, 2013), los que una vez identificados y evaluados simplifican y aceleran el trabajo experimental en programas de mejora genética para el carácter tolerancia al estrés salino (Lamz *et al.*, 2013).

Numerosos métodos se emplean para simular la tolerancia a la salinidad en condiciones *in vitro* una vez identificada la variabilidad genética del germoplasma disponible. En ocasiones, se han añadido al medio de cultivo soluciones de ciertas sustancias como manitol, polietilenglicol (González y Argentel, 2005) y cloruro de sodio para evaluar la respuesta a la salinidad (Munss *et al.*, 2016). Precisamente mediante el cultivo *in vitro* de los tejidos vegetales es factible fisiológicamente determinar la respuesta de importantes variables que determinan la

out from photosynthetic and protective pigments. The evaluation showed the positive effect of radioinduction on wheat tolerance to saline stress.

Keywords: *Triticum aestivum* L., ABA, callus, salinity, wheat.

Introduction

Among the adverse conditions of the world's agricultural systems, soil salinity has become the abiotic factor with the greatest impact on plant productivity (Setter *et al.*, 2016). At present, more than 74% of agricultural soils worldwide present salinity problems (Zaki and Yokoi, 2016) and in many cases the electrical conductivity of the soil exceeds the tolerance index of important economic species (Zhao *et al.*, 2016) and wheat (*Triticum aestivum* L.), which is the feeding basis of more than 96.4% of the world population (Argentel *et al.*, 2016).

The evaluation of the effect of saline stress on economic species such as wheat is of vital importance in order to know and understand the possible mechanisms that these develop in its adaptation to this abiotic factor. However, for the final evaluation and recommendation of tolerant varieties, the main task is to identify the main characters associated to this tolerance (Argentel *et al.*, 2013), which, once identified and evaluated, simplify and accelerate experimental work in genetic improvement for the tolerance character to saline stress (Lamz *et al.*, 2013).

Numerous methods are used to simulate salinity tolerance under *in vitro* conditions once the genetic variability of available germplasm has been identified. Occasionally, solutions of certain substances such as mannitol, polyethylene glycol (González and Argentel, 2005) and sodium chloride have been added to the culture medium to evaluate the response to salinity (Munss *et al.*, 2016). It is precisely through the *in vitro* culture of plant tissues that it is physically possible to determine the response of important variables that determine the tolerance to stress as the selectivity of membranes (García *et al.*, 2003), the synthesis and concentration of hormones such as abscisic acid (ABA), which regulates the induction of structural genes encoding enzymes and proteins involved in such tolerance (Kadri *et al.*, 2014).

tolerancia al estrés como la selectividad de membranas (García *et al.*, 2003), la síntesis y concentración de hormonas como el ácido abscísico (ABA), que regula la inducción de genes estructurales que codifican enzimas y proteínas involucradas en dicha tolerancia (Kadri *et al.*, 2014).

Por ello su determinación y evaluación durante el cultivo de tejidos tiene importante significado práctico (Zaidi *et al.*, 2016). Fue objetivo de la presente investigación evaluar el efecto de diferentes concentraciones salinas y tiempos de exposición al estrés en la permeabilidad de las membranas celulares, actividad de la enzima peroxidasa, concentración de proteínas solubles y síntesis de ácido abscísico, en tres variedades de trigo harinero: un progenitor y dos radiomutantes durante el cultivo de callos para su posible recomendación en el proceso de mejora genética mediante la técnica de inducción de mutaciones para la tolerancia al estrés salino.

Materiales y métodos

Desarrollo del experimento y variedades empleadas

Los experimentos se desarrollaron en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Habana, Cuba. Se utilizaron tres variedades de trigo harinero. La variedad Cuba-C-204 (progenitor), primera variedad de trigo obtenida en Cuba a partir de la variedad de trigo brasileña BH-11 (Gutiérrez *et al.*, 2005) y dos variedades radiomutante INIFAT RM 26; INIFAT RM 29 obtenidos a partir de Cuba-C-204 (Argente *et al.*, 2012).

Etapa de formación de callos

Para la formación de callos se partió de semillas maduras previamente desinfectadas (Labrada, 1999). De cada variedad estudiada, se utilizaron 80 semillas y se cultivaron en medio de cultivo a base de sales MS. Se adicionaron los reguladores del crecimiento 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D; 2 mg L⁻¹) y 6 Bencilaminopurina (BAP; 2 mg L⁻¹) y las concentraciones de NaCl que representan conductividades eléctricas (CE) de 0.002 dS m⁻¹ (tratamiento control); 5 dS m⁻¹, 7 dS m⁻¹ y 9 dS m⁻¹. El medio de cultivo se ajustó a pH 5.8, se solidificó con agar Gelrite (2 g L⁻¹) y se esterilizó en autoclave a 120 °C y 1.5 atmósferas de presión durante 20 min.

Therefore, its determination and evaluation during tissue culture has important practical significance (Zaidi *et al.*, 2016). It was the objective of this paper to evaluate the effect of different saline concentrations and stress exposure times on cell membrane permeability, peroxidase enzyme activity, soluble protein concentration and abscisic acid synthesis in three common wheat varieties: a progenitor and two radiomutants during callus culture for possible recommendation in the process of genetic improvement through the technique of induction of mutations for tolerance to saline stress.

Materials and methods

Development of the experiment and varieties used

The experiments were carried out at the Plant Biotechnology Center of the Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba. Three varieties of common wheat were used. The variety Cuba-C-204 (progenitor), the first variety of wheat obtained in Cuba from the Brazilian wheat variety BH-11 (Gutiérrez *et al.*, 2005) and two radiomutant varieties INIFAT RM 26; INIFAT RM 29 obtained from Cuba-C-204 (Argente *et al.*, 2012).

Callus formation stage

Callus formation was based on mature seeds previously disinfected (Labrada, 1999). Of each variety studied, 80 seeds were used and grown in MS-based culture medium. Growth regulators 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D; 2 mg L⁻¹) and 6-benzylaminopurine (BAP; 2 mg L⁻¹) and NaCl concentrations representing electrical conductivities (EC) of 0.002 dS m⁻¹ (control treatment); 5 dS m⁻¹, 7 dS m⁻¹ and 9 dS m⁻¹. The culture medium was adjusted to pH 5.8, it was solidified with Gelrite agar (2 g L⁻¹) and autoclaved at 120 °C and 1.5 atmospheres of pressure for 20 min.

Seeding and disinfection of seeds were performed under asepsis conditions in a laminar flow chamber. Two seeds were seeded per test tube (15.5 cm * 2.3 cm), and eight tubes were used per treatment. The seed tubes were placed in a growth chamber under dark conditions and a temperature of 25±2 °C. Three replicates were established for each experimental variant. For each variety in the electrical conductivities, evaluations were performed at 24 h of stress exposure, at 30 days and 70 days in order to evaluate the variability degree of responses as a function of time. The evaluated variables were as follows.

La siembra y la desinfección de las semillas se efectuaron en condiciones de asepsia en una cámara de flujo laminar. Se sembraron dos semillas por tubo de ensayo (15.5 cm * 2.3 cm), y se emplearon ocho tubos por cada tratamiento. Los tubos con las semillas se colocaron en una cámara de crecimiento en condiciones de oscuridad y una temperatura de 25±2 °C. Se establecieron tres repeticiones por cada variante experimental. Para cada variedad en las conductividades eléctricas se realizaron evaluaciones a las 24 h de exposición al estrés, a los 30 días y 70 días para evaluar el grado de variabilidad de respuestas en función del tiempo. Las variables evaluadas fueron las siguientes.

Permeabilidad de las membranas celulares (PMC)

La PMC se cuantificó en los callos obtenidos a las 24 horas, 30 días y 70 días de exposición al estrés. Se pesaron 0.05 g de callo de cada tratamiento en seis repeticiones y se lavaron cuatro veces con agua desionizada. Luego, los callos se colocaron en 5 mL de agua desionizada durante 20 h a 18 °C en la oscuridad. Después se evaluó la salida de electrolitos de las muestras sometidas a diferentes tratamientos de estrés, por la conductividad eléctrica de la solución al cabo de las 24 h. Se empleó un conductímetro (DD-IIA, China). La PMC se estimó con respecto al control siguiendo la metodología propuesta por Blum (1981).

Actividad peroxidasa

Se homogenizaron en un mortero, 0.25 g de tejido vegetal con 5 mL de tampón tris-HCl pH 7.4. El homogenato se centrifugó a 20 000 g durante 15 min. El sobrenadante se usó para determinar la actividad peroxidasa y se definió como unidad de actividad enzimática (UAE), un cambio de 0.01 en la absorbancia (420 nm) en 1 min por gramo masa fresca. La determinación, propiamente dicha, de la actividad peroxidasa se realizó según el método continuo descrito por Martínez (2013).

Contenido de proteínas solubles totales

El contenido de proteínas solubles totales se determinó por el método fotométrico. Una muestra de 1 g de material fresco se depositó en un mortero y se maceró. La extracción se realizó con 40 mL de una solución buffer de fosfato a pH 6.86 preparado a partir de fosfato de potasio, solución que se adicionó lentamente mientras se efectuaba la extracción. El extracto se decantó en tubos de centrifugación de 50 mL

Permeability of cell membranes (PMC)

PMC was quantified in the callus obtained at 24 hours, 30 days and 70 days of stress exposure. 0.05 g of callus was weighed from each treatment in six replicates and washed four times with deionized water. The calluses were then placed in 5 mL of deionized water for 20 h at 18 °C in the dark. The electrolyte output of the samples subjected to different stress treatments was evaluated by the electrical conductivity of the solution after 24 h. A conductivity meter (DD-IIA, China) was used. PMC was estimated with respect to control following the methodology proposed by Blum (1981).

Peroxidase activity

0.25 g of plant tissue were homogenized in a mortar with 5 mL of tris-HCl buffer pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 20 000 g for 15 min. The supernatant was used to determine the peroxidase activity and was defined as unit of enzyme activity (UAE), a change of 0.01 at absorbance (420 nm) in 1 min per gram of fresh mass. The determination, properly speaking, of the peroxidase activity was performed according to the continuous method described by Martínez (2013).

Total soluble protein content

The total soluble protein content was determined by the photometric method. A sample of 1 g of fresh material was deposited in a mortar and macerated. The extraction was performed with 40 mL of a phosphate buffer solution at pH 6.86 prepared from potassium phosphate, a solution which was added slowly while the extraction was being carried out. The extract was decanted in 50 mL centrifuge tubes and centrifuged at 10 000 revolutions per minute for 7 min. Finally the separated supernatant solution was transferred to 50 mL volumetric flasks. Total soluble protein content was quantified by absorption photometry on a Hewlett Packard 8452 spectrophotometer, at a wavelength of 750 nm (Galvani and Gaertner, 2006).

Abscisic acid content

A mass of 5 g of calli of the varieties was taken at each concentration and time of incubation to the stress and these were macerated to make the determination (liquid-liquid extraction) of ABA. The quantification of the phytohormone was performed by an ABA calibration curve and its final concentration was expressed in $\mu\text{m g mf}^{-1}$ using a mass spectrometer (Bautista and Gallardo, 2008).

y se centrifugó a 10 000 revoluciones por minuto, durante un tiempo de 7 min. Finalmente la solución sobrenadante separada se trasvasó a matraces volumétricos de 50 mL. El contenido de proteína solubles totales fue cuantificado mediante fotometría de absorción en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452, a una longitud de onda de 750 nm (Galvani y Gaertner, 2006).

Contenido de ácido abscísico

Se tomó una masa de 5 g de callos de las variedades en cada concentración y tiempo de incubación al estrés y éstos se maceraron para realizar la determinación (extracción líquido-líquido) de ABA. La cuantificación de la fitohormona se realizó mediante una curva de calibración de ABA y su concentración final se expresó en $\mu\text{m g mf}^{-1}$ usando un espectrómetro de masas (Bautista y Gallardo, 2008).

Análisis estadísticos

Los datos fueron procesados a través de análisis de varianza de clasificación simple basado en modelos lineales de efectos fijos (Fischer, 1935) sin interacción entre los factores conductividad/variedad/ tiempo de exposición al estrés salino. De manera independiente se evaluó la respuesta de cada variable entre conductividades eléctricas, medias que fueron comparadas por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Tukey, 1960) para niveles de significación de 5% y 1%. Las comparaciones entre los tiempos de exposición al estrés salino de 30 y 70 días se realizaron intravarietalmente en cada nivel de conductividad eléctrica mediante la distribución teórica de probabilidades de t-student (Gosset, 1917) para niveles de significación de 5% y el 1%. Se utilizó para todos los análisis el paquete estadístico profesional Estadística, versión 8.0 para Windows.

Resultados y discusión

Permeabilidad de las membranas celulares

La permeabilidad de las membranas celulares (PMC), no se afectó significativamente, aunque la tendencia fue a ascender, cuando los callos de las tres variedades fueron incubados por 24 h en las soluciones salinas (Figura 1).

Statistical analysis

The data were processed through analysis of variance of simple classification based on linear models of fixed effects (Fischer, 1935) without interaction between the factors conductivity/variety/time of exposure to saline stress. Independently the response of each variable was evaluated between electrical conductivities, means that were compared by Tukey's multiple comparisons test (Tukey, 1960) for significance levels of 5% and 1%. The comparisons between exposure times to 30 and 70 days saline stress were performed intravarietally at each level of electrical conductivity using the theoretical distribution of probabilities of t-student (Gosset, 1917) for significance levels of 5% and 1%. The Statistical Professional Statistical Package, version 8.0 for Windows was used for all analyzes.

Results and discussion

Permeability of cell membranes

The permeability of cell membranes (PMC) was not significantly affected, although the tendency was to increase when the calli of the three varieties were incubated for 24 h in the saline solutions (Figure 1).

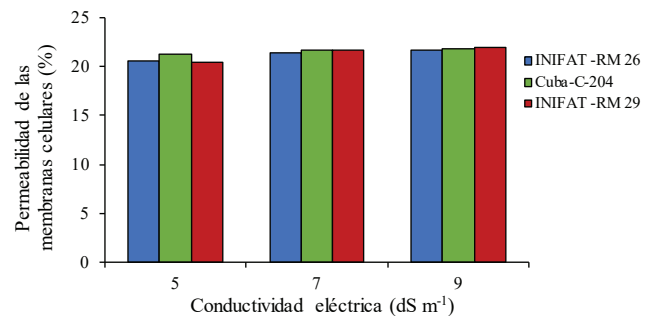


Figura 1. Permeabilidad de la membrana celular (PMC) en callos de tres variedades de trigo harinero formados en medio salino por 24 h. $R^2= 0.822; 0.824; 0.831$ para Cuba-C-204, INIFAT RM 26, INIFAT RM 29 respectivamente. $ESx=0.001$ ns NS=no significativo.

Figure 1. Permeability of the cell membrane (PMC) in calluses of three varieties of common wheat formed in saline medium for 24 h. $R^2= 0.822; 0.824; 0.831$ for Cuba-C-204, INIFAT RM 26, INIFAT RM 29 respectively. $ESx=0.001$ ns NS= not significant.

Varios estudios tratan de explicar que condiciones de estrés salino se produce una estimulación de la actividad enzimática y la permeabilidad de membranas, tal fue el resultado aquí obtenido, aspecto al que se le conoce como efecto estimulante de la salinidad o euestrés (Bakry *et al.*, 2012).

Los cambios en la permeabilidad de las membranas celulares (PMC) generalmente varían en dependencia del tiempo de exposición de los tejidos al estrés y del grado de tolerancia de las variedades y tiene variación entre los tipos de estrés hídrico y salino (Chávez *et al.*, 2012). En el estudio se observó que a medida que se incrementó la conductividad eléctrica del medio de cultivo la permeabilidad de las membranas celulares disminuyó significativamente a partir de 30 días de exposición al estrés, quizás para evitar efectos adversos como la toxicidad iónica. La mayor disminución de PMC se obtuvo en los radiomutantes (Cuadro 1). La variedad progenitor presentó diferencias marcadas en respuesta al estrés salino impuesto y en el tiempo de exposición al estrés y los mayores valores de PMC a los 30 días, que denota que conforme incrementó el período de exposición al estrés disminuyó la PMC aunque en menor medida que los mutantes. Esta respuesta tiene un significado práctico porque ofrece la medida en que las membranas se hacen menos permeables a iones como el sodio y el cloro que pudieran propiciar toxicidad.

Several studies try to explain that initially under conditions of saline stress there is a stimulation of the enzymatic activity and the permeability of membranes, such was the result obtained here, an aspect that is known as salinity stimulating effect or euestrés (Bakry *et al.*, 2012).

Changes in cell membrane permeability (PMC) generally vary depending on the exposure time of tissues to stress and degree of tolerance of the varieties and has variation between the types of water and saline stress (Chávez *et al.* 2012). In this paper it was observed that as the electrical conductivity of the culture medium increased, the permeability of cell membranes decreased significantly after 30 days of exposure to stress, perhaps to avoid adverse effects such as ionic toxicity. The largest decrease in PMC was obtained in radiomutants (Table 1). The progenitor variety showed the most marked differences in the response to imposed saline stress and in the times of stress exposure and the highest PMC values at 30 days, which indicates that as the stress exposure period increased, PMC decreased, although to a lesser extent than the mutants. This response has important practical significance because it offers the extent to which membranes become less permeable to ions such as sodium and chlorine that could lead to toxicity.

Cuadro 1. Permeabilidad de las membranas celulares en callos de tres variedades de trigo sometidas a diferentes conductividades eléctricas a 30 y 70 días de exposición al medio salino.

Table 1. Permeability of cell membranes in callus of three wheat varieties subjected to different electrical conductivities at 30 and 70 days of saline exposure.

Variable	CE (dS m ⁻¹)	Estrés por 30 días			Estrés por 70 días		
		INIFAT RM-26	Cuba-C-204	INIFAT RM-29	INIFAT RM-26	Cuba-C-204	INIFAT RM-29
PMC (%)	5	33.1 c	36.7 c**	34.1 c*	32.1 b	33.2 c	32.2 b
	7	30.4 b*	34.1 b**	32.2 b	32.3 b	29.4 b	31.1 b
	9	25.1 a*	28.3 a**	26.3 a**	20.2 a	23.2 a	20.8 a
	Es(x)	0.02	0.033	0.03	0.002	0.013	0.002

Medias con letras iguales no difieren según la prueba de comparación múltiple de Tukey HSD. ** y * = diferencias para el 5% y 1% respectivamente por t-student; Es(x) = error estándar de la media.

Otro resultado importante en los radiomutantes fue que aún en 9 dS m⁻¹ los valores de PMC fueron similares a cuando el estrés se impuso durante las 24 h. Quizás este elemento sea debido al efecto de la radioinducción donde se muestra superdominancia de caracteres deseados como la tolerancia al estrés salino. En tal sentido se ha reportado que la inducción de mutaciones ha sido propuesta como una técnica biotecnológica efectiva para

Another important result in the radiomutants was that even in 9 dS m⁻¹ the PMC values were similar to when the stress was imposed during the 24 h. Perhaps this element is due to the effect of the radioinduction where it shows superdominance of desired characters as the tolerance to the saline stress. In this sense it has been reported that mutation induction has been proposed as an effective biotechnological technique

tales fines en otras especies vegetales (Oladosu *et al.*, 2016). La evaluación de la PMC en tejidos foliares ha resultado un indicador eficiente para detectar variaciones en los niveles de tolerancia a los estrés salino e hídrico en diferentes genotipos de cereales (Munss *et al.*, 2012).

Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa experimentó diferencias significativas respecto al control en los dos tiempos de evaluación en las tres variedades y la tendencia inicial fue al incremento, excepto para la variedad progenitor (Cuba-C-204) en la cual a los 9 dS m⁻¹ tuvo el mismo valor de actividad enzimática que en control. La variedad INIFAT RM-26, mostró una respuesta similar en las diferentes concentraciones salinas y en el tiempo de exposición al estrés y sus valores fueron los más altos entre las tres variedades aunque a 9 dS m⁻¹ el valor del indicador no mostró diferencias significativas al compararlo con lo obtenido para CE de 5 dS m⁻¹. En la variedad progenitor la actividad peroxidasa no superó las 100 UAE min⁻¹ a los 30 días de exposición mientras que a los 70 días se incrementó a más del doble de lo obtenido a 30 días. En sentido general la actividad peroxidasa fue superior en las variedades radiomutantes que en el progenitor (Cuadro 2). El incremento de la actividad peroxidasa en el presente estudio demuestra la capacidad protectora de la enzima para evitar el daño oxidativo causado directa o indirectamente por la salinidad.

for such purposes in other plant species (Oladosu *et al.*, 2016). The evaluation of PMC in foliar tissues has been an efficient indicator to detect variations in the tolerance levels to saline and water stress in different cereal genotypes (Munss *et al.*, 2012).

Peroxidase activity

The peroxidase activity experienced significant differences with respect to the control at the two evaluation times in the three varieties and the initial tendency was to increase, except for the progenitor variety (Cuba-C-204) in which at 9 dS m⁻¹ the same value of enzymatic activity as the control. The INIFAT RM-26 variety showed a similar response in the different saline concentrations and in the time of exposure to stress and their values were the highest among the three varieties, although at 9 dS m⁻¹ the value of the indicator did not show significant differences. When compared to that obtained for EC of 5 dS m⁻¹. In the parent variety the peroxidase activity did not exceed 100 UAE min⁻¹ at 30 days of exposure while at 70 days it increased to more than twice that at 30 days. In general, the peroxidase activity was higher in the radiomutant varieties than in the progenitor (Table 2). The increase in peroxidase activity in this paper demonstrates the protective ability of the enzyme to prevent oxidative damage caused directly or indirectly by salinity.

Cuadro 2. Actividad de la enzima peroxidasa, en callos de tres variedades de trigo sometidas a diferentes conductividades eléctricas a 30 y 70 días de exposición al medio salino.

Table 2. Activity of the peroxidase enzyme, in calluses of three wheat varieties subjected to different electrical conductivities at 30 and 70 days of exposure to saline medium.

Variable	CE (dS m ⁻¹)	Estrés por 30 días			Estrés por 70 días		
		INIFAT RM-26	Cuba-c-204	INIFAT RM-29	INIFAT RM-26	Cuba-c-204	INIFAT RM-29
Actividad peroxidasa (UAE min ⁻¹)	Control	92.5 b	92.4 a	93.2 d	93.5 c	92.4 d	93.3 d
	5	354.2 a	86.7 b**	284.7 a*	353.8 b	174.5 c	297.5 a
	7	353.9 a**	86.1 b**	164.9 b**	356.7 a	179.3 b	288.4 b
	9	354.3 a	92.9 a**	147.2 c**	353.9 b	199.3 a	275.4 c
	Es(x)	0.71	0.002	1.37	1.43	0.011	1.21
	R ²	0.911	0.894	0.974	0.982**	0.976*	0.981**

Medias con letras iguales en una misma columna no difieren según la prueba de comparación múltiple de Tukey HSD. ** y * = representan los tiempos de estrés, diferencias para el 5% y 1% respectivamente por t-student; Es(x) = error estándar de la media; R² = coeficiente de determinación sin ajustar.

Al analizar los valores del coeficiente de determinación para cada variedad en los dos tiempos de exposición al estrés evaluados se pudo observar que por efecto de la CE se explicó más de 89% de la variabilidad encontrada.

When analyzing the values of the determination coefficient for each variety in the two times of exposure to stress evaluated, it was observed that by EC effect explained more than 89% of the variability found.

Se tienen evidencias de que en maíz expuesto al estrés hídrico y salino la actividad peroxidasa se incrementa significativamente originando la formación de radicales superóxido (O_2^-) (Ahmad *et al.*, 2016). El radical superóxido y su producto reductor peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son compuestos potencialmente tóxicos que al combinarse forman un radical conocido como radical hidroxilo (OH) y se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhang *et al.*, 2016). Los genotipos tolerantes a estrés como la sequía y la salinidad presentan un sistema activo eficiente para evitar el daño oxidativo en función de la actividad peroxidasa (Young *et al.*, 2012), quizás tal proceso se puso de manifiesto en el presente ensayo.

Concentración de proteínas solubles

La concentración de proteínas solubles totales fue similar en el tratamiento control en las tres variedades; sin embargo, se observó un incremento significativo cuando se elevó la concentración salina en las dos variedades radiomutantes pero su incremento fue solo hasta la CE de 5 dS m^{-1} cuando fue evaluada a los 30 días mientras que el progenitor incrementó el valor del indicador hasta los 9 dS m^{-1} . El incremento obtenido fue de al menos $0.92 \text{ mg g mf}^{-1}$ de proteínas cuando el período de incubación de los callos fue de 70 días, aspecto que denota las transformaciones bioquímicas significativas para tolerar la condición de estrés. Las mayores concentraciones de proteínas solubles se obtuvieron en el mutante INIFAT RM-26 aunque se observó que en la primera evaluación (a los 30 días de exposición al estrés) a partir de $CE=7 \text{ dS m}^{-1}$ el valor del indicador evaluado disminuyó (Cuadro 3).

There is evidence that in maize exposed to water and saline stress the peroxidase activity increases significantly causing the formation of superoxide radicals (O_2^-) (Ahmad *et al.*, 2016). The superoxide radical and its reducing agent hydrogen peroxide (H_2O_2) are potentially toxic compounds that when combined form a radical known as hydroxyl radical (OH) and are known as reactive oxygen species (ROS) (Zhang *et al.*, 2016). Stress-tolerant genotypes such as drought and salinity present an efficient active system to prevent oxidative damage as a function of peroxidase activity (Young *et al.*, 2012), perhaps this process was evidenced in this paper.

Concentration of soluble proteins

The concentration of total soluble proteins was similar in the control treatment in the three varieties; however, a significant increase was observed when saline concentration was increased in the two radiomutant varieties but its increase was only up to the EC of 5 dS m^{-1} when it was evaluated at 30 days while the parent increased the value of the indicator until 9 dS m^{-1} . The increase obtained was at least $0.92 \text{ mg g mf}^{-1}$ of proteins when the incubation period of callus was of 70 days, aspect that denotes the biochemical transformations significant to tolerate the condition of stress. The highest concentrations of soluble proteins were obtained in the INIFAT RM-26 mutant, although the value of the evaluated indicator decreased (at 30 days of stress exposure) from $CE=7 \text{ dS m}^{-1}$ (Table 3).

Cuadro 3. Concentración de proteínas solubles, en callos de tres variedades de trigo sometidas a diferentes conductividades eléctricas a los 30 y 70 días de exposición al medio salino.

Table 3. Activity of the peroxidase enzyme, in calluses of three wheat varieties subjected to different electrical conductivities at 30 and 70 days of exposure to saline medium.

Variable	CE (dS m^{-1})	Estrés por 30 días			Estrés por 70 días		
		INIFAT RM-26	Cuba-c-204	INIFAT RM-29	INIFAT RM-26	Cuba-c-204	INIFAT RM-29
Concentración de proteínas solubles ($\mu\text{g g mf}^{-1}$)	Control	5.55 c	3.44	3.58 c	5.56 c	3.41	3.65 c
	5	7.43 b*	3.5	5.48 a	6.41 c	3.34	5.48 a
	7	8.94 a**	3.77	4.59 b	7.66 b	3.39	4.58 b
	9	8.12 a	3.91	3.73 c	9.92 a	3.32	4.33 b
	Es(x)	0.03	0.001	0.032	0.022	0.0001	0.003

Medias con letras iguales no difieren según la prueba de comparación múltiple de Tukey HSD. ** y * = representan diferencias para el 5% y 1% respectivamente por t-student; Es(x) = error estándar de la media.

Una forma de mantener la estabilidad e integridad de las membranas celulares es a través del incremento en síntesis de proteínas estructurales. Este incremento se asocia con la síntesis de nuevas proteínas en condiciones de estrés (Valifard *et al.*, 2012). Esto demuestra que las variedades estudiadas sintetizan nuevas proteínas como respuesta al estrés impuesto.

En condiciones de salinidad, en muchas especies de cereales, produce un incremento del contenido de proteínas solubles totales pero estos valores van descendiendo debido a la actividad de las proteasas para emplear aminoácidos para el recambio proteico, como fuente de energía, carbonada o nitrogenada (Mollasadeghi *et al.*, 2011), además de emplear los aminoácidos para el incremento de la concentración de compuestos osmóticamente activos, entre otros prolina y glicina, glicina-betaina, y así asegurar la disminución del potencial osmótico y en consecuencia el potencial hídrico celular (Argentel *et al.*, 2013).

Contenido de ácido abscísico (ABA)

La concentración de ABA se incrementó significativamente en los callos de las variedades en condiciones de salinidad del medio de incubación. Además se observaron diferencias entre sus concentraciones en los dos tiempos de incubación evaluados, siendo la mayor concentración a 70 días de estrés. Se encontraron incrementos de la concentración de ABA en más de 25 unidades en las conductividades eléctricas establecidas. La concentración de ABA fue similar para cada una de las tres variedades estudiadas cuando el tiempo de exposición a la salinidad fue de 70 días a las conductividades eléctricas de 7 dS m⁻¹ y 9 dS m⁻¹ (Figura 2).

One way to maintain the stability and integrity of cell membranes is through the increase in structural protein synthesis. This increase could be associated with the synthesis of new proteins under stress conditions (Valifard *et al.*, 2012). Such an assertion demonstrates that the varieties studied synthesize new proteins in response to the imposed stress.

In salinity conditions, in many species of cereals, there is an increase in the content of total soluble proteins, but these values are decreasing due to the activity of the proteases to use the amino acids for protein exchange, as energy source, as a carbon or nitrogen source (Mollasadeghi *et al.*, 2011), as well as using amino acids in the first step to increase the concentration of osmotically active compounds, among others, proline and glycine, glycine-betaine, and thus to ensure a decrease in the osmotic potential and consequently the cellular water potential (Argentel *et al.*, 2013).

Abscisic acid content (ABA)

The concentration of ABA was significantly increased in calli of all varieties under salinity conditions of the incubation medium. In addition, differences between their concentrations were observed in the two incubation times evaluated, being the highest concentration at 70 days of stress. Increases in ABA concentration were found in more than 25 units in established electrical conductivities. The ABA concentration was similar for each of the three varieties studied when the exposure time to the salinity was 70 days to the electrical conductivities of 7 dS m⁻¹ and 9 dS m⁻¹ (Figure 2).

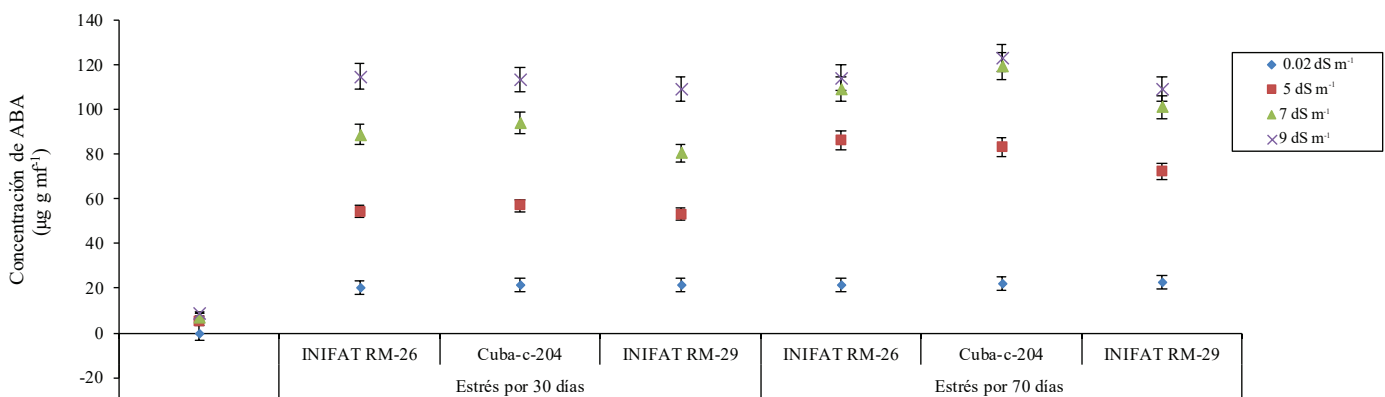


Figura 2. Concentración de ABA en callos de tres variedades de trigo sometidas a diferentes conductividades eléctricas a los 30 y 70 días de exposición al medio salino.

Figure 2. Concentration of ABA in callus of three wheat varieties subjected to different electrical conductivities at 30 and 70 days of saline exposure.

En la mayoría de las plantas superiores la biosíntesis del ABA se realiza, por vía indirecta, o sea, por degradación de algunos carotenoides (C40) presentes en cloroplastos (Wang *et al.*, 2016); sin embargo, los resultados aquí mostrados demuestran que su síntesis ocurrió plenamente en callos, no en células vasculares ni a partir de carotenoides, quizás sí a partir de precursores no pigmentados quedando demostrada la capacidad de sintetizar ABA por cualquier célula vegetal en condiciones de estrés salino.

Entre los efectos que produce el ABA en las plantas además de la regulación y apertura estomática (Fujita *et al.*, 2011), latencia en yemas (Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2013) y semillas (Kadri *et al.*, 2014), ocurre la inhibición de las síntesis de RNA y algunas proteínas (Alhasnawi *et al.*, 2016). Por ello sería interesante probar si a partir de callos con altas concentraciones endógenas de ABA, como en el presente estudio, se afecta la capacidad de regeneración de plantas.

Los resultados de las variables bioquímicas evaluadas en el presente estudio muestran el efecto de la inducción de mutaciones para crear variabilidad de respuesta y superdominancia a partir de variedades consideradas como tolerantes en la producción agrícola en condiciones de estrés como el salino (Jimenez *et al.*, 2016). Actualmente los programas de mejora genética se enmarcan en la creación, identificación y caracterización de dicha variabilidad mediante técnicas rápidas y precisas como la inducción de mutaciones, dado que la mejora por cruzamiento para condiciones de estrés abióticos en general es un proceso largo (Oyiga *et al.*, 2016) y en ocasiones cuando se obtiene una variedad promisoriosa ya las condiciones edáficas han cambiado y la nueva variedad no expresa su potencial genético productivo (Al-Mashhadani *et al.*, 2016).

El estudio realizado constituyó una vía factible y eficiente para determinar el efecto del estrés salino en estos tejidos y al mismo tiempo definir la variabilidad de respuesta de los mutantes respecto a su progenitor, los cuales mostraron mayor tolerancia. La caracterización de estos radiomutantes permitirá su recomendación como futuros parentales para la mejora genética ya que su permeabilidad disminuyó incluso cuando las concentraciones salinas fueron altas, al mismo tiempo demostraron desarrollar mecanismos para mitigar el estrés salino mediante la síntesis de compuestos osmóticamente activos para asegurar un buen estado hídrico e impedir la sequía fisiológica que se presenta en condiciones de estrés salino.

In most of the higher plants, the ABA biosynthesis is indirectly carried out by degradation of some carotenoids (C40) present in chloroplasts (Wang *et al.*, 2016); however, the results shown here demonstrate that its synthesis occurred fully in callus, not in vascular cells or from carotenoids, perhaps from non-pigmented precursors, showing the ability to synthesize ABA by any plant cell under saline stress conditions.

Among the effects of ABA on plants in addition to stomatal regulation and opening (Fujita *et al.*, 2011), bud dormancy (Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013) and seeds (Kadri *et al.*, 2014) the inhibition of RNA synthesis and some proteins is shown (Alhasnawi *et al.*, 2016). Therefore, it would be interesting to test if from the callus with high concentrations of endogenous ABA, as in this paper, the capacity of regeneration of plants is affected.

The results of the evaluated biochemical variables in this paper show the effect of the induction of mutations to create response variability and superdominance from varieties considered as tolerant in agricultural production under conditions of stress such as saline (Jimenez *et al.*, 2016). Genetic improvement programs are currently involved in the creation, identification and characterization of such variability by rapid and precise techniques such as mutation induction, since breeding for abiotic stress conditions in general is a long process (Oyiga *et al.*, 2016), and sometimes when a promising variety is obtained the edaphic conditions have changed and the new variety does not express its productive genetic potential (Al-Mashhadani *et al.*, 2016).

The research was a feasible and efficient way to determine the effect of saline stress on these tissues and at the same time to define the variability of the response of mutants regarding to their parent, which showed greater tolerance. The characterization of these radiomutants will allow their recommendation as future parents for the genetic improvement since their permeability decreased even when the saline concentrations were high, at the same time they demonstrated to develop mechanisms to mitigate the saline stress through the synthesis of osmotically active compounds to ensure a good water status and prevent the physiological drought that occurs under conditions of saline stress.

Conclusiones

La salinidad propició variaciones significativas en las variables evaluadas, siendo la permeabilidad de las membranas celulares y la concentración de ácido abscísico las más afectadas. Tales características demuestran tolerancia, y pueden ser utilizadas en el mejoramiento genético por la capacidad de evitar la toxicidad iónica mediante el incremento de su selectividad.

Los callos de los radiomutantes evaluados presentaron mejor respuesta al estrés salino impuesto en el medio de cultivo y los resultados más favorables se obtuvieron hasta la conductividad eléctrica de 7dS m^{-1} en ambos tiempos de exposición, demostrando la tolerancia a éste tipo de estrés a corto y mediano plazo de exposición hasta éste nivel de CE y el efecto positivo de la inducción de mutaciones para mitigar los efectos adversos del estrés salino.

Literatura citada

- Argentel, L. 2013. Efectos de la salinidad en las variables hídricas potenciales hídrico y osmótico y ajuste osmótico en cultivares cubanos de trigo (*Triticum aestivum* L. y *T. durum* L.). Cultivos Tropicales. 34(4):43-48.
- Argentel, L. 2012. Tolerancia del trigo a la salinidad. Caso de estudio de variedades cubanas, Número 12479 e ISBN 978-3-659-02109-1. 2012. EAE.
- Bakry, A. B.; Abdelraouf, M. A.; Ahmed, M. F. 2012. Effect of drought stress and ascorbic acid foliar application on productivity and irrigation water use efficiency of wheat under newly reclaimed sandy soil. J. Appl. Sci. Res. 8(8):4552-4558.
- Bautista, L. X. C., y Gallardo, I. R. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (AIA, ABA y GB) en cultivos microbianos. Pontificia Universidad Javeriana.
- Blum, A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. Crop Science. 21(1):43-47.
- Borges, M.; Estrada, E.; Pérez, I. y Meneses, S. (2012). El cultivo *in vitro* del ñame. Rev. Colomb. Biotecnol. 11(2):127-135.
- Broertjes, C. E. 2012. Application of mutation breeding methods in the improvement of vegetatively propagated crops. Vol. 2. Elsevier.
- Chávez, L.; Fonseca, A. y Ramírez, R. 2012. Apuntes sobre algunos reguladores del crecimiento vegetal que participan en la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico. Cultivos Tropicales. 33(3):47-56.
- Fisher, R. A. 1935. The design of experiments. Oliver & Boyd. Londres.
- Fujita, Y.; Fujita, M.; Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. J. Plant Res. 124:509-525. DOI 10.1007/s10265-011-0412-3
- Galvani, F. & Gaertner, E. 2006. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína solúvel total e bruta. XI MET, 34.

Conclusions

The salinity caused significant variations in the evaluated variables, being the permeability of the cellular membranes and the concentration of abscisic acid the most affected. Such characteristics demonstrate tolerance, and can be used in breeding for the ability to avoid ionic toxicity by increasing their selectivity.

The callus of the evaluated radiomutants presented better response to the saline stress imposed on the culture medium and the most favorable results were obtained up to the electrical conductivity of 7dS m^{-1} at both exposure times, demonstrating the tolerance to this type of stress in the short and medium term exposure to this level of EC and the positive effect of mutations induction to mitigate the adverse effects of saline stress.

End of the English version



- García, A.; Florido, M. y Lara, R. M. 2003. Estudios bioquímicos para la selección *in vitro* de variedades de arroz con tolerancia a estrés hídrico y salino. Biotecnología Vegetal, 3(3):181-186.
- González, L. M. y Argentel, L. 2005. Efectos de la sequía simulada con PEG-600 en la germinación y el crecimiento de las plántulas de dos variedades de trigo. Cultivos Tropicales. 26(3):65-69.
- Gosset, E. 1917. An other differences calculus based on standar deviation and confidence interval. Statistical References. 26:66-72.
- Gutiérrez, L.; Pérez, S.; Cabrera, M. y Villasana, R. 2005. Algunas experiencias en la producción de trigo cubano. Memorias VI taller internacional de recursos fitogenéticos. Sancti Spiritus, Cuba. 180 p.
- Kadri, K.; Abdellaoui, R.; Mhamed, H. C. and da Silva, J. A. T. 2014. Analysis of salt-induced mRNA transcripts in tunisian local barley (*Hordeum vulgare*) leaves identified by differential display RT-PCR. Biochemical genetics. 52(1-2):106-115.
- Labrada, M. 1999. Selección *in vitro* en condiciones salinas de líneas de arroz obtenidas a través del uso combinado de técnicas biotecnológicas y nucleares.
- Lamz, P. A.; Reyes, G. Y. y González, C. M. C. 2013. Indicadores bioquímicos para la selección de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) con tolerancia a la salinidad. Cultivos Tropicales. 34(1):11-17.
- Martínez C. T. 2013. Estudio y purificación de peroxidasas implicadas en la lignificación de plantas basales.
- Mollasadeghi, V.; Valizadeh, M.; Reza, S. R. and Imani, A. A. 2011. Evaluation of end drought tolerance of 12 wheat genotypes by stress indices. Middle-East J. Sci. Res. 7(2):241-247.
- Munss, R.; James, R. A.; Xu, B.; Athman, A. and Conn, S. J. 2012. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na^+ transporter gene. Nature Biotechnology. 30(4):360-364.

- Nakashima, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2013. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant cell reports*. 32(7):959-970.
- Valifard, M.; Moradshahi, A. and Kholdebarin, B. 2012. Biochemical and physiological responses of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to drought stress applied at seedling stage. *J. Agri. Sci. Tech.* 14:1567-1578.
- Young, J.; Ye, J.; Chae, G. y Hunseung, G. 2012. Aquaporin as a membrane transporter of hydrogen peroxide in plant response to stresses. *Plant Signaling & Behavior*. 7(9):1180-1181.
- Tukey, J. W. 1960. "A survey of sampling. Post-hoc comparisons". *Contribution to probability and statistics. Essays in honor to Harold Hotelling*. Sandford: Sandford University Press. 448-485 pp.