

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS

**Selección de mutantes de arroz (*Oryza sativa*) con tolerancia a
salinidad obtenidos por radiación gamma**

Documento de tesis para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Alexis Ángel Fernández Acuña

Tutor:

Dr. Rafael Orozco Rodríguez

Asesores:

Dr. Willy Navarro Álvarez

Lic. Juan Félix Arguello

Campus Omar Dengo

Heredia, Costa Rica, 2020

Selección de mutantes de arroz (*Oryza sativa*) con tolerancia a salinidad obtenidos por radiación gamma

Por

Ing. Alexis Fernández Acuña

**Tesis de investigación sometida a consideración del tribunal examinador
como requisito parcial para optar por el grado de
Licenciado en Ingeniería en Agronomía**

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

GRACE
WONG REYES
(FIRMA)

Digitally signed by
GRACE WONG REYES
(FIRMA)
Date: 2020.08.05
17:44:19 -06'00'

Ph.D. Grace Wong Reyes
Decana Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

RAFAEL EVELIO
GRANADOS
CARVAJAL (FIRMA)


Firmado digitalmente por RAFAEL
EVELIO GRANADOS CARVAJAL
(FIRMA)
Fecha: 2020.08.05 13:51:21 -06'00'

Dr. Rafael Evelio Granados Carvajal
Director Escuela de Ciencias Agrarias

RAFAEL SANTIAGO OROZCO
RODRIGUEZ (FIRMA)

Firmado digitalmente por RAFAEL
SANTIAGO OROZCO RODRIGUEZ
(FIRMA)
Fecha: 2020.08.03 18:09:30 -06'00'

Dr. Rafael Orozco Rodríguez
Tutor de tesis



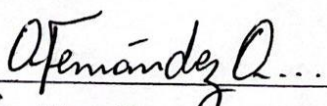
Dr. Willy Navarro Álvarez

Lector de tesis



Lic. Juan Félix Arguello Delgado

Lector de tesis



Bach. Alexis Fernández Acuña

Sustentante

DEDICATORIA

A mi familia y en especial a mis padres Edwin y Saira, los cuales son los que me dan fuerza de voluntad para superarme.

A Carolina Vargas Muñoz por su apoyo incondicional para ayudarme a finalizar esta investigación.

A todos mis amigos y amigas que me motivaron en el camino para culminar mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional por haberme aceptado como uno más de sus hijos.

A la Escuela de Ciencias Agrarias por darme todos los conocimientos que puso a mi disposición y ahora pongo en práctica con orgullo.

Al programa BIOVERFI que gracias a ellos aprendí a desempeñarme como profesional y me brindó su valiosa colaboración para mi investigación.

A mi tutor y lectores que brindaron sus conocimientos y me dieron libertad de creatividad para desarrollar mi tesis.

A mis compañeros y amigos Mairon Madriz, Alexander Sáenz, Olger Esquivel y Johan Rosales por apoyarme en el desarrollo de mi tesis.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica que propició mediante el acuerdo ARCAL el desarrollo del Proyecto 0568 en el cual se desarrolló mi tesis.

A Vicerrectoría de Investigación de la UNA y a FESS-CONARE por brindar el financiamiento de esta investigación.

A los funcionarios del INTA de la Estación Experimental Enrique Jiménez Núñez y la Finca Experimental Santa Lucía de la UNA.

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo aprovechar la variabilidad genética inducida por la radiación gamma cobalto 60 (Co^{60}) en el cultivo del arroz, para seleccionar mutantes con tolerancia a la salinidad. Se utilizó 1,5 kg semillas de arroz de la variedad CR5272 irradiadas a una dosis de 400 Gy y se multiplicó para obtener la generación M_2 en condiciones de campo. Se valoró la susceptibilidad a la salinidad (NaCl) de esta variedad mediante la determinación de la dosis letal media (DL50) usando valores de conductividad eléctrica (CE) de 2 a 20 dS/m (deciSiemens por metro) con incrementos de dos unidades entre cada valor. Para ello se utilizó el cultivo hidropónico, utilizando la solución nutritiva descrita por Yoshida et al. (1976), para el crecimiento de plantas de arroz. En campo se logró cosechar 14 Kg de semilla M_2 . En invernadero se determinó que la DL50 del factor de estrés salino (factor de selección) corresponde a 11.75 dS/m. No obstante, se usó 14 dS/m como factor de estrés debido a que esta dosis fue más eficiente para discriminar mutantes tolerantes de los susceptibles al compararse con la de 11.75 dS/m. Una vez obtenida la semilla M_2 (14 kg) en campo y definido el nivel de estrés salino a ser aplicado a la población segregante se tomaron 9450 semillas M_2 y se sembraron en invernadero en el sistema hidropónico, al cual se le adicionó la solución nutritiva ya descrita salinizada a 14 dS/m de CE desde la germinación hasta los 21 días de edad. En esta primera fase se seleccionaron 30 mutantes, los cuales fueron trasplantados a un medio sin sal usando el mismo sistema hidropónico para que continuaran su crecimiento hasta la etapa de prefloración. En la cual fueron sometidas nuevamente al factor de estrés durante 25 días. En esta segunda evaluación sobrevivieron ocho mutantes promisorios de los cuales se recuperó semilla para ser incrementada. A lo largo de todo el ciclo fenológico del cultivo se evaluaron diferentes variables agronómicas con el fin de describir a los mutantes promisorios. Esta investigación demostró que la técnica de inducción de mutaciones usando irradiaciones gamma Co^{60} es capaz de generar mutantes promisorios con tolerancia a salinidad, los cuales pueden ser usados en la obtención de nuevas variedades que contribuyan a enfrentar el avance de la salinización de los suelos de Costa Rica.

ABSTRACT

The objective of this research was to take advantage of the genetic variability induced by gamma radiation with cobalt 60 (Co^{60}) in rice to select mutants tolerant to salinity. 1.5 kg of rice seeds of the variety CR5272 irradiated at a dose of 400 Gy were used. It was multiplied to obtain the M_2 generation in field conditions. The susceptibility to salinity (NaCl) of this variety was evaluated to determine the mean lethal dose (LD50). Different electrical conductivity (CE) values of 2 to 20 dS/m (deciSiemens per meter) were used with increments of two units between each value. The hydroponic culture was used. The nutrient solution described by Yoshida et al. (1976) was added for the growth of rice plants. 14 Kg of M_2 seed were harvested in the field. In the greenhouse, it was determined that the LD50 of the saline stress factor (selection factor) corresponded to 11.75 dS/m. However, 14 dS/m was used as a stress factor because this dose was more efficient to discriminate tolerant mutants from susceptible ones when compared to 11.75 dS/m. Once the M_2 seed (14 kg) has been obtained in the field and the level of saline stress to be applied to the segregating population has been defined 9,450 seeds M_2 were grown in the greenhouse in the hydroponic system with the salinized nutrient solution at 14 dS/m CE from germination to 21 days of age. In this first selection 30 seedlings survived. Subsequently, they were transplanted into a salt-free medium using the same hydroponic system so that they continued their growth until the pre-flowering stage. In which they were subjected again to the stress factor for 25 days. In this second evaluation eight candidate mutants survived from which seed was recovered to be increased. Throughout the entire phenological cycle of the crop, different agronomic variables were evaluated to describe the promising mutants. This investigation demonstrated that the mutation induction technique using Co^{60} gamma irradiation can generate candidate mutants with tolerance to salinity. These can be used to obtain new varieties that contribute to face the advance of the salinization of the soils of Costa Rica.

INDICE

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE ANEXOS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Generalidades del cultivo de arroz	5
Cultivo de arroz en Costa Rica	5
Salinidad en Costa Rica	6
La salinidad en los suelos	7
La salinidad en el mundo	8
Entrada de iones de Na⁺ y Cl⁻ a las plantas	8
Efectos de la salinidad en las plantas	9
Efectos de la salinidad en el cultivo de arroz	10
Tolerancia a la salinidad	10
Genes involucrados en la tolerancia a salinidad	12
Mejoramiento genético para tolerancia a salinidad	12
Inducción de mutaciones	14
Agentes mutagénicos	15
Rayos gamma	16

Inducción de mutaciones en Costa Rica.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Fases de la investigación	19
Localización	19
FASE 1: Generación de una población segregante (M₂) de arroz a partir de semillas irradiadas con Co⁶⁰.	20
Material genético.....	20
Preparación del terreno.....	20
Siembra.....	20
Manejo.....	20
Cosecha.....	20
FASE 2: Determinación de la dosis letal media (DL50) de NaCl en plántulas de arroz CR5272 en sistema hidropónico.	22
Material genético.....	22
Tratamientos.....	22
Preparación del medio hidropónico.....	23
Manejo del cultivo.....	24
Diseño experimental.....	25
Variables a evaluar.....	25
Análisis de datos.....	25
FASE 3: Selección de mutantes promisorios tolerantes a salinidad en hidroponía.	26
Descripción del sistema hidropónico:.....	26
PRIMERA SELECCIÓN	30
Material genético.....	30
Tratamientos.....	30
Primer periodo de estrés salino.....	30
Preparación de la solución nutritiva.....	30
Siembra.....	31
Manejo del cultivo.....	31
Diseño experimental.....	31
Variables evaluadas.....	33

SEGUNDA SELECCIÓN	34
Trasplante	34
Manejo.....	34
Segundo periodo de estrés salino	34
Arreglo espacial de las plantas en el invernadero	34
VARIABLES EVALUADAS.....	35
Análisis de datos	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
FASE 1: Generación de una población segregante (M₂) de arroz a partir de semillas irradiadas con Co⁶⁰.....	37
FASE 2: Determinación de la dosis letal media (DL50) de NaCl en plántulas de arroz CR5272 en sistema hidropónico	39
FASE 3: Selección de plantas M₂ tolerantes a salinidad en hidroponía.	44
PRIMERA SELECCIÓN	44
Descripción del grado de tolerancia y parámetros cuantitativos a los 21 dds.	48
SEGUNDA SELECCIÓN.....	52
Comportamiento de la altura y número de macollas antes y después del segundo estrés salino.	56
Comportamiento de diferentes variables agronómicas postcosecha	58
Determinación preliminar del mutante más promisorio a través de un análisis comparativo de todas las variables evaluadas desde la siembra hasta la cosecha.	61
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS.....	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del suelo de acuerdo con su grado de salinidad.....	7
Tabla 2. Tratamientos y conductividad eléctrica en la determinación de la DL50 de salinidad en el cultivo del arroz (<i>Oryza sativa</i>).	22
Tabla 3. Reactivos utilizados para preparar las soluciones madre de Yoshida para arroz. ...	23
Tabla 4. Tratamientos en la selección de materiales tolerantes a salinidad.	30
Tabla 5. Escala de tolerancia a salinidad para la selección de plántulas tolerantes.	33
Tabla 6. Resumen de los valores de las DL50 para NaCL obtenidas del análisis dosis-respuesta por medio de regresión no lineal de cada variable.	42
Tabla 7. Porcentajes de selección de mutantes M ₂ 400 Gy en solución nutritiva salina (14 dS/m) a los 21 días de edad, de acuerdo con su grado de tolerancia.	47
Tabla 8. Grado de tolerancia y parámetros cuantitativos de los mutantes seleccionados. ...	48
Tabla 9. Porcentajes de selección de plantas adultas M ₂ 400 Gy en solución nutritiva salina (14 dS/m) a los 142 días de edad.	53
Tabla 10. Duración en días de etapas relevantes del ciclo de cultivo de testigos y mutantes promisorios sobrevivientes a los 2 periodos de estrés salino.	55
Tabla 11. Variables agronómicas observadas a los testigos y mutantes sobrevivientes a la cosecha.....	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las posibles vías de transporte del Na ⁺ y Cl ⁻ y su distribución celular y de larga distancia (Isayenkov & Maathuis, 2019).	9
Figura 2. Mecanismo de acción de la radiación ionizante (rayos gamma) en la molécula del ADN. Real (2014).....	17
Figura 3. Cosecha de la semilla segregante M ₂ . Estación Experimental Enrique Jiménez Núñez. Cañas, Guanacaste. A (Corta), B (Aporrea), C (Limpieza), D (Transporte).	21
Figura 4. Proceso para la preparación de la solución nutritiva A: recipiente de la solución y corrección de pH. B: recipiente para administrar la solución a cada tratamiento. C: aplicación de los tratamientos. D: siembra de semillas.	24
Figura 5. Bandejas utilizadas para implementar el sistema hidropónico.	27
Figura 6. Reservorio utilizado para la preparación de la solución nutritiva.	27
Figura 7. Ilustración general del sistema de distribución de la solución nutritiva.	28
Figura 8. Ilustración general del diseño construido para el drenaje.	29
Figura 9. Diferentes soportes utilizados para el crecimiento de las plantas. A: 3600 semillas. B: 24 plántulas. C: 12 plantas. D: 6 plantas.....	29
Figura 10. Proceso de siembra de los tratamientos para la selección individual de materiales tolerantes a salinidad.	31
Figura 11. Esquema de la distribución de los tratamientos en las bandejas para la selección individual de plántulas tolerantes a salinidad.	32
Figura 12. Escala de tolerancia a salinidad utilizada para favorecer el proceso de selección individual de plántulas M ₂ de 400 Gy de esta investigación.....	33
Figura 13. Distribución de las plantas mutantes y los testigos en el invernadero en un sistema hidropónico.....	35
Figura 14. Diferentes estados de desarrollo de las plantas M ₁ . Estación Experimental Enrique Jiménez Núñez. Cañas, Guanacaste. A (Plántulas), B (Macollamiento), C (Floración), D (Grano maduro).	38
Figura 15. A: Semilla segregante M ₂ seca y limpia. B Semilla empacada para ser almacenada en cámara fría. Laboratorio de Recursos Fitogenéticos, Universidad Nacional de Costa Rica.....	38

Figura 16. Aspecto general de plántulas de arroz de la variedad CR5272 en diferentes niveles de conductividad eléctrica por NaCl a los 21 días de edad.....	39
Figura 17. Curvas de la determinación de la DL50 a salinidad de CR5272, obtenidas por medio de un modelo de regresión no lineal: A) Germinación, B) Supervivencia), C) Altura de planta, D) Longitud de raíz, E) Número de hojas.....	43
Figura 18. Ensayo para la selección de plántulas M ₂ de 400 Gy tolerantes a salinidad a los 21 dds. A (bandejas con solución con sal y sin sal), B (plántulas M ₂ susceptibles), C (plántulas M ₂ tolerantes).....	45
Figura 19. Proceso de selección de los genotipos tolerantes a salinidad a 21 días después de la siembra. A y B (rescate de plántulas), C (materiales seleccionados), D (medición de variables cuantitativas).	46
Figura 20. aspecto general de las plántulas del testigo sin sal (Grado 1), Testigo con sal (Grado 5) y los mutantes tolerantes (Grado 3) seleccionados a los 21 días de edad.....	50
Figura 21. Plantas adultas sometidas al segundo estrés salino. A (desarrollo del experimento en el sistema hidropónico), B (Diferencias visuales entre mutantes tolerantes y mutantes susceptibles después de estrés).....	52
Figura 22. Comportamiento de las plantas antes, durante y después del estrés. A (antes de estrés), B (testigo sin sal vs plantas estresadas), C (mutantes que lograron sobrevivir), D (mutantes que no toleraron el estrés).....	52
Figura 23. Altura de los testigos y mutantes antes y después del segundo estrés salino.....	56
Figura 24. Número de macollas de los testigos y mutantes antes y después del segundo estrés salino.....	56

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medias de respuesta de las variables analizadas al efecto de la salinidad sobre la variedad de arroz CR5272.	73
Anexo 2. Supervivencia de las plantas y duración en días de periodos relevantes del ciclo de cultivo.	74
Anexo 3. Ilustración general de las dos selecciones sobre los materiales M ₂ . (A: Primera selección), (B: Segunda selección).	75

LISTA DE ABREVIATURAS

Co⁶⁰: Isótopo de cobalto

Gy: Gray

NaCl: Cloruro de sodio

CE: Conductividad eléctrica

dS/m: deciSiemens por metro

DL50: Dosis letal 50

M0: Material sin irradiar

M1: Material irradiado primera generación

M2: Segunda generación de material irradiado

M3: Tercera generación de material irradiado

ADN: Ácido desoxirribonucleico

dds: Días después de la siembra

INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los cereales más importantes a nivel mundial ya que suplente a 3500 millones de personas el 20% de sus calorías (Khush, 2013). Debido a esta necesidad año a año se cultivan millones de hectáreas a nivel mundial principalmente en países como China, India, Indonesia, Bangladesh y Vietnam. Para el periodo 2017-2018 se cultivaron 167 millones de hectáreas (Shahbandeh, 2020) con una producción mundial de 718,4 millones de toneladas de arroz elaborado, aproximadamente, y con un consumo mundial de 503,9 millones de toneladas, dando como resultado un consumo per cápita de 53,9 kg por persona (FAO, 2018).

En el ámbito nacional se sabe que el país dejó de ser autosuficiente en el grano desde el año 1992 cuando se empezó a importar 40000 toneladas de arroz provenientes de EEUU, Argentina y Taiwán (Hernández, 2001). A partir de esa fecha el país ha visto afectada su dependencia alimentaria del grano, la cual se refleja más claramente en los diversos informes estadísticos realizados por la Corporación Arrocera Nacional (CONARROZ, 2020) en los últimos años. En su informe del periodo 2018-2019 ilustra una curva de producción desde el año 2014 a la fecha donde muestra una tendencia decreciente en la producción de arroz, la cual se debe a diversos factores que han provocado fuertes disminuciones en los rendimientos y áreas sembrada (CONARROZ, 2020).

En ese mismo periodo, Costa Rica consumió 236224 toneladas de arroz pilado de las cuales apenas el 42,88% fue cubierta con producción nacional y el restante 57,12% provino de países como Estados Unidos, Brasil, Argentina y Uruguay. Fueron cosechadas un total de 36979 hectáreas con una producción de 151051 toneladas, dando rendimientos de 4,19 ton/ha. La Región Chorotega abarcó el 52% del área sembrada, Región Brunca 19%, Región Pacífico Central 16%, Región Huetar Norte 12% y Huetar Atlántica 0,4% (CONARROZ, 2020).

El consumo per cápita nacional se mantuvo en los 46,96 kg (CONARROZ, 2020) muy cercanos al consumo a nivel mundial de 53,9 kg (FAO, 2018). Estos números revelan la importancia de este cereal en la dieta de los costarricenses, convirtiéndolo en un elemento fundamental de la seguridad alimentaria. Por esto, se debería de realizar esfuerzos para

contrarrestar los diversos factores que podrían afectarlo y poner en riesgo el consumo nacional.

Algunos factores afectan el rendimiento del cultivo de arroz. Uno de ellos corresponde a la presencia de sales en el suelo, comúnmente llamada salinidad del suelo. Esta según su origen, puede clasificarse en dos formas: puede ser natural cuando hay una cercanía y baja altura sobre el nivel del mar, además de la intemperización y la existencia de sales propiamente en los suelos (Rodríguez et al., 2016) o por otra parte, puede ser provocada por el ser humano, cuando lleva a cabo incorrectas prácticas agrícolas (Allbed & Kumar, 2013).

En zonas cercanas a la costa, como las del Pacífico costarricense, el nivel freático es poco profundo y es ahí donde las sales que se acumulan en el agua freática se mueven hacia arriba por los procesos de capilaridad, inundaciones o entrada del mar, lo cual deposita las sales en la zona de crecimiento de las raíces (Combatt et al., 2015). En fincas productoras de la provincia de Guanacaste como la Hacienda Taboga, Ranchos Horizontes, o fincas de la costa del Pacífico Central han presentado estos problemas; ya sea por su cercanía al mar, por el constante uso de fertilizantes o del mal manejo del agua de riego.

Para hacerle frente a esta situación, se ha planteado la mejora genética como una alternativa eficaz para la obtención de materiales tolerantes a salinidad. Esta se puede realizar ya sea por introducción y o incorporación de genes, inducción de mutaciones, identificación de caracteres relacionados, la multiplicación *in vitro*, selección o adaptación de suspensiones celulares y la variación somaclonal (Lamz & González, 2013).

Para incrementar la eficiencia y acortar el periodo de creación de variedades, los mejoradores combinan muchas técnicas en el proceso. Como el cultivo *in vitro* para acelerar la multiplicación, métodos moleculares para seleccionar genotipos específicos, mutagénesis para incrementar la variación, uso de genética reversa, técnica de dobles haploides y el uso de ambientes controlados para facilitar y manipular el crecimiento (Ahloowalia et al., 2004; Mba, 2013).

Si bien es cierto, en nuestro país existen otros factores que actualmente provocan mayores daños en el cultivo de arroz. La salinidad ya ha sido reportada en el país desde el año 1996 por Montes de Oca et al. (1996) demostrando nuestra necesidad de obtener variedades de

arroz adaptables a este tipo de suelos antes de que los efectos del cambio climático generen mayores áreas afectadas por este problema.

Por todo lo anterior, esta investigación tiene el objetivo producir suficiente variabilidad genética en el cultivo de arroz para seleccionar plantas con tolerancia a salinidad utilizando la técnica de inducción de mutaciones a través de rayos gamma; las cuales se adecuen a las condiciones cambiantes en el medio ambiente de nuestro país de manera que logre cumplir las exigencias de los productores y consumidores.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener mutantes de arroz tolerantes al estrés salino, a partir de una población segregante M₂ generada por irradiación gamma con cobalto 60 (Co⁶⁰).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Generar una población segregante de semilla M₂ a partir de material sometido a radiación gamma con cobalto 60 (Co₆₀).
2. Determinar la dosis letal media (DL50) de salinidad en arroz por medio de la hidroponía para utilizarla en la selección individual de plantas tolerantes.
3. Seleccionar mutantes tolerantes M₂ con características promisorias de desarrollo en condiciones de estrés salino, bajo un sistema hidropónico.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades del cultivo de arroz

El arroz es una planta herbácea de la familia de las poaceae de tallo redondo y hueco que tiene tallos primarios, secundarios y terciarios los cuales se conocen como macollas. Estas usualmente culminan su crecimiento con la formación de una panícula donde se desarrollan los granos de arroz (Wang & Li, 2005). Su crecimiento está dividido en tres etapas fenológicas: vegetativa la cual varía de 45 a 65 días dependiendo de la variedad, la reproductiva donde se desarrolla la panícula y ocurre la floración con una duración de 35 días y la maduración que comprende el llenado del grano que tarda alrededor de 30 días (IRRI, 2007).

Existen alrededor de 120000 cultivares de *Oryza sativa* y la mayoría de ellos se agrupan dentro de dos subespecies o razas de arroz, *Oryza sativa* japónica de granos cortos opacos y *Oryza sativa* indica de granos largos translucidos (Chávez, 2012). Estos últimos corresponden a las diferentes variedades cultivadas en el país.

Cultivo de arroz en Costa Rica

En Costa Rica este cultivo fue establecido después de la colonia en lugares como Atenas, Turrubares, Cebadilla, Ciruelas, Puriscal y Santa Ana. Posteriormente fue llevado a otras zonas con topografías menos irregulares donde se han mantenido hasta la fecha (Tinoco & Acuña, 2009). Las primeras variedades fueron liberadas en los años 70 por lo que hoy se conoce como el INTA, algunas de ellas fueron CR113 en 1973 y CR5272 en 1978 (Romero, 2004).

Actualmente, las principales variedades a son Lazarroz FL, Palmar 18, Puita INTA, NayuribeB FL y Nayudel FL. También se cultivan, aunque en menor medida, otras variedades o líneas como Sabana 21, CR5272, CFX 18, GURI, Línea 5272, Sem 202, Sem 257, INTA CR 1508 y Emperador. Todas estas fueron cultivadas en el periodo 2017 – 2018 por alrededor de 590 productores bajo modalidad de secano (55%) y riego con (45%), siendo la Región Chorotega la principal área de siembra (CONARROZ, 2020).

Este cultivo, básico en la dieta de los costarricenses, requiere identificar y desarrollar estrategias que permitan disminuir la vulnerabilidad ante los impactos negativos como el cambio climático o políticas poco favorables. Al respecto, Vignola et al (2018) identificaron los principales factores que podrían afectar la producción del grano en el país; donde destacan agentes fitosanitarios, variaciones en la disponibilidad del recurso hídrico, sequías, altas temperaturas y radiación solar, principalmente.

Salinidad en Costa Rica

Dentro de todos estos factores Vignola et al. (2018) mencionan que la salinidad presenta desde una alta hasta a una muy baja afectación en el país dependiendo de la región. Por lo cual, es un tema que debería de tomar mayor importancia ya que se reporta desde la década de los 70s. En un estudio realizado por Montes de Oca et al (1996) sobre la presencia de suelos salinos en Costa Rica, reportan un suelo de la Hacienda Taboga en Cañas de Guanacaste con una conductividad de 16.2 dS/m, además, cita diversos autores que hicieron hallazgos de suelos afectados por salinidad entre ellos:

- Vasquez (1975) que realizó estudios semidetallados de la cuenca baja del Río Tempisque en fincas del Ingenio Taboga el cual reportó conductividades de 0.21, 0.75, 1.73 y 1.82 dS/m a diferentes profundidades.
- Vasquez & Chaves (1976) que evaluaron tierras y aguas para riego en la Hacienda Taboga encontrando conductividades de 12.23 dS/m.
- Ranchos Horizontes (1978) donde analizaron agua y suelo del mismo lugar con conductividades desde los 0.13 a 5.65 dS/m.

Además de esto, en el año 2018, el programa BIOVERFI de la Escuela de Ciencias Agrarias evaluó dos fincas con suelos aptos para la producción arrocerera, una en la Hacienda Taboga la cual arrojó conductividades de 6.3, 0.2 y 5.3 dS/m y la otra en Finca La Ligua de Parrita con conductividades de 6.2, 6.8 y 9.6 dS/m. Esto podría significar, a razón de haber un estudio detallado, que la salinidad en Costa Rica se ha mantenido a lo largo de estos años y que además podría ser causada por la influencia de la cercanía del mar con los sitios de siembra por lo que se requiere de una serie de acciones para seguir utilizando el potencial de dichos suelos.

La salinidad en los suelos

La salinidad en los suelos corresponde a la presencia de una concentración de sales que perjudican a las plantas por su efecto tóxico y la disminución del potencial osmótico del suelo (Lamz & González, 2013). Existe una gran variedad de sales que pueden afectar el desarrollo de las plantas, entre las más comunes son: NaCl, CaCl₂, MgCl₂, KCl, MgSO₄, (Na)₂SO₄, NaNO₃, KNO₃, (Na)₂CO₃ y NaHCO₃ (Narváez et al. 2014). De todas, la más común es el cloruro de sodio debido a su amplia disponibilidad y distribución mundial, por lo que también se les suele llamar suelos salinos-sódicos.

No obstante, es normal que los suelos presenten este tipo de sales en diferentes concentraciones. Por su parte, la FAO ha propuesto que cuando el contenido total de sales excede los 2.56 g/L, equivalentes a 4 dS/m (deciSiemens por metro cuando se mide su conductividad eléctrica) puede considerarse como un suelo salino. De acuerdo con su grado de salinidad, los suelos reciben diferentes tipos de clasificación como la siguiente:

Tabla 1. Clasificación del suelo de acuerdo con su grado de salinidad.

Clasificación	Características
No salino	CE < 2 dS/m. No se afecta el rendimiento de ningún cultivo.
Ligeramente salino	2 ≤ CE < 4 dS/m. Los cultivos sensibles rinden más del 50%, pero menos del 85%
Moderadamente salino	4 ≤ CE < 8 dS/m. Los cultivos moderadamente sensibles rinden más del 50%, pero menos del 85%
Salino	8 ≤ CE < 12 dS/m. Los cultivos moderadamente sensibles rinden más del 50%, pero menos del 85%
Muy salino	CE ≥ 12 dS/m. Los cultivos moderadamente tolerantes y plantas halófilas

Fuente: (Villafañe, 2000).

La salinidad en el mundo

Wicke et al. (2011) determinaron la extensión global de tierras salinizadas que incluye suelos salinos y sódicos, de origen natural y/o inducida por el hombre, donde encontraron alrededor de 1128 millones de hectáreas afectadas. De esta extensión el 60% corresponde a suelos salinos, el 26% a sódicos y el 14% a salino-sódicos. Por otro lado, se ha reportado que más de ochenta millones de hectáreas de áreas cultivables han sido afectadas por este problema (Gabriel et al., 2012), y que más de un tercio de los sistemas bajo riego del mundo se vieron afectados por anegamiento y o la salinización del suelo (Singh, 2015).

En Centroamérica, Wicke et al. (2011) reportaron alrededor de 5 millones de hectáreas afectadas por este problema. En el caso de Costa Rica, se sabe que existen suelos afectados por salinidad, pero no se tiene un estudio que haya determinado áreas totales afectadas. A través de diversos medios locales se informa de afectaciones en la costa pacífica como incremento en la erosión de las playas, mareas cada vez más altas e inundaciones más frecuentes. Haciendo alusión a ciertas comunidades en cantones como Puntarenas o Garabito, principalmente, las cuales verían afectadas sus actividades producto de un incremento en el nivel de mar. Por este motivo, muchas de estos lugares sufrirían incrementos en la salinización de sus suelos.

Entrada de iones de Na^+ y Cl^- a las plantas

La absorción de iones Na^+ y Cl^- en las plantas puede darse de manera apoplástica o simplástica (Figura 1). La vía apoplástica en arroz es responsable de al menos un 50% del total de Na^+ absorbido y el otro 50% se debe a la vía simplástica. En esta última, diferentes proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática del parénquima del xilema como AKT, HKT2, NSCC, PIP2;1, NHA, LCT1, HAK5 pueden estar involucradas en la absorción de Na^+ a través de la membrana plasmática. En el caso del Cl^- , un 50% de total absorbido se debe a la vía apoplástica y otro 50% se debe a la vía simplástica mediada por el co-transportador NRT (Isayenkov & Maathuis, 2019).

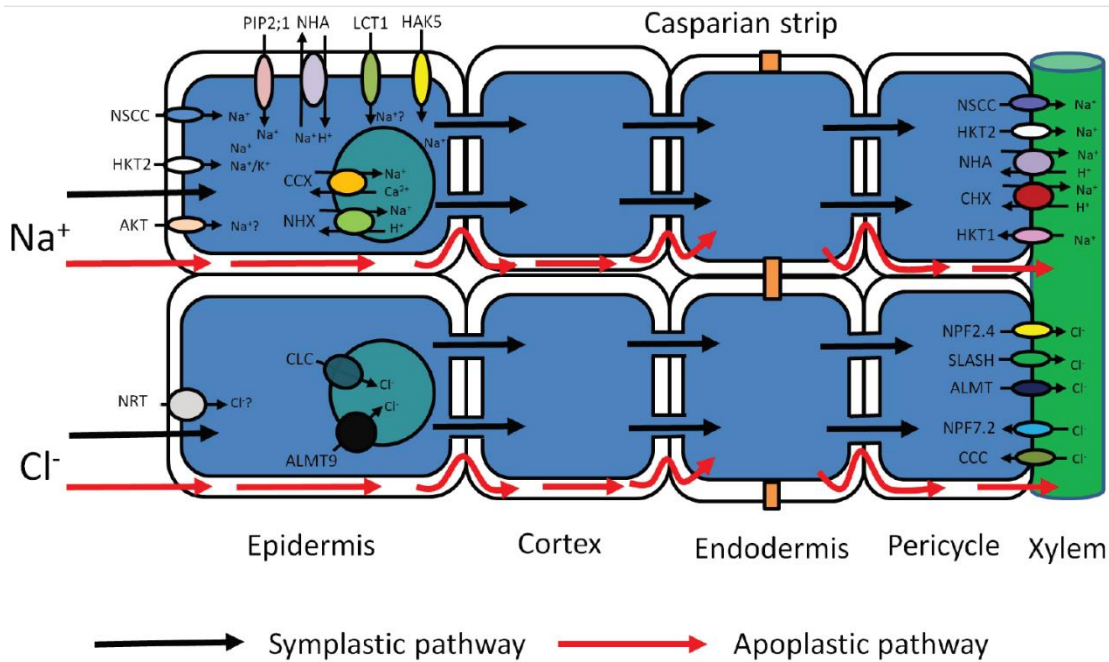


Figura 1. Representación esquemática de las posibles vías de transporte del Na⁺ y Cl⁻ y su distribución celular y de larga distancia (Isayenkov & Maathuis, 2019).

Una vez que estos dos iones entraron al citoplasma celular existen diferentes transportadores que se encargan de secuestrarlos en la vacuola y otros transportadores se encargan de redistribuirlos en el xilema para ser depositados en los diferentes órganos de la planta (Figura 1).

Efectos de la salinidad en las plantas

Las plantas, por su comportamiento ante la salinidad, se pueden dividir en dos grupos: las sensibles que se conocen como glicófitas y las halófitas que pueden tolerar ambientes salinos (Tuteja et al., 2011).

La salinidad afecta a las plantas principalmente por dos motivos. El primero es un problema osmótico, debido a que elementos que componen las sales como por ejemplo el Na⁺ son altamente higroscópicos lo cual provoca que atrapen moléculas de agua y esto disminuye el potencial hídrico (Martínez et al., 2011). El segundo se considera un problema iónico porque provoca toxicidad debido a la acumulación de iones en las células (Pernús & Sánchez, 2015).

Las sales son absorbidas por las raíces, lo cual produce una disminución en la absorción de agua y nutrientes del suelo (Bronwyn et al., 2007). Esta absorción puede provocar la formación de especies reactivas con el oxígeno que provoca en la planta un proceso de estrés oxidativo (Pernús & Sánchez, 2015).

Efectos de la salinidad en el cultivo de arroz

Muchos de los cultivos de importancia agronómica del mundo, incluyendo el arroz, son sensibles a la salinidad y su rendimiento se reduce drásticamente cuando son cultivados en suelos salinos. Según Asch & Wopereis (2001), por encima de los 2 dS/m cada incremento de 1 grado de CE reduce hasta en 1 tonelada el rendimiento por hectárea. Existe un umbral para la reducción de rendimiento por efecto de la salinidad, el cual es de 3 dS/m de conductividad eléctrica del suelo, con 90% de pérdida del rendimiento a 10 dS/m. El arroz es relativamente tolerante a las sales durante la germinación, el ahijamiento, y hacia la madurez; pero es sensible durante los comienzos de las plántulas, la floración y el llenado de los granos (FAO, 2012).

Diversos autores han reportado los efectos negativos de la salinidad en el cultivo de arroz como: baja sobrevivencia después de la germinación (Cabalceta & Cordero, 1991), afectaciones en la tasa de crecimiento de raíces y parte aérea, dificultad del mecanismo fotosintético y formación de macolla (Morales et al., 2004), esterilidad (IRRI, 2020) dimensiones del grano y contenido de amilosa (Rao et al., 2013), entre otros. Los síntomas visuales del estrés de la salinidad son área foliar reducida, aspecto blanquecino de hojas más bajas, muerte de la extremidad de hoja y balanceo de la hoja (Bado et al., 2016). Por estos motivos resulta de suma importancia establecer alternativas para contrarrestar estos efectos producidos y mejorar las condiciones en las cuales se desarrolla este cultivo.

Tolerancia a la salinidad

La habilidad de las plantas para crecer en un ambiente con altas concentraciones de NaCl está asociado con la habilidad de esta para transportar, compartimentar, extruir y movilizar iones de Na⁺ (Tuteja et al., 2011).

Las plantas, según SEFV (2016), evitan la intoxicación por Na⁺ de tres formas:

- Durante la absorción en las raíces discriminando eficientemente el Na⁺ del K⁺
- Excluyendo el Na⁺ del citoplasma mediante la expulsión hacia el suelo o secuestrándolo en la vacuola.
- Redistribución a los diferentes órganos de la planta.

Los criterios para evaluar la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas varían dependiendo del nivel y la duración del estrés salino y la etapa de desarrollo de la planta. En general, la tolerancia al estrés salino se evalúa en términos de producción o rendimiento de biomasa en comparación con las condiciones sin estrés (Bado et al., 2016).

La tolerancia a la salinidad es un fenómeno complejo, que comprende cambios morfológicos y de desarrollo, en estrecha relación con los principales procesos fisiológicos y bioquímicos que operan en las plantas (Reyes et al., 2008).

Los mecanismos fisiológicos que juegan un papel importante en el mantenimiento de la capacidad de producción de un genotipo no son los mismos que contribuyen a la tolerancia a concentraciones de sal extremadamente altas (Bado et al., 2016). Por su parte, Reyes et al (2008) hace referencia a estos mecanismos que explican la capacidad de las especies vegetales para tolerar el estrés por sales, los cuales se mencionan a continuación:

1- El ajuste osmótico: ligado a la síntesis de solutos orgánicos como la prolina, los cuales ayudan a estabilizar la estructura cuaternaria de las proteínas involucradas y algunos sirven de receptores de radicales libres formados por la acumulación de iones en las células.

2- Exclusión de iones a nivel radicular: la exclusión de iones a nivel radicular y la retención de iones en las vacuolas de las raíces en crecimiento y en los diferentes órganos, permiten que las plantas toleren concentraciones extracelulares muy elevadas de sales.

3- Retención de iones Na⁺ en las vacuolas es una estrategia para disminuir las concentraciones de sodio en el citosol.

4- La eliminación del exceso de sales a través de glándulas o estructuras especializadas como los pelos vesiculares o eliminación de sales mediante la regulación de la caída de sus hojas y en casos extremos de sus frutos.

Genes involucrados en la tolerancia a salinidad

El Dr. Navarro aclara que ciertos genes denominados mayores están relacionados a proteínas que tienen que ver en la síntesis de sustancias para la regulación del potencial osmótico como la prolina y los otros denominados menores están relacionados a procesos metabólicos que producen la tolerancia. (W. Navarro, comunicación personal, 25 de junio de 2020).

Se han identificado más de 300 genes inducidos por este tipo de estrés y más de la mitad de los genes inducidos por sequía también son inducidos por salinidad, lo que indica la existencia de una intersección aparente entre las respuestas a la sequía y a la salinidad (García et al. 2013). La sequía y el estrés salino activan diferencialmente la expresión de dos genes de P5CS: AtP5CS1 (At2g39800) y AtP5CS2 (At3g55610). AtP5CS1 es responsable de la acumulación de prolina durante el estrés salino y la sequía. La expresión de AtP5CS1 es activada por una vía de traducción de señales dependiente de ácido abscísico (ABA) y modulada por la luz y los brasinoesteroides. La transcripción de AtP5CS2 es ligeramente elevada por el estrés salino e inducida por bajas temperaturas a través del factor de transcripción CBF3 (Reyes et al., 2008).

Mejoramiento genético para tolerancia a salinidad

Los primeros trabajos en tema de mejoramiento realizados por el Instituto Internacional de Investigación del Arroz (IIRI) en los años 60's revolucionaron las metodologías de mejoramiento en el cultivo, propiciando la gran cantidad de variedades que conocemos en el mundo (Jennings et al., 1981). Las metodologías utilizadas se han hecho cada vez más sofisticadas, desde la simple selección ejercida en forma visual por el hombre hasta las nuevas estrategias de creación de variación (hibridación, ADN recombinante), selección, evaluación y multiplicación de los genotipos deseados (Ahloowalia & Maluszynsky, 2001; Mba, 2013).

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) recopiló una serie de metodologías usadas para el mejoramiento del arroz, en su mayoría llevadas a cabo por el Instituto Internacional de Investigación del Arroz (IRRI) en Filipinas. Ellos establecen una serie de procedimientos para la selección de líneas tolerantes a salinidad, en la cual hace constar que

la tolerancia para arroz debe ser evaluada con una conductividad eléctrica de 8 – 10 dS/m o superior, durante las primeras cuatro semanas después del trasplante (Jennings et al., 1981). Este lapso de tiempo coincide con el periodo de plántula a la formación de las primeras macollas en la mayoría de las variedades (Jennings et al., 1981; FAO, 2012).

Los genotipos tolerantes usualmente se suelen evaluar fenotípicamente, para lo cual Bado et al (2016) menciona algunos parámetros que se pueden tomar en cuenta:

- Germinación: la sobrevivencia a ese estrés en este periodo es un buen indicador; sin embargo, no suele asociarse con la tolerancia a la salinidad en etapas de crecimiento subsiguientes.
- Sobrevivencia: se considera como el principal indicador de tolerancia, si el individuo logra sobrevivir al estrés.
- Daño de la hoja: es fácil de identificar ya que se presenta blanqueo y necrosis en las hojas.
- Biomasa y rendimiento: necesarios para realizar las evaluaciones en cualquier estado de desarrollo.
- Mecanismos fisiológicos: estos pueden incluir medidas de contenido de sodio en el tejido, discriminación iónica y ajuste osmótico.

Al respecto, diversos autores sugieren tres parámetros mínimos para realizar la selección para estrés salino. Uno corresponde a la etapa fenológica adecuada que usualmente corresponde al periodo de plántula (desde la germinación hasta la formación del primer hijo) (Glenn et al., 1997), otro es el número de días en estrés (12 días mínimo) y el otro es la conductividad eléctrica (alrededor de 8 – 10 dS/m).

Investigadores evaluaron cultivares y mutantes de arroz utilizando suelo salino como medio de aporte de sales, tal es el caso de Sultana et al. (1999), Ali et al. (2013), Piedra et al. (2013), Cahyoargo et al. (2015), Abdallah et al. (2016) y Krishnamurthy et al. (2016). Sin embargo, no coinciden en cuanto a la concentración de las sales que utilizan, variando desde 2.5, 3, 5, 6, 8, 10, 12 hasta los 20 dS/m. También varían los periodos de exposición al estrés, encontrándose inicios que van desde los 7, 15, 21, 30 y 90 días.

Otros implementaron el uso de la hidroponía como método alternativo al suelo Dionisio & Tobita (2000), Morales et al. (2004), Suárez & González (2004), Li et al. (2014) y Nath et al. (2016). Pero, aun así, siguen presentando las mismas inconsistencias en cuanto a los métodos utilizados, concentraciones y periodos de exposición al estrés. Esto sugiere que aun las metodologías para seleccionar plantas de arroz tolerantes a salinidad no se encuentran perfeccionadas o estandarizadas a nivel mundial, lo cual representa un motivo de duda sobre las técnicas a utilizar si se desea optar por mejorar el cultivo para este tipo de problema.

A pesar de que el uso del suelo podría representar una buena forma de aportar estrés salino para la planta ya que representaría la forma natural en la cual se desarrolla el cultivo. Se sabe que la salinidad en este es muy dinámica, la cual varía horizontal y verticalmente y a lo largo del tiempo (Bado et al., 2016). Por esto, las metodologías que utilicen suelo para investigaciones podrían tener cierto sesgo que comprometa el resultado final. Por lo que los sistemas hidropónicos para este tipo de evaluaciones se plantean como una solución a estos inconvenientes.

Inducción de mutaciones

Una mutación es un cambio heredable en la composición genética de un individuo que genera nuevas características. Estas mutaciones ocurren en la naturaleza como un error en la replicación del ADN. Los individuos que han modificado su ADN y ahora posee nuevas características se le conoce como mutante. Sin embargo, esto no es nuevo ya que se sabe que a partir de 1930 se descubrió que los rayos X producían mutaciones cloróticas en cebada, maíz, trigo y avena (Geraldino, 2012).

Las mutaciones se llevan a cabo de manera espontánea o inducida y suelen producir deleciones, inversiones o translocaciones a gran escala de cromosomas o mutaciones puntuales (IAEA, 2020a). Sin embargo, la técnica de inducción de mutaciones, por radiación, utiliza la misma estructura genética de la planta para provocar cambios genéticos más rápidos, imitando el proceso de mutación espontánea natural. Estos cambios generan variabilidad genética que por medio de la selección del mejorador se convierten en nuevas variedades con características favorables distintas a la variedad original (IAEA, 2020b).

En un reciente informe, el Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA por sus siglas en inglés) reporta noticias alentadoras sobre los últimos 10 años acerca del uso de variedades obtenidas por esta técnica como el caso de Vietnam donde repartió, a cerca de 4,5 millones de agricultores, 18 variedades de arroz (algunas tolerantes a suelos salinos) generando ingresos de 374 millones de dólares. Otros casos como Perú (cebada y amaranto) aportando 32 millones de dólares, Bangladesh donde hacen uso de unas 76 cultivos mejorados, Malasia con incrementos en los rendimientos de arroz por el uso de la variedad NMR152 (IAEA, 2018).

Según la base de datos del IAEA se encuentran registradas un total de 4871 variedades de diferentes cultivos generadas por esta técnica en las cuales 1673 fueron generadas por rayos gamma. De todos estos cultivos, a la fecha, se han registrado 833 variedades de arroz obtenidas por diferentes agentes mutagénicos. En dicha base ofrecen descripciones generales de cada variedad donde explican, entre otros aspectos, las características mejoradas e impacto de cada una de ellas (FAO/IAEA, 2020).

La inducción de mutaciones en arroz ha sido usada para la creación de variedades que, mediante la selección natural, llevaría mucho tiempo en obtenerlas; por ejemplo: resistencia a *Pyricularia oryzae* (Montepeque et al., 1991; Cruz et al., 1992;) tolerancia a sequía (Cristo et al., 2012; González & Martínez, 2016), enanismo, plantas con mayor producción y resistencia a herbicidas (CIAT, 2010) y tolerancia a salinidad (Hernández, 2001; Suárez & Gonzalez, 2004).

Agentes mutagénicos

Existen distintos tipos de agentes los cuales provocan que las mutaciones ocurran más rápido. Los más comunes son los siguientes:

- Los químicos, tienen la capacidad de ocasionar inestabilidad en la molécula del ADN cambiando las bases nitrogenadas y esto provoca errores en el apareamiento, pero dando mutaciones puntuales sobre el ADN (IAEA, 2020). Se incluyen agentes alquilantes como ifosfamida o melfalán. Otros como el gas mostaza, etilmetano sulfonato y el ácido nitroso provocan errores en futuras replicaciones del ADN, por

ejemplo que convierte la citocina en uracilo y la adenina en guanina (Landeró, 2006).

- Los físicos, que tienen la capacidad de liberar energía ionizante y suelen producir cambios cromosómicos y deleciones en el ADN de mayor envergadura aumentando la tasa de mutación natural de 1000 a 1 millón de veces (IAEA, 2020); pero difieren en cuanto a la energía desplegada, la penetración y el peligro para los operadores. Dentro de ellos encontramos a los rayos X, rayos gamma, luz ultravioleta, partículas alfa, partículas beta, aceleradores de partículas, neutrones, haz de iones e implantación con haz de iones, radiación cósmica y rayos láser (FAO/IAEA, 2018).

Los rayos X, los rayos gamma y los neutrones son radiaciones ionizantes efectivas muy utilizadas para crear nuevas variedades con características nuevas, ya que ofrece algunas ventajas sobre la selección natural. El uso de las mutaciones en la agricultura presenta un particular interés para variar caracteres heredables de variedades que sucumben a determinado agente biótico o abiótico (Zamora, 2014).

Rayos gamma

Los rayos gamma son un agente mutagénico físico que produce radiación de tipo ionizante en el cual los átomos inestables de un elemento proporcionan partículas de energía llamadas radioisótopos (Hernández et al., 2019). Estos radioisótopos cuando sufren la desintegración nuclear liberan energía en longitudes de ondas electromagnéticas cortas entre $10^{-11} - 10^{-14}$ m para convertirse en su forma natural más estable (Fontal, 2005).

Por ejemplo, el elemento químico cobalto en su estado natural Co^{59} es bombardeado con un flujo de neutrones, convirtiéndolo en su isótopo radiactivo Co^{60} el cual emite fotones de alta energía. Estos fotones son partículas carentes de masa que transportan energía a diferentes longitudes de onda producto de la liberación de protones del Co^{60} al desintegrarse y convertirse en Co^{59} (Albarrán et al., 2017).

La radiación se conoce como ionizante porque la energía producida por este radioisótopo es capaz de desalojar electrones de las órbitas nucleares de los átomos cercanos, convirtiéndolos en iones. Interactúa en todos los orgánulos de la célula, incluyendo el

núcleo, causando diversos tipos de lesiones físico-químicas afectando procesos como la división celular, metabolismo o causando la muerte (Hernández et al., 2019).

Puede interactuar en la célula de dos formas (Figura 2), ya sea indirectamente al formar especies reactivas con el oxígeno o directamente al afectar la molécula del ADN generando rupturas simples o dobles. Estas últimas, al llevar a cabo su mecanismo de reparación, pueden producir errores como deleciones, inserciones e inversiones en los sitios de reparación que causan las denominadas mutaciones (Hernández et al., 2019).

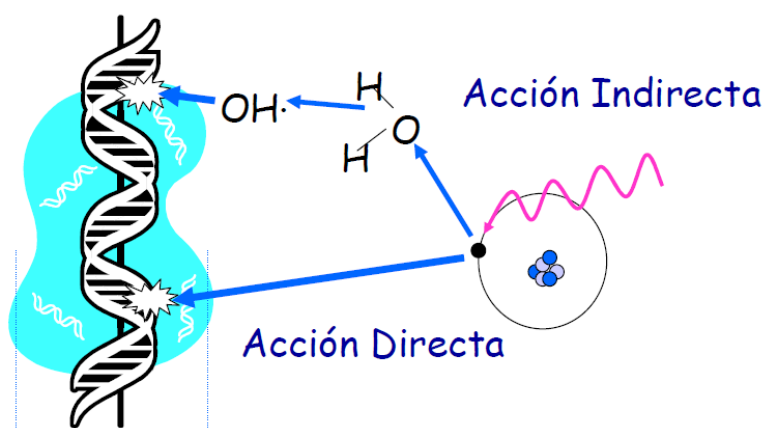


Figura 2. Mecanismo de acción de la radiación ionizante (rayos gamma) en la molécula del ADN. Real (2014)

Este tipo de radiación tiene muchos usos, años atrás fue utilizada con fines militares, pero también se encuentran otros como la esterilización de materiales valiosos en la industria alimenticia y médica. Uno particular, muy importante, corresponde a la irradiación de especies vegetales para inducir variabilidad genética. Se sabe que desde la década de los 60 los rayos gamma se han convertido en el agente mutagénico preferido con el cual se irradian semillas u otros propágulos (polen, esporas, esquejes) utilizando preferentemente el cobalto 60 (IAEA, 2020).

Sin embargo, el uso como tal de esta radiación se realiza aplicando sobre el material objetivo dosis específicas de radiación que son determinadas a través de una dosimetría de radiosensibilidad sobre el material vegetal. Estas dosis se expresan como la cantidad de energía absorbida en joule por kilogramo de material irradiado. La unidad que representa

esta energía absorbida se conoce como Gray (Gy) y está dada en unidad de tiempo (Albarrán et al., 2017).

Existe una nomenclatura asociada a materiales vegetales y sus subsecuentes generaciones en la que suele utilizarse una M en alusión a que corresponde a un material mutante y se acompaña por un número que puede ser 0, 1, 2, 3 o más, para indicar cuántas generaciones han pasado desde el momento de radiación. Por ejemplo, en el caso de semillas élite seleccionadas para radiación se conocen M₀, una vez irradiadas se les llama M₁. Estas semillas M₁ producirán plantas adultas, las cuales a su vez producen semillas denominadas M₂ y así sucesivamente (FAO/IAEA, 2018).

Una particularidad de esto es que las posibles mutaciones inducidas en la M₁ y que son de carácter recesivo no muestran características fenotípicas distintas de la M₀. Cuando ocurre la recombinación durante la meiosis, esas mutaciones inducidas en estado recesivo empiezan a manifestarse a partir de la generación M₂ a partir de la cual se puede hacer selección (FAO/IAEA, 2018).

Inducción de mutaciones en Costa Rica

En Costa Rica, la liberación oficial de CAMAGO 8 en 1996, variedad de arroz con resistencia a *Pyricularia oryzae* obtenida por radiación gamma, demostró la capacidad de nuestro país de utilizar las técnicas de inducción de mutaciones para la creación de nuevas variedades de arroz. No solo en búsqueda de resistencia o tolerancia a factores bióticos o abióticos, sino para mejorar rendimientos y plantas con características deseables de acuerdo a las necesidades de nuestro país (Navarro, n.d.).

Es claro que el incremento en la producción basada en el uso de fertilizantes y compuestos químicos para el combate de plagas, enfermedades y malezas, la rotación de cultivos y el uso de maquinaria agrícola especializada no será suficiente (Ahloowalia y Maluszynsky 2001). Por lo que la creación de nuevas variedades con características agronómicas deseables constituye una vía importante para hacerle frente a los nuevos retos. Y la técnica de inducción de mutaciones constituye una herramienta eficiente para lograr avances importantes no solo en el cultivo de arroz, sino también en todos aquellos que lo requieran.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fases de la investigación

La investigación se realizó en tres fases:

- 1- Generación en campo de una población segregante (M_2) de arroz a partir de semillas irradiadas con Co^{60} .
- 2- Determinación de la dosis letal media (DL50) de cloruro de sodio (NaCl) en plántulas de arroz en un sistema hidropónico.
- 3- Selección de mutantes promisorios tolerantes a salinidad en hidroponía.

Localización

Esta investigación se llevó a cabo en tres sitios de trabajo. La siembra de la semilla irradiada (M_1) se hizo en la Estación Experimental Enrique Jiménez Núñez del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), la cual se ubica en el cantón de Cañas, provincia de Guanacaste, a $86^{\circ}08'$ longitud oeste $10^{\circ}20'$ latitud norte. A una altura de 10 msnm con una precipitación promedio es de 1700 mm anuales y una temperatura promedio de 28 grados centígrados.

La determinación de la DL50 y la primera selección de plántulas tolerantes se realizaron en un invernadero de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA), ubicada en la provincia de Heredia a $86^{\circ}08'$ longitud oeste $10^{\circ}20'$ latitud norte a una altura de 1155 msnm. La precipitación promedio es de 1700 mm anuales y una temperatura promedio de 28 grados centígrados.

Por último, el desarrollo de las plantas seleccionadas y la segunda selección se situó en la Finca Experimental Santa Lucía de la Universidad Nacional. Situada en Santa Lucía de Barva de la provincia de Heredia entre las coordenadas $84^{\circ}06'$ longitud oeste y $10^{\circ}01'$ latitud norte. A una altura de 1350 msnm con una temperatura de 21 grados centígrados y 86% humedad relativa.

FASE 1: Generación de una población segregante (M₂) de arroz a partir de semillas irradiadas con Co⁶⁰.

Material genético

Se utilizó una muestra de 1,5 kg de la semilla M₁ irradiada a 400 Gy.

Preparación del terreno

Se preparó una parcela de 273 m², se realizaron dos pases de rastra para desmenuzar el suelo. Se hizo una mínima nivelación mecánica para la distribución del riego y con la utilización de maquinaria se realizó un bancal para mantener el cultivo inundado durante su ciclo productivo.

Siembra

La siembra fue realizada de forma manual a chorro, con una densidad de siembra de 55 kg/ha. Se sembraron surcos de 21 metros de largo y 30 cm entre surcos.

Manejo

El manejo de las plantas se efectuó de acuerdo con la metodología del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) de Costa Rica para la producción de semilla. Además, fue necesario colocar una protección para el ataque de pájaros, por lo cual se utilizó malla de protección colocada antes de la floración.

Cosecha

La cosecha de la semilla se realizó de forma manual (Figura 3). Se cosechó con una humedad del 18% y se secó al sol hasta alcanzar 12% de humedad. Posteriormente se limpió y se trasladó a la Universidad Nacional (UNA), en donde se almacenó en una cámara de semillas (5°C y 50% HR) en el Laboratorio de Recursos Fitogenéticos de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA).



Figura 3. Cosecha de la semilla segregante M₂. Estación Experimental Enrique Jiménez Núñez. Cañas, Guanacaste. A (Corta), B (Aporrea), C (Limpieza), D (Transporte).

FASE 2: Determinación de la dosis letal media (DL50) de NaCl en plántulas de arroz CR5272 en sistema hidropónico.

Material genético

Se utilizaron semillas de la variedad CR5272 sin irradiar.

Tratamientos

Se contó con 11 tratamientos (Tabla 2). Los cuales consistieron en modificar la conductividad eléctrica de la solución nutritiva añadiendo una cantidad conocida de NaCl, sal común, en diferentes cantidades. Se preparó las soluciones salinas siguiendo las especificaciones de Bado et al (2016).

Tabla 2. Tratamientos y conductividad eléctrica en la determinación de la DL50 de salinidad en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*).

Tratamientos	Conductividad eléctrica (dS/m)	Gramos de sal/L
1 (Testigo)	1,17 (solución Yoshida)	0
2	2	0.42
3	4	1.22
4	6	2.56
5	8	3.66
6	10	4.78
7	12	5.92
8	14	7.08
9	16	8.26
10	18	9.46
11	20	10.96

* pH a 5.0 y 5.5 regulado por ácido clorhídrico (HCl)

Preparación del medio hidropónico

Se utilizó la solución nutritiva para arroz descrita por (Yoshida et al., 1976) (Tabla 3). Esta fue preparada en un recipiente de 50 litros en el cual se mezclaban las soluciones madre a razón de 1,25 mL por litro de solución preparada. La preparación consistió en mezclar y agitar una por una las soluciones conforme se llenaba el recipiente hasta completar el volumen requerido, de manera que todos los tratamientos contenían la misma cantidad de nutrientes. Al finalizar de preparar el volumen deseado, se evaluaba el pH y se ajustó entre 5.0 y 6.0, utilizando ácido clorhídrico 1 normal (Figura 4A). Luego de corregir el pH, se llenaban con la solución preparada los recipientes de los testigos que no requerían salinidad (Figura 4C).

Posteriormente, se tomaba del recipiente una cantidad conocida de la solución preparada y se modificaba con sal hasta llegar a la CE requerida. Luego se llenaban con esta solución nutritiva salina los recipientes de cada tratamiento (Figura 4B). El pH y CE de la solución nutritiva fue monitoreada y corregida con ayuda de pHmetro de la marca Extech y modelo PH100/PH110 (Figura 4A).

Tabla 3. Reactivos utilizados para preparar las soluciones madre de Yoshida para arroz.

Stock	Nombre	Nomenclatura	Cantidad/L
1	Nitrato de amonio	NH_4NO_3	91,4 g
2	Fosfato de sodio hidratado	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40,3 g
3	Sulfato de potasio	K_2SO_4	71,4 g
4	Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	117,33 g
5	Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	324 g
	Cloruro de manganeso	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
	Molibdato tetrahidratado de amonio	$(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,074 g
	Ácido bórico	H_3BO_3	0,934 g
6	Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,035 g
	Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,031 g
	Cloruro de hierro hexahidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7,7 g
	Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	11,9 g
	Ácido sulfúrico	1 M H_2SO_4	2,77 mL



Figura 4. Proceso para la preparación de la solución nutritiva A: recipiente de la solución y corrección de pH. B: recipiente para administrar la solución a cada tratamiento. C: aplicación de los tratamientos. D: siembra de semillas.

Siembra de semillas

La siembra se realizó en recipientes de plástico de 350 mL de capacidad de color oscuro para evitar proliferación de algas (Figura 4D). Las semillas fueron colocadas sobre láminas de estereofón de una pulgada de grosor con dimensiones de 7 cm x 7 cm con un espacio interior de 3 cm x 3 cm. Como soporte de las semillas se utilizó malla de nylon de 70%. Cada recipiente fue llenado de manera que las semillas estuvieran siempre en contacto con la solución nutritiva (2 a 3 milímetros sobre las semillas).

Manejo del cultivo

Posterior a la siembra las semillas estuvieron 8 días en oscuridad para su germinación. Finalizado este periodo todos los tratamientos se pusieron a la luz natural y se le realizaron

cambios de solución nutritiva cada tres días. La evaluación se realizó a los 21 días después de la siembra.

Diseño experimental

Se implementó un diseño irrestricto al azar con 3 repeticiones por tratamiento y 40 semillas por repetición.

Variables a evaluar

Se evaluó la germinación a los 7 días después de la siembra, sobrevivencia a los 21 días, la longitud del tallo (de la base del tallo al ápice de la hoja más larga), longitud de raíz (de la base del tallo a la parte más distal de la raíz más larga) y el número de hojas.

Análisis de datos

La determinación de la DL50 fue realizada mediante el análisis de la dosis respuesta por medio de un modelo de regresión no lineal utilizando R. Para todas las variables se realizó un análisis de variancia y posteriormente se realizó una prueba de LSD de Fisher ($p < 0,05$) para realizar comparaciones entre medias en InfoStat.

FASE 3: Selección de mutantes promisorios tolerantes a salinidad en hidroponía.

Esta fase consistió en cultivar el material M₂ durante todo su ciclo de cultivo con la técnica de la hidroponía. Para seleccionar mutantes tolerantes de susceptibles se cultivaron en una solución nutritiva con alta CE, por adición del NaCl, en dos momentos de su ciclo. Desde el día 0 hasta los 21 días y en prefloración durante 25 días, seguidos por periodos de recuperación con una solución nutritiva sin sal.

Para esta fase lo primero que se hizo fue implementar un sistema de selección hidropónico que permitiera el desarrollo adecuado de las plantas, el cual se describe a continuación.

Descripción del sistema hidropónico:

Se construyeron dos sistemas hidropónicos, uno para la selección individual de plántulas tolerantes a y otro para el desarrollo de plantas seleccionadas hasta la cosecha. Estos se ubicaron en dos invernaderos, uno en la Escuela de Ciencias Agrarias y el otro en la Finca Experimental Santa Lucía respectivamente. Básicamente consisten en un sistema hidropónico tipo raíz flotante sin retorno y sin aireación, donde las raíces de las plantas de arroz están en contacto directo con la solución nutritiva. Debido a que ambos comparten similitudes en su diseño. A continuación, se describe cada una de sus partes.

Bandejas para siembra hidropónica

Se utilizaron bandejas de plástico con dimensiones externas de 73 cm de largo, 42,5 cm de ancho y 19,5 cm de altura; y dimensiones internas de 69,5 cm de largo, 39 cm de ancho y 18 cm de altura (Figura 5). A cada bandeja se le hizo una salida para el drenaje en la esquina inferior izquierda.



Figura 5. Bandejas utilizadas para implementar el sistema hidropónico.

Reservorio de solución nutritiva

Compuesto por un tanque tricapa de 450 litros. Su finalidad consistió en tener la suficiente capacidad para contener la solución nutritiva de todas las plantas en una sola preparación, de manera que todas contaran con la misma proporción de nutrientes y no se incurriera en variaciones en el contenido de estos (Figura 6).

Debido a que la posición del desagüe se encuentra a un costado del tanque, siempre queda un remanente de líquido importante. Por lo cual, se le realizó una perforación en la parte inferior para evacuar la solución sin dejar remanentes. Ubicando el tanque a 1,5 m de altura se favoreció la distribución de la solución por gravedad (Figura 6).



Figura 6. Reservorio utilizado para la preparación de la solución nutritiva.

Distribución de la solución nutritiva

Para distribuir la solución se utilizó tubería poliducto de media pulgada, construyendo una línea principal de riego sobre un costado de las bandejas (Figura 7). Sobre esa línea se adaptaron conexiones de poliducto que conducían la solución nutritiva hacia las bandejas. La entrada de la solución se construyó de manera independiente para cada bandeja.



Figura 7. Ilustración general del sistema de distribución de la solución nutritiva.

Evacuación de la solución nutritiva

Se utilizó tubería pvc de media pulgada para descartar la solución nutritiva de desecho. Se conectaron todos los drenajes a nivel del suelo del invernadero, el cual posee una pendiente del 3%. Todos los drenajes se conectaron a una tubería principal que desagua la solución fuera del invernadero (Figura 8).



Figura 8. Ilustración general del diseño construido para el drenaje.

Soporte de las plantas

Una vez construido el sistema hidropónico se implementó un sistema de soporte para las plantas, el cual estaba compuesto por láminas de estereofón de 1 ½ pulgada adaptadas a las dimensiones internas de las bandejas. Se utilizaron 4 tipos de soporte (Figura 9), los cuales variaron de acuerdo con el estado de desarrollo de las plantas.

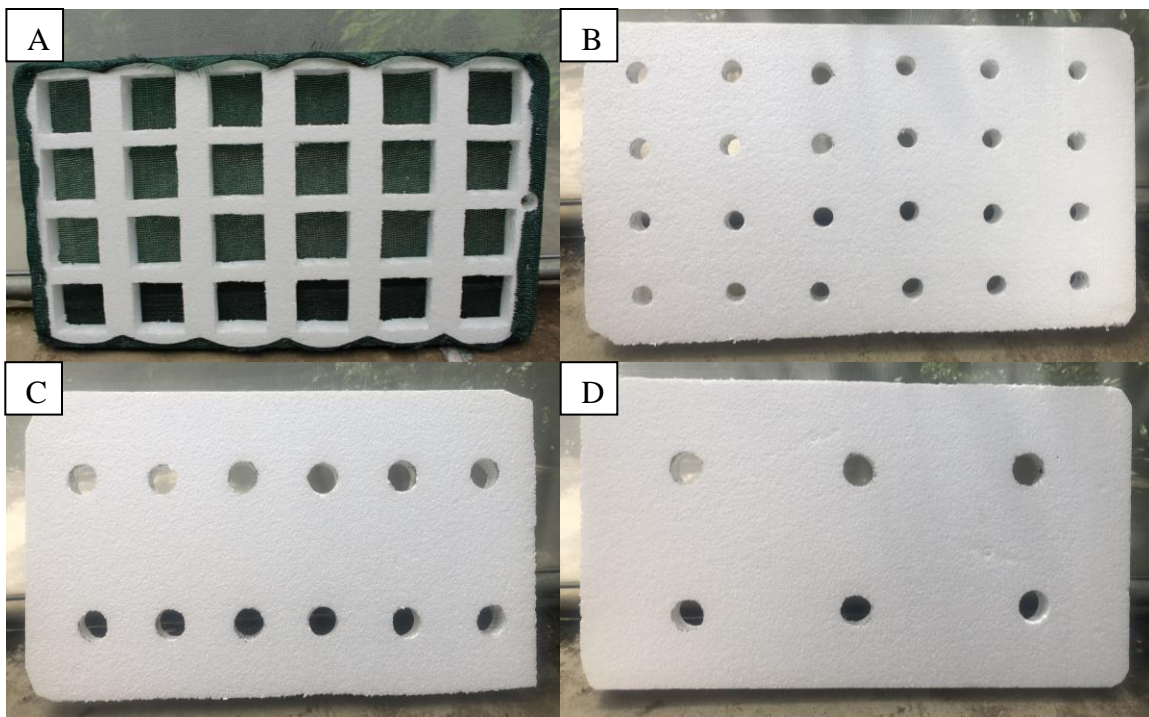


Figura 9. Diferentes soportes utilizados para el crecimiento de las plantas. A: 3600 semillas. B: 24 plántulas. C: 12 plantas. D: 6 plantas.

Una vez implementado el sistema hidropónico con sus variantes se inició con el proceso de selección de mutantes candidatos tolerantes al estrés salino, el cual se hizo en dos momentos de presión de selección. A continuación, se describe cada uno de esos momentos:

PRIMERA SELECCIÓN

Material genético

Se utilizaron las semillas segregantes de una población M₂ irradiadas a 400 Gy y semillas sin irradiar en ambos casos de la variedad CR5272.

Tratamientos

Se contó con un total de tres tratamientos: dos en solución nutritiva salina, más un testigo con solución nutritiva sin sal (Tabla 4).

Tabla 4. Tratamientos en la selección de materiales tolerantes a salinidad.

Tratamiento	Material genético	Irradiación (Gy)	CE (dS/m)	N° de semillas
1	M ₂	400 Gy	14	9450
2	CR5272	0	14	1350
3	CR5272	0	1.17	3600

Primer periodo de estrés salino

El material M₂ y CR5272 con sal fueron estresados por salinidad modificando la CE de la solución nutritiva a 14 dS/m, utilizando sal común (NaCl), desde la siembra hasta que las plántulas cumplieron 21 días de edad. El tratamiento CR5272 sin sal fue cultivado en condición normal durante todo su ciclo.

Preparación de la solución nutritiva

La solución nutritiva fue preparada en un reservorio de 450 litros de capacidad y en el cual se mezclaban las soluciones madre a razón de 1,25 mL por litro de agua preparada. La preparación consistió en mezclar y agitar una por una las soluciones con forme se llenaba el reservorio hasta completar el volumen requerido. Al finalizar la preparación, se evaluaba el pH y se corregía entre 5.0 y 6.0 utilizando ácido clorhídrico 1 normal. Luego de corregir el pH, se llenaba con la solución normal la bandeja del testigo no salino.

Posteriormente, la CE de la solución nutritiva restante en el reservorio fue modificada con sal hasta llegar a los 14 dS/m. Luego de modificarla, se llenaban con esta solución las bandejas de los tratamientos que requerían estrés salino.

Siembra

La siembra se realizó utilizando el soporte para plántulas, con una densidad de 150 semillas por cada compartimento para un total de 3600 semillas por bandeja (Figura 10).



Figura 10. Proceso de siembra de los tratamientos para la selección individual de materiales tolerantes a salinidad.

Manejo del cultivo

Posterior a la siembra, todas las semillas fueron tapadas durante 8 días por una cubierta oscura para favorecer germinación. Finalizado este periodo, todas las semillas se pusieron a la luz natural y se le realizaron cambios de solución nutritiva cada tres días hasta cumplir los 21 días de edad. Cumplido este periodo de 21 días bajo estrés, se procedió a realizar la selección de los mutantes promisorios y posterior a esto, fueron rescatadas y cultivadas en solución nutritiva normal hasta el siguiente periodo salino.

Diseño experimental

Debido a la naturaleza del material segregante, no es posible hacer replicas, aleatorizaciones, bloques o algún otro tipo de diseño ya que cada semilla o planta presenta teóricamente una conformación genética distinta. Sin embargo, para tener criterio de selección y evaluación de comportamiento de las semillas y plantas segregantes, se utilizaron testigos cultivados en solución nutritiva salinizada y no salinizada.

En el caso del testigo sin sal se sembraron semillas de la variedad CR5272 en una bandeja independiente. Para el testigo con sal, dentro cada una de las bandejas con la semilla M₂ fueron sembrados 3 compartimentos distribuidos al azar con semilla de CR5272 (Figura 11).

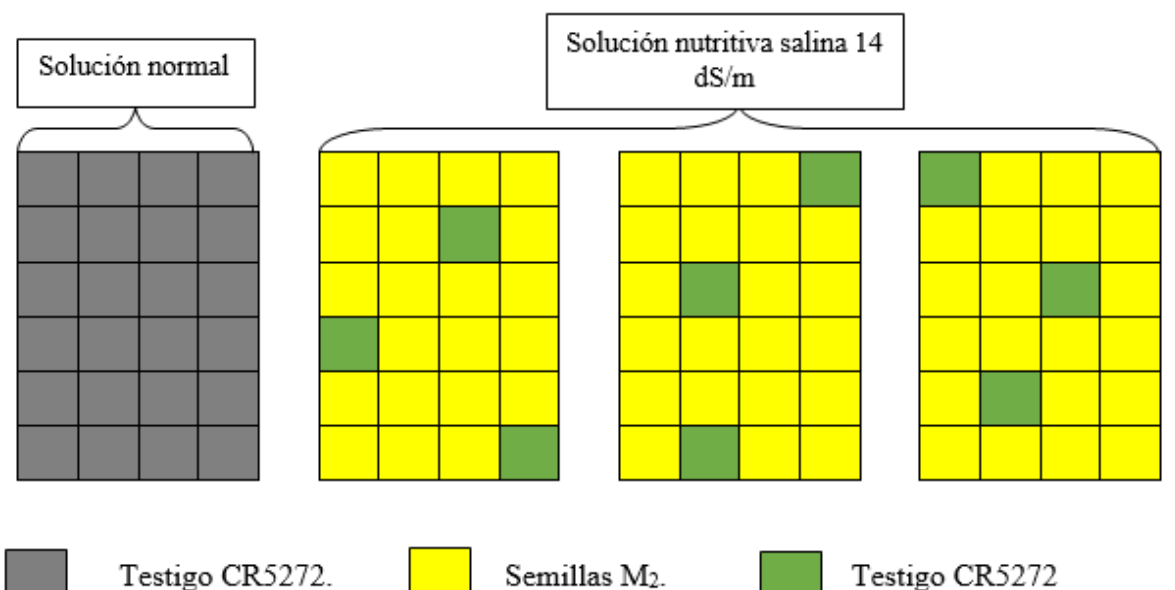


Figura 11. Esquema de la distribución de los tratamientos en las bandejas para la selección individual de plántulas tolerantes a salinidad.

Criterio para la selección individual de mutantes M₂ con tolerancia a salinidad

Para la selección de los mutantes tolerantes se tomó en cuenta una variable cualitativa que describe la respuesta fenotípica de las plántulas ante el estrés salino. Esta variable llamada “Grado de Tolerancia” (Tabla 5), es usada para la evaluación y selección de los materiales tolerantes a salinidad (Bado et al., 2016).

La selección comprendió rescatar todas aquellas plántulas M₂ que presentaran calificaciones entre 1 y 5. En este caso las plántulas del testigo sin sal, al crecer en solución nutritiva normal, fueron consideradas como plántulas con un comportamiento de calificación 1. En la figura 12 se establece de forma visual plantas según la escala de tolerancia a salinidad.

Tabla 5. Escala de tolerancia a salinidad para la selección de plántulas tolerantes.

Calificación	Observación visual	Grado de tolerancia
1	Crecimiento normal, hojas sin síntomas de toxicidad.	Altamente tolerante
3	Crecimiento casi normal, pero blanqueamiento ocasional en las puntas de las hojas, algunas enrolladas.	Tolerante
5	Crecimiento severamente retardado, hojas más enrolladas, poca elongación de las hojas	Moderadamente tolerante
7	Completa suspensión del crecimiento, mayor cantidad de hojas secas, plántulas muertas.	Susceptible
9	Mayor cantidad de plántulas muertas o en procesos de muerte.	Altamente susceptible

Fuente: (Bado et al., 2016)



Figura 12. Escala de tolerancia a salinidad utilizada para favorecer el proceso de selección individual de plántulas M₂ de 400 Gy de esta investigación.

VARIABLES EVALUADAS

A cada una de las plántulas, incluyendo testigos, se les determinó el grado de tolerancia, longitud del tallo (de la base del tallo al ápice de la hoja más larga), longitud de raíz (de la base del tallo a la parte más distal de la raíz más larga) y el número de hojas. Con esto se generó de forma descriptiva una tabla con los datos obtenidos. En el caso de ambos testigos CR5272 se generaron promedios de cada uno y para el caso de los mutantes únicamente se mostró el dato individual de cada uno. Para esto se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2015.

SEGUNDA SELECCIÓN

Material vegetal

Se utilizaron los 30 mutantes promisorios seleccionados a los 21 días, 12 plántulas seleccionadas al azar del testigo sin sal y 12 plántulas seleccionadas al azar del testigo con sal. En total se evaluaron en esta segunda selección 54 plantas.

Trasplante

Las plantas fueron trasladadas al invernadero de la Finca Experimental Santa Lucía y trasplantadas a un sistema hidropónico en donde se utilizaron soportes de 24 plántulas por bandeja.

Manejo

Posterior al trasplante, cuando las plantas fueron creciendo se utilizaron los demás soportes hasta llegar a 6 plantas por bandeja. Se realizaron cambios de solución nutritiva sin sal cada tres días hasta la prefloración. Se realizaron 3 aplicaciones de fungicida AMISTAR 50 WG a dosis de 250 g/ha y 3 aplicaciones de insecticida Diazinon 60 EC a dosis de 0,5 L/ha, no se realizó ninguna fertilización a parte de la solución nutritiva.

Segundo periodo de estrés salino

El testigo CR5272 sin sal continuó su ciclo de cultivo en condición normal hasta la cosecha. El testigo CR5272 con sal y los mutantes promisorios fueron sometidos a una presión de selección en prefloración, modificando la CE de la solución nutritiva a 14 dS/m y este estrés comprendió un total de 25 días.

Arreglo espacial de las plantas en el invernadero

Los testigos de CR5272 sin sal se mantuvieron juntos en sus respectivas bandejas hasta la cosecha. Los mutantes y el CR5272 con sal fueron cultivados, desarrollados y estresados por salinidad en bandejas compartidas, de manera que siempre existiera al menos un testigo CR5272 con sal creciendo con los mutantes. Para esta etapa se utilizaron un total de 9 bandejas con 6 plantas cada una (Figura 13).

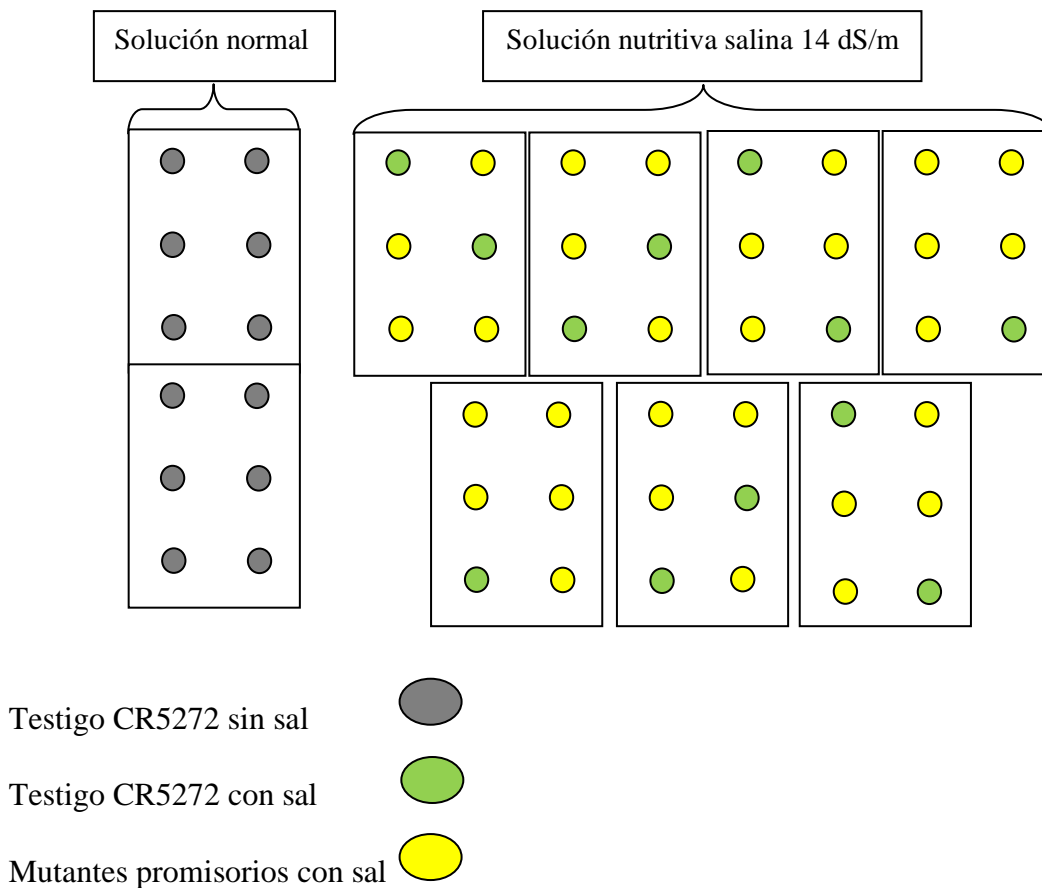


Figura 13. Distribución de las plantas mutantes y los testigos en el invernadero en un sistema hidropónico.

VARIABLES EVALUADAS

Comportamiento antes y después de estrés: se evaluó la altura y el número de macollas de cada planta antes y después del segundo estrés salino. En altura se utilizó cinta métrica midiendo desde la base del tallo hasta la punta de la hoja o panícula más alta y se contó el número de macollas de cada una.

Duración de etapas fenológicas: se contó el número de días de cada planta al llegar a prefloración, floración y cosecha.

Variables postcosecha: realizada la cosecha a cada planta se le midió una serie de variables de rendimiento en las cuales se incluyen:

- Altura de las plantas: se realizó en la cosecha.

- Número de macollas: se realizó en la cosecha.
- Número de panículas: se contó el número de panículas de cada planta
- Longitud de panículas: se midió desde el nudo o anillo ciliar hasta la punta del grano más largo.
- Espigas por panícula: se contó el número de espigas de cada panícula de cada planta
- Granos por panícula: se estimó utilizando la siguiente ecuación

$$\text{Granos por panícula} = \frac{\text{Número total de granos por planta}}{\text{Número de panículas}}$$

- Granos llenos

Para el caso del testigo no salino, se tomó una muestra de 100 granos de cada planta y se contó el número de granos llenos. Para el caso del testigo salino y los mutantes se contó el número de granos que lograron llenar.

- Granos vanos

Se tomaron 3 muestras de 100 granos de cada planta y se contó el número promedio granos vanos.

- Esterilidad: fue estimada con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Esterilidad} = \frac{\text{Número de granos vanos}}{\text{Número total de granos}} \times 100$$

Análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo del comportamiento de cada una de las variables analizadas a cada uno de los mutantes candidatos seleccionados. Para esto, se estableció una serie de tablas, figuras y gráficos. En el caso de ambos testigos CR5272 se generaron promedios de cada uno y para el caso de los mutantes únicamente se mostró el dato individual de cada uno. Para esto se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2015.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FASE 1: Generación de una población segregante (M_2) de arroz a partir de semillas irradiadas con Co^{60} .

Para desarrollar la población M_2 se utilizó la semilla M_1 de 400 Gy, la cual corresponde a la DL50 en la cual, de acuerdo a diversas investigaciones, se favorecen las mutaciones inducidas para características deseables (Ambavane et al., 2015). Esta DL50 para CR5272 fue determinada por el programa BIOVERFI en evaluaciones previas. Radiaciones menores o mayores a esta provocarían características indeseables como estimulación de procesos fisiológicos no heredables o aberraciones que impiden el crecimiento o incluso provocando la muerte de plantas (FAO/IAEA, 2018).

Algunos autores han utilizado diferentes dosis de radiación en el cultivo de arroz para mejoramiento genético como 150, 250 y 350 Gy (González & Pérez, 1997), 345 Gy (Harding et al., 2012), 150, 300, 450 y 600 Gy (Silvera, 2017); demostrando que distintas variedades de arroz tienen respuestas variadas a la radiación, por lo que la dosis de 400 Gy seleccionada, en las condiciones que fue tratada, podría ser adecuada para esta variedad.

La población M_2 se produjo realizando un ciclo de cultivo completo del material M_1 . Esto debido a que la mayoría de las mutaciones inducidas en poblaciones M_1 son de carácter recesivo, por lo tanto, el fenotipo mutante no puede ser observado hasta que la mutación sea homocigota. Para esto es necesario que los posibles cambios en el ADN, provocados por la radiación, sufrieran recombinación durante la meiosis para tratar que las mutaciones inducidas presenten una condición homocigota y logren manifestarse en la siguiente generación M_2 (FAO/IAEA, 2018).

Del área sembrada ($273m^2$) se cosechó un total de 14 kg de semilla M_2 . Este bajo rendimiento obtenido en esta investigación pudo estar asociado a la alta esterilidad observada en el lote de cultivo. Este comportamiento concuerda con Silvera (2017) donde reporta incrementos en los porcentajes de esterilidad de plantas M_1 en dos variedades de arroz irradiadas a diferentes dosis de radiación gamma. Esto, según FAO/IAEA (2018), se debe a que las plantas M_1 sufren desordenes fisiológicos como resultado de la radiación incluyendo retraso en el crecimiento, esterilidad y muerte de plantas, ligado a daños en los cromosomas.

Al respecto, Tinoco & Acuña (2009) reportan para la variedad CR5272 rendimientos entre 5,5 y 6 toneladas por hectárea. A pesar de esto, la semilla M_2 generada tubo un menor rendimiento. Sin embargo, la cantidad de material segregante obtenido fue suficiente para el desarrollo de esta investigación y de trabajos futuros relacionados.

En la figura 14 se muestra los diferentes estados de desarrollo de las plantas M_1 durante el proceso de obtención de la M_2 . En la figura 15 se muestra la semilla M_2 obtenida para ser almacenada en cámara fría.

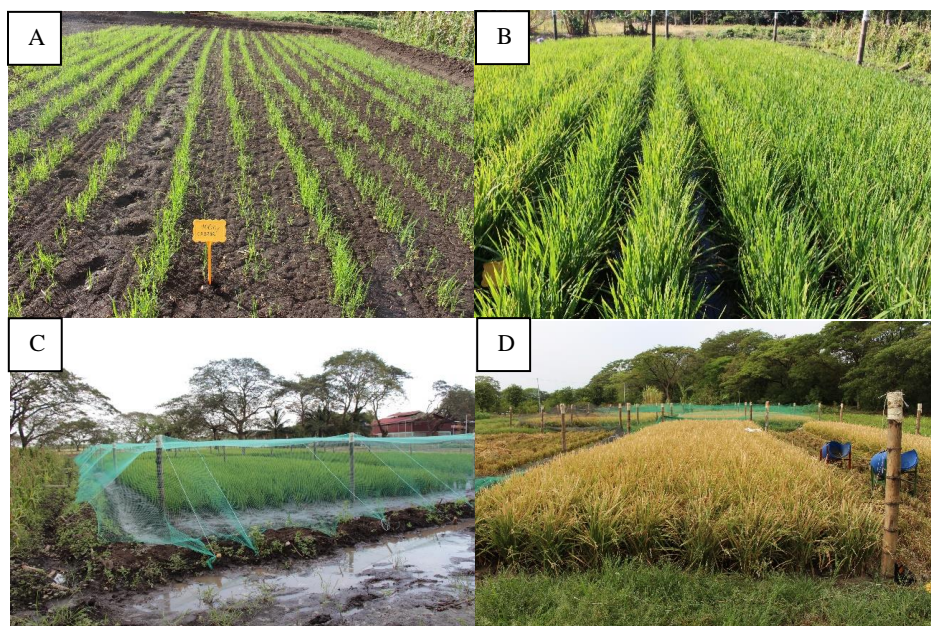


Figura 14. Diferentes estados de desarrollo de las plantas M_1 . Estación Experimental Enrique Jiménez Núñez. Cañas, Guanacaste. A (Plántulas), B (Macollamiento), C (Floración), D (Grano maduro).



Figura 15. A: Semilla segregante M_2 seca y limpia. B Semilla empacada para ser almacenada en cámara fría. Laboratorio de Recursos Fitogenéticos, Universidad Nacional de Costa Rica.

FASE 2: Determinación de la dosis letal media (DL50) de NaCl en plántulas de arroz CR5272 en sistema hidropónico

La figura 16 muestra el efecto de la salinidad sobre las plántulas de la variedad CR5272 a los 21 días de edad. Se evidencia que cada aumento de CE produce una reducción tanto de follaje como del sistema radical y crecientes síntomas de toxicidad en hojas. Estos síntomas fueron visibles a partir de los 9 días edad desde los 4 dS/m, con mayores afectaciones a partir de los 12 dS/m en adelante.

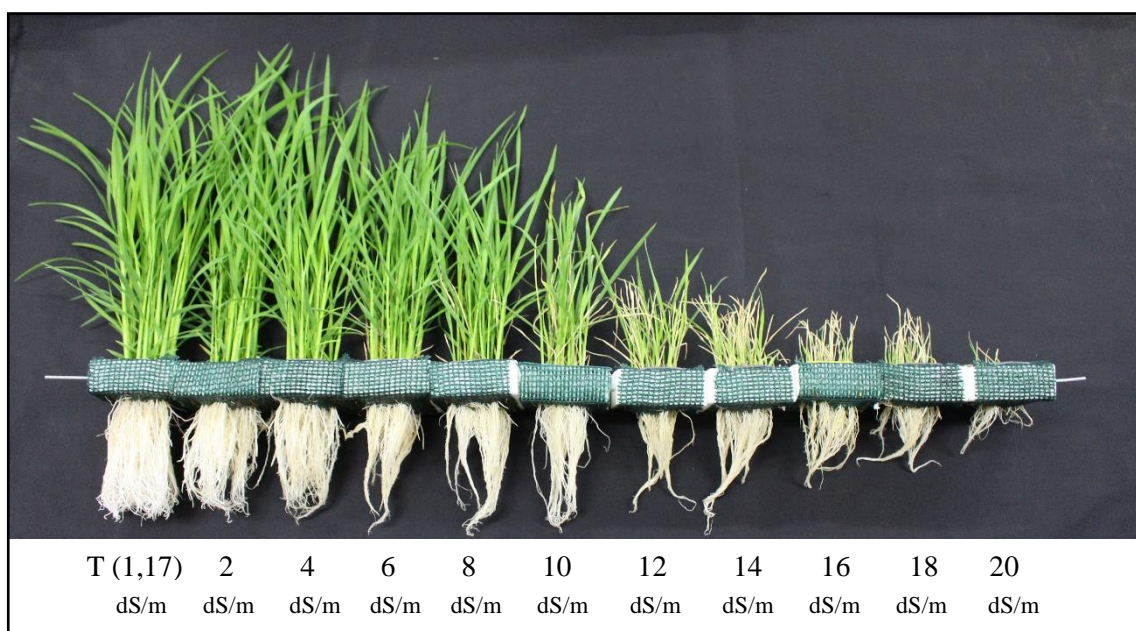


Figura 16. Aspecto general de plántulas de arroz de la variedad CR5272 en diferentes niveles de conductividad eléctrica por NaCl a los 21 días de edad.

Germinación

La germinación no presentó diferencias significativas hasta los 12 dS/m (Anexo 1). Lo cual concuerda con las versiones de FAO (2012) donde indica que el arroz posee una cierta tolerancia a la salinidad durante la germinación. Esto podría deberse al ajuste osmótico que llevan a cabo las semillas para superar el potencial del medio en el que está inmersa y poder germinar (Hakim et al., 2010) .

Al respecto, diversos autores reportan disminuciones en la germinación de semillas de arroz por efecto de la salinidad (Hakim et al., 2010; Kazemi & Eskandari, 2011; Mint et al.,

2015) donde justifican un efecto tóxico de ciertos iones y una reducción del potencial hídrico del agua del medio, lo cual limita a las semillas el acceso al agua.

Esta variable se vio afectada significativamente a partir de una CE de 14 dS/m y se redujo a un máximo de 48,33% a los 16 dS/m (Anexo 1). Resultados similares fueron reportados por Hakim et al. (2010) donde evaluaron 12 variedades de arroz a distintas concentraciones salinas, encontrando que la mayoría de estas mostraron una reducción significativa con una CE de 16 dS/m. Dicha disminución se debe, según Liu et al. (2018), al efecto inhibitorio del NaCl sobre los genes involucrados en la producción de giberelinas sintetizadas durante el proceso de germinación.

Sobrevivencia

En esta variable se observó una tendencia similar a la germinación, en la cual se encontró que hasta los 14 dS/m empiezan a evidenciarse afectaciones significativas en la sobrevivencia (Anexo 1). La alta sobrevivencia puede estar influenciada a que los experimentos de hidroponía o forraje verde hidropónico se desarrollan en ambientes idóneos, donde la nutrición y el pH son ideales y se encuentran alejado de factores bióticos y abióticos que pueden afectar los rendimientos (Gamero, 2015). Caso contrario encontraron Cabalceta & Cordero (1991) en la provincia de Guanacaste de Costa Rica, donde reportan porcentajes de sobrevivencia cercanos al 0% en dos variedades de arroz costarricense con una CE de 7 dS/m a los 20 dds pero utilizando suelo salino y donde las plantas se encontraban en interacción con los diversos factores bióticos y abióticos del lugar.

Altura de la planta

Esta fue la única variable que presentó una tendencia decreciente con cada aumento de CE (Figura 18). Lo observado se debe a que la salinidad afecta el crecimiento de las plantas debido al proceso de inducción de estrés salino, toxicidad por iones de sodio y cloro, desbalance nutricional y efecto de especies reactivas de oxígeno (Lamz & González, 2013). En esta investigación hubo diferencias significativas desde los 2 dS/m en adelante (Anexo 1), concordando con resultados reportados en arroz (Suárez & González, 2004; Laynez et al. 2018), frijol (Chulim et al., 2014) y maíz (Laynez et al., 2008).

Longitud de raíz

La raíz presentó estabilidad en longitud hasta los 12 dS/m (Figura 18). Luego mostró una reducción significativa a partir de los 14 dS/m en adelante (Anexo 1). Esto puede deberse a que es el primer órgano de interacción de la planta con la salinidad y, según explica Reddy et al. (2017), realiza la mayor parte del trabajo en la protección contra la absorción del Na^+ y Cl^- , por lo cual, en sitios con altos contenidos de sales se dificulta la captación de agua del medio más hipertónico. Es por ello que la estabilidad de longitud de la raíz encontradas en los tratamientos menores a 14 dS/m (Figura 18) puede considerarse un comportamiento de adaptación al ambiente salino para favorecer una mayor captación de agua (SEFV, 2016).

Número de hojas

En el número de hojas no hubo diferencias significativas con CE entre los 2 y 8 dS/m, CE posteriores sí mostraron diferencias (Anexo 1), además de recobrar la tendencia decreciente mostrada en altura de la planta (Figura 18). Esta variable se comportó similar a la longitud de raíz en cuanto a que no hubo un rango amplio de hojas entre tratamientos que permitiera encontrar un 50% de reducción (Anexo 1).

Determinación de DL50 de salinidad por medio de análisis dosis respuesta con regresión no lineal

Las DL50 derivadas por la regresión no concordaron exactamente en una única CE para todas, sino que se encontró un rango que va desde los 11.75 hasta los 19.87 dS/m (Tabla 6). Lo cual es producto de que cada una de las variables presentó diferentes respuestas a la salinidad. Estudios de determinación de DL50 en arroz, comúnmente de radiosensibilidad, analizan variables como las de ésta investigación, por ejemplo González & Pérez (1997), Zamora (2014), Ambavane et al. (2015), Sanjinez (2016) y Madriz et al. (2020). Sin embargo, exponen una o dos variables clave que se utilizan para concluir las DL50. En la siguiente tabla se muestra un resumen de las diferentes DL50 derivadas de cada variable estudiada.

Tabla 6. Resumen de los valores de las DL50 para NaCL obtenidas del análisis dosis-respuesta por medio de regresión no lineal de cada variable.

Variable	DL50 (dS/m)	E.E.	t-valor	p-valor
Germinación (%)	13.29	0,91	14,54	7.499e-15 ***
Sobrevivencia (%)	12.44	0,72	17,17	2e-16 ***
Altura de la planta (cm)	11.75	0,27	42,63	2.2e-16 ***
Longitud raíz (cm)	14.57	0,57	25,18	2.2e-16 ***
Número de Hojas	19,87	0,44	44,94	2.2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

La altura de la planta fue la variable que mostró de mejor forma el efecto de los tratamientos salinos en las plántulas de arroz a los 21 de edad. En contraste con las demás variables que evidenciaron inconsistencias en los resultados (Figura 17). Por esto, fue considerada como la variable indicadora para determinar que la DL50 de salinidad para CR5272 corresponde a 11.756 dS/m, basado en una reducción de la altura en un 50%.

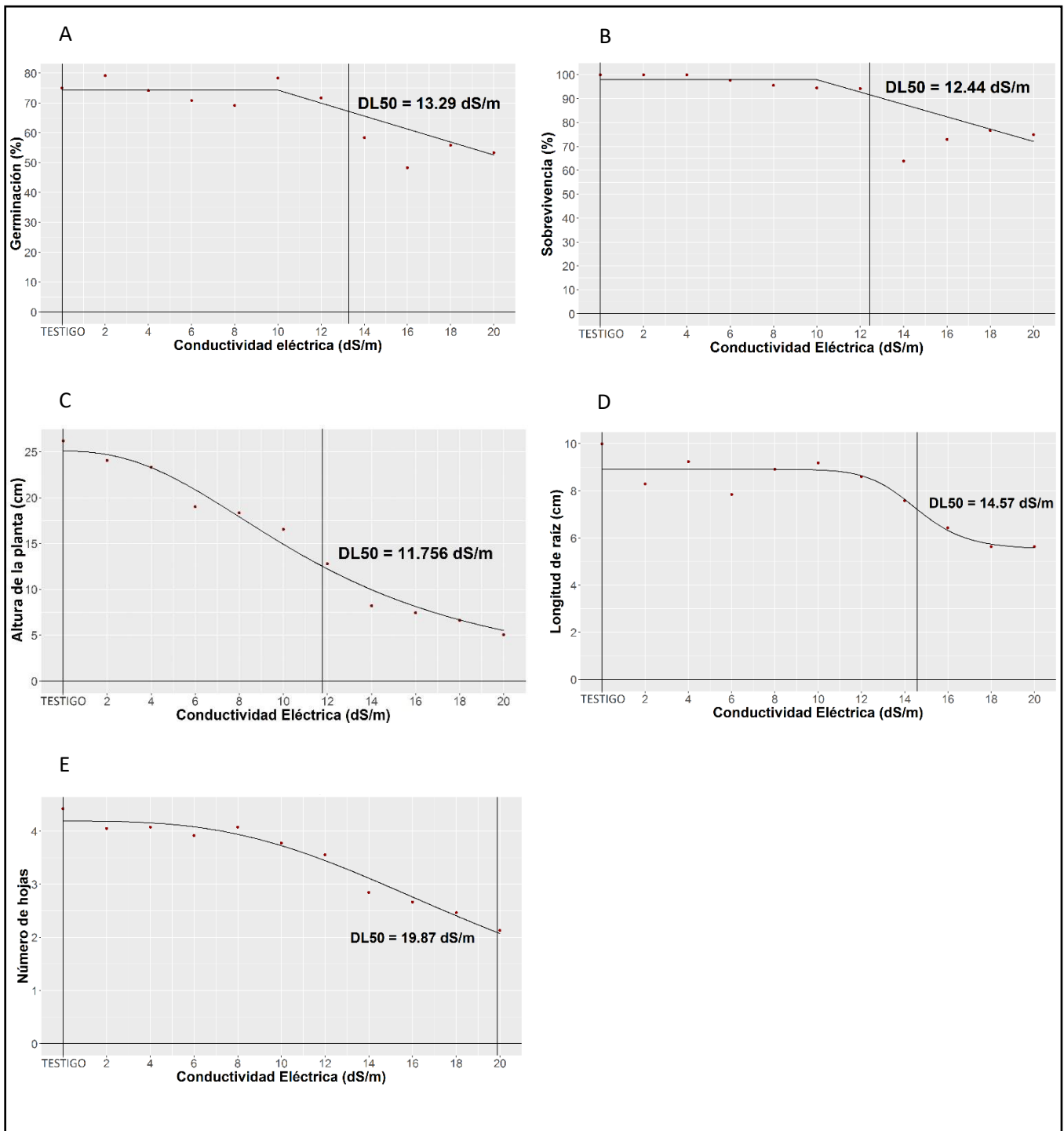


Figura 17. Curvas de la determinación de la DL50 a salinidad de CR5272, obtenidas por medio de un modelo de regresión no lineal: A) Germinación, B) Sobrevivencia), C) Altura de planta, D) Longitud de raíz, E) Número de hojas.

FASE 3: Selección de plantas M₂ tolerantes a salinidad en hidroponía.

En un ensayo previo de estrés salino se utilizó la dosis de 12 dS/m (DL50) en semillas de CR5272. Sin embargo, esta dosis fue poco satisfactoria para discriminar plantas tolerantes debido a que gran parte del material CR5272 evidenció pocos síntomas dificultando el descarte visual. Este resultado junto con el observado en la DL50 (11.57 dS/m) indicaría que esta variedad CR5272 podría presentar un cierto grado de tolerancia a salinidad. Por lo cual, para someter a estrés salino la semilla M₂, se decidió utilizar una dosis superior a la DL50, utilizando la dosis de 14 dS/m para ejercer mayor estrés sobre las plántulas y favorecer la selección de mutantes promisorios.

PRIMERA SELECCIÓN

En la figura 18 se muestra el efecto que produjo la solución salina de 14 dS/m en las plántulas a los 21 dds. Donde se observa un efecto severo principalmente en el desarrollo foliar respecto al testigo en la solución normal (Figura 18A). Produjo la muerte de una gran cantidad de plántulas que no lograron tolerar dicho estrés (Figura 18B). Resultados similares a los encontrados en esta investigación fueron reportados por diversos autores, los cuales han estudiado el efecto de la salinidad sobre la germinación y plántulas de diferentes cultivares de arroz. Estos autores reportan efectos similares como poco desarrollo radicular, foliar y muerte. Tal es el caso de Dionisio & Tobita (2000), Morales et al (2004), Suárez & González (2004), Hakim et al. (2010), Kazemi & Eskandari (2011) y Mint et al. (2015). Coinciden en que estos efectos se deben a la reducción del potencial osmótico, lo que podría causar una disminución en el contenido hídrico de las células y a la acumulación de iones tóxicos como el Na⁺ y Cl⁻ lo cual provocaría una difícil translocación de nutrientes. Los resultados de esta investigación podrían estar asociados a los factores mencionados anteriormente.

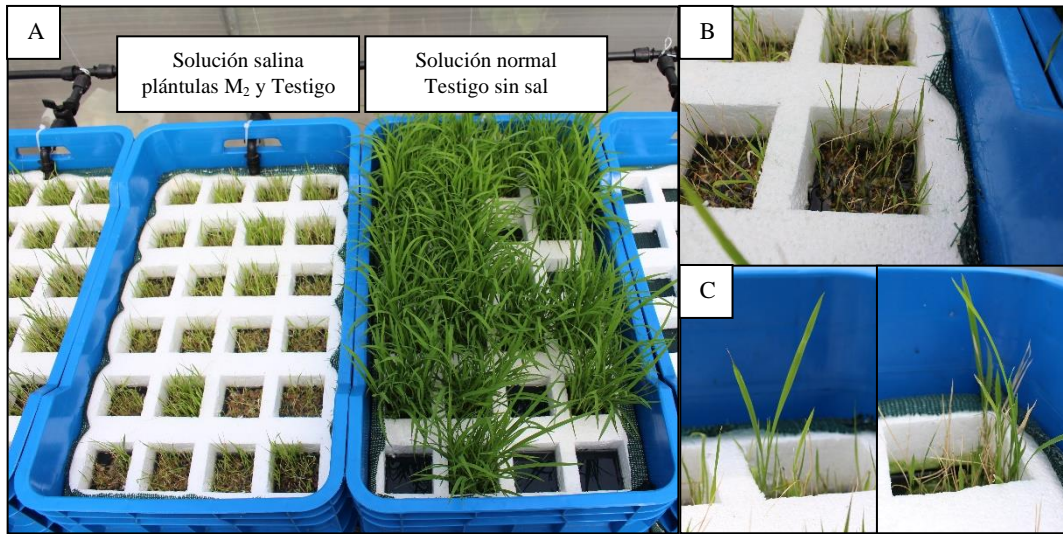


Figura 18. Ensayo para la selección de plántulas M₂ de 400 Gy tolerantes a salinidad a los 21 dds. A (bandejas con solución con sal y sin sal), B (plántulas M₂ susceptibles), C (plántulas M₂ tolerantes).

Sin embargo, dentro de la población M₂, fue posible encontrar plántulas con un crecimiento destacado en la solución salina (Figura 18C). Estas plántulas fueron consideradas como mutantes promisorios al estrés salino. Dicho comportamiento, tomado como un indicador de tolerancia, favoreció el proceso de selección individual (Figura 19), el cual concuerda con Bado et al (2016) para la selección individual de plántulas con la habilidad de crecer en una solución nutritiva salinizada.

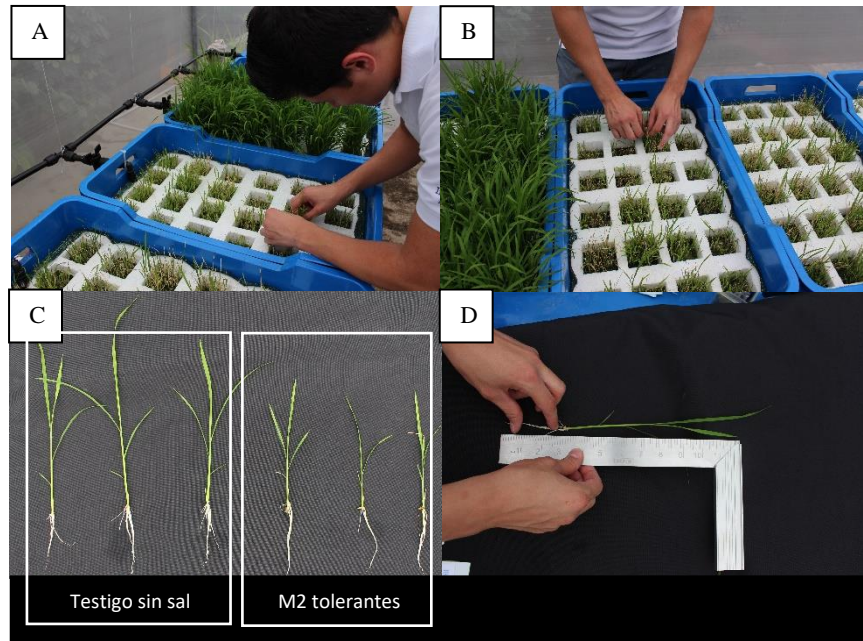


Figura 19. Proceso de selección de los genotipos tolerantes a salinidad a 21 días después de la siembra. A y B (rescate de plántulas), C (materiales seleccionados), D (medición de variables cuantitativas).

Estas plántulas, que mostraron esas características promisorias, podrían presentar ventajas sobre las demás en cuanto al ajuste osmótico y la translocación de nutrientes en condiciones de estrés salino (Rodríguez et al., 2019). Estas podrían haber desarrollado mecanismos de tolerancia a salinidad, los cuales según Reddy et al. (2017) se pueden resumir en la exclusión de iones, tolerancia osmótica y tolerancia tisular.

Un total de 30 plántulas M_2 con características promisorias, las cuales cumplían con el criterio de selección propuesto. Fueron recuperadas de la solución salina y clasificadas de acuerdo su grado de tolerancia. Con esta clasificación, se encontró plántulas que presentaron distinto grado de tolerancia. Lo cual permitió establecer un porcentaje de selección para cada clasificación. En la siguiente tabla se muestra los porcentajes obtenidos para cada uno (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de selección de mutantes M₂ 400 Gy en solución nutritiva salina (14 dS/m) a los 21 días de edad, de acuerdo con su grado de tolerancia.

Grado de tolerancia	Grado 1	Grado 3	Grado 5
	Altamente tolerante	Tolerante	Moderadamente tolerante
Tipo de semilla	M ₂ 400 Gy	M ₂ 400 Gy	M ₂ 400 Gy
N° días en salinidad	21	21	21
CE (dS/m)	14	14	14
N° mutantes seleccionados	0	2	28
Porcentaje de selección (%)	0	0,021	0,296

En la tabla anterior se observa como existe un incremento en el porcentaje de selección con forme disminuye el grado de tolerancia. Esto quiere decir que mientras más estricto sea el parámetro de selección, menos mutantes serán seleccionadas. Tal es así, que se encontró un 0% cuando se trató de seleccionar plántulas altamente tolerantes (Grado 1) y aumentó a un 0,021% y 0,296% cuando el grado de tolerancia no fue tan estricto (Grado 3 y 5).

Descripción del grado de tolerancia y parámetros cuantitativos a los 21 dds.

En la tabla 8 se muestra el grado de tolerancia, altura, longitud de la raíz y el número de hojas de los 30 mutantes seleccionados a los 21 días por su tolerancia a salinidad.

Tabla 8. Grado de tolerancia y parámetros cuantitativos de los mutantes seleccionados.

Planta	Grado de tolerancia	Altura (cm)	Raíz (cm)	Nº hojas
Testigo sin sal	1*	26 *	9 *	4 *
Testigo con sal	5*	14 *	10 *	4 *
ECA400-01	3	18	11	5
ECA400-02	5	14	12	4
ECA400-03	5	14	13	4
ECA400-04	5	14	12	4
ECA400-05	5	14	11	4
ECA400-06	5	13	14	4
ECA400-07	3	17	11	4
ECA400-08	5	13	13	3
ECA400-09	5	15	13	4
ECA400-10	5	15	10	3
ECA400-11	5	14	13	3
ECA400-12	5	15	11	4
ECA400-13	5	15	9	3
ECA400-14	5	14	14	4
ECA400-15	5	14	10	4
ECA400-16	5	13	10	3
ECA400-17	5	13	10	4
ECA400-18	5	13	11	4
ECA400-19	5	13	13	4
ECA400-20	5	12	13	4
ECA400-21	5	13	9	2
ECA400-22	5	13	12	4
ECA400-23	5	13	12	4
ECA400-24	5	13	12	4
ECA400-25	5	13	8	4
ECA400-26	5	13	10	4
ECA400-27	5	13	12	4
ECA400-28	5	12	8	3
ECA400-29	5	12	12	4
ECA400-30	5	11	13	3

* Dato promedio de 12 plantas

Diferentes autores como Bado et al. (2016) o Reddy et al. (2017) exponen la importancia de contar con testigos tolerantes y susceptibles al momento de realizar la selección de plantas tolerantes a salinidad, como una forma de facilitar el proceso de selección. En este caso, no fue posible desarrollar el experimento con dichos materiales, por lo cual se utilizó la variedad progenitora de la semilla M₂ (CR5272) como testigo para tener un parámetro a tomar en cuenta.

En cuanto al grado de tolerancia (Tabla 8) solo fueron seleccionados dos mutantes tolerantes (Grado 3). Estos fueron: ECA400-01 y ECA400-07 (Figura 20). Los demás fueron clasificados con un grado de tolerancia igual al testigo con sal (Grado 5) (Figura 20). Resultados similares a los encontrados en esta investigación son reportados por Mondal & Borromeo (2016) donde indican diferentes grados de tolerancia de distintas variedades en la etapa de plántula; he igualmente a esta investigación no encontraron materiales altamente tolerantes (Grado 1).



Figura 20. aspecto general de las plántulas del testigo sin sal (Grado 1), Testigo con sal (Grado 5) y los mutantes tolerantes (Grado 3) seleccionados a los 21 días de edad.

En altura de la planta (Tabla 8) el testigo sin sal fue superior y los dos mutantes seleccionados con grado 3 (ECA400-01 y ECA400-07) sobresalieron como los mejores dentro de los 30 seleccionados. Lo cual podría deberse a una relación directa del grado de tolerancia con el desarrollo foliar. Al respecto, Reddy et al. (2017) mencionan que plántulas con mayor vigor podrían evitar los efectos tóxicos de la salinidad; sin embargo, el vigor no es considerado un mecanismo de tolerancia. Se debe destacar que se encontró un mayor número de mutantes que fue superior en altura al testigo con sal.

En la variable longitud de raíz (Tabla 8), la mayoría de los mutantes presentan raíces más largas que el testigo sin sal, lo cual obedece según SEFV (2016) a una adaptación de estos

al ambiente salino para tener mayores sitios de absorción de agua.. En este caso se encontraron otros dos genotipos que presentaron mayor longitud como ECA400-06 y ECA400-14. En el número de hojas (Tabla 8) no se evidenció mucha diferencia entre plantas, ambos testigos y la mayoría de los mutantes formaron alrededor de 4 hojas. Se destaca a ECA400-01 que fue el único que presentó 5 hojas.

SEGUNDA SELECCIÓN

A continuación, se muestran dos figuras 21 y 22 que evidencian el proceso y el comportamiento de los mutantes durante la segunda selección.

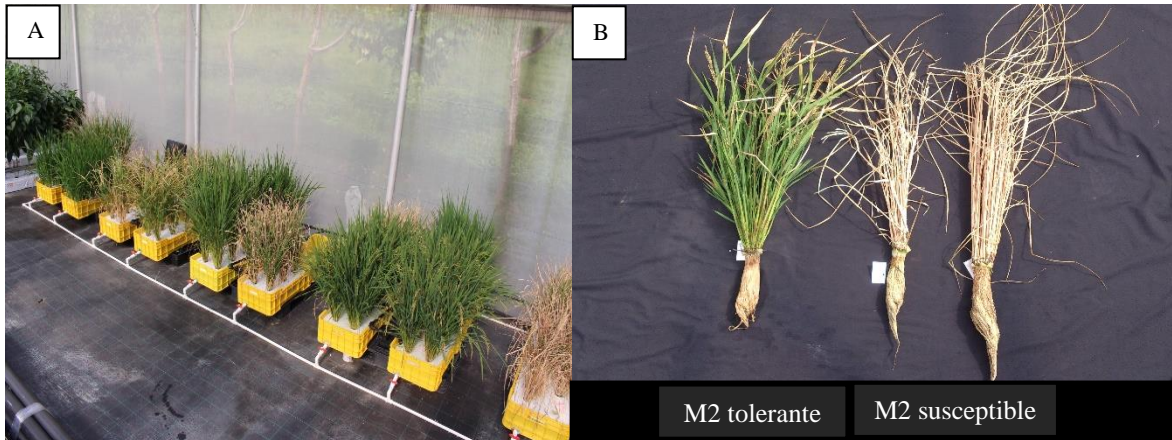


Figura 21. Plantas adultas sometidas al segundo estrés salino. A (desarrollo del experimento en el sistema hidropónico), B (Diferencias visuales entre mutantes tolerantes y mutantes susceptibles después de estrés).

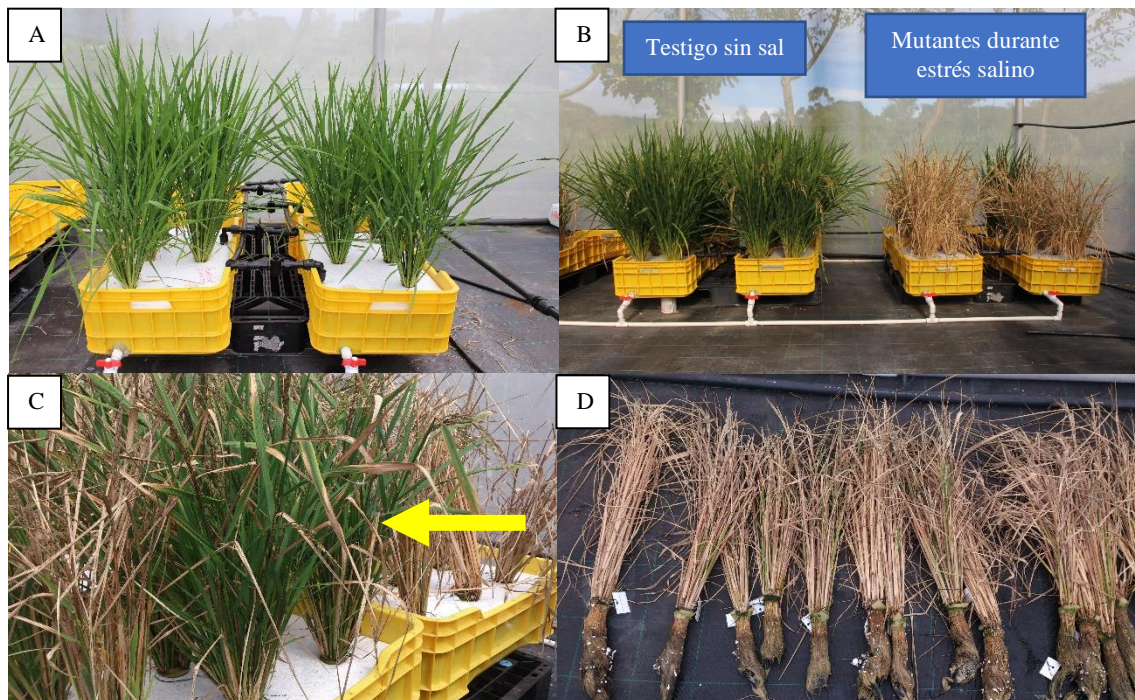


Figura 22. Comportamiento de las plantas antes, durante y después del estrés. A (antes de estrés), B (testigo sin sal vs plantas estresadas), C (mutantes que lograron sobrevivir), D (mutantes que no toleraron el estrés).

En las figuras anteriores se observa la respuesta de los mutantes al segundo estrés salino en prefloración provocando que algunos mutantes presentaran completa suspensión de crecimiento, muerte de la raíz y del follaje y nula producción de semilla (Figura 22D). Sin embargo, se encontró mutantes que todavía mostraban tejidos vivos (Figura 22C). Lo cual fue considerado como un indicador de tolerancia de una posible mutación que les permitió tolerar esa condición y mantener sus estructuras morfológicas y actividades bioquímicas activas. Debido a este comportamiento, se decidió cultivarlos con solución normal durante 21 días para evidenciar cuáles de ellos si lograban recuperarse, generar grano maduro y descartar los que no se recuperaran. Gracias a esto, un total de 8 mutantes lograron recuperarse y producir al menos un grano lleno.

La producción de grano lleno se tomó como indicador de base para determinar nuevos porcentajes de selección contemplando la selección visual en etapa de plántula y la sobrevivencia en etapa de floración (Tabla 9). En un trabajo similar realizado por Hernández (2001) expuso porcentajes de selección de mutantes tolerantes a salinidad entre 3.6 y 4.0% solamente en etapa de plántula. Estos son muy superiores a los encontrados en esta investigación, sin embargo, cabe destacar que existen variantes en la metodología utilizada como la dosis de radiación, material genético, dosis de salinidad, medio salino y parámetro de selección.

Tabla 9. Porcentajes de selección de plantas adultas M₂ 400 Gy en solución nutritiva salina (14 dS/m) a los 142 días de edad.

Grado de tolerancia	Calificación 1 Altamente tolerante	Calificación 3 Tolerante	Calificación 5 Moderadamente tolerante
Tipo de semilla	M ₂ 400 Gy	M ₂ 400 Gy	M ₂ 400 Gy
N° días en salinidad (plántula + prefloración)	46	46	46
CE (dS/m)	14	14	14
Mutantes sobrevivientes	0	1	7
Porcentaje de selección	0	0,010	0,074

El segundo estrés salino provocó una disminución en los porcentajes de selección obtenidos en la etapa de plántula (Tabla 7). Es importante destacar que un mutante Grado 1 y 21 mutantes Grado 5 seleccionadas en plántula no lograron sobrevivir el segundo estrés. Podría deberse a que los genes que controlan la tolerancia a salinidad en la fase de plántula no son los mismos que están involucrados en la etapa reproductiva (Singh et al., 2008; Singh et al., 2010). Por lo que los mutantes seleccionados en plántula y que lograron sobrevivir en la etapa reproductiva podrían contener genes de tolerancia a ambas etapas de susceptibilidad al estrés salino.

No se han encontrado hasta el momento trabajos en los cuales la selección de mutantes tolerantes a salinidad se lleva a cabo estresando las plantas en dos periodos salinos en un mismo ciclo (plántula y prefloración). Sino que se realiza ya sea la selección de plántulas como Hernández (2001), comprobación de tolerancia en plántula como Mondal & Borromeo (2016) o selección invitro (Watson, 2019). Posterior a este tipo de trabajos se procede a realizar un incremento de semilla para la confirmación de tolerancia en otro ciclo de cultivo para la etapa reproductiva.

De aquí en adelante, para facilitar la comprensión, solo se describirán las características agronómicas de los mutantes sobrevivientes al segundo estrés. Los cuales fueron ECA400-04, ECA400-06, ECA400-07, ECA400-13, ECA400-14, ECA400-15, ECA400-24 y ECA400-29.

Duración de etapas fenológicas.

En la siguiente tabla (Tabla 10) se muestra la duración en días de los testigos y mutantes seleccionados.

Tabla 10. Duración en días de etapas relevantes del ciclo de cultivo de testigos y mutantes promisorios sobrevivientes a los 2 periodos de estrés salino.

Planta	1er estrés	Prefloración	2do estrés	Floración	Cosecha
Testigo sin sal	No hay	87*	No hay	108*	131*
Testigo con sal	21	91*	25	112*	137*
ECA400-04	21	97	25	119	143
ECA400-06	21	97	25	119	143
ECA400-07	21	85	25	105	131
ECA400-13	21	85	25	107	131
ECA400-14	21	97	25	119	143
ECA400-15	21	85	25	105	131
ECA400-24	21	97	25	119	143
ECA400-29	21	101	25	119	147

* Dato promedio de 12 plantas

Se encontró un retraso en el ciclo de cultivo del testigo sin sal de al menos 15 días aproximadamente, según lo reportado por Tinoco & Acuña (2009) para CR5272. Esto podría deberse a que la temperatura afecta directamente sobre el desarrollo del cultivo retrasándolo cuando se encuentran temperaturas más bajas o altas a las requeridas (Rodríguez, 2017) como las encontradas en la región central del país en la cual se desarrolló esta investigación.

Se observa como ciertos mutantes se extendieron en su ciclo de cultivo respecto al testigo sin sal. Esta diferencia podría deberse a que estos requirieron más tiempo para sobreponerse a las dos etapas salinas. Sin embargo, 3 de ellos mantuvieron un ciclo igual al testigo sin sal, estos fueron ECA400-07, ECA400-13 y ECA400-15. Esto podría significar, aparte de presentar una posible tolerancia a salinidad, una reducción de días en su ciclo fenológico. Los demás mutantes mantuvieron una fenología un poco más larga que ambos testigos, siendo ECA400-29 el que presentó un mayor número de días a cosecha.

Comportamiento de la altura y número de macollas antes y después del segundo estrés salino.

En las figuras 23 y 24 se muestra el comportamiento de la altura y número de macollas de los mutantes sobrevivientes antes y después del segundo estrés salino.

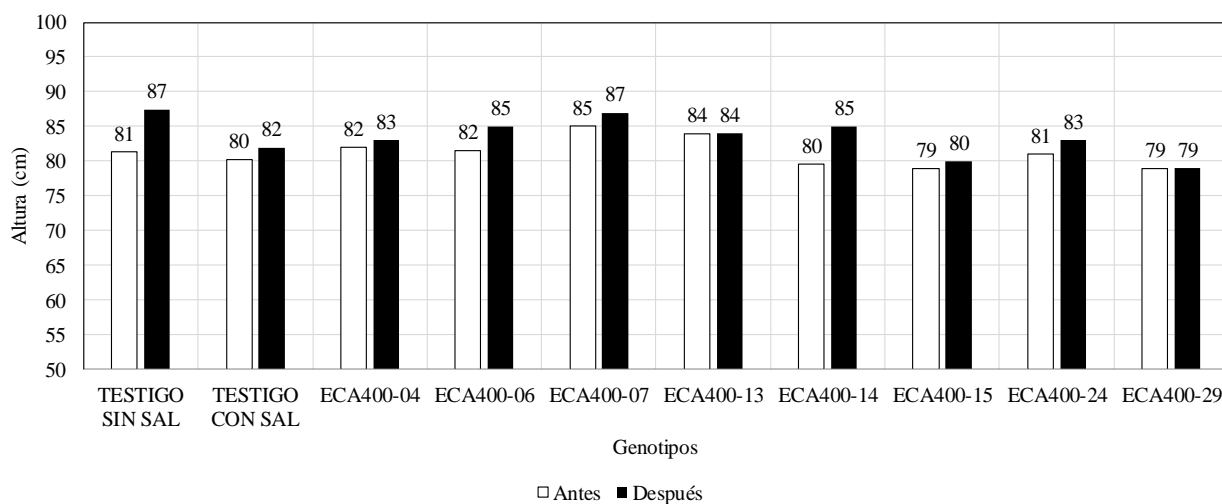


Figura 23. Altura de los testigos y mutantes antes y después del segundo estrés salino.

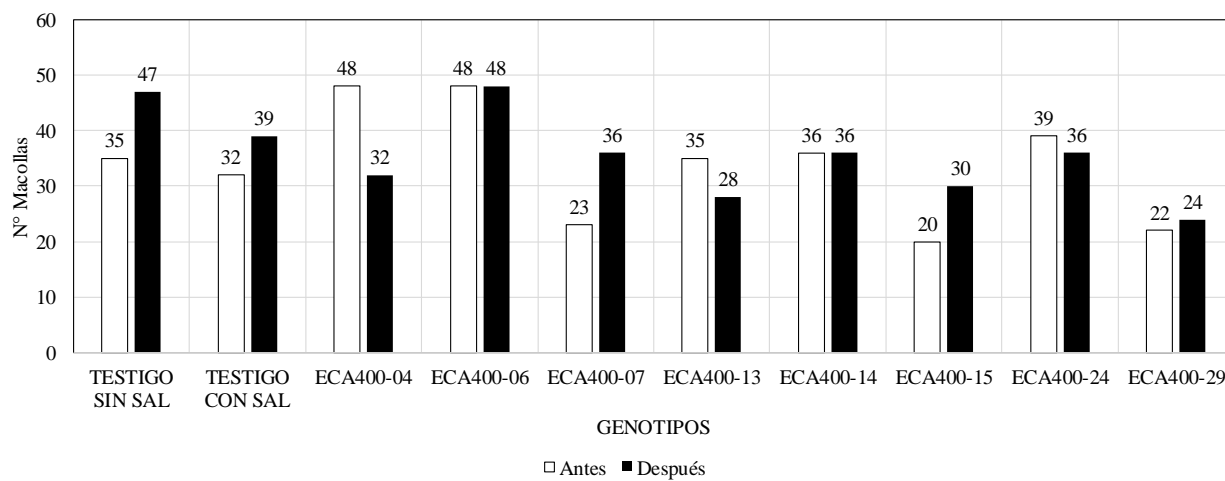


Figura 24. Número de macollas de los testigos y mutantes antes y después del segundo estrés salino.

En relación con la altura, la mayoría de las plantas testigos y mutantes no presentaron mucha diferencia, debido a que el estrés se llevó a cabo en la etapa reproductiva en donde el crecimiento en altura prácticamente ha finalizado. El mutante que mostró mayor crecimiento fue ECA400-14 (5cm) y sólo dos no variaron en altura, estos fueron ECA400-13 y ECA400-29.

Caso contrario sucedió con el número de macollas, donde se observó diferentes comportamientos. Algunos disminuyeron su número como ECA400-04, ECA400-13 y ECA400-24, otros se mantuvieron como ECA400-06 y ECA400-14 y por último los que aumentaron su número como ECA400-07, ECA400-15 y ECA400-29. El comportamiento tan diferente podría atribuirse a diferencias en el grado de tolerancia de cada uno. Los testigos sin sal y con sal mostraron un aumento de 12 y 7 macollas respectivamente. Para esta variable se destacan dos mutantes: ECA400-07 el cual generó 14 nuevas macollas superando a ambos testigos y ECA400-15 el cual generó 10 macollas superando en este caso sólo al testigo con sal. El comportamiento de los dos mutantes podría considerarse como promisorio ante un estrés salino ya que evidencia que, aunque se encuentre bajo estrés, continúan su macollamiento. Dicho aumento en el número de macollas podría atribuirse a que estos poseen alguna ventaja fisiológica como un aumento en la concentración de prolina para llevar a cabo un mayor ajuste osmótico o un incremento de la actividad de la zFerritina en la absorción de radicales libres del oxígeno durante el estrés salino (Reyes et al., 2008).

Comportamiento de diferentes variables agronómicas postcosecha

En la tabla 11 se muestra las variables agronómicas más importantes que se analizaron a los testigos y mutantes al final de la cosecha.

Tabla 11. Variables agronómicas observadas a los testigos y mutantes sobrevivientes a la cosecha.

Planta	Altura (cm)	Número de macollas	Número de panículas	Longitud de panícula (cm)	Espigas / panícula	Semillas / panícula	Esterilidad		
							Granos vanos	Granos llenos	%
Testigo sin sal	87,1 *	51,4 *	37,9 *	19,3 *	8,1 *	86 *	1061 *	2153 *	33 *
Testigo con sal	81,5 *	37,9 *	18,6 *	17,1 *	8,2 *	79,4 *	1464 *	2 *	99,9 *
ECA400-04	81	32	13	16,6	9,7	97,9	1272	4	99,69
ECA400-06	85	48	16	16,2	10,0	89,0	1427	1	99,93
ECA400-07	85	51	15	22,2	9,6	99,5	1493	2	99,87
ECA400-13	86	34	15	19,4	8,4	101,0	1521	1	99,93
ECA400-14	83,5	30	20	15,4	8,0	65,0	1304	1	99,92
ECA400-15	79	42	24	18,2	7,6	76,0	1842	8	99,57
ECA400-24	83	36	12	15,13	8,16	69	828	3	99,64
ECA400-29	73,6	24	24	19,5	7,5	81	1058	4	99,62

* Dato promedio de 12 plantas

En la tabla anterior se puede ver que no siempre el testigo sin sal fue superior a las demás plantas. Las variables en las que el testigo sin sal resultó superior a todas fueron altura de la planta, número de panículas, granos llenos y esterilidad. El testigo con sal solo fue superior al testigo sin sal en espigas por panícula. No se encontró un mutante que mostrara total dominancia sobre los demás o sobre los testigos, sino que hubo una alternancia en la cual algunos mostraron superioridad en ciertas variables, pero inferiores en otras. A continuación, se describe cada una de las variables donde se detallan los principales resultados.

En el caso de la variable de altura, no se encontró una diferencia importante entre las plantas. Todos los mutantes compartieron una similitud en altura con los testigos a excepción de ECA400-29 que fue el de menor tamaño (73,6 cm). Un resultado similar fue encontrado por Cristo et al. (2004) y Valdés et al. (2012) donde informan una baja afectación en la altura por efecto de la salinidad, esto se debe a que el estrés en las plantas ocurrió cuando el desarrollo estaba prácticamente finalizado. Se encontraron valores por debajo de lo reportado para CR5272 de 96 cm (Tinoco & Acuña, 2009), estos valores encontrados podrían deberse a las diferentes densidades de siembra, temperatura o la nutrición empleada durante el desarrollo de su ciclo fenológico y utilizadas en esta investigación (Chaudhary et al., 2018).

Caso contrario sucedió en el número de macollas, en el cual se presentaron diferencias más notorias entre mutantes y testigos. A pesar de que los mutantes pasaron por dos periodos de estrés, produjeron una cantidad de macollas considerada como muy bueno (CIAT, 1983). Para FAO (2012), se debe a que la fase vegetativa del arroz, donde se desarrollan la mayor cantidad de macollas, es relativamente tolerante a la salinidad. El mutante ECA400-07 a pesar de ser sometido al estrés salino logró producir la misma cantidad de macollas que el testigo sin sal.

El número de panículas fue la primera variable de rendimiento en la cual se presentó un efecto más marcado de la salinidad, ya que se observa como el testigo sin sal mostró una notoria superioridad sobre el testigo con sal y los mutantes. Esta reducción podría deberse a los efectos de la salinidad sobre la formación de nuevas panículas. Resultados similares fueron encontrados por Valdés et al. (2012) y Aguilar et al. (2016) donde exponen

reducciones en el número de panículas por metro cuadrado en arroz afectado por salinidad. El mutante más destacado fue ECA400-29 haciendo énfasis en que el 100% de sus macollas lograron producir panícula.

En las variables de longitud de panícula, espigas por panícula y semillas por panícula se encontraron mutantes con valores superiores a ambos testigos. Los resultados encontrados difieren de los reportados por diversos autores donde exponen reducciones significativas de estas variables en condiciones salinas por ejemplo: longitud de panícula (Cristo et al., 2004 y Valdés et al., 2012), espigas por panículas (Zeng & Shannon, 2000) y semillas por panícula (Zeng & Shannon, 2000; Aguilar et al., 2016). Lo encontrado en esta investigación indica ya sea que la salinidad no afectó directamente la formación de estructuras de la panícula como tal o que los mutantes presentaron algún mecanismo de tolerancia que favoreció la formación de estas estructuras. En esas tres variables los mutantes destacados fueron ECA400-07, ECA400-06 y ECA400-13 respectivamente.

El efecto más crítico de la salinidad se observó en la esterilidad. Lo cual se evidencia en la esterilidad el testigo sin sal de un 33% mientras que el testigo con sal y los mutantes sobrevivientes llegaron casi al 100%. El alto porcentaje de esterilidad del testigo sin sal pudo estar asociado a que las condiciones ambientales en las cuales se desarrolló esta investigación no fueron las recomendadas para este cultivo.

La alta esterilidad del testigo con sal y mutantes evidencia la susceptibilidad del arroz en la etapa reproductiva mencionada por diversos autores entre ellos IRRI (2020) y Chaudhary et al. (2018). Esta afectación tan severa se debe a que la salinidad afecta directamente la fotosíntesis, viabilidad del polen, receptividad del estigma y el flujo normal de nutrientes hacia la panícula (Reddy et al., 2017 y Hussain et al (2018).

Se logró coleccionar al menos un grano lleno de cada uno de los mutantes sobrevivientes (Tabla 11) dentro de los cuales ECA400-15 fue el que más granos produjo. Aun cuando la obtención de semilla de materiales seleccionados en esta investigación resultó muy baja, la Dr. González considera que por pequeña que sea lo progenie obtenida en procesos de selección de mutantes bajo algún tipo de estrés resulta valiosa ya que podría favorecer la continuación de procesos de mejora genética posteriores. (M. González, comunicación personal, 15 de noviembre de 2018).

Determinación preliminar del mutante más promisorio a través de un análisis comparativo de todas las variables evaluadas desde la siembra hasta la cosecha.

Durante la ejecución de esta investigación se analizaron al menos 14 variables. Este análisis sirvió para describir cada uno de los mutantes promisorios seleccionados (Tabla 8, 10 y 11; Figura 23 y 24). Se encontraron respuestas diferenciadas en cada uno de los mutantes promisorios, donde un mutante sobresalía en una variable, pero resultaba inferior en otra de modo que ninguno de estos fue superior a los demás en todo el ciclo.

Se destacan dos mutantes los cuales presentaron los mejores valores en diferentes variables. Uno corresponde a ECA400-07, el cual sobresalió de los demás en 7 de 14 variables analizadas. Esta superioridad pudo estar influenciada por la respuesta de este en la primera selección a los 21 días, donde fue el único de los sobrevivientes que se clasificó como tolerante (Grado 3).

Sin embargo, ECA400-15 (Grado 5) aunque solamente fue superior a los demás en 4 de 14 variables, fue el que produjo mayor número de granos llenos (Tabla 11). Esta variable es considerada la más importante sobre cualquier otra analizada, porque determina el rendimiento ante el estrés salino. Por este motivo, se considera a ECA400-15 como el más promisorio de los 8 mutantes seleccionados en esta investigación.

CONCLUSIONES

- Se generó una población segregante de arroz (M_2) con suficiente variabilidad genética, la cual permitió seleccionar mutantes promisorios con tolerancia a salinidad.
- La dosis de 14 dS/m de NaCl seleccionada por la determinación de la DL50 de NaCl, es lo suficientemente rigurosa para discriminar mutantes tolerantes de los susceptibles al ser expuestos al factor de estrés salino.
- La exposición de una población segregante de arroz (M_2) en condiciones de hidroponía a una dosis de 14 dS/m de NaCl en dos momentos del desarrollo de las plantas (de la siembra hasta los 21 dds) y en la etapa de prefloración y floración permitió seleccionar un total de 8 mutantes promisorios de arroz con diferente grado de tolerancia a la salinidad.
- Las variables agronómicas evaluadas en los mutantes candidatos permitieron establecer en esta investigación que el mutante con mayor grado de tolerancia corresponde al ECA400-15.

RECOMENDACIONES

- Es importante valorar otras dosis de radiación y diferentes generaciones segregantes (M_3 , M_4 , M_5 , M_6 , etc.) con la finalidad de aumentar la posibilidad de rescatar más mutantes candidatos tolerantes al estrés salino, ya que esta característica se encuentra controlada por muchos genes.
- La selección en etapa de plántula del arroz requiere de una dosis de salinidad alta como la utilizada en esta investigación, sin embargo, es prudente disminuir la dosis en la etapa reproductiva para no comprometer la progenie de los mutantes seleccionados.
- La caracterización molecular de los mutantes obtenidos resultaría esencial para determinar cuáles genes intervinieron en la activación de algún mecanismo fisiológico o bioquímico que favoreció la sobrevivencia de dichos materiales.
- Antes de valorar los mutantes tolerantes a la salinidad en condiciones de campo sería prudente reconfirmar su respuesta nuevamente en condiciones de hidroponía.
- Se aconseja llevar a cabo determinaciones de DL50 de grado de respuesta a la salinidad para cada mutante seleccionado. Esto para demostrar más claramente el grado máximo de tolerancia de cada mutante.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, M. M., Abdelgawad, Z. A., & El-bassiouny, H. M. S. (2016). Alleviation of the adverse effects of salinity stress using trehalose in two rice varieties. *South African Journal of Botany*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.09.019>
- Aguilar, M., Fernández, J. L., Aguilar, M., & Ortiz, C. (2016). Respuesta Agronómica del Arroz al Riego Salino en Distintas Fases del Cultivo. *Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera SERVIFAPA*, 1–25.
- Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M., & Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 187–204.
- Albarrán, G., Mendoza, E., & Cruz, E. (2017). Dosimetría Química de irradiadores gamma de ⁶⁰Co y ¹³⁷Cs de uso semi-industrial e investigación. *Nova Scientia*, 9(19), 113. <https://doi.org/10.21640/ns.v9i19.943>
- Ali, S., Gautam, R. K., Mahajan, R., Krishnamurthy, S. L., Sharma, S. K., Singh, R. K., & Ismail, A. M. (2013). Field Crops Research Stress indices and selectable traits in SALTOL QTL introgressed rice genotypes for reproductive stage tolerance to sodicity and salinity stresses. *Field Crops Research*, 154, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.06.011>
- Allbed, A., & Kumar, L. (2013). Soil Salinity Mapping and Monitoring in Arid and Semi-Arid Regions Using Remote Sensing Technology : A Review. *School of Enviromental and Rural Sciencie*, 2(December), 373–385.
- Ambavane, A. R., Sawardekar, S. V., Sawantdesai, S. A., & Gokhale, N. B. (2015). Studies on mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays and its effect on quantitative traits in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn) . *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.12.004>
- Asch, F., & Wopereis, M. C. S. (2001). Responses of field-grown irrigated rice cultivars to varying levels of floodwater salinity in a semi-arid environment. *Field Crops Research*, 70(2), 127–137. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(01\)00128-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00128-9)
- Bado, S., Forster, B. P., Abdelbagi, G. M., Jankowicz-cieslak, J., Berthold, G., & Luxiang, L. (2016). *Protocols for Pre- Field Screening of Mutants for Salt Tolerance in Rice , Wheat and Barley* (Issue 1). International Atomic Energy Agency.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-26590-2>

- Bronwyn, B., Vera, R., Balderas, E., & Pantoja, O. (2007). Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. *Biotechnología*, 14, 272.
- Cabalaceta, G., & Cordero, Á. (1991). Efectos de salinidad en arroz bajo riego en Guanacaste, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 15(112), 167–172.
- Cahyoargo, Y., Nurhayatia, A., Soeparjono, S., & Arifb, I. (2015). Screening Six Varieties of Rice (*Oryzasativa*) for Salinity Tolerance. *Procedia Environmental Sciences*, 28, 78–87.
- Chaudhary, R., Nanda, J., & Tran, D. (2018). *Problemas y limitaciones de la producción de arroz*. Salinidad. <http://www.fao.org/3/y2778s/y2778s04.htm#TopOfPage>
- Chávez, C. (2012). *Estudio fisicoquímico, nutricional y estructural del almidón de variedades de arroz (Oryza sativa subespecie indica) cultivadas en México*. Instituto Politécnico Nacional.
- Chulim, Á. C., Guadalupe, L., Guerrero, R., Manuel, H., Escobar, O., & Crespo, E. C. (2014). *Germinación y crecimiento de plántulas de Phaseolus vulgaris L . en condiciones de salinidad * Germination and seedling growth of Phaseolus vulgaris L . in saline conditions Resumen Introducción*. 5, 753–763.
- CIAT. (1983). *Sistema de evaluación estándar para arroz*. (2a ed.). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- CIAT. (2010). *Producción Eco-Eficiente de arroz en América Latina*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Combatt, E., Narváez, H., & Bustamante, I. (2015). Estimación de la salinidad en aguas freáticas del área de influencia de la desembocadura del río Sinú-Córdoba , Colombia. *Idesia*, 33, 55–64.
- CONARROZ. (2020). *INFORME ESTADÍSTICO PERÍODO 2018/2019*.
- Cristo, E, González, M., & Cárdenas, N. (2004). Comportamiento de un grupo de variedades cubanas de arroz (*Oryza sativa L .*) en suelos afectados por sales. *Cultivos Tropicales*, 25, 68.
- Cristo, Elizabeth, González, M. C., León, N. D. J. P., Ventura, E., Cárdenas, R. M., Echevarría, A., Blanco, G., & Gonzalez, M. (2012). Efecto de bajos suministros de agua en el comportamiento agronómico en industrial de nuevos genotipos de arroz

- (*Oriza sativa* L.) obtenidos por diferentes métodos de mejora. *Cultivos Tropicales*, 33(1), 50–56.
- Cruz, A., Orozco, R., Madriz, J., Salazar, R., & Brenes, A. (1992). Selección preliminar de plantas de arroz con resistencia vertical a *Pyricularia orizae* por inducción de mutaciones. *UNICIENCIA*, 9, 22–32.
- Dionisio, M., & Tobita, S. (2000). Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 157(1), 54–58. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80135-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80135-2)
- FAO/IAEA. (2018). Manual on mutation breeding. In M. . Spencer-Lopes, B. P. Forster, & L. Jankuloski (Eds.), *Journal of Nuclear Energy* (Third edit, Vol. 26, Issue 8). Food and Agriculture Organization of the United Nations. [https://doi.org/10.1016/0022-3107\(72\)90060-3](https://doi.org/10.1016/0022-3107(72)90060-3)
- FAO/IAEA. (2020). *Base de datos conjunta de variedades mutantes FAO/OIEA*. Base de Datos de Variedades Mutantes Registradas. <https://mvd.iaea.org/#!/Home>
- FAO. (2012). *Respuesta del rendimiento de los cultivos al agua. Estudio FAO: Riego y Drenaje*. (P. Steduto, T. Hsiao, E. Fereres, & D. Raes (eds.)). FAO.
- FAO. (2018). *Seguimiento del Mercado del Arroz (SMA)*. Seguimiento Del Mercado Del Arroz, Abril de 2018. <http://www.fao.org/economic/est/publicaciones/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>
- Fontal, B. (2005). *El Espectro Electromagnético y sus Aplicaciones* (E. V. para la E. de la Química (ed.)).
- Gabriel, J. L., Almendros, P., Hontoria, C., & Quemada, M. (2012). The role of cover crops in irrigated systems: Soil salinity and salt leaching. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 158, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.06.012>
- Gamero, C. J. (2015). *Evaluación de gramíneas y leguminosas de trópico alto en cultivo hidropónico como alternativa de producción orgánica para la nutrición animal*. Universidad de La Salle.
- García, S., Gomez, F., Trejo, L., & Herrera, E. (2013). Transcription factors involved in molecular responses of plants to osmotic stress. *Fitotec*, 36(2), 105–115.
- Geraldino, C. (2012). *Variación Fenotípica en una población M3 de quinua (Chenopodium quinua Wild.) variedad amarilla maranganí desarrollada mediante aplicación de*

- rayos gamma* (Issue 511). Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Glenn, B., Dharmawansa, S., & Rhulyx, M. (1997). Screening rice for salinity tolerance. *International Rice Research Institute*, 22, 30.
- González, L. ., & Pérez, S. (1997). Mejoramiento genético en arroz para la tolerancia a la salinidad a través de la radioinducción de mutaciones. *Núcleo*, 23.
- González, M. C., & Martínez, A. (2016). Selecting rice mutants with good agronomic performance under conditions of low water supplies. *Cultivos Tropicales*, 37(1), 102–109.
- González, M, & Pérez, S. (1997). Mejoramiento genético en arroz. *Nucleus*, 23, 7.
- Hakim, M. A., Juraimi, A. S., Begum, M., Hanafi, M. M., Ismail, M. R., & Selamat, A. (2010). *Effect of salt stress on germination and early seedling growth of rice (Oryza sativa L .)*. 9(13), 1911–1918. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1526>
- Harding, S., Johnson, S., Taylor, D., Dixon, C., & Turay, M. (2012). Effect of Gamma Rays on Seed Germination, Seedling Height, Survival Percentage and Tiller Production in Some Rice Varieties Cultivated in Sierra Leone. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(2), 247–255. <https://doi.org/10.9734/ajea/2012/820>
- Hernández, L. (2001). *Selección de mutantes de arroz Oriza sativa L, con tolerancia a suelos salinos*. Universidad Nacional de Costa Rica.
- Hernández, S., Pedraza, M. E., López, P. A., Gómez, J. M., & Morales, J. L. (2019). Mutagenesis in the improvement of ornamental plants. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 25(3), 151–167. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2018.12.022>
- Hussain, M., Ahmad, S., Hussain, S., Lal, R., Ul-Allah, S., & Nawaz, A. (2018). Rice in Saline Soils: Physiology, Biochemistry, Genetics, and Management. In *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 148). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.11.002>
- IAEA. (2018). *Mejoramiento de los cultivos por inducción de mutaciones*. <https://www.iaea.org/sites/default/files/19/06/mutation-breeding-for-crop-improvement-sp.pdf>
- IAEA. (2020a). *Inducción de mutaciones | OIEA*. Inducción de Mutaciones. <https://www.iaea.org/es/temas/induccin-de-mutaciones>
- IAEA. (2020b). *Mejora por inducción de mutaciones | OIEA*. Mejora Por Inducción de

- Mutaciones. <https://www.iaea.org/es/temas/mejora-por-induccion-de-mutaciones>
- IRRI. (2007). *Growth stages of the rice plant*. Recognize the Different Growth Stages. http://www.knowledgebank.irri.org/ericeproduction/0.2._Growth_stages_of_the_rice_plant.htm
- IRRI. (2020). *Stress and disease tolerance*. Breeding for Salt Tolerance in Rice. http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Breeding_for_salt_tolerance.htm
- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. M. (2019). Plant salinity stress: Many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science*, 10(February). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
- Jennings, P., Coffman, W., & Kauffman, H. (1981). *Mejoramiento de arroz*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Kazemi, K., & Eskandari, H. (2011). *Effects of salt stress on germination and early seedling growth of rice (Oryza sativa) cultivars in Iran*. 10(77), 17789–17792. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2219>
- Khush. (2013). Strategies for increasing the yield potential of cereals: case of rice as an example. *Plant Breeding*, 132, 433–436.
- Krishnamurthy, S. L., Gautam, R. K., Sharma, P. C., & Sharma, D. K. (2016). Effect of different salt stresses on agro-morphological traits and utilisation of salt stress indices for reproductive stage salt tolerance in rice. *Field Crops Research*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.02.018>
- Lamz, A., & González, M. C. (2013). Revisión Bibliográfica. La salinidad como problema en la agricultura: La mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos Tropicales*, 34(4), 31–42.
- Landero, J. (2006). *Agentes mutagénicos y su daño en el ADN* [Universidad de Guadalajara]. http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5800/Landeros_Gutierrez_Juan_Fernando.pdf?sequence=1
- Layne, J., Méndez, J., & Mays, J. (2008). Efecto de la salinidad y del tamaño de la semilla sobre la germinación y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de laboratorio. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-*

Biológicas, 11(1), 17–25.

- Li, N. A., Hosh, B. G., Antait, S. G., & Hakraborty, S. C. (2014). Selection of Rice Genotypes for Salinity Tolerance Through Morpho-Biochemical Assessment. *Rice Science*, 21(5), 288–298. [https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(13\)60189-4](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(13)60189-4)
- Liu, L., Xia, W., Li, H., Zeng, H., Wei, B., Han, S., & Yin, C. (2018). Salinity Inhibits Rice Seed Germination by Reducing α -Amylase Activity via Decreased Bioactive Gibberellin Content. *Frontiers in Plant Science*, 9(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00275>
- Madriz, M., Fernández, A., Hernández, S., Orozco, R., & Argüello, J. (2020). *Radiosensibilidad del arroz (Oryza sativa L. var CR5272) por irradiación gamma en Costa Rica*.
- Martinez, N., López, C. V., Basurto, M., & Pérez, R. (2011). Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo. *Tecnociencia Chihuahua*, V(3), 156–161.
- Mba, C. (2013). Induced Mutation Unleashes the Potentials of Plant Genetic Resources For Food and Agriculture. *Agronomy*, 3, 200–231.
- Mint, S., Mokhtar, E., Samb, A., Moufid, A. O., Ould, A., Boukhary, M. S., Khyar, T., & Djeh, O. (2015). *Effect of different levels of salinity on germination and early seedling growth of three rice varieties cultivated in Mauritania*. 346–349.
- Mondal, S., & H. Borromeo, T. (2016). Screening of salinity tolerance of rice at early seedling stage. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, 10(1), 843–847. <https://doi.org/10.18801/jbar.100116.102>
- Montepeque, R., Pelico, M., Lopez, J., & Sanabria, C. (1991). Contribución al mejoramiento de arroz *Oryza sativa L.* a través de inducción artificial de mutaciones con rayos gamma. *Plant Mutation Breeding For Crop Improvement*, 1, 335–351.
- Montes de Oca, P., Mata, R., & Chaves, M. (1996). Estudios de salinidad en la provincia de Guanacaste (Costa Rica) y caracterización de algunos suelos con influencia salina. *AGRONOMIA MESOAMERICANA*, 7(2), 77–83.
- Morales, D., Rodríguez, P., Sánchez, M., & Torrecillas, A. (2004). Efecto del estrés por NaCl en el crecimiento y las relaciones hídricas de diferentes variedades de arroz (*Oryza sativa L.*). *Cultivos Tropicales*, 25(4), 11–16.
- Narváez, H., Bustamante, I., & Combatt, E. (2014). Estimación de la salinidad en suelos del

- delta del río Sinú en Colombia , mediante modelos de regresión lineal múltiple. *Idesia*, 32, 81–90.
- Nath, M., Yadav, S., Kumar Sahoo, R., Passricha, N., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2016). PDH45 transgenic rice maintain cell viability through lower accumulation of Na⁺, ROS and calcium homeostasis in roots under salinity stress. *Journal of Plant Physiology*, 191, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.11.008>
- Navarro, W. (n.d.). *Utilización de la energía nuclear para el mejoramiento genético de plantas.pdf* (pp. 117–121). Programa de Genética Vegetal. Escuela de Ciencias Agrarias.
- Pernús, M., & Sánchez, J. (2015). Salinidad en Cuba y tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de semillas. *Pastos y Forrajes*, 38(4), 379–392.
- Piedra, A. L., González, M. C., & Reyes, Y. (2013). Indicadores bioquímicos para la selección temprana de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) con tolerancia a salinidad. *Cultivos Tropicales*, 34(1), 11–17.
- RANCHOSHORIZONTES. (1978). *Estudio de diagnóstico de salinidad de aguas y suelos de los campos de producción de de Ranchos Horizontes, S.A.*
- Rao, P. S., Mishra, B., & Gupta, S. R. (2013). Effects of soil salinity and alkalinity on grain quality of tolerant, semi-tolerant and sensitive rice genotypes. *Rice Science*, 20(4), 284–291. [https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(13\)60136-5](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(13)60136-5)
- Real, A. (2014). *Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes* [Universidad Complutense]. [http://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-19202/Efectos de las RI_UCM_27 nov 2014_A Real_pdf.pdf](http://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-19202/Efectos%20de%20las%20RI_UCM_27%20nov%202014_A%20Real_pdf.pdf)
- Reddy, I. N. B. L., Kim, B. K., Yoon, I. S., Kim, K. H., & Kwon, T. R. (2017). Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches. *Rice Science*, 24(3), 123–144. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.09.004>
- Reyes, Y., Mazorra, L., & Nuñez, M. (2008). Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la tolerancia del arroz al estrés salino y su relación con los brasinoesteroides. *Cultivos Tropicales*, 29(4).
- Rodríguez, G. (2017). *Etapas Fenológicas de Tres Variedades de Arroz (Oryza sativa), en Relación a la Temperatura y la Radiación Solar en Guanacaste , Costa Rica* María Gabriela Rodríguez González. *Licenciatura en Ciencias Agrícolas* (Issue December

- 2014). Universidad EARTH.
- Rodríguez, N. D., Torres, C. N., Chaman, M. E., & Hidalgo, J. E. M. (2019). Efecto del estrés salino en el crecimiento y contenido relativo del agua en las variedades IR-43 y amazonas de *Oryza sativa* “arroz” (Poaceae). *Arnaldoa*, 26(3), 931–942. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.263.26305>
- Rodríguez, V., Ruíz, J., Padilla, J., & Silva, M. (2016). Mapeo espacial de la salinidad del suelo a través de sensores remotos. Estudio de caso norte de Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13, 2577–2587.
- Romero, M. N. (2004). *El Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria-INTA, las variedades de arroz desarrolladas, así como la producción nacional de este cereal*. [http://www.ucipfg.com/Repositorio/MIA/MIA-12/Bloque_Academico/Ejemplo de articulo científico 1.pdf](http://www.ucipfg.com/Repositorio/MIA/MIA-12/Bloque_Academico/Ejemplo_de_articulo_científico_1.pdf)
- Sanjinez, F. (2016). *Determinación de la dosis óptima de rayos gamma para inducir mutaciones en arroz (Oryza sativa L.) variedad Amazonas*. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- SEFV. (2016). Boletín de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal (SEFV). In 62.
- Shahbandeh, M. (2020). • *World rice acreage 2018 | Statista*. World Rice Acreage from 2010 to 2018 (in Million Hectares). <https://www.statista.com/statistics/271969/world-rice-acreage-since-2008/>
- Silvera, B. (2017). Mutaciones mediante radiaciones gamma en arroz. *Observatorio de La Economía Latinoamericana*, 17. <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/ec/2017/mutaciones-arroz-ecuador.html>
- Singh, A. (2015). Soil salinization and waterlogging: A threat to environment and agricultural sustainability. *Ecological Indicators*, 57, 128–130. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.04.027>
- Singh, R., Gregorio, G., & Ismail, A. (2008). Breeding rice varieties with tolerance to salt stress . *Journal of the Indian Society of Coastal Agricultural Research*, 26, 16–21. https://www.researchgate.net/publication/288034285_Breeding_rice_varieties_with_tolerance_to_salt_stress
- Singh, R. K., Redoña, E., & Refuerzo, L. (2010). Varietal Improvement for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants : Special Reference to Salinity in Rice. *Physiology and*

- Molecular Biology of the Effects of Salinity on Rice*, 387–415.
<https://doi.org/10.1007/978-90-481-3112-9>
- Suárez, L., & Gonzalez, M. (2004). Evaluación en estadios tempranos de un grupo de mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones salinas, utilizando marcadores morfoagronómicos. *Cultivos Tropicales*, 25(1), 27–31.
- Sultana, N., Ikeda, T., & Itoh, R. (1999). Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environmental and Experimental Botany*, 42, 211–220.
- Tinoco, R., & Acuña, A. (2009a). Cultivo de arroz (*Oryza sativa*). In *Manual de recomendaciones técnicas* (p. 74). www.minag.gob.pe
- Tinoco, R., & Acuña, A. (2009b). *Manual de recomendaciones técnicas: Cultivo de arroz (Oryza sativa)* (p. 74). Instituto de Investigación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Tuteja, N., Singh, S., & Tuteja, R. (2011). *Omics and Plant Abiotic Stress Tolerane* (N. Tuteja, S. Singh, & R. Tuteja (eds.)). USA: Bentham Science Publisher.
<https://doi.org/10.2174/97816080505811110101>
- Valdés, E. C., González, M. C., & Pérez, N. (2012). *Comportamiento de genotipos de arroz (Oryza sativa L.) promisorios para suelo salino*. 33(3), 42–46.
- Vasquez, A. (1975). Estudio semidetallado de suelos Cuenca Baja del Río Tempisque. In *ICE-MAG-SNE*.
- Vasquez, A., & Chaves, F. C. (1976). *Evaluación de los recursos de tierras y aguas con fines de riego de los terrenos del Ingenio TABOGA S. A., Cañas, Guanacaste*.
- Vignola, R., Poveda, K., Watler, W., Vargas, A., Berrocal, A., & Morales, M. (2018). *Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en Costa Rica*. Cultivo de Arroz. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/reduccion-impacto-por-eventos-climaticos/Informe-final-Arroz.pdf>
- Villafañe, R. (2000). Calificación de los suelos por sales y dispersión por sodio y su aplicación en la evaluación de tierras. *Agronomía Tropical*, 50(4), 645–658.
- Wang, Y., & Li, J. (2005). The plant architecture of rice (*Oryza sativa*). *Plant Molecular Biology*, 59(1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-4038-x>
- Watson, W. (2019). *CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE*

MUTANTES M3 DE ARROZ (Oryza sativa indica L. VAR. CR5272) EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO [Universidad de Costa Rica].
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Wicke, B., Smeets, E., Dornburg, V., Vashev, B., Gaiser, T., Turkenburg, W., & Faaij, A. (2011). The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy & Environmental Science*, 4, 2669–2681.
<https://doi.org/10.1039/C1EE01029H>
- Yoshida, S., Forno, D., Cock, J., & Gómez, K. (1976). *Laboratory manual for physiological studies of rice*. 83.
- Zamora, E. (2014). *Efectos de cinco niveles de Radiaciones de Gamma en el cultivo de arroz (Oriza sativa l)*. Universidad Técnica de BABAHOYO.
- Zeng, L., & Shannon, M. C. (2000). Effects of salinity on grain yield and yield components of rice at different seeding densities. *Agronomy Journal*, 92(3), 418–423.
<https://doi.org/10.2134/agronj2000.923418x>

ANEXOS

Anexo 1. Medias de respuesta de las variables analizadas al efecto de la salinidad sobre la variedad de arroz CR5272.

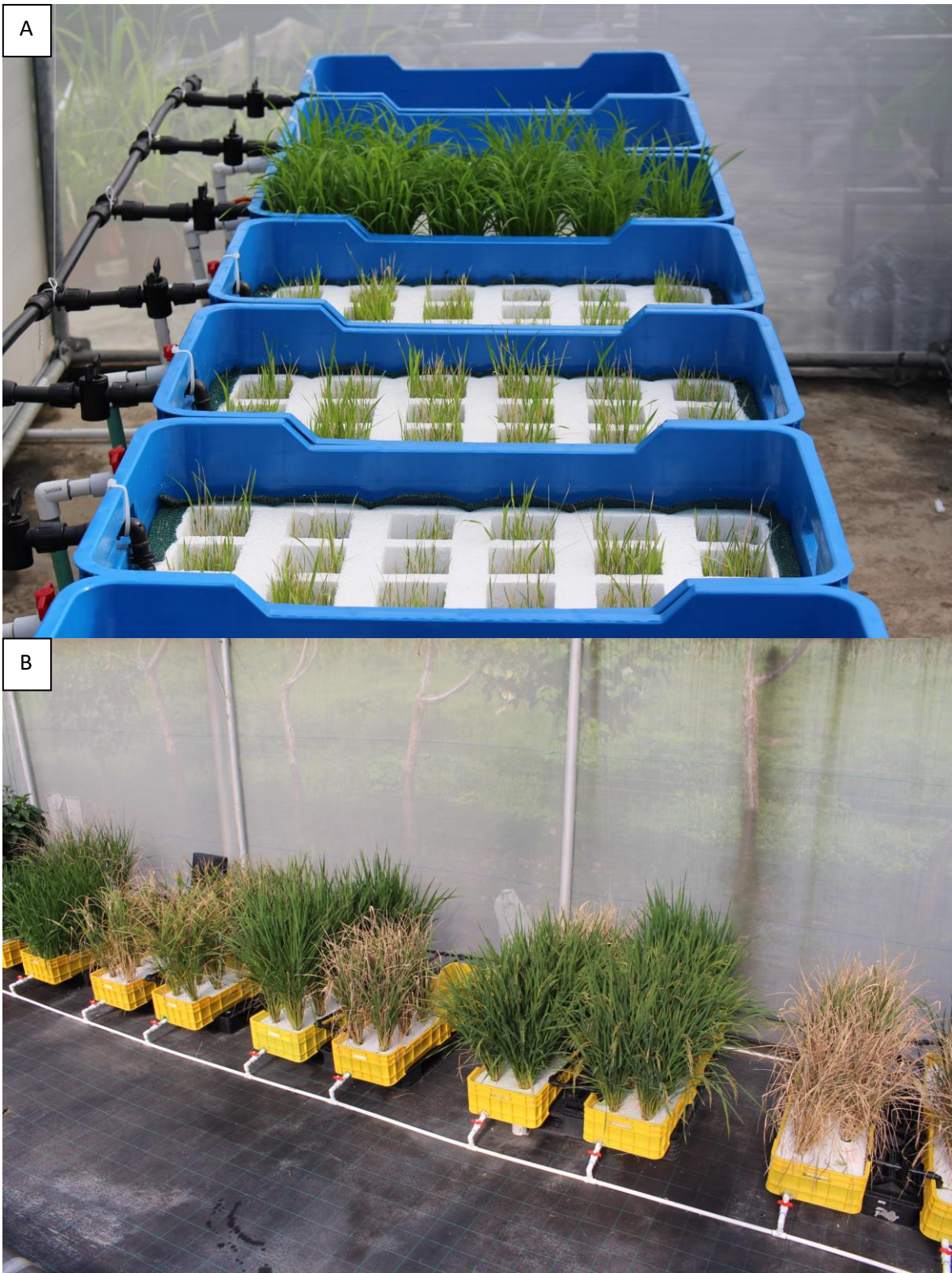
Tratamientos		Variables														
Conductividad Eléctrica		Germinación (%)			Sobrevivencia (%)			Altura planta (cm)			Longitud raíz (cm)			Número de hojas		
dS/m	NaCl/L (g)	M	Sig.	E.E	M	Sig.	E.E	M	Sig.	E.E	M	Sig.	E.E	M	Sig.	E.E
1,17	0 (normal)	75	a	5,1	100	a	8,7	26,2	a	0,5	10	a	0,3	4,42	a	0,07
2	0,42	79,2	a	5,1	100	a	8,7	24,1	b	0,5	8,3	cd	0,3	4,05	b	0,07
4	1,22	74,2	a	5,1	100	a	8,7	23,3	b	0,5	9,2	b	0,3	4,08	b	0,07
6	2,56	70,8	abc	5,1	97,7	ab	8,7	19	c	0,5	7,9	d	0,3	3,92	bc	0,08
8	3,66	69,2	abc	5,1	95,6	ab	8,7	18,3	c	0,5	8,9	bc	0,3	4,08	b	0,08
10	4,78	78,3	a	5,1	94,4	ab	8,7	16,5	d	0,5	9,2	b	0,3	3,78	c	0,07
12	5,92	71,7	ab	5,1	94,3	ab	8,7	12,8	e	0,5	8,6	bc	0,3	3,56	d	0,09
14	7,08	58,3	bcd	5,1	63,9	c	8,7	8,2	f	0,7	7,6	d	0,4	2,85	e	0,10
16	8,26	48,3	d	5,1	73	bc	8,7	7,44	f	0,7	6,4	e	0,4	2,67	ef	0,11
18	9,46	55,8	cd	5,1	76,7	abc	8,7	6,61	fg	0,7	5,6	e	0,3	2,46	f	0,09
20	10,96	53,3	d	5,1	74,9	abc	8,7	5,05	g	0,7	5,6	e	0,4	2,13	g	0,1

Letras iguales no difieren significativamente según prueba de LSD Fisher al 95%.

Anexo 2. Supervivencia de las plantas y duraci3n en d1as de periodos relevantes del ciclo de cultivo.

Planta	1 ^{er} estr3s	Prefloraci3n	2 ^{do} estr3s	Floraci3n	Cosecha	Supervivencia
CR5272 sin sal	No hay	87*	No hay	108*	131*	Si
CR5272 con sal	21	91*	25	112*	137*	Si
ECA400-01	21	85	25	107	131	No
ECA400-02	21	85	25	105	131	No
ECA400-03	21	101	25	119	147	No
ECA400-04	21	97	25	119	143	Si
ECA400-05	21	85	25	105	131	No
ECA400-06	21	97	25	119	143	Si
ECA400-07	21	85	25	105	131	Si
ECA400-08	21	97	25	117	143	No
ECA400-09	21	97	25	119	143	No
ECA400-10	21	101	25	119	147	No
ECA400-11	21	97	25	119	143	No
ECA400-12	21	101	25	119	147	No
ECA400-13	21	85	25	107	131	Si
ECA400-14	21	97	25	119	143	Si
ECA400-15	21	85	25	105	131	Si
ECA400-16	21	101	25	119	147	No
ECA400-17	21	105	25	121	151	No
ECA400-18	21	85	25	107	131	No
ECA400-19	21	97	25	119	143	No
ECA400-20	21	101	25	119	147	No
ECA400-21	21	101	25	119	147	No
ECA400-22	21	97	25	119	143	No
ECA400-23	21	97	25	119	143	No
ECA400-24	21	97	25	119	143	Si
ECA400-25	21	101	25	119	147	No
ECA400-26	21	101	25	121	147	No
ECA400-27	21	101	25	119	147	No
ECA400-28	21	105	25	121	151	No
ECA400-29	21	101	25	119	147	Si
ECA400-30	21	105	25	115	151	No

* Dato promedio de 12 plantas



Anexo 3. Ilustración general de las dos selecciones sobre los materiales M₂. (A: Primera selección), (B: Segunda selección).