

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

**CONFORMACIÓN DE LÍNEAS PROMISORIAS DE MUTANTES  
DE ARROZ (*Oryza sativa* var. CR -5272) CON TOLERANCIA A  
CONDICIONES DE SEQUÍA EN UNA POBLACIÓN M2  
OBTENIDA POR IRRADIACIÓN GAMMA**

Trabajo de graduación sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias  
de la Universidad Nacional para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Alexander Xavier Sáenz Cordero

Heredia, Costa Rica, 2020

**CONFORMACIÓN DE LÍNEAS PROMISORIAS DE MUTANTES DE  
ARROZ (*Oryza sativa* var. CR -5272) CON TOLERANCIA A  
CONDICIONES DE SEQUÍA EN UNA POBLACIÓN M2 OBTENIDA  
POR IRRADIACIÓN GAMMA**

**Por**

**Alexander Xavier Sáenz Cordero**

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

**MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**

**JOSE FABIO CHAVERRI  
FONSECA (FIRMA)** Firmado digitalmente por JOSE  
FABIO CHAVERRI FONSECA  
(FIRMA)  
Fecha: 2020.12.03 10:47:27 -06'00'

**M.Sc. José Fabio Chaverri Fonseca**

**Vicedecano de la Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar**

**RAFAEL EVELIO  
GRANADOS  
CARVAJAL (FIRMA)** Firmado digitalmente por RAFAEL  
EVELIO GRANADOS CARVAJAL  
(FIRMA)  
Fecha: 2020.12.01 06:51:57 -06'00'

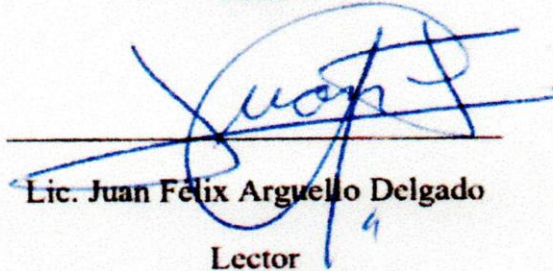
**Dr. Rafael Evelio Granados Carvajal**

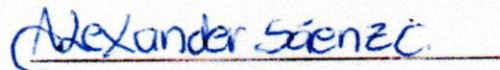
**Director de la Escuela de Ciencias Agrarias**

**RAFAEL SANTIAGO OROZCO  
RODRIGUEZ (FIRMA)** Firmado digitalmente por RAFAEL  
SANTIAGO OROZCO RODRIGUEZ  
(FIRMA)  
Fecha: 2020.11.26 18:24:03 -06'00'

**Dr. Rafael Santiago Orozco Rodríguez**

**Tutor**

  
\_\_\_\_\_  
**Lic. Juan Félix Arguello Delgado**  
**Lector**

  
\_\_\_\_\_  
**Alexander Xavier Sáenz Cordero**

**Alexander Xavier Sáenz Cordero**

**Postulante**

## **DEDICATORIA**

*A mi Dios, por guiarme y brindarme la fortaleza necesaria para concluir con éxito mis estudios de Licenciatura.*

*A mi familia, que siempre ha depositado su confianza en mí y en el valor de mis decisiones.*

*A aquellas personas que invirtieron parte de su valioso tiempo, para aconsejar, guiar y criticar mis acciones y decisiones.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Escuela de Ciencias Agrarias, por el apoyo en recursos y equipos durante todo el proceso.

Al programa FOCAES de la Vicerrectoría de Investigación, por el apoyo económico brindado durante la investigación.

A los Académicos Dr. Rafael Orozco Rodríguez, al Lic. Juan Félix Arguello Delgado y al Dr. Willy Navarro Álvarez Q.E.P.D por sus oportunos consejos y la colaboración en el desarrollo de la presente investigación.

A mis colegas y amigos Alexis Fernández Acuña, Mairon Madriz Martínez y Olger Esquivel por su apoyo en el trabajo de campo durante el desarrollo de esta investigación.

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue el de obtener plantas de arroz tolerantes al estrés hídrico a partir de una población segregante  $M_2$  de la variedad CR-5272 generada por irradiación gamma cobalto 60 ( $Co^{60}$ ). El estudio se dividió en dos fases, la fase I consistió en la determinación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de Polietilenglicol 8000 (PEG8000) en condiciones de laboratorio, la cual sería usada en el proceso de selección de mutantes promisorios tolerantes a estrés hídrico. Para ello, se utilizaron 11 tratamientos distribuidos al azar correspondientes a potenciales osmóticos que iban desde los 0 MPa a los -1.0 MPa con tres repeticiones por tratamiento, donde se evaluaron tres variables: germinación, altura de la planta y longitud de la raíz, La fase II se basó en la selección de mutantes promisorios de arroz con tolerancia al estrés hídrico usando la  $DL_{50}$  de PEG8000 determinada en la fase I, para dicha selección se evaluaron los mutantes en las dos etapas de mayor sensibilidad al estrés hídrico, siendo estas la etapa vegetativa y la reproductiva. En esta fase, y en la primera selección (21 dds) se definieron tres tratamientos, tratamiento 1 (T1), semillas  $M_2$  de CR5272 irradiada con 300 Gy (10,000 semillas  $M_2$ ) en solución de PEG8000 con el potencial osmótico de -0.5 MPa, el tratamiento 2 (T2) de CR5272 (1000 semillas  $M_0$ ) sin irradiar en solución con el potencial osmótico de -0.5 MPa, y el tratamiento 3 (T3) con CR5272 (1000 semillas  $M_0$ ) sin irradiar en agua destilada. Los tratamientos se ubicaron en bandejas metálicas colocándose 14 días en una cámara de germinación y 7 días en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 26°C. La segunda selección se realizó en condiciones de invernadero, en la cual las plantas obtenidas de los tres tratamientos de la primera selección se sembraron en potes con suelo estéril y se sumergieron en una piscina plástica llena de agua para mantener las plantas a Capacidad de Campo (CC), donde permanecieron hasta prefloración y así iniciar la segunda selección, para ello a los tratamientos T1 y T2 se les redujo la humedad de modo que permanecieran en un rango de 30-40% (-0.5MPa) durante un periodo de 27 días una vez transcurrido este tiempo estas plantas se volvieron a sumergir en la piscina para culminar con el llenado de granos hasta la cosecha. Durante este segundo periodo de estrés hídrico hasta a cosecha todas las plantas se evaluaron utilizando parámetros de rendimiento y el Sistema de Evaluación Estándar adoptado para el arroz (IRRI 1996). Como producto de la primera fase se logró determinar la  $DL_{50}$  de PEG8000 siendo esta de -

0.5 MPa. En la fase II en la primera selección se rescataron 17 mutantes tolerantes a condiciones de estrés hídrico provenientes del tratamiento T1. Finalmente, en la segunda selección se rescataron cuatro mutantes que fueron los que mostraron un mejor comportamiento bajo condiciones de estrés hídrico cuando fueron comparados con el tratamiento testigo T3. Producto de este trabajo se destaca que la técnica de inducción de mutaciones usando radiaciones ionizantes, constituyen una herramienta valiosa para la obtención de mutantes tolerantes a la sequía en el cultivo del arroz en Costa Rica.

## ABSTRACT

The objective of this research was to obtain water stress tolerant rice plants from a segregating population M<sub>2</sub> of the CR-5272 variety generated by cobalt 60 gamma irradiation (Co<sup>60</sup>). The study was divided into two phases, phase I consisted of determining the mean lethal dose (LD<sup>50</sup>) of Polyethylene glycol 8000 (PEG8000) under laboratory conditions, which would be used in the selection process of promising mutants tolerant to water stress. For this, 11 treatments were used, distributed by raising, corresponding to osmotic potentials ranging from 0 MPa to -1.0 MPa with three repetitions per treatment, where three variables were evaluated: germination, plant height and root length, La Phase II was based on the selection of promising rice mutants with tolerance to water stress using the LD<sub>50</sub> of PEG8000 determined in phase I, for this selection the mutants in the two stages of greater sensitivity to water stress were evaluated, these being the stage vegetative and reproductive. In this phase, and in the first selection (21 dds), three treatments were defined, treatment 1 (T<sub>1</sub>), M<sub>2</sub> seeds of CR5272 irradiated with 300 Gy (10000 seeds M<sub>2</sub>) in PEG8000 solution with the osmotic potential of -0.5 MPa, the Treatment 2 (T<sub>2</sub>) of CR5272 (1000 seeds M<sub>0</sub>) without irradiation in solution with the osmotic potential of -0.5 MPa, and treatment 3 (T<sub>3</sub>) with CR5272 (1000 seeds M<sub>0</sub>) without irradiation in distilled water. The treatments were placed in metal trays, placing them in a germination chamber for 14 days and in a growth room for 7 days with a photoperiod of 16 hours of light and 8 of darkness at a temperature of 26 C. The second selection was carried out under greenhouse conditions, in which the plants obtained from the three treatments of the first selection were sown in pots with sterile soil and immersed in a plastic pool filled with water to keep the plants at Field Capacity (CC), where they remained until pre-flowering and thus start the second selection, for this to the treatments T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> the humidity was reduced so that they remained in a range of 30-40% (-0.5MPa) during a period of 27 days Once this time had elapsed, these plants were submerged in the pool again to complete the filling of grains until harvest. During this second period of water stress until harvest, all plants were evaluated using yield parameters and the Standard Evaluation System adopted for rice (IRRI 1996). As a product of the first phase, the LD<sup>50</sup> of PEG8000 was determined, being -



0.5 MPa. In phase II, in the first selection, 17 mutants tolerant to conditions of water stress were rescued from the T1 treatment. Finally, in the second selection four mutants were rescued, which were the ones that showed better behavior under conditions of water stress when they were compared with the control T3 treatment. As a result of this work, it is highlighted that the mutation induction technique using ionizing radiation constitutes a valuable tool for obtaining drought-tolerant mutants in rice cultivation in Costa Rica.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
Generalidades del cultivo del arroz .....	5
Variedades utilizadas en Costa Rica.....	5
Variedad CR 5272 .....	5
Modelos de siembra y áreas que abarcan en Costa Rica .....	6
Etapas fenológicas del cultivo de arroz .....	6
Etapa vegetativa .....	6
Etapa reproductiva.....	6
Etapa de maduración .....	7
Efecto del estrés hídrico en el cultivo de arroz .....	7
Respuestas del arroz al estrés hídrico .....	7
Respuestas morfológicas.....	8
Respuestas fisiológicas.....	8
Respuestas moleculares.....	9
Resistencia del arroz a condiciones de estrés hídrico .....	9
Escape.....	9
Evitación.....	10
Tolerancia.....	10
Recuperación.....	11
Técnica de inducción de mutaciones para el mejoramiento genético.....	11
Técnica de inducción de mutaciones en arroz .....	12

Efecto de los rayos gamma <sup>60</sup> Co.....	13
Estrategias de mitigación para el cultivo de arroz para afrontar el estrés por sequía. ....	14
Metodología para seleccionar plantas con tolerancia a condiciones de estrés hídrico o sequía .....	14
Uso del Polietilenglicol (PEG) en selección de plantas de arroz con tolerancia a sequía	15
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
Localización y fechas de ensayos .....	16
Fase I. Determinación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) de Polietilenglicol 8000 (PEG 8000) en plántulas de arroz. ....	17
Material genético y agente osmoregulador utilizado .....	17
Tratamientos.....	17
Procedimiento experimental.....	18
Diseño experimental.....	19
Variables evaluadas.....	19
Análisis de datos.....	19
Fase II: Selección de mutantes promisorios de arroz con tolerancia al estrés hídrico.....	19
Primera selección Fase II:.....	20
Material genético.....	20
Tratamientos.....	20
Preparación del PEG 8000 .....	21
Desinfección de la semilla M <sub>2</sub> y el testigo .....	21
Siembra de semilla y adición agente osmoestresante.....	22
Manejo de cultivo.....	22
Variables evaluadas.....	22
Diseño experimental .....	23
Criterio para la selección individual de mutantes M <sub>2</sub> con tolerancia a estrés hídrico...	23

Recuperación de plántulas en un sistema hidropónico.....	24
Segunda selección Fase II.....	24
Material vegetal.....	24
Trasplante .....	24
Segundo periodo de estrés hídrico .....	25
Manejo.....	26
Diseño experimental.....	26
Variables evaluadas.....	26
Selección de plantas en etapa reproductiva.....	29
Análisis de datos.....	29
RESULTADOS Y DISCUSION .....	29
Fase I. Determinación de la dosis letal media (DL <sub>50</sub> ) de Polietilenglicol 8000 (PEG 8000) en plántulas de arroz CR5272.....	29
Altura de la plántula .....	31
Longitud de la raíz.....	31
Porcentaje de Germinación .....	32
Determinación de la dosis de PEG8000 a usarse en el proceso de selección .....	33
Fase II: Selección de mutantes promisorios de arroz con tolerancia al estrés hídrico.....	35
Primera selección: Etapa vegetativa (germinación y plántula), 21 días después de la siembra (dds).....	35
Altura de la planta .....	37
Longitud del sistema radical .....	38
Segunda selección: Etapa reproductiva (prefloración, floración y llenado de granos).....	40
Enrollamiento de las hojas .....	40
Secado de las hojas.....	42
Altura final de la planta.....	45

Número de macollas.....	45
Días a floración .....	46
Días a la madurez del grano .....	47
Longitud de la panícula.....	48
Número de panículas por planta.....	48
Número de granos llenos y peso de granos llenos .....	49
Peso de 100 granos.....	51
Granos por panícula y granos llenos por panícula .....	51
Peso total de grano por planta .....	52
Esterilidad.....	53
Peso seco de la planta.....	54
Análisis comparativo de todas las variables evaluadas en la etapa reproductiva para determinar los mutantes más promisorios.....	55
Selección de mutantes promisorios.....	56
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES .....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos, potencial osmótico y concentración de PEG 8000 en la determinación de la DL <sub>50</sub> en el cultivo del arroz ( <i>Oryza sativa</i> ).....	17
Tabla 2. Tratamientos en la selección de materiales tolerantes a estrés hídrico. ....	20
Tabla 3. Variables evaluadas para la selección de plántulas con tolerancia a condiciones de estrés hídrico a los 21 dds.....	23
Tabla 4. Escala de evaluación visual para enrollamiento de hojas.....	27
Tabla 5. Escala de evaluación visual para secado de hojas.....	27
Tabla 6. Mutantes promisorios al estrés hídrico seleccionados según altura de la planta, longitud de la raíz e índices de tolerancia relativos.....	35
Tabla 7. Mutantes de arroz evaluados con la escala de evaluación visual del IRRI (1996) para el enrollamiento y secado de las hojas y la escala de enrollamiento de hojas de O'Toole et al., (1979).....	40
Tabla 8. Altura de mutantes y variables agronómicas observadas a los testigos y mutantes sobrevivientes a la cosecha.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A. Desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio al 2.5%. B. PEG8000 en gramos según tratamiento. C. Colocación de las semillas en las placas Petri. D. Aplicación de los tratamientos de PEG8000 a las semillas. ....	18
Figura 2. Periodos de selección en la investigación para la obtención de mutantes con tolerancia a estrés hídrico .....	20
Figura 3. A. Preparación de la Solución de PEG8000 B. Desinfección de la semilla. C. Desinfección de las bandejas. D. Siembra de semillas E. Semillas en PEG8000, M <sub>2</sub> y CR5272 delimitadas por una liga y. F. Bandejas colocadas en la cámara de germinación..	21
Figura 4. Recuperación en sistema hidropónico A. Plántulas seleccionadas trasplantadas a los 21 días después de germinación en sistema hidropónico. B. Plantas seleccionadas y recuperadas en sistema hidropónico a los 71 días después de la siembra. ....	24
Figura 5. A. Trasplante de plantas a potes con suelo estéril. B. Potes con plantas sumergidas en piscina. ....	25
Figura 6. A. Plantas promisorias M <sub>2</sub> , expuestas a estrés hídrico en etapa reproductiva. B. Reposición de agua de las plantas estresadas en etapa reproductiva.....	26
Figura 7. A. Método de medición de humedad utilizando el TDR. B. Cosecha manual de panículas. ....	26
Figura 8. Escala visual para la evaluación del enrollamiento de las hojas descrita por O´Toole et al., (1979) .....	28
Figura 9. Curvas de la determinación de la DL <sub>50</sub> a sequia de CR5272, obtenidas por un modelo de regresión no lineal. A. Altura de la Planta. B. Longitud de raíz. C. Germinación. ....	30
Figura 10. Peso seco (gr) de la planta de los genotipos evaluados en condiciones de estrés hídrico. ....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

Co60: Isótopo de cobalto

Gy: Gray

PEG8000: Polietilenglicol 8000

NaCl: Cloruro de sodio

DL50: Dosis letal media

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

°C: Grados centígrados

g/L: Gramos por litro

ml: Mililitros

cm: Centímetros.

g: Gramos

MPa: Megapascuales

M.s.n.m: Metros sobre el nivel del mar

CC: Capacidad de campo

ITR: Índice de tolerancia relativo



## INTRODUCCIÓN

El arroz es el cultivo alimenticio de más importancia en el mundo y la principal fuente de nutrición para aproximadamente la mitad de la población a nivel mundial. Supliendo para 3 500 millones de personas el 20% de sus calorías (Meybeck, Lankoski, Redfern, Azzu & Gitz 2012). El consumo global de arroz pasará de 676 millones de toneladas en el 2010 a 763 millones en el 2020 con un incremento de 852 millones para el 2035 (Khush, 2013).

En Costa Rica el periodo 2018/2019 el consumo aparente de arroz se estimó en 236 224 toneladas métricas de arroz pilado, para un consumo per-cápita de 46,96 kg y un promedio mensual de 19,685 toneladas, el 56 % del consumo fue cubierto con arroz nacional, mientras que el arroz importado cubrió el 44 %. En este mismo periodo se sembraron 36 979 hectáreas, de las cuales 16 767 se sembró bajo el sistema de riego lo que representa un 45% y 20 212 bajo el sistema seco correspondiente a un 55% (CONARROZ, 2020).

Uno de los mayores problemas que enfrenta el sector arrocero es la sequía debido a que este es el estrés abiótico más grave y la principal causa de pérdidas significativas en el crecimiento y productividad del cultivo de arroz, además causa una reducción severa en la germinación y la etapa de plántula, mientras que en la etapa vegetativa se reduce en gran medida el crecimiento y el desarrollo de la planta (Harris, Tripathi & Joshi, 2002).

Los cambios en los regímenes de lluvias producto del cambio climático aumentan las probabilidades de fracaso de las cosechas a corto plazo y de reducción de la producción a largo plazo. Aunque algunos cultivos en ciertas regiones del mundo puedan beneficiarse, en general se espera que los impactos de este fenómeno sean negativos para la agricultura, amenazando la seguridad alimentaria mundial (Nelson et al., 2009).

Diferentes estudios científicos confirman que el cambio climático global es un problema que a nivel mundial traerá consecuencias importantes sobre el bienestar de los seres humanos y que demanda respuestas oportunas. Los efectos del calentamiento global se han reflejado en mayores inundaciones, sequías, huracanes, entre otros fenómenos.

Centroamérica es una región sobre la que se han presentado algunos de estos eventos climatológicos extremos, los cuales se podrían intensificar en un futuro, de no tomarse acciones con rapidez (Ordaz, Mora, Acosta, Serna & Ramirez, 2010).

En Costa Rica en las últimas décadas se han observado cambios importantes en las precipitaciones y aumentos en las temperaturas, así como en el uso del suelo y procesos de degradación de este. Si las condiciones de variabilidad climática siguen dominando la expresión anual del clima, existen múltiples fenómenos que pueden aumentar o disminuir su frecuencia e intensidad. Por tanto, el clima del país se verá sometido a extremos secos y lluviosos simultáneos, dando como resultado muestras de vulnerabilidad en el sector agrícola de Costa Rica al cambio climático (Ordaz et al., 2010).

En el país la variabilidad climática ha tenido un impacto negativo en las plantaciones de arroz reportándose en el año 2015 en la Región Chorotega la sequía causada por el fenómeno de El Niño ocasiono una pérdida de 714 ha de arroz (CONARROZ, 2016). Para la mitigación del efecto de la sequía en el cultivo se necesitan desarrollar variedades que sobrevivan y den mejores rendimientos en condiciones de sequía (Singh, Binod, Suhel & Kunj, 2012). El desarrollo de variedades y líneas de arroz tolerantes a la sequía mediante la selección tiene un valor económico considerable para aumentar la producción de arroz en áreas con escasas precipitaciones o sin un sistema de riego adecuado (Subbarao et al., 2005).

Para la obtención de variedades que mitiguen el efecto de la sequía se utiliza el fitomejoramiento, el cual tiene como objetivo principal el obtener plantas con cualidades agronómicas relevantes. La estrategia consiste en aumentar la variabilidad de la especie de interés para luego seleccionar a los individuos que presenten las características que se buscan, como alto rendimiento, resistencia a enfermedades o condiciones adversas. En la naturaleza esta variabilidad ocurre por adquisición de nuevas características, ya sea a través de modificaciones en la información genética a nivel individual (mutaciones) o bien por intercambio entre individuos distintos (recombinación genética), el fitomejorador debe emplear técnicas que traten de imitar este procesos, en el caso de inducción a variabilidad genética utilizan elementos que provocan mutaciones denominados múgatenos entre los que destaca la radiación ionizante(González, 2004).

Las radiaciones ionizantes son un instrumento utilizado para alterar el genoma, se usa en el fitomejoramiento para obtener mutaciones en menor tiempo que los métodos convencionales. Como resultado estos radiomutantes permiten incrementar las reservas genéticas de los bancos de germoplasma y pueden ser usados en programas de mejoramiento. Se han obtenido resultados por diversos investigadores demostrando que la radioinducción de mutaciones puede ser muy útil para obtener variedades mejoradas de arroz, con alta productividad y resistencia a factores bióticos y abióticos, con la ventaja de que esta técnica permite acortar los periodos de selección y aportar nuevos genes que no estén restringidos a la constitución genética de los progenitores. (Núñez & Andreu, 1998).

El mejoramiento por medio de la inducción de mutaciones el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) en 2015 contaba en sus bases de datos con 2672 variedades mutante, las cuales han tenido un gran impacto económico en muchos países (Marn, Minn, Zar & Mar, 2015) entre estas variedades 525 son pertenecientes al cultivo de arroz (Reig, 2019) En el caso de Costa Rica por medio de esta técnica fue posible la obtención de mutantes resistentes a enfermedades, principalmente *Pyricularia* (Navarro, 1999b)

Por lo anterior el Programa de Biotecnología y Recursos Genéticos para el Fitomejoramiento (BIOVERFI) de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA) cuya meta es la búsqueda de mutantes tolerantes a factores abióticos y bióticos en el cultivo del arroz, motivo la realización de esta investigación, y de esta manera seleccionar mutantes promisorios con tolerancia a la sequía, los cuales al ser menos demandantes de agua podrían solventar las perdidas en los sistemas productivos de este cereal, lo cual afecta directamente la economía del productor y del país.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Obtener plantas de arroz tolerantes al estrés hídrico (Sequía) a partir de una población segregante M<sub>2</sub> de la variedad CR-5272 generada por irradiación gamma con cobalto 60 (Co<sup>60</sup>) para seleccionar mutantes promisorios y contribuir a mitigar el cambio climático.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de semillas de arroz en un ambiente controlado producto de la aplicación de un agente osmoestresante el cual permita simular condiciones de estrés hídrico.
- Seleccionar a partir de una población M<sub>2</sub> mutantes promisorios de arroz con tolerancia al estrés hídrico en condiciones controladas.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **Generalidades del cultivo del arroz**

Botánicamente se define el arroz como una gramínea anual de tallos redondos y huecos compuestos de nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas a los tallos por la lámina y su inflorescencia es una panícula. Taxonómicamente se considera el arroz como una fanerógama, tipo espermatofita, subtipo angiosperma. Pertenece a la clase de las monocotiledoneas, orden glumifora, familia Poaceae, su género y especie es *Oryza sativa*. (Tinoco & Acuña, 2009).

El arroz se cultiva en una diversidad de condiciones ambientales y algunos autores sostienen que es un cultivo especial para las zonas húmedas del trópico o de climas con temperatura alta. En Costa Rica, el arroz puede cultivarse desde el nivel del mar hasta 850 msnm, en cuanto a la precipitación es importante la distribución de las lluvias, se estima que 10 mm diarios durante todo el período del cultivo hasta el de llenado de grano es adecuado. El cultivo de arroz requiere una radiación solar entre 250 a 350 cal/cm<sup>2</sup>/día y su época de siembra debe ubicarse de tal manera que se eviten vientos fuertes que puedan afectar las hojas y causar aborto en las flores. Son adecuadas humedades relativas superiores a 80% (Tinoco & Acuña, 2009).

Los suelos para el cultivo del arroz deben ser preferiblemente planos con una textura arcillo-arenosa, arcillosa o franco arcillo-limoso y con pH adecuado el cual se sugiere entre un rango de 5,5 y 7 (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1991).

### **Variedades utilizadas en Costa Rica**

En el período 2016/2017 la variedad más utilizada en Costa Rica fue Palmar 18 de la cual se sembraron 16,810 ha, en orden de importancia, le siguen Lazarroz FL con 8,541 ha, Puita INTA con 5,161 ha, NayiribeB FL con 3,757 ha y Sierpe FL 250 con 3,752 ha (CONARROZ, 2018).

### **Variedad CR 5272**

La variedad CR 5272 fue liberada en 1976 por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), es una variedad de porte bajo, hojas erectas, macollamiento moderado, resistente al acame, florece entre 80 y 85 días después de siembra y dura a la cosecha entre

110 y 155 días después de siembra. Al igual que otras variedades como CR 1113 es susceptible a *Pyricularia*, pero tiene una menor capacidad de recuperación cuando está afectando severamente el follaje (Cortés, 1994).

### **Modelos de siembra y áreas que abarcan en Costa Rica**

En Costa Rica en el periodo 2016/2017 se sembró un total de 46 426 ha de las cuales 18 524 ha se sembraron bajo el sistema de riego lo que representa un 40% y 27 902 ha se sembraron bajo el sistema seco lo que equivale a un 60% (CONARROZ, 2018).

### **Etapas fenológicas del cultivo de arroz**

#### **Etapa vegetativa**

Inicia con la germinación de la semilla y termina cuando comienza la formación del primordio panicular, esta etapa se divide en etapa vegetativa básica y etapa vegetativa retardada sensible al fotoperiodo. La etapa vegetativa básica es insensible a la duración del día y termina una vez que la planta puede iniciar la formación del primordio panicular al presentarse días cortos. La etapa vegetativa retardada tiene una duración variable y es la responsable de las diferencias en la duración del ciclo de vida de las variedades fotosensibles (Quistian, 2010).

Se caracteriza por un activo macollamiento, un gradual incremento de la altura de las plantas, y la emergencia de las hojas a intervalos regulares. Los macollos que no desarrollan una panoja se llaman macollos infértiles (Olmos, 2006).

#### **Etapa reproductiva**

Empieza en la iniciación de la panícula y en el inicio de la floración (Jarma et al, 2010). Esta etapa se caracteriza por un declinamiento del número de macollos, la emergencia de la hoja bandera, el engrosamiento del tallo por el crecimiento interno de la panoja, la emergencia de la panoja (ocurre unos 20-25 días luego de la diferenciación del primordio floral), y la floración(antesis) (Olmos, 2006). Desde el punto de vista agronómico se considera que la planta se encuentra en floración cuando el 50% de las panículas han emergido (Quistián, 2010).

### **Etapa de maduración**

Empieza en el inicio de la floración y termina en la madurez fisiológica del grano (Jarma, Degiovanni & Montoya, 2010) Su duración en los trópicos es más o menos constante, alrededor de 30 días, mientras que en las zonas templadas puede durar hasta 65 días. En términos prácticos se le subdivide en las etapas de grano lechoso, masoso, sazón y maduro. Esta etapa se caracteriza por la senescencia de las hojas y por el crecimiento del grano, manifestado éste por el aumento en tamaño y peso, además de los cambios de color (Quistián, 2010).

### **Efecto del estrés hídrico en el cultivo de arroz**

La sequía es el estrés abiótico más grave y la principal causa de pérdidas significativas en el crecimiento y productividad del cultivo de arroz, además causa una reducción severa en la germinación y la etapa de plántula, Mientras que en la etapa vegetativa se reduce en gran medida el crecimiento y el desarrollo de la planta (Harris et al., 2002).

El arroz es altamente susceptible al estrés hídrico y la magnitud de las pérdidas de rendimiento depende de la duración de este estrés y la etapa de crecimiento del cultivo (Venuprasad, Lafitte & Atlin, 2007). El estrés por sequía puede afectar negativamente varias etapas del crecimiento de la planta y la influencia puede verse desde el punto de vista morfológico, anatómico y fisiológico (Masyhudi & Patterson, 1994).

Los síntomas comunes del déficit de agua son el enrollado de las hojas, hojas resacas, macollaje limitado, el raquitismo, el retraso de la floración, la esterilidad de las espiguillas y un llenado incompleto de los granos. En la etapa vegetativa se reduce la altura, el macollaje y el área foliar mientras que en la etapa de iniciación de la panícula hasta la espigazón; se reduce el rendimiento al aumentar la esterilidad de la espiguilla (Chaudhary, Nanda & Tran, 2003).

### **Respuestas del arroz al estrés hídrico**

El cultivo del arroz responde y se adapta al estrés hídrico mediante la inducción de diversas modificaciones, estas pueden ser morfológicas, fisiológicas o moleculares, estas modificaciones se dan acorde al desarrollo fenológico del cultivo (Noelle, Weru, Rodrigue & Karlin, 2018).

### **Respuestas morfológicas**

Involucran la disminución en la germinación, tamaño de la hoja, número de hojas, biomasa, y el crecimiento celular y elongación. Otras respuestas morfológicas causadas por el estrés hídrico son el incremento en el enrollamiento y secado de la punta de las hojas, incremento en el cierre de los estomas y un aumento en la longitud del sistema radical (Noelle et al., 2018)

### **Respuestas fisiológicas**

Entre las respuestas fisiológicas que se dan en presencia de estrés hídrico, las más comunes se asocian con una reducción en la transpiración, la fotosíntesis, el contenido de clorofila, la estabilidad de la membrana, la conductancia estomática y la actividad del fotosistema II (Noelle et al., 2018).

En condiciones de sequía se disparan los niveles de la hormona ácido abscísico (ABA) que juega un papel crucial en la regulación del consumo de agua y en la fisiología vegetal de respuesta al estrés osmótico, esta hormona es un compuesto orgánico sintetizado por la planta, transportado a otras regiones de la misma, con potentes efectos fisiológicos a muy bajas dosis y desempeña un papel determinante en la coordinación de la respuesta vegetal a la sequía (Rodríguez & Pardo, 2017).

A nivel fisiológico la transpiración es un proceso que se controla inicialmente por la apertura y cierre de estomas, en el momento en el momento que las extremidades de las raíces detectan el déficit hídrico en el suelo envían ácido abscísico (ABA) a los estomas cuya síntesis y translocación se aceleran hacia las partes aéreas de la planta, y los estomas bajo ese estímulo se cierran reduciendo la transpiración, cuando esto sucede inicia una serie de ajustes como el cierre estomático, disminución de los procesos fotosintético y transpiratorio, además se da una suspensión de la división celular y alargamiento celular, alteraciones de los procesos hormonales y como consecuencia la reducción del crecimiento (Quistián, 2010).



## **Respuestas moleculares**

Los efectos moleculares al estrés por sequía inician en el momento en el cual los receptores de las plantas detectan el estrés, lo que ocasiona que se dé una serie de respuestas celulares coordinadas que inducen a la expresión de un gran número de genes, dichas expresiones de genes también se ocasionan por las respuestas morfológicas y fisiológicas (Noelle et al., 2018)

En el cultivo de arroz existen más de 6000 genes que están regulados por el estrés hídrico (Maruyama et al., 2014). Wang et al., (2011) al realizar perfiles de expresión genética de todo el genoma del arroz, detectaron 5284 genes que se expresaron diferencialmente bajo estrés hídrico. De los genes que se más importantes se pueden mencionar el Ghd2, este se asocia al número de granos y altura de la planta, también el Ghd7 que está relacionado en la regulación de la senescencia de la hoja (Liu et al., 2016). Otro gen importante es el OsAHL1 está asociado al mecanismo de evitación de la sequía esto se debe a que regula el desarrollo de la raíz y también regula el contenido de clorofila en las hojas, además cuando este gen se sobre expresa aumenta la tolerancia a la sequía en las plantas de arroz durante la etapa de desarrollo de las plántulas y también del desarrollo de la panícula (Zhou et al., 2016).

## **Resistencia del arroz a condiciones de estrés hídrico**

Asociado a la resistencia se dan cuatro mecanismos: escape, evitación, tolerancia y recuperación (Quistián, 2010).

La resistencia a la sequía es conferida a las plantas por alguno o por la combinación de estos cuatro mecanismos, la resistencia a la sequía puede ser de naturaleza fisiológica y genética (Quistián, 2010). La magnitud del efecto de sequía depende de la resistencia propia de la variedad, características genéticas y rasgos agronómicos específicos, intensidad y duración del estrés y la etapa de desarrollo en que se encuentre la planta durante la carencia de agua (Singh, Habirand & Naik; Morgan, 1986).

### **Escape**

Capacidad fisiológica de la planta para escapar al efecto de la sequía completando su ciclo vegetativo antes de que se presente el estrés de humedad (Quistián, 2010).

El escape es una adaptación al entorno que permite a las plantas evitar los periodos críticos para tener un buen desarrollo, como por ejemplo la selección de variedades con un ciclo más corto para evitar los periodos más susceptibles a estrés hídrico (Fukai, Pantuwan, Jongdee & Cooper, 1999; Turner, Gardner, O'Neill & O'Neill, 2001). Este mecanismo puede darse de dos maneras la primera es completar el ciclo de cultivo antes de que ocurra una sequía terminal, y la segunda evitar la coincidencia entre los periodos de baja disponibilidad de agua y las etapas sensibles del cultivo, especialmente donde se requiere bastante agua como lo es en la floración y llenado de granos (Noelle et al., 2018).

### **Evitación**

Propiedad genético-fisiológica de la planta para evitar los efectos de la sequía por dos vías importantes, una vía es por el mantenimiento del nivel de hidratación de los tejidos a causa del desarrollo de sus raíces profundas y reducción del flujo de agua de los tejidos, tallos y hojas. La disminución de la pérdida de agua por el rápido cierre de los estomas y enrollamiento de sus hojas, disminuye la superficie evaporativa ayudado por la plasticidad y serosidad sus cutículas (Quistián, 2010). Al disminuirse la superficie evaporativa se reduce la pérdida de agua por transpiración y gracias a un sistema de raíces prolífico extenso las plantas pueden mantener la absorción de agua (Noelle et al, 2018).

Cuando se da la reducción de humedad del suelo, se puede conducir a un menor contenido de agua en las hojas lo que hace que las células pierdan agua y presión lo que causa que el tamaño de los poros estomáticos se reduzca (Tezara, Mitchell, Driscoll & Lawlor, 2002) lo que provoca el cierre estomático (Signh et al., 2012)

### **Tolerancia**

Habilidad del citoplasma de las células para sobrevivir y funcionar normalmente, aunque los tejidos de la planta se dessequen o tengan potenciales de agua reducidos, a fin de poder soportar el déficit de presión y difusión de la misma. Es la resultante de interacciones fisiológicas complejas que involucran procesos de osmoregulacion (Quistián, 2010).

Desde el punto de vista agronómico, una planta es tolerante cuando puede obtener un mayor rendimiento que las plantas sensibles. La tolerancia permite el mantenimiento de las funciones celulares esenciales para la supervivencia, debido a las respuestas específicas y dirigidas a pesar de la deficiencia de agua (Passioura, 1996; Tardieu, 2005). El

mantenimiento de la turgencia de la planta cuando hay deficiencia de agua puede retrasar el cierre de estomas, mantiene el volumen cloroplástico y reduce el marchitamiento de las hojas lo que confiere a la planta una mayor tolerancia al déficit interno de agua, esto permite un funcionamiento más prolongado de la fotosíntesis, debido a que el estrés hídrico puede ser imprevisible la tolerancia es la estrategia más efectiva en situaciones de estrés hídrico severo y prolongado (Noelle et al., 2018).

### **Recuperación**

Consiste en la habilidad genético-fisiológica de las plantas para reanudar su desarrollo fenológico después de un período de carencia de humedad del suelo; la velocidad con que se presenta está asociada al mayor contenido de agua o potencial hídrico, es decir la velocidad de recuperación es proporcional al potencial de agua en las vainas y las hojas; y esta recuperación puede registrarse en cualquier de las etapas fenológicas (Chang, Loresto, O'Toole & Armenta, 1983).

### **Técnica de inducción de mutaciones para el mejoramiento genético**

El método empleado para desarrollar nuevas variedades de plantas en determinado cultivo, que posean características deseables se conoce como fitomejoramiento, método que inicialmente se basaba en la selección, entre plantas buenas y malas. Si bien la fitotecnia exige la variación genética de las características útiles para mejorar los cultivos, muchas veces no se logra obtener la variación deseada. En estos casos pueden emplearse agentes mutágenos, como la radiación y algunos productos químicos, con la finalidad de inducir mutaciones y generar variaciones genéticas de las cuales puedan seleccionarse los mutantes que presenten respuestas deseadas (Novak & Brunner, 1992).

La inducción de mutaciones ha resultado ser un método eficaz para lograr variaciones dentro de los diferentes cultivares, ya que ofrece la posibilidad de inducir características deseadas que no se pueden hallar en la naturaleza o se han perdido durante el proceso evolutivo (Ahloowalia & Maluszynski, 2001).

Las radiaciones inductoras de mutaciones son de dos clases: las ionizantes y no ionizantes, siendo las ionizantes de primordial interés para el fitomejorador las cuales pueden ser las radiaciones beta, gamma de sustancias radioactivas, rayos X y los neutrones (Almeida, 2009).

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).

### **Técnica de inducción de mutaciones en arroz**

Desde los años sesenta se han generado un gran número de líneas mutantes que abarca un amplio espectro de especies, muchas de las cuales han sido utilizadas en la obtención de nuevas variedades. Las que se han desarrollado provienen tanto de la explotación directa de las líneas mutantes obtenidas como del uso de estas como progenitores en programas de mejora genética. La base de datos de Variedades Mutantes (Mutant Varieties Database) de la IAEA/FAO (Atomic Energy Agency/Food and Agriculture Organization) en 2007 contaba con más de 2.500 variedades oficialmente liberadas, de las cuales unas 1.600 fueron generadas directamente después del tratamiento de mutagenesis y el respectivo proceso de selección. Se puede destacar que 525 de estas nuevas variedades pertenecen a especies de arroz obtenidas en su mayoría mediante la irradiación con rayos gamma (Reig, 2019).

Los mutantes en arroz pueden clasificarse ampliamente como transgénicos y no transgénicos. Los transgénicos se producen mediante vectores de transformación principalmente de transferencia de ADN (T-ADN), estos dependiendo de las características de los vectores, los eventos de inserción pueden causar mutaciones de Knockout o activación. En las de activación un gen normalmente inactivo puede ser activado para desencadenar una variación (Leung & An, 2004).

Los mutantes no transgénicos incluyen aquellos producidos por mutagenesis química y por irradiación convencional. Para la detección genética de la tolerancia a la sequía los mutantes no transgénicos son ventajosos porque pueden distribuirse libremente y probarse en condiciones de campo a diferencia de los mutantes transgénicos que sus condiciones de prueba deben ser más controladas (Fischer, Fukai, Kumar, Leung & Jongdee, 2012b).

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, 1998a)

### **Efecto de los rayos gamma <sup>60</sup> Co**

La utilización de radiaciones gamma como una alternativa para obtener variación genética por la vía de mutaciones inducida es una técnica muy utilizada actualmente en el mejoramiento genético de plantas. Como resultado ha permitido la obtención de cultivares de alta adaptación en muchas especies. Su utilización debe de estar precedida de ensayos que permitan determinar la dosificación adecuada. La determinación de la radiosensibilidad se logra sometiendo el material a un rango de intensidades y seleccionando aquellas dosis que permitan observar efectos visibles de la radiación procurando mantener siempre la supervivencia de tejidos, esta dosis optima se asocia con la dosis letal media (DL<sub>50</sub>). (Lemus, Méndez, Cedeño & Otahola, 2002).

Las semillas son el material predilecto para irradiación en muchos experimentos de inducción de mutaciones y en el mejoramiento práctico, las semillas tratadas suelen perder poder germinativo dependiendo ciertamente de la reacción de la especie y de la variedad a tratar, así como de la dosis de irradiación (Lemus et al., 2002).

Esta técnica de irradiación de semillas ha sido empleada con éxito en bastantes experimentos alrededor del mundo, como lo es el caso de países como Malasia donde se irradiaron semilla de arroz con Rayos Gamma a una dosis de 300 Gy y posteriormente se evaluaron y caracterizaron líneas de arroz mutante en condiciones de sequía avanzada (Cha-um, Yooyongwech & Supaibulwatana, 2012). En Myanmar al igual que en el caso anterior se irradiaron semillas de arroz a una dosis de 300 Gy con Rayos Gamma, usando Co<sub>60</sub> con la finalidad de mejorar una variedad de arroz nativa Var. Manawthukha y de esta manera desarrollar un mutante tolerante a condiciones de sequía (Marn et al., 2015).

### **Estrategias de mitigación para el cultivo de arroz para afrontar el estrés por sequía.**

El estrés hídrico afecta la morfología y fisiología del cultivo, resultando en la reducción del rendimiento de grano. Por lo tanto, se necesitan desarrollar estas variedades que sobrevivan y den mejores rendimientos en condiciones de estrés hídrico (Singh et al., 2012). Las estrategias señaladas son:

1. Desarrollo de variedades de arroz de maduración temprana para escapar de la sequía (Singh et al., 2012).
2. Desarrollo de variedades con tolerancia a la sequía que se desempeñen mejor en condiciones de estrés por sequía. La reproducción de la heterosis es un método de cría más efectivo para mejorar el rendimiento y sus características asociadas. La heterosis para los caracteres de la raíz puede dar la mejor oportunidad en el desarrollo de variedades tolerantes a la sequía (Singh et al., 2012).
3. Mejora e incorporación de aquellas características que son esenciales para la supervivencia de las plantas de arroz en condiciones de estrés hídrico como el sistema de raíces profundas, el enrollamiento de las hojas, la cera de la cutícula, la posición de los estomas y la capacidad de recuperación rápida, etc. (Singh et al., 2012).

### **Metodología para seleccionar plantas con tolerancia a condiciones de estrés hídrico o sequía**

La selección de plantas de arroz con tolerancia a condiciones de sequía se puede llevar a cabo en condiciones de campo o en condiciones de laboratorio. La detección de la tolerancia a la sequía en condiciones de campo implica recursos considerables (tierra, personas, etc.) y requiere condiciones ambientales adecuadas para la expresión fenotípica efectiva y repetible de la tolerancia a la sequía atribuible al genotipo. Por lo que se vuelve necesario utilizar métodos de detección en etapas tempranas del cultivo que sean simples pero efectivos como lo es la selección *in vitro* (Marmar, Baenziger, Dweikat & El Hussein, 2013).

Para la selección *in vitro* de plantas tolerantes a déficit hídrico es necesario simular este tipo de estrés, a nivel de laboratorio se utilizan sustancias denominadas osmoestresantes disminuyen el potencial osmótico, reteniendo las moléculas de agua y

dificultando su absorción por parte de los tejidos vegetales algunas de estas sustancias osmoestresantes son el manitol, sorbitol, sacarosa y polietilenglicol (PEG) siendo esta última la más empleada (Rai, Kalia, Singh, Gangola & Dhawan, 2011).

A nivel *in vitro* los métodos de selección de tolerancia a la sequía representan un paso inicial que evita la evaluación en campo de un elevado número de individuos. Métodos en el cual se utilizan polímeros no penetrantes como el polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular en el medio de cultivo, el cual produce una disminución en el potencial hídrico, de una manera similar a la sequía en el suelo (Álvarez et al., 2013).

El polietilenglicol (PEG) es un polímero neutro disponible en un rango de pesos moleculares, altamente soluble en agua y con baja toxicidad a los mamíferos y debido a estas propiedades ha sido utilizado por diferentes investigadores para imponer un estrés hídrico en plantas disminuyendo el potencial hídrico del medio donde están las raíces y así el potencial de agua de la planta (Lawlor, 1970).

Estos agentes no tienen efectos perjudiciales o tóxicos en la planta; sin embargo, inhiben el crecimiento de la planta al reducir el potencial hídrico de medio de cultivo de manera similar al secado del suelo, de modo que las plantas cultivadas no pueden absorber el agua (Bressan, Hasegawa & Handa, 1981)

Debido a lo anterior el uso de compuestos de alto peso molecular tienen un uso creciente en ensayos de germinación ya que simulan adecuadamente a las condiciones de sequía sin provocar toxicidad a la semilla, y debido a su alto peso molecular no pasa por la membrana plasmática de las células (Emmerich & Hardegee, 1990)

### **Uso del Polietilenglicol (PEG) en selección de plantas de arroz con tolerancia a sequía**

La utilización del Polietilenglicol debido a su capacidad de no ser absorbido por las raíces, además de la exposición uniforme del sistema radicular a un deseado potencial osmótico, independientemente de las diferencias de magnitud de las raíces, convierten al PEG en un compuesto muy utilizado por los investigadores en experimentos donde se deseen emular las condiciones de sequía que se dan en campo (Kato, Hirotsu, Nemoto & Yamagishi, 2008).

El PEG ha sido empleado en arroz para simular condiciones de sequía, en estudios realizados en Cuba, como simulador del déficit hídrico en el crecimiento de tres variedades de arroz en la etapa de plántula (García, González & Marreno, 2005b). Se uso en la selección de mutantes de arroz de buen comportamiento agronómico en condiciones de bajo suministro de agua (González & Martínez, 2016). Además, en la evaluación de la tolerancia al déficit hídrico en genotipos de arroz en condiciones in vitro (García, Florido & Lara, 2003a).

En Japón se utilizó en la identificación de los QTL que controlan la tolerancia del arroz a la sequía, empleando plantas de semillero en cultivo hidropónico (Kato et al., 2008).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Esta investigación se llevó a cabo en dos fases, las cuales se describen a continuación:

**Fase I:** Consistió en la determinación de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de Polietilenglicol 8000 (PEG8000) en condiciones de controladas (laboratorio), la cual sería usada en el proceso de selección de mutantes promisorios tolerantes al estrés hídrico.

**Fase II.** Constituyo en la selección de mutantes promisorios de arroz con tolerancia al estrés hídrico. Esta selección se realiza en dos momentos del desarrollo del cultivo, la primera selección en la etapa vegetativa (germinación y plántulas) y la segunda selección en la etapa reproductiva (prefloración, floración e inicio de llenado de granos). Para ello se usó la dosis determinada PEG8000 en la fase I.

### **Localización y fechas de ensayos**

La primera fase y la primera selección de la fase dos se desarrolló en la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica, específicamente en los Laboratorios de Recursos Fitogenéticos y de Cultivo de Tejidos, ubicados en la provincia de Heredia a 86°08' longitud oeste 10°20' latitud norte a una altura de 1158 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) esta primera fase del ensayo se realizó en los meses de diciembre del 2017 y enero del 2018 y se registró una temperatura promedio de 28 °C.



La segunda selección de la fase dos se llevó a cabo en la Finca Experimental Santa Lucía, ubicada en Santa Lucía, Barva de Heredia, entre las 10° 1' 20" latitud norte y 84° 06' 45" longitud oeste, una altitud de 1250 msnm, con una precipitación anual de 2.371 mm, una humedad relativa de 78%, temperatura media anual de 21,50°C, con 15,20°C de promedio entre las mínimas y 27,80° C de promedio entre las máximas (Instituto Meteorológico Nacional, Costa Rica, 2015). De acuerdo con los registros climáticos de la estación meteorológica ubicada en la misma finca para el periodo de ejecución del experimento que fue entre febrero y junio del 2018 el clima se caracterizó por presentar temperaturas máximas de 29,15°C y mínimas de 18,23°C.

**Fase I.** Determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de Polietilenglicol 8000 (PEG 8000) en plántulas de arroz.

#### **Material genético y agente osmoregulador utilizado**

Se utilizaron semillas de la variedad CR5272 sin irradiar (M<sub>0</sub>) y como agente osmoregulador se usó el polietilenglicol 8000 (PEG 8000).

#### **Tratamientos**

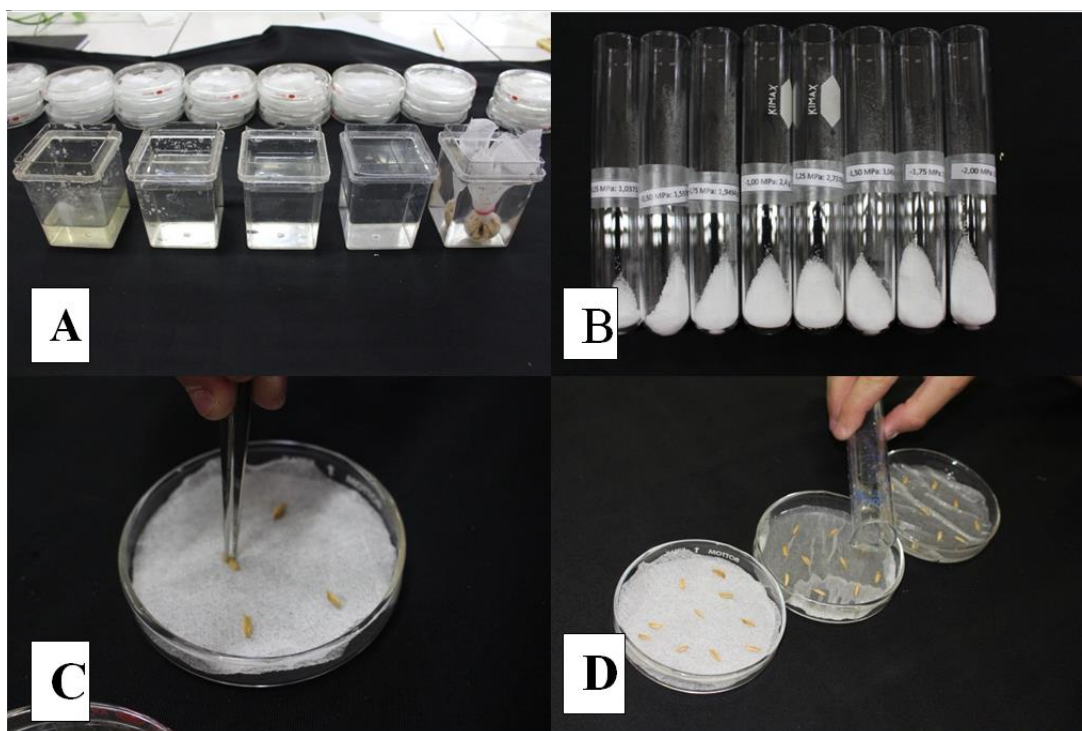
Se realizaron 11 tratamientos (Tabla 1). Los cuales consistieron en modificar el potencial osmótico de la solución (Agua destilada) añadiendo una cantidad conocida de PEG8000, en diferentes cantidades de 0 a 287 gramos por litro (g/L).

**Tabla 1.** Tratamientos, potencial osmótico y concentración de PEG 8000 en la determinación de la DL<sub>50</sub> en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*).

<b>N° Tratamiento</b>	<b>Potencial osmótico en Megapascals (MPa)</b>	<b>Concentración PEG 8000 g/l de agua</b>
<b>1</b>	0 MPa	0
<b>2</b>	-0.1 MPa	80
<b>3</b>	-0.2 MPa	120
<b>4</b>	-0.3 MPa	150
<b>5</b>	-0.4 MPa	175
<b>6</b>	-0.5 MPa	200
<b>7</b>	-0.6 MPa	220
<b>8</b>	-0.7 MPa	237
<b>9</b>	-0.8 MPa	255
<b>10</b>	-0.9 MPa	271
<b>11</b>	-1 MPa	287

## Procedimiento experimental

Esta fase se hizo en condiciones controladas, para ello se utilizaron platos petri con dimensiones de 9 centímetros (cm) de diámetro y 1,5 cm de altura. En el fondo de cada plato se colocó papel de germinación humedecido con 10 mililitros (ml) del tratamiento experimental (PEG8000) y se puso 10 semillas previamente desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% de la variedad CR-5272 sobre el papel de germinación (Fig. 1). Los platos Petri se colocaron en una cámara de germinación en donde permanecieron 14 días y posteriormente fueron trasladados a un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad en el cual permanecieron 7 días más para completar la prueba que duro 21 días.



**Figura 1.** A. Desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio al 2.5%. B. PEG8000 en gramos según tratamiento. C. Colocación de las semillas en las placas Petri. D. Aplicación de los tratamientos de PEG8000 a las semillas.

## **Diseño experimental**

Se utilizó un diseño irrestricto al azar con tres repeticiones por cada tratamiento experimental, estos corresponden a distintos potenciales osmóticos.

Los potenciales osmóticos se obtuvieron a partir de la ecuación de Michel (1983).

Concentración de PEG 8000 g/L=

$$[\text{PEG}] = [4 - (5.16 \Psi T - 560 \Psi + 16)^{0.5}] / (2.58 T - 280)$$

Dónde:

PEG: concentración de Polietilenglicol en gramos por litro de agua.

T: temperatura en C°

$\Psi$ : Potencial osmótico deseado

## **Variables evaluadas**

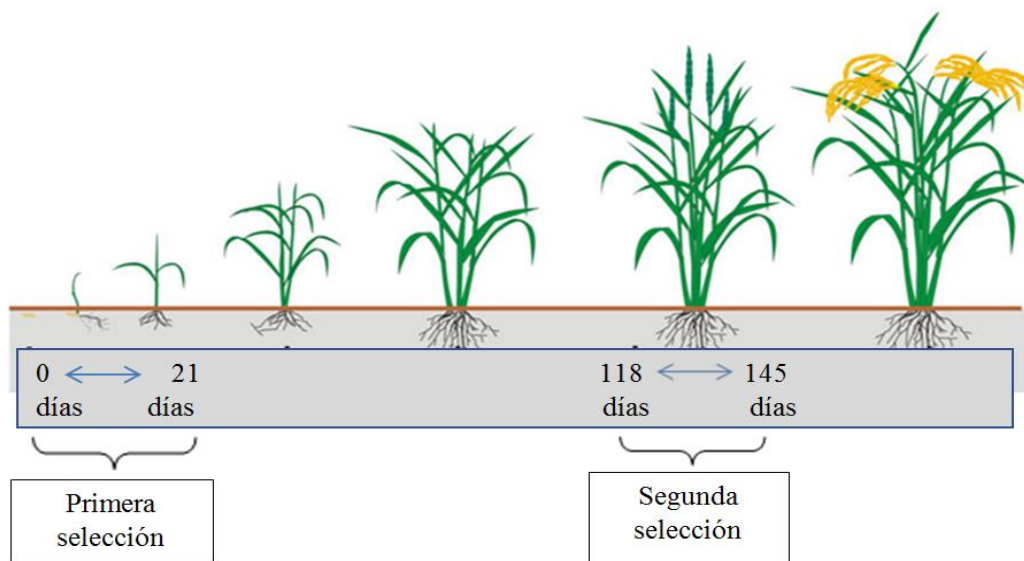
Se evaluó la germinación de las semillas, la altura de la planta (de la base del tallo a la punta de la hoja más larga) (cm), longitud del sistema radical (de la base del tallo a la parte más distal de la raíz más larga) (cm).

## **Análisis de datos**

La determinación de la DL<sub>50</sub> del PEG8000 fue realizada mediante el análisis de la dosis respuesta por medio de un modelo de regresión no lineal. Para todas las variables se realizó un análisis de varianza y posteriormente se usó una prueba de LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ) para realizar comparaciones entre las medias.

## **Fase II: Selección de mutantes promisorios de arroz con tolerancia al estrés hídrico**

La selección de mutantes promisorios se hizo en dos momentos del desarrollo del cultivo. La primera selección se realizó en la etapa vegetativa que abarco el estado de germinación y plántula en cual tuvo una duración de 21 días después de la siembra (dds) y la segunda selección al inicio de la etapa reproductiva que abarco los estados de prefloración, floración e inicio de llenado de granos, la cual tuvo una duración de 27 días (Figura 2).



**Figura 2.** Periodos de selección en la investigación para la obtención de mutantes con tolerancia a estrés hídrico

### Primera selección Fase II:

#### Material genético

Se utilizaron semillas segregantes de una población  $M_2$  irradiadas a 300 Gy y semillas sin irradiar ( $M_0$ ) en ambos casos de la variedad CR5272.

#### Tratamientos

Se contó con un total de tres tratamientos, dos en solución con el agente osmoregulador PEG 8000, más uno en agua destilada y sin PEG 8000 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tratamientos en la selección de materiales tolerantes a estrés hídrico.

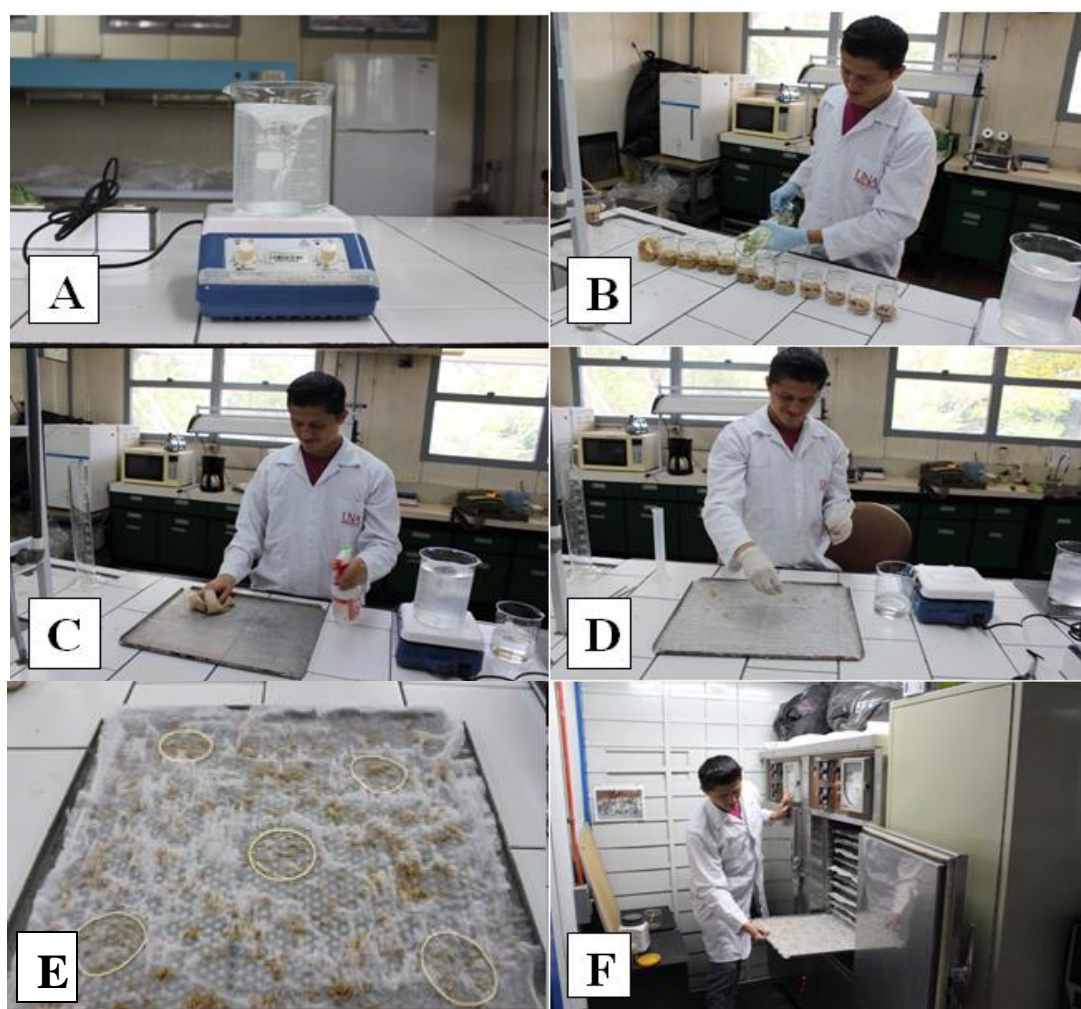
Tratamiento	Material genético	Irradiación (Gy)	Dosis de PEG8000	Número de semillas
1	Población segregante CR5272 ( $M_2$ )	300 Gy	200 g/L	10000
2	CR5272 sin irradiar	0	200 g/L	1000
3	CR5272 sin irradiar	0	0 g/L	1000

### Preparación del PEG 8000

Para obtener la solución simuladora de estrés hídrico para el primer periodo de selección se realizó una disolución de 400 gr de PEG8000 en 2000 ml de agua destilada (Fig.3A), la cual se distribuyó en 10 bandejas metálicas con las semillas a evaluar.

### Desinfección de la semilla M<sub>2</sub> y el testigo

Se realizó la desinfección de las semillas con hipoclorito de sodio (NaCl) al 2.5% v/v durante cinco minutos, después se realizaron cuatro lavados de un minuto cada uno con agua destilada (Fig.3B).



**Figura 3.** A. Preparación de la Solución de PEG8000 B. Desinfección de la semilla. C. Desinfección de las bandejas. D. Siembra de semillas E. Semillas en PEG8000, M<sub>2</sub> y CR5272 delimitadas por una liga y. F. Bandejas colocadas en la cámara de germinación.

### **Siembra de semilla y adición agente osmoestresante**

La siembra de las semillas a evaluar con el PEG8000 y los testigos se realizó en 11 bandejas de germinación (Fig. 3D y E), previamente desinfectadas con alcohol etílico al 95%, estas bandejas contaban con una dimensión de 43 x 48 cm cada una, en el fondo de estas, se colocaron dos láminas de papel de germinación. En 10 de las bandejas se colocaron 1000 semillas M<sub>2</sub> de arroz y 100 semillas sin irradiar de la variedad CR-5272 como testigo bajo estrés hídrico, estas semillas testigo se distribuyeron en grupos de 20 semillas en cinco puntos distintos de la bandeja y se identificaron con ligas para que no se confundieran con las semillas M<sub>2</sub>, posteriormente, cada bandeja ya preparada se cubrió con una lámina de papel de germinación y se procedió a agregarle a cada bandeja 200 ml de solución de PEG8000 al -0,5MPa.

En el caso del tratamiento testigo sin estrés hídrico, se utilizó 1 bandeja con 1000 semillas de la variedad CR-5272 sin irradiar. El procedimiento de siembra fue el mismo que se utilizó en el tratamiento anterior con las diferencias que en esta bandeja solo se utilizó un tipo de semilla y que se agregaron 200 ml de agua destilada. Las 11 bandejas fueron colocadas en la cámara de germinación ubicada en el Laboratorio de Recursos Fitogenéticos. Figura 3F.

### **Manejo de cultivo**

Las 11 bandejas permanecieron durante 14 días en la cámara de germinación con una temperatura promedio de 25-30 °C y en oscuridad y al 100% humedad, una vez transcurrido este periodo las bandejas fueron trasladadas por siete días al cuarto de crecimiento del Laboratorio de Cultivo de Tejido con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de obscuridad, una temperatura entre 24-26 °C, y una humedad relativa ambiental del 40%, esto con la finalidad de que las plántulas continuaran con su desarrollo para poder ser seleccionadas. La selección se realizó a los 21 días después de la siembra (dds).

### **Variables evaluadas**

En la tabla 3 se muestran las variables evaluadas, estas se basaron en los indicadores de tolerancia a estrés hídrico en etapas tempranas del cultivo de arroz sugeridas por González & Martínez, (2016); García et al., (2005b) y Sabesan & Saravanan, (2016).

**Tabla 3.** Variables evaluadas para la selección de plántulas con tolerancia a condiciones de estrés hídrico a los 21 dds.

<b>Variable evaluada</b>	<b>Medición</b>
Altura de la planta (cm)	De la base del tallo hasta la punta de la hoja más larga
Longitud del sistema radical (cm)	De la base del tallo hasta la raíz más larga
Índice de tolerancia relativo altura (ITR)	Se midió aplicando la siguiente formula, ITR altura (%) = $100(\text{Altura de la planta (cm) en condiciones de estrés hídrico} / \text{Media de la altura de las plantas (cm) del testigo en agua.})$
Índice de tolerancia relativo longitud de la raíz (ITR)	Se midió aplicando la siguiente formula, ITR longitud de la raíz (%) = $100(\text{longitud de la raíz (cm) en condiciones de estrés hídrico} / \text{Media de la longitud de la raíz (cm) del testigo en agua.})$

### **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 plántula presenta teóricamente una conformación genética distinta. Sin embargo, para tener criterio de selección y evaluación de comportamiento de las semillas y plántula segregantes, se utilizaron testigos germinados en presencia de agente osmoregulador (PEG 8000) y sin el osmoregulador.

### **Criterio para la selección individual de mutantes M<sub>2</sub> con tolerancia a estrés hídrico**

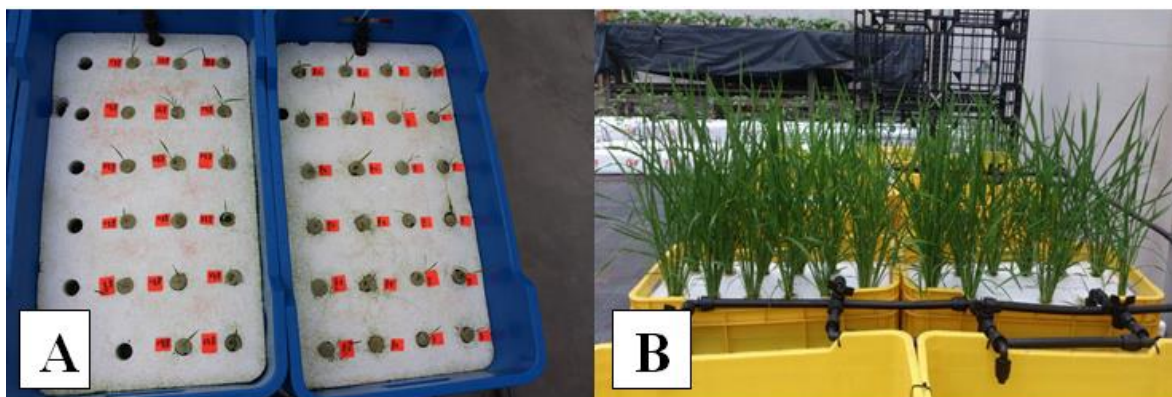
La selección se realizó utilizando como base las plántulas del tratamiento testigo en agua, para ello se seleccionaron 12 plántulas al azar, con las cuales se obtuvo una media de la altura de plantas y de la longitud de raíz. Esto sirvió de base para seleccionar todas aquellas plántulas M<sub>2</sub> que presentaron como mínimo el 50 % de la altura promedio de la planta y de la longitud de la raíz del testigo.

En el caso de las plantas testigo de la variedad CR-5272 expuestas a déficit hídrico debido a que muy pocas llegaron a germinar, se procedió a seleccionar las 12 plántulas que mostraron un mejor comportamiento y se realizó una media de altura de la planta y longitud de raíz.

Los mutantes rescatados para su identificación se nombraron con un código provisional el cual consistía en el nombre PEG300 y un número consecutivo.

### **Recuperación de plántulas en un sistema hidropónico**

Las plántulas M<sub>2</sub> seleccionadas en condiciones de estrés hídrico a los 21 dds, las plántulas de la variedad CR-5272 en esta misma condición y las plántulas de la variedad CR-5272 testigo en agua se trasplantaron a un sistema hidropónico libre del agente osmoestresante para su recuperación, en el cual permanecieron durante 50 días. Se utilizó la solución nutritiva para arroz descrita por Yoshida, (1976), utilizado rutinariamente en el programa BIOVERFI para la recuperación de plantas de arroz. Figura 4.



**Figura 4.** Recuperación en sistema hidropónico A. Plántulas seleccionadas trasplantadas a los 21 días después de germinación en sistema hidropónico. B. Plantas seleccionadas y recuperadas en sistema hidropónico a los 71 días después de la siembra.

## **Segunda selección Fase II**

### **Material vegetal**

Se utilizaron 16 mutantes promisorios seleccionados a los 21 días (primera selección), 12 plántulas seleccionadas al azar del testigo estresado con PEG8000 y 12 plántulas seleccionadas al azar del testigo sin PEG8000, todas provenientes de la fase I. En total se evaluaron en esta segunda selección 40 plantas.

### **Trasplante**

Las plantas fueron trasladadas al invernadero de la Finca Experimental Santa Lucía y trasplantadas a potes de 8,5 kilogramos. Con suelo estéril y se ubicaron en una piscina



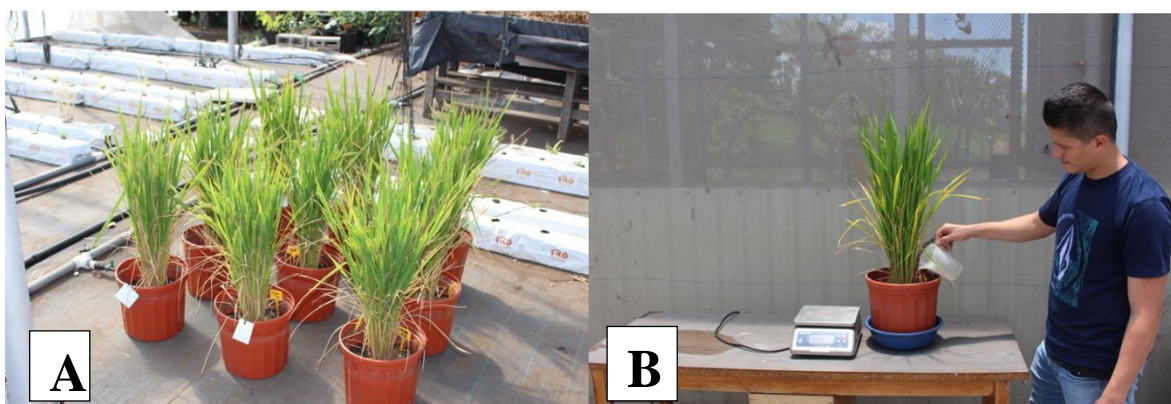
(150 cm de diámetro y 52 cm de altura) que contenía agua suficiente para mantener las plantas a Capacidad de Campo (CC). Figura 5.



**Figura 5.** A. Trasplante de plantas a potes con suelo estéril. B. Potes con plantas sumergidas en piscina.

### Segundo periodo de estrés hídrico

El testigo CR5272 sin estrés hídrico continuó su ciclo de cultivo en condición normal hasta la cosecha. El testigo CR5272 con estrés hídrico y los mutantes promisorios fueron sometidos a una presión de selección en el momento de la prefloración, reduciendo la humedad volumétrica y gravimétrica en un rango de 30-40% (Fig. 6), se eligió este rango de humedad debido a que se optó por utilizar un potencial osmótico igual al que se obtenga en la determinación de la  $DL_{50}$  y los valores de la curva de retención de humedad del suelo realizada en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica (2018) La disminución de la humedad se dio hasta la etapa de inicio de llenado del grano, una vez llegada esta etapa se les volvió a mantener a Capacidad de Campo por un periodo de 7 días, momento en que se realizó la cosecha. (Fig.6).



**Figura 6.** A. Plantas promisorias M2, expuestas a estrés hídrico en etapa reproductiva. B. Reposición de agua de las plantas estresadas en etapa reproductiva.

### Manejo

Para monitorear la humedad en el rango de 30-40% se utilizó un equipo TDR Soil Moisture Meter que midió el contenido volumétrico del agua presente en el suelo. Figura 7A. La cosecha se inició a los 152 días con las plantas más precoces y termino a los 182 días con las plantas más tardías. La cosecha de plantas se realizó de forma manual y se cosecharon todas las panículas de cada planta de manera individual. Figura 7B.



**Figura 7.** A. Método de medición de humedad utilizando el TDR. B. Cosecha manual de panículas.

### Diseño experimental

Igual que en la primera selección no fue posible hacer replicas, aleatorizaciones, bloques o algún otro tipo de diseño ya que cada planta presenta teóricamente una conformación genética distinta. Sin embargo, para tener un criterio de selección y evaluación de comportamiento de las plantas segregantes, se utilizaron plantas testigos de CR 5272 que se estresaron y plantas testigos que no se estresaron en esta fase.

### Variables evaluadas

Durante el segundo periodo de estrés hídrico se evaluaron las siguientes variables:

- Días a floración: se contó el número de días de cada planta al llegar a la etapa de floración.
- Días a madurez: se contó el número de días de cada planta al llegar a la madurez.

- Evaluación visual de enrollamiento y secado de hojas: esta evaluación visual se realizó una vez concluido el segundo periodo de estrés hídrico y se utilizaron las Escalas de evaluación visual para enrollamiento y secado de hojas (IRRI, 1996) Tablas 4 y 5. También se utilizó la Escala para la visual para la evaluación del enrollamiento e las hojas descrita por O´Toole, Cruz & Singh, (1979) figura 8.

**Tabla 4.** Escala de evaluación visual para enrollamiento de hojas

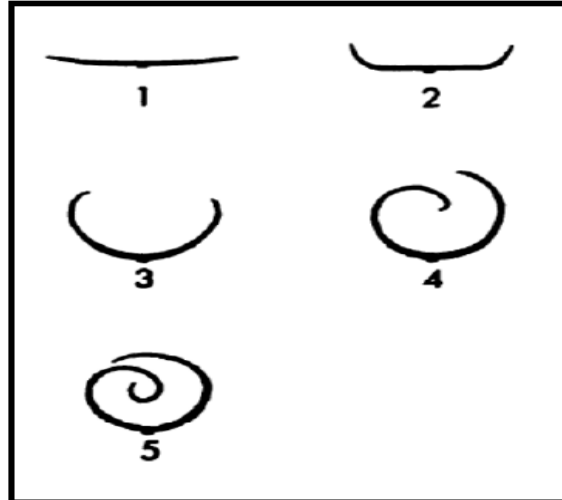
<b>Escala</b>	<b>Descripción</b>	<b>Grado de tolerancia</b>
<b>0</b>	Hojas sanas	Altamente tolerante
<b>1</b>	Las hojas comienzan a doblarse	Tolerante
<b>3</b>	Hojas plegadas (forma de V profunda)	Moderadamente tolerante
<b>5</b>	Hojas totalmente ahuecadas (forma de U)	Moderadamente susceptible
<b>7</b>	Los márgenes de las hojas se tocan en (forma de O)	Susceptible
<b>9</b>	Hojas bien enrolladas	Altamente susceptible

Sistema de Evaluación Estándar adoptado para el arroz (IRRI 1996)

**Tabla 5.** Escala de evaluación visual para secado de hojas

<b>Escala</b>	<b>Descripción</b>	<b>Grado de tolerancia</b>
<b>0</b>	Sin síntomas	Altamente tolerante
<b>1</b>	Secado de punta leve	Tolerante
<b>3</b>	Secado de la punta extendido a un 25% de longitud en la mayoría de las hojas	Moderadamente tolerante
<b>5</b>	De un 25% a un 50% de las hojas completamente secas	Moderadamente susceptible
<b>7</b>	Más de 2/3 de todas las hojas completamente secas	Susceptible
<b>9</b>	Todas las plantas aparentemente muertas	Altamente susceptible

Sistema de Evaluación Estándar adoptado para el arroz (IRRI, 1996)



\* 1 Plana, 2 Doblado superficial, 3 Forma de V, 4. Forma de U, 5. Hoja completamente enrollada

**Figura 8.** Escala visual para la evaluación del enrollamiento de las hojas descrita por O'Toole et al., (1979)

Una vez finalizada la cosecha se evaluaron en todas las plantas las siguientes variables:

- Altura de las plantas (cm)
- Número de macollas
- Número de granos llenos por planta: se contaron cada uno de los granos llenos de cada planta.
- Peso de los granos llenos por planta (gr): se pesaron los granos llenos de cada planta.
- Peso de 100 granos (gr): se pesaron 100 granos al azar de las plantas que produjeron como mínimo 100 granos.
- Peso total de granos (gr): se pesaron todos los granos de la planta incluyendo los granos llenos y los vanos.
- Número de panículas por planta
- Longitud de cada panícula (cm): se midió desde el nudo o anillo ciliar hasta la punta del grano más largo.
- Esterilidad: fue estimada con la siguiente ecuación.  

$$\% \text{ Esterilidad} = (\text{Número de granos vanos} / \text{Número de granos llenos}) * 100$$
- Granos por panícula: se estimó utilizando la siguiente ecuación

Granos por panícula= Número total de granos por planta/ Número de panícula

- Granos llenos por panícula se estimó utilizando la siguiente fórmula

Granos llenos por panícula= Número total de granos llenos /Número de panícula

- Peso seco de la parte aérea de la planta (gr): a cada planta mutante y los dos testigos cosechada se les realizó un análisis de materia seca en un horno a 60 °C durante 48 horas.

### **Selección de plantas en etapa reproductiva**

La selección se realizó con base a las plantas del tratamiento testigo en condiciones de Capacidad de Campo (100% humedad) lo que quiere decir que se rescataron únicamente las plantas M<sub>2</sub> que mostraron un mejor comportamiento bajo estrés hídrico en las variables evaluadas, y además que alcanzaran al menos un 40% de la producción en comparación con el tratamiento testigo en agua (100% humedad).

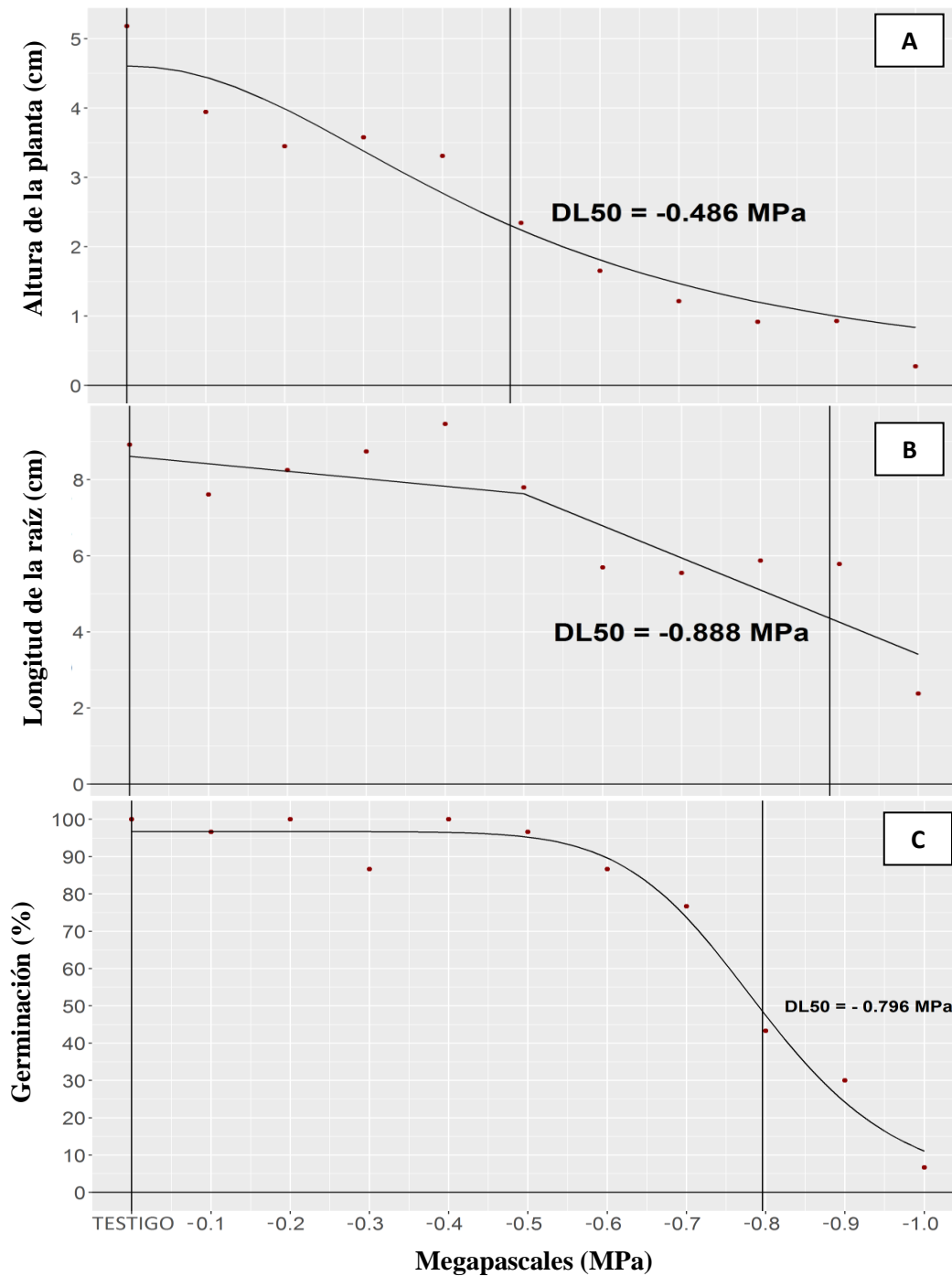
### **Análisis de datos**

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 DISCUSION**

**Fase I.** Determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de Polietilenglicol 8000 (PEG 8000) en plántulas de arroz CR5272.

A Continuación, en la Fig. 9, se evidencian los resultados logrados en la determinación de la DL<sub>50</sub> para las variables altura de planta, longitud de raíz y porcentaje de germinación en la variedad CR-5272 usando el PEG8000; lo cual permitió definir cuál de estas era el mejor indicador de estrés hídrico para favorecer el proceso de selección de mutantes candidatos tolerantes al estrés hídrico.



**Figura 9.** Curvas de la determinación de la DL<sub>50</sub> a sequía de CR5272, obtenidas por un modelo de regresión no lineal. A. Altura de la Planta. B. Longitud de raíz. C. Germinación.

### **Altura de la plántula**

De manera general en esta investigación la variable altura de la planta se redujo conforme aumentó la concentración de PEG8000 (Fig. 9). En el potencial osmótico de -0.486 MPa se puede observar que la altura de la planta mostro una reducción del 50% del tamaño en comparación con el tratamiento testigo. Esto se puede atribuir según Noelle et al., 2018 a que la disminución en el crecimiento es una de las primeras manifestaciones de estrés hídrico en la planta de arroz. Esta disminución del crecimiento en condiciones de estrés hídrico se debe a la afectación que sufren dos procesos asociados al crecimiento los cuales son el incremento de la cantidad de las células (división celular) y el incremento en el tamaño de las células (alargamiento celular) (Taiz & Zeiger, 2002).

Tanto la división celular como el alargamiento celular son sensibles al estrés hídrico, lo que resulta en una inhibición en el alargamiento celular y en una reducción de la tasa de división celular (Maroco, Pereira & Chaves, 2000) Los resultados encontrados en esta investigación concuerdan con lo reportado por los autores señalados, por lo que la disminución en la altura de las plantas de arroz estaría asociado al estrés hídrico al que fueron expuestos las semillas de arroz.

Este resultado concuerda con Sabesan & Saravanan, (2016) quienes también encontraron una reducción del 50% en la altura de las variedades de arroz ADT-47 y Poongkar a -0.5 MPa. Resultados similares fueron obtenidos por Priyanka, Rizwan, Bhatt, Mohapatra &, Govind (2011); Khadimi et al., (2016) y Nurhayati, Rahayu, Syaukani & Ritonga, (2017) quienes evidenciaron que al aumentar la concentración de PEG se reduce la altura de las plantas.

### **Longitud de la raíz**

En cuanto a la reducción del 50% de la variable longitud de la raíz (Fig.9) esta se dio en el potencial osmótico de -0.88 MPa, siendo esta la variable menos sensible al PEG8000 a diferencia de la variable altura de la planta y germinación donde la reducción del 50% fue en potenciales osmóticos menores.

En esta variable (Fig.9) se puede observar el efecto del estrés hídrico en las plantas de la variedad CR 5272, se puede observar que al aumentarse el potencial osmótico hay disminución la longitud del sistema radical en todos los tratamientos cuando se compara

con el tratamiento testigo; este comportamiento se debe a que en el cultivo de arroz el crecimiento de las raíces disminuye bajo estrés hídrico (Cuit et al., 2008) y la respuesta del crecimiento de la raíz al estrés depende de la tolerancia del genotipo y el grado del estrés (Xu et al., 2015) por lo que al ser la variedad CR 5272 susceptible al estrés hídrico se vio más afectada conforme aumentaba el potencial osmótico. Resultados similares fueron obtenidos por Sabesan & Saravanan, (2016) y Kadhimi et al., (2016) quienes encontraron reducciones en la longitud del sistema radical al exponer en diferentes concentraciones de PEG genotipos de arroz sensibles al estrés hídrico.

### **Porcentaje de Germinación**

El porcentaje de germinación (Fig.9) disminuyó al aumentarse la concentración de PEG8000, mostrando reducciones del 50% en la germinación a partir del potencial osmótico de -0.796 MPa. La reducción del porcentaje de germinación fue causada por la disminución del potencial osmótico, esto podría deberse a la baja conductividad hidráulica del ambiente, donde en donde el PEG8000 hace que el agua no esté disponible para las semillas, esto afecta los procesos de imbibición de la semilla aspecto que es fundamental para la germinación (Lobato et al., 2009). La disminución en la germinación también puede atribuirse al efecto que causan las altas concentraciones de PEG8000 que impiden la absorción de agua por las semillas debido al alto potencial osmótico que se crea en la solución y a que se reduce la disponibilidad de oxígeno (Fanti & Perez, 2004).

El comportamiento de la variedad CR 5272 ante los tratamientos con PEG8000 fueron similares a los obtenidos por Sabesan & Saravanan, (2016) quienes evaluaron 50 genotipos de arroz para identificar condiciones de estrés hídrico los cuales 39 mostraron susceptibilidad, con porcentajes de germinación inferiores al 50% en condiciones a -0.75 MPa, tal como se comportó la variedad estudiada en esta investigación. Otros resultados similares fueron reportados por González, Argentel, Zaldivar & Ramírez, (2005) donde se encontraron diferencias significativas en la germinación a partir de -0.75 MPa, en dos variedades de trigo, y por García et al., (2005b), quienes obtuvieron una disminución en la germinación al aumentarse la concentración de PEG8000 en la variedad de arroz Jucarito-104 susceptible a la sequia



El menor porcentaje de germinación se observó en -1.0 MPa, este resultado se atribuye a la alta viscosidad del PEG8000 en potenciales osmóticos más altos donde la solubilidad y la difusión del oxígeno se redujeron en comparación con el tratamiento control. Pirdashti, Sarvestani, Nematzadeh & Imasil, (2003) y Sabesan & Saravanan, (2016) obtuvieron resultados similares donde en -1.0 MPa la germinación fue nula.

### **Determinación de la dosis de PEG8000 a usarse en el proceso de selección**

Las  $DL_{50}$  obtenidas por las regresiones no lineales no concordaron en un único potencial osmótico (MPa) siendo de -0.486 MPa para la altura de la planta, -0.796 MPa para la germinación y de -0.888 MPa en el caso de la longitud de la raíz lo que indica que cada una de las variables evaluadas mostraron respuestas diferentes al estrés hídrico simulado con PEG8000.

La variable altura de la planta mostro una mayor sensibilidad al estrés hídrico debido a que la  $DL_{50}$  fue en un potencial osmótico menor en comparación con las otras variables, también en dicha variable se pudieron apreciar mejor los síntomas del estrés hídrico, lo cual se puede atribuir a que en la altura es donde se dan primeras manifestaciones de este estrés esto debido a una disminución de los proceso de formación de las hojas y los tallos, los cuales causan la disminución de la altura (Chaves et al., 2002b)

Para determinar la dosis de PEG8000 a utilizarse en la selección preliminar de mutantes tolerantes a estrés hídrico se usó la variable que mostro una mayor sensibilidad en la  $DL_{50}$ , la cual fue la altura de la planta, con la dosis de -0.486 MPa equivalente a 20% de PEG8000 por litro de agua, esta dosis es similar a la obtenida por García et al., (2005b) quienes reportan que el potencial osmótico de -0.5 MPa (estrés ligero) permite diferenciar las variedades tolerantes al estrés hídrico de las susceptibles, mientras que a -1.0 MPa (estrés moderado). Dado que la variedad CR 5272 es una variedad susceptible al estrés por estrés hídrico, coincide con los resultados obtenidos por García et al., (2005b), ya que se evidencio que a partir de -0.5 y -0.6 MPa se observaron reducciones significativas (50%) en la altura de la planta.

La variable longitud de la raíz fue la menos sensible al PEG8000 debido a que su  $DL_{50}$  fue en el potencial osmótico de -0.888 MPa, se debe tomar en cuenta que en variedades sensibles al estrés hídrico la longitud de la raíz disminuye como fue el caso de la

variedad CR5272. Sin embargo, en variedades tolerantes una mayor elongación de las raíces es una de las características fundamentales de las especies tolerantes al estrés hídrico lo que les permite continuar con su desarrollo ante bajos potenciales hídricos, esto incrementa la absorción de humedad que se encuentra a mayor profundidad del suelo (Chaves, Maroco, & Pereira 2003c) por ende esta variable en la selección de mutantes tolerantes debería mostrar un comportamiento opuesto obtenido en la  $DL_{50}$ . Finalmente, la germinación no puede utilizarse como una variable para la selección ya que únicamente se seleccionarán plántulas, descartando las semillas que no tengan germinación.

## Fase II: Selección de mutantes promisorios de arroz con tolerancia al estrés hídrico

**Primera selección:** Etapa vegetativa (germinación y plántula), 21 días después de la siembra (dds).

Esta selección se llevó a cabo usando el potencial osmótico de -0.5 MPa (estrés ligero).

En la tabla 6 se presentan los mutantes promisorios seleccionados a los 21 (dds) y los resultados de las variables altura de la planta, longitud de la raíz e índices de tolerancia relativos.

**Tabla 6.** Mutantes promisorios al estrés hídrico seleccionados según altura de la planta, longitud de la raíz e índices de tolerancia relativos

Planta	Altura (cm)	Longitud raíz (cm)	ITR altura	ITR raíz
PEG300 01	5,0	11,0	83,33	129,41
PEG300 02	4,5	7,5	75,00	88,24
PEG300 03	5,5	10,0	91,67	117,65
PEG300 04	5,0	9,5	83,33	111,76
PEG300 05	4,5	10,5	75,00	123,53
PEG300 06	4,5	12,0	75,00	141,18
PEG300 07	5,5	9,5	91,67	111,76
PEG300 08	4,0	11,5	66,67	135,29
PEG300 09	4,5	10,5	75,00	123,53
PEG300 10	4,5	8,0	75,00	94,12
PEG300 11	5,5	10,0	91,67	117,65
PEG300 12	4,5	10,0	75,00	117,65
PEG300 13	5,0	11,5	83,33	135,29
PEG300 14 *	4,5	8,5	75,00	100,00
PEG300 15	4,5	8,0	75,00	94,12
PEG300 16	5,5	11,5	83,33	135,29
PEG300 17	4,0	11,0	66,67	129,41
Testigo expuesto a PEG**	3,35	8,7	55,83	102,36
Testigo con agua **	6,0	8,5	-	-

\*Planta mutante que murió después de la selección \*\*Dato promedio de 12 plantas

De las 10000 semillas M<sub>2</sub> evaluadas se rescataron 17 plántulas que superaron en un 50% (tabla 6) los Índices de Tolerancia Relativos de la variable altura de la plántulas y longitud de la raíz con respecto al tratamiento testigo con agua lo que significa que las plántulas rescatadas alcanzaban al menos un 50% de la altura y de la longitud de la raíz de las plántulas testigo con agua.

El método de selección mostro una gran efectividad en la selección temprana de mutantes con posible tolerancia a condiciones de estrés hídrico, por medio de este fue posible la detección de rasgos morfológicos en las plántulas que se asocian a la tolerancia temprana al estrés hídrico permitiendo la selección de estos 17 mutantes promisorios, los rasgos morfológicos o variables contempladas para la selección de dichas plántulas M<sub>2</sub> coinciden con los reportados por Khadimi et al., (2016) donde indican que la longitud de la raíz y las etapas iniciales del desarrollo de la plántulas son consideradas un criterio para la selección en condiciones de estrés hídrico.

Otros estudios realizados por García et al., (2005b) y González & Martínez, (2016) obtuvieron como resultado que las variables altura de la planta y longitud del sistema radical y sus respectivos Índices de Tolerancia Relaticos son los más útiles para identificar genotipos tolerantes a condiciones de estrés hídrico en etapas tempranas del ciclo fenológico del cultivo de arroz, además reportan otros criterios de selección que son la masa seca de la parte aérea y de la raíz de las plantas pero por ser destructivos no se pudieron evaluar en esta investigación.

Según Kacem, Delporte, Muhovski, Djekoun & Watillon, (2017) los métodos de selección temprana a estrés hídrico deben ser simples y efectivos que se relacionen con los métodos usados de campo los cuales implican recursos considerables (tierra, trabajadores, recursos) y requieren condiciones ambientales adecuadas para la expresión fenotípica efectiva y repetible de la tolerancia al estrés hídrico que sea atribuible al genotipo, por ende el método de selección temprana de plántulas tolerantes a estrés hídrico empleado en esta investigación cumplió con dichas condiciones ya que fue efectivo y siempre mantuvo las mismas condiciones de todas las plántulas evaluadas.

Los 17 mutantes promisorias seleccionadas con posible tolerancia a estrés hídrico pueden tener un contenido más alto de prolina debido al estrés hídrico impuesto de la aplicación de PEG8000, este aumento de este aminoácido, puede incrementar la tolerancia en los cultivos a la sequía ya que funciona como un aminoácido en las plantas de arroz que favorece la tolerancia a sequía (Nurhayati et al., 2017).

Una mayor concentración de prolina debido al estrés por sequía induce varias respuestas bioquímicas en los cultivos, estas respuestas a veces pueden ayudar a las plantas a adaptarse a condiciones ambientales limitantes (Shehab, Ahmed & El-Beltagi, 2010), las plantas expuestas al estrés hídrico acumulan moléculas como la prolina en sus tejidos (Kadhimi et al., 2016). La prolina es un aminoácido no proteico que se acumula en la mayoría de los tejidos y se encuentra relacionado con la insuficiencia de agua (Singh, Sale, Pallaghy & Singh, 2000). Esta acumulación puede considerarse un medio de modificación osmótica que protege los tejidos de las plantas de las consecuencias destructivas relacionadas con el estrés hídrico.

### **Altura de la planta**

Como se puede observar en la tabla 6, las plántulas mutantes seleccionadas alcanzaron al menos un 50% del tamaño de las plántulas del testigo con agua, estas plantas seleccionadas mostraron un buen comportamiento a una concentración de PEG8000 al 20% evidenciando una posible tolerancia a condiciones de estrés hídrico en la etapa de plántula del cultivo

Cuando se analiza el índice de tolerancia (ITR) se observa que el promedio del testigo con PEG8000 al 20% presentó índices más bajos que los mutantes promisorios seleccionados (55,83%), esto nos indica que todos los mutantes seleccionados en principio son mejores al expuesto en PEG8000 según en esta variable. Los mutantes con mejor respuesta a esta variable son el PEG300-03, PEG300-07 y PEG300-11 ya que alcanzaron un ITR de 91,67%. Según Jerez et al., (1999) y Tudela et al., (1993) el estrés hídrico afecta el alargamiento celular, por lo que los genotipos más tolerantes sufren menos afectaciones en su crecimiento. Estos resultados son similares a los reportados por González & Marínez, (2016) quienes seleccionaron mutantes de arroz de buen comportamiento bajo condiciones de sequía, en su investigación se obtuvo que los genotipos con mayor tolerancia presentaban una mayor altura bajo estrés hídrico en comparación con genotipos susceptibles a la sequía. Los resultados de esta investigación concuerdan con estos resultados y se considera que los criterios de selección fueron oportunos y bien fundamentados. Además, Noelle et al., (2018) indican que la disminución del crecimiento es una de las primeras manifestaciones de estrés hídrico en el cultivo de arroz, por lo que en esta investigación se seleccionaron dichos mutantes promisorios ya que mostraron una

característica morfológica de tolerancia además estos mutantes promisorios seleccionados podrían tener otras características fisiológicas, morfológicas, moleculares o bien mostrar algún mecanismo de resistencia al estrés hídrico los cuales no fueron evaluados en esta investigación.

Es importante indicar que la mayoría de mutantes promisorios seleccionados además de mostrar un buen ITR de la altura, mostraban ITR de raíz superior al tratamiento testigo en PEG8000. La altura de estos mutantes puede estar ligada a la longitud de su sistema radical ya que un sistema de raíces prolífico puede conferir la ventaja de apoyar el crecimiento acelerado de las plantas durante la etapa temprana de crecimiento del cultivo y extraer agua de las capas de suelo poco profundas para enfrentar la situación de estrés abiótico (Bhadra & Roy, 2014).

Es importante aclarar que ninguno de los mutantes seleccionados alcanzó la altura promedio de los testigos con agua, esto puede deberse a que el crecimiento es el resultado de la producción de células hijas por divisiones celulares meristemáticas y la posterior expansión masiva de las células jóvenes (Adjum et al., 2011), este crecimiento celular es de los procesos fisiológicos más sensibles al estrés hídrico debido a reducción de la turgencia de las células (Noelle et al., 2018) por ende las plantas M<sub>2</sub> seleccionadas aunque muestren un grado de tolerancia mayor en el ITR de la altura siempre se verán afectadas por los efectos que causa la sequía en los procesos fisiológicos de las plantas.

En relación a las plantas de CR5272 que se estresaron con PEG8000 la reducción del crecimiento puede atribuirse a una respuesta controlada y progresiva de la planta, cuyo resultado es anticipar el estrés hídrico, esto genera la disminución en la tasa de la división de las células vegetales (Granier, Inzé & Tardieu, 2000) y la modificación de las propiedades fisicoquímicas de las paredes celulares que se vuelven más rígidas, lo que inhibe su crecimiento (Cosgrove, 2005).

### **Longitud del sistema radical**

En relación con esta variable se puede observar en la tabla 6 que el promedio de longitud de las plantas testigo con PEG8000 fue de 8,7 cm. De los 17 mutantes seleccionados 13 obtuvieron valores superiores y 4 valores inferiores a este promedio esta tendencia se mantuvo cuando los mutantes se compararon con el testigo con agua.

Al menos 14 de los mutantes seleccionados tuvieron valores superiores a los testigos, comportamiento atribuible a las variedades que se clasifican como tolerantes al estrés hídrico, las cuales se caracterizan por presentar un alargamiento temprano y rápido de la raíz, estas raíces al ser más largas son útiles para extraer agua de las capas más profundas del suelo (Kim, Yun, Park & Park, 2001; Pandey & Shukla, 2015).

Estas raíces al estar más profundas son más sólidas y fuertes lo que garantiza el suministro de agua y nutrientes del suelo a la planta sin problemas (Supriyanto, 2013). Las raíces largas de las plantas con tolerancia a sequía desempeñan un papel directo con una alta capacidad de penetración en las capas profundas del suelo al tener radios grandes en los vasos del xilema y menor resistencia axial al flujo de agua lo que favorece una mayor adquisición del agua (Sabesan & Saravanan, 2016).

Las plantas M<sub>2</sub> seleccionadas al mostrar un mayor desarrollo del sistema radical bajo estrés hídrico están asociadas con una alta biomasa, debido a su capacidad de extraer más agua del suelo y su transferencia a las partes aéreas para la fotosíntesis (Jaleel, Manivannan, Lakshmanan, Gomathinayagam & Panneerselvam, 2008b) incluso si el estrés por sequía es muy severo y las hojas dejan de crecer la fotosíntesis continua gracias a su sistema radical más desarrollado (Pattanagul & Thitisaksakul, 2008; Davatgar, Neishabouri, Sepaskhah, & Soltani, 2012).

Las plantas con una longitud de raíz superior se asocian a un mecanismo de resistencia a la sequía, el cual es llamado evitación, este mecanismo permite que las plantas limiten los efectos del estrés a través de adaptaciones, en este caso el mantenimiento de la hidratación de los tejidos de la planta por medio de un extenso y prolífico sistema de raíces (Noelle et al., 2018; Quistián, 2010).

El comportamiento de la raíz de las plántulas M<sub>2</sub> seleccionadas en esta investigación concuerda con los obtenidos por Kadhim et al., (2016) que determino que el mutante MR269 muestra una buena longitud de raíz en concentraciones de PEG6000, lo que puede asociarse con la tolerancia a la sequía. Por otro lado, Nurhayati et al., (2017) señalan que plantas tolerantes a un estrés por sequía presentan las siguientes características: a) son capaces de desarrollar el sistema de raíces cuando el agua todavía está disponible antes de

que la planta experimente estrés para que estas puedan extraer agua de la capa más profunda del suelo, y b) modifican el sistema de raíces para extraer el agua de las capas más profundas, esta condición ocurre cuando hay estrés hídrico.

**Segunda selección:** Etapa reproductiva (pre floración, floración y llenado de granos).

En relación con esta segunda etapa de selección en la siguiente tabla 7, se puede observar el efecto del estrés hídrico sobre el follaje de los mutantes evaluados, una vez concluido el segundo periodo de estrés hídrico.

**Tabla 7.** Mutantes de arroz evaluados con la escala de evaluación visual del IRRI (1996) para el enrollamiento y secado de las hojas y la escala de enrollamiento de hojas de O'Toole et al., (1979)

Mutante		Escala		
		Enrollamiento de hoja (IRRI)*	Enrollamiento de hoja(O'Toole)**	Secado de las hojas (IRRI)***
1	PEG300 01	3	3	5
2	PEG300 02	3	3	5
3	PEG300 03	3	3	5
4	PEG300 04	1	2	3
5	PEG300 05	3	3	5
6	PEG300 06	3	3	5
7	PEG300 07	1	2	3
8	PEG300 08	1	2	3
9	PEG300 09	3	2	5
10	PEG300 10	1	3	3
11	PEG300 11	3	3	5
12	PEG300 12	3	3	5
13	PEG300 13	3	3	5
14	PEG300 15	1	2	3
15	PEG300 16	3	3	5
16	PEG300 17	3	3	5

\* 1 Tolerante, 3 Moderadamente tolerante.

\*\* 2. Doblado superficial, 3 Forma de V

\*\*\* 3 Moderadamente tolerante, 5 Moderadamente susceptibles.

### Enrollamiento de las hojas

En las plantas testigo con agua no fue necesario utilizar la escala debido a que en condiciones de riego completo las hojas de las plantas de arroz no se enrollan, en cambio



con los mutantes este fue el primer síntoma que apareció cuando las plantas fueron sometidas a estrés hídrico, esto para reducir la transpiración de las hojas (Sié et al., 2008)

En todas las plantas sometidas a estrés hídrico en la etapa reproductiva fue posible observar el enrollamiento y marchitamiento de las hojas, al ser evaluadas en la escala del IRRI, como se puede ver en la tabla 7, cinco mutantes (PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10 y PEG300-15) se clasifican como tolerantes, los restantes mutantes fueron moderadamente tolerantes. Según Lafitte Blum, & Atlin, (2003) el enrollamiento de hojas es útil para la detección rápida de genotipos tolerantes al estrés hídrico, por ende, los cinco mutantes que tuvieron una calificación de 1, son los más tolerantes al estrés hídrico.

Al respecto Rahim et al., (2012) el primer signo de disminución del agua en el suelo es el enrollamiento de las hojas, lo cual es una manifestación simple del marchitamiento de las hojas. El enrollamiento de hojas es un criterio para calificar la tolerancia a la sequía en cultivares de arroz (Fischer, Lafitte, Fukai, Atlin, & Hardy, 2003a). Por ende, este criterio fue bien utilizado en esta investigación y al tener mutantes clasificados entre 1 y 3 se podría decir que estos mutantes presentaran tolerancia a condiciones de estrés hídrico en la etapa reproductiva.

Las plantas tolerantes (PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10 y PEG300-15) mostraron un menor enrollamiento de la hoja además este síntoma tardaba más en presentarse en estas plantas, según Singh et al., (2012) el enrollamiento demorado de las hojas se utiliza como un criterio importante para la selección de plantas con tolerancia a sequía en arroz. En dichas plantas también se observó una recuperación más rápida posterior al incremento de la humedad del suelo, esto concuerda con Singh & Ingram, (1991) quienes determinaron que una planta que tenga características de retraso en el enrollamiento de las hojas bajo estrés hídrico y una tasa de recuperación más rápida después de eliminar el estrés se consideran como tolerantes al estrés hídrico aspecto que favorece el llenado y desarrollo de los granos.

Los mutantes al ser evaluados con la escala visual (tabla 7) de enrollamiento de hojas propuesta por O'Toole et al., (1979) obtuvieron una puntuación de 2 (doblado superficial de las hojas) para cinco mutantes (PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08 ,

PEG300-10 y PEG300-15 ) y para los demás mutantes la puntuación fue de 3(hojas en forma de V) según O'Toole et al., (1979) las puntuaciones más altas indican una reducción en la transpiración de las hojas, ya que funciona como un mecanismo hidrostático que reduce la interceptación de luz, la transpiración y la deshidratación, en cuanto a los mutantes evaluados debido a que todos presentaron síntomas de enrollamiento se puede atribuir a este mecanismo (Kadioglu & Terzi, 2007), el cual se pudo activarse con mayor intensidad en las plantas más susceptibles las cuales ocupaban reducir más su transpiración para sufrir menos daños.

Los síntomas de enrollado de las hojas se pueden asociar con el mecanismo de evitación a la sequía, el cual es la capacidad de la planta para mantener un estado hídrico satisfactorio (Noelle et al., 2018). La reducción de la humedad en el suelo puede conducir a un menor contenido de agua en las hojas, lo que hace que las células pierdan la presión, lo que ocasiona que se reduzca el tamaño de los poros estomáticos (Tezara et al., 2002), causando el cierre de estomas (Singh et al., 2012). Resultando finalmente en el enrollamiento y marchitamiento de las hojas.

Las plantas mutantes seleccionadas en esta investigación que mostraron un menor enrollamiento de las hojas también se les puede atribuir el mecanismo de tolerancia al déficit hídrico, el cual es la capacidad de la planta para sobrevivir y crecer durante la sequía, al mantener la turgencia en las células puede retrasar el cierre de los estomas, manteniendo el volumen cloroplástico y reducir el enrollamiento y marchitamiento de las hojas, lo que le confiere a la planta una mejor tolerancia al déficit hídrico interno (Noelle et al., 2018).

### **Secado de las hojas**

En la tabla 7 se puede observar que ninguno de los mutantes seleccionados se clasifica como tolerantes (1), se clasificaron 5 mutantes (PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10 y PEG300-15) como moderadamente tolerantes (3) y los restantes mutantes se clasificaron con moderadamente susceptibles (5). Estos resultados muestran que las plantas que se clasificaron como moderadamente tolerantes tienen ventaja ya que dichas plantas sufren menos daño por sequía (Kadioglu & Terzi, 2007). Estos daños si van

más allá del punto de turgencia de la planta, se empieza a dar la muerte del tejido lo que causa la reducción de la fotosíntesis (Fischer et al., 2003a).

El secado de la punta de la hoja es un indicador del nivel de sequía (Henderson, Kamboonruang & Copper, 1995), su severidad está relacionada con el grado de sequía, lo que significa que a mayor sequía mayor será el secado de las hojas, por lo que genotipos más susceptibles se verán más afectados (Rahim et al., 2012; Kazerani et al., 2019), por lo que se puede corroborar que los mutantes clasificados como moderadamente susceptibles presentarían mayores daños si son comparados con los mutantes clasificados como moderadamente tolerantes. Las plantas testigo con agua no mostraron secado de punta, esto se debe a que en condiciones de riego completo las hojas no muestran ese síntoma, pero en el caso de los mutantes seleccionados en la primera selección y posteriormente sometidas a estrés hídrico, en todas se observó el secado de las puntas de las hojas (Noelle et al., 2018).

Estos resultados difieren de los obtenidos por Rahim et al., (2012) que evaluaron líneas mutantes en condiciones de estrés hídrico y obtuvieron dos mutantes tolerantes MR219-4, MR219-9 1, estos mostraron el mismo comportamiento que una variedad avanzada tolerante a sequía la ARN1 evaluada en el mismo experimento. Sin embargo, aunque el comportamiento de los mutantes PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10 y PEG300-15 no fue de tolerantes, estos evidenciaron un buen comportamiento al ser moderadamente tolerantes.

Es claro que si tomamos en cuenta estas dos características juntas el enrollamiento de la hoja y el secado de la hoja los (PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10 y PEG300-15) son los más sobresalientes en lo que respecta a la resistencia al estrés hídrico por los factores ya mencionados.

En la tabla 8, se muestran variables vegetativas y reproducción de mutantes de arroz sometidos a estrés hídrico en el segundo proceso de selección. Esto como parte de una primera caracterización fenotípica después de ser sometidos al factor de selección abiótico mencionado.

**Tabla 8.** Altura de mutantes y variables agronómicas observadas a los testigos y mutantes sobrevivientes a la cosecha

Planta	Variables evaluadas												
	Altura (cm)	Número de macollas	Días a floración	Días a madurez	Longitud de panícula (cm)	Panícula por planta	Granos por panícula	Granos llenos por panícula	Granos llenos	Peso de granos llenos (gr)	Peso de 100 granos (gr)	Peso total de granos (gr)	Esterilidad (%)
<b>PEG300 01</b>	68	51	148	175	18,5	42	96,3	11,36	477	8,9	1,86	17,9	88,2
<b>PEG300 02</b>	74	62	142	175	17,9	54	93,3	2,16	25	0,41	-	12,8	99,5
<b>PEG300 03</b>	73	68	142	175	18	51	93,8	2,08	106	1,75	1,65	13,7	97,8
<b>PEG300 04</b>	79	52	128	145	18,3	43	99	35,42*	1523*	31,88*	2,18	40,8*	64,2
<b>PEG300 05</b>	70	58	142	175	17,8	45	81,1	5,2	234	3,84	1,64	12,9	93,6
<b>PEG300 06</b>	74	64	142	175	18,4	51	94,6	1,5	34	0,62	-	12,6	99,3
<b>PEG300 07</b>	78	55	128	145	19,7	40	111,5	14,13*	565	11,79	2,19	24,0*	87,3
<b>PEG300 08</b>	84	53	128	145	20,4	46	109,9	14,78*	680*	15,31*	2,25	29,4*	86,3
<b>PEG300 09</b>	72	64	139	175	18,9	51	97,6	7,45	380	6,81	1,79	18,7	92,4
<b>PEG300 10</b>	75	55	128	145	19,8	45	114,1	5,89	265	5,7	2,15	19,8	94,8
<b>PEG300 11</b>	71	65	142	175	17,9	51	85,9	2,47	126	2,11	1,68	13,1	97,1
<b>PEG300 12</b>	73	59	139	175	19,5	52	91,2	4,44	231	4,17	1,81	17,1	95,1
<b>PEG300 13</b>	70	64	139	175	17,8	61	86,9	1,38	84	1,48	-	14,3	98,4
<b>PEG300 15</b>	79	51	128	145	19,5	41	117,3	15,39*	631	12,97	1,91	25,4*	86,9
<b>PEG300 16</b>	72,5	58	139	175	17,7	45	102,6	0,07	3	0,07	1,98	11,2	99,9
<b>PEG300 17</b>	76,5	51	148	175	20,2	40	107,4	5,5	220	4,37	-	16,3	95
<b>Testigo en estrés**</b>	73	60	139	164	18,7	47	105,3	8,06	379	7,48	1,97	19,9	92,3
<b>Testigo con agua**</b>	73	69	131	162	19,2	47	109,2	28,11	1321	29,1	2,2	41,7	74,3

\* Valores superiores al 50% en comparación con el testigo con agua \*\* Dato promedio de las 12 plantas

### **Altura final de la planta**

La altura final en las plantas (tabla 8.) mutantes varió entre 68 cm a 84 cm, mientras que en las plantas testigo con agua y testigo sometidas a estrés hídrico tuvieron un promedio de 73 cm en su altura final. En el caso de los genotipos mutantes 10 igualaron o superaron la altura del tratamiento testigo con agua destacándose que los genotipos PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08 y PEG300-17 fueron las que mostraron una mayor altura, 79, 78, 84, 79 cm respectivamente. Debido a que la mayoría de mutantes superaron la altura final del testigo con agua, puede deberse a que desde la primera selección estos mutantes fueron seleccionadas por tener un buen comportamiento en la altura en condiciones de estrés hídrico, lo que pudo influir en su altura final por tener una mayor tolerancia al estrés hídrico desde la etapa de plántula, esto debido a que el estrés hídrico disminuye el agrandamiento y crecimiento celular afectando el crecimiento, por ende las plantas con mayor tolerancia se verán menos afectadas (Singh et al., 2018). Un resultado similar fue descrito por Marn et al., (2015) quienes evaluaron 12 líneas mutantes prometedoras evaluadas en condiciones de estrés hídrico, de las cuales 3 líneas con posible tolerancia al estrés hídrico superaron la altura de los testigos con agua y en estrés hídrico.

Dado que la altura de todas las plantas mutantes y las plantas testigo, las cuales fueron sometidas a estrés hídrico no mostraron reducciones en su altura antes y después de ser estresadas, por lo que es posible determinar que esta variable no se vio afectada por el déficit hídrico durante la etapa reproductiva, esto podría deberse a que este periodo de estrés se dio después de la etapa vegetativa ya que la altura final de la planta se alcanza en dicha etapa (Rahim et al., 2012).

### **Número de macollas**

El número de macollas en el testigo con agua fue de 69, mientras que las líneas mutantes y el testigo en estrés hídrico ninguna alcanzo el número de macollas que tuvo el testigo con agua (tabla 8). La disminución en el macollamiento se puede deber a que las plantas experimentaron una menor absorción de agua lo que inhibe la preparación suficiente de alimentos (fotosíntesis) y también afecta inhibiendo la división celular del tejido meristemático (Teng et al., 2004). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por

Tripathy, Zhang, Robin, Nguyen, & Nguyen, (2000) quienes encontraron que el estrés hídrico afecta el número de macollos por planta. Una situación similar fue detectada en líneas mutantes de arroz por Rahim et al., (2012) quienes obtuvieron que varias líneas mutantes de arroz mostraran disminuciones en el número de macollos producidos en condiciones de estrés hídrico. Asimismo, Ndjondjop et al., (2010) reportaron una disminución de un 16.9% en el número de macollos producidos por plantas de arroz en condiciones de estrés hídrico.

### **Días a floración**

Como se puede observar en la tabla 8 los días a floración fueron variables en los mutantes, siendo de 128 dds en 5 de los 16 mutantes evaluados, estos fueron PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08 y PEG300-10 y PEG300-15 (considerados precoces), en el caso de las plantas testigo con agua alcanzaron la floración a los 131 días y el testigo en estrés hídrico fue a los 139 días. En los otros genotipos mutantes la floración se dio a partir de los 139 días hasta los 148 días.

Los resultados obtenidos son similares a los de Marn et al., (2015) quienes seleccionaron líneas mutantes con tolerancia a estrés hídrico las cuales tuvieron una floración anticipada en comparación con el tratamiento testigo con agua y en estrés hídrico, mostrando un comportamiento similar al de los mutantes señalados que también tuvieron una floración anticipada. La floración temprana puede favorecer la fertilidad de espiguillas sobre la floración tardía causando un mayor índice de cosecha y un mayor rendimiento, (Lafitte, & Courtois, 2002), lo que significa que genotipos con floración temprana pueden tener mejores rendimientos productivos por lo que los mutantes con floración menor a 128 dds podrían tener estas características. Según Pantuwan, Fukai, Cooper, Rajatasereekul, & O'Toole, (2002b) el tiempo de floración es determinante en el rendimiento de grano en condiciones de sequías prolongadas o severas. Los genotipos con floración anticipada muestran un mecanismo de escape al estrés hídrico severo por lo que tendrían mayores rendimientos de grano, esto se evidencia ya que 5 plantas mutantes con una floración anticipada fueron las que tuvieron mejores rendimientos en producción de grano.

En el caso de las plantas mutante PEG300-01, PEG300-03, PEG300-05, PEG300-06, PEG300-09, PEG300-11, PEG300-12, PEG300-13, PEG300-16 y PEG300-17, la

floración mostro retrasos superiores a 8 hasta 17 días, lo que evidencia el retraso en esta etapa del cultivo debido a la escasez de agua en el suelo. Al respecto según Bocco et al., (2012) los retrasos en la floración se relacionan con el tipo de sequía, los regímenes de temperatura, el periodo de ocurrencia de la sequía, y el genotipo de arroz, por ende, al imponerse estrés hídrico en la etapa de prefloración, los genotipos más sensibles van a mostrar mayores retrasos en la floración.

El tiempo en llegar a la floración es un rasgo importante relacionado con la adaptación a la sequía, donde un ciclo de vida corto puede conducir al mecanismo de escape a la sequía, este permite a las plantas reproducirse antes de que el ambiente se vuelva más seco (Araus Slafer, Reynolds & Royo, 2002), por ende, los genotipos PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10 y PEG300-15 pueden presentar este mecanismo de tolerancia a la sequía.

### **Días a la madurez del grano**

En la tabla 8 se puede observar que el testigo con agua y el testigo en estrés hídrico tardaron en llegar a la madurez del grano en 162 y 163 días respectivamente, 5 mutantes (PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10 y PEG300-15) alcanzaron la madurez del grano a los 145 días los restantes 11 mutantes tardaron 175 días en llegar a la etapa de maduración.

Los mutantes que alcanzaron un periodo menor en lograr esta etapa se puede atribuir al mecanismo de escape a la sequía el cual es una adaptación al entorno que permite a las plantas evitar los periodos críticos para su buen desarrollo, en el caso de las plantas mutantes indicadas en el párrafo anterior al reducirse la humedad del suelo en la prefloración, completaron el ciclo de cultivo antes de que ocurriera una sequía terminal (Noelle et al., 2018).

Las plantas mutantes en las cuales la etapa de madurez se extendió hasta los 175 días, mostraron un retraso de 14 días en comparación con las plantas testigo con agua, por lo que se puede evidenciar que el estrés hídrico retrasa los días hasta la madurez, estos resultados concuerdan con los de Levitt, (1980), quien afirmó que las plantas que estaban bajo estrés hídrico tardaron más tiempo en madurar en comparación con las plantas que estaban bien regadas. Otros resultados similares fueron obtenidos por Noelle et al., (2018)

donde se evaluaron líneas mutantes en condiciones de estrés hídrico las cuales se retrasaron en llegar a la etapa de madurez en comparación con las plantas testigo con agua.

### **Longitud de la panícula**

En la tabla 8 se puede ver que la longitud de la panícula en el tratamiento testigo con agua y el testigo en estrés hídrico fue de 19.2 y 18.7 cm respectivamente, de los mutantes evaluados seis mutantes superaron la medida del testigo con agua, estos mutantes fueron PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10, PEG300-12, PEG300-15 y PEG300-17. Estos seis genotipos mostraron un comportamiento similar al reportado por Rahim et al., (2012) que evaluó líneas mutantes de arroz en condiciones de sequía encontrando que las condiciones de sequía no afectaron la longitud de la panícula de los genotipos que evaluó, esto puede deberse a que el estrés por sequía no impuso ningún efecto sobre la translocación de asimilados a el crecimiento vegetativo de las panículas (Champoux et al., 1995).

En el caso de los genotipos mutantes en los cuales su longitud de panícula se vio afectada por el estrés hídrico, se puede deber a que el estrés hídrico en la etapa reproductiva hace que el crecimiento y desarrollo de la panícula sea más lento, lo que ocasiona el número y tamaño de los granos (Sarkarung, Singh, Roy, Vanavichit, & Bhekasut, 1995). El lento crecimiento y desarrollo de las panículas se debe es ocasionado por cualquier intensidad de estrés hídrico durante la etapa reproductiva lo que puede deberse a una disminución de la translocación de los asimilados hacia los órganos reproductivos de la planta (Rehman, Islam & Islam, 2002).

### **Número de panículas por planta**

En la tabla 8 se observa que el número de panículas por planta, en los dos tratamientos testigo fue de 47, en el caso de los mutantes siete de ellos superaron esta cantidad siendo los PEG300-02, PEG300-03, PEG300-06, PEG300-09, PEG300-11, PEG300-12 y PEG300-13, mientras que los otros mutantes su número de panículas fue inferior al de los dos tratamientos testigo, el comportamiento de estos siete mutantes difiere de los resultados obtenidos por Swain, Mall, Bose, Baig, & Singh, (2010) quienes evaluaron 18 genotipos de arroz, encontrando una reducción del 72% en el número de panículas, Otro resultado similar fue obtenido por Singh, Mall, Singh, & Verma (2010)



donde encontraron una disminución del número de panículas al evaluar estrés hídrico en variedades de arroz, en el caso de los mutantes que su número de panículas si fue inferior al de los testigos si concuerda con dichos autores, se destaca que los mutantes que tuvieron un mayor peso y número de granos llenos, fueron inferiores en número de panículas al testigo con agua, esto se puede atribuir a que una de las características de las variedades de arroz tolerante a estrés hídrico es su capacidad de producir de manera consistente panículas completamente fértiles lo que ayuda a la estabilidad de los rendimientos (González & Martínez, 2016). Por otro lado, algunos mutantes de los mutantes superaron en número de panículas al testigo con agua, pero sus rendimientos fueron bajos lo que puede deberse a la esterilidad de dichas panículas.

### **Número de granos llenos y peso de granos llenos**

El número de granos llenos como se puede ver en la tabla 8 para el tratamiento testigo con agua fue de 1321 granos llenos, en el caso de los mutantes solamente dos sobrepasaron el criterio de selección el cual era que alcanzaran al menos un 50% de la producción en comparación con el tratamiento testigo con agua, siendo los mutantes PEG300-04 y el PEG300-08. Sin embargo, también se seleccionaron las plantas PEG300-07 y PEG300-15 ya que su producción estuvo cercana al 50% del testigo con agua.

En cuanto al peso de los granos llenos por planta como se muestra en el tabla 8 el tratamiento testigo en agua registro un peso de 29.1 g, donde solo los mutantes PEG300-04 y PEG300-08 alcanzaron el 50% del peso de los granos llenos en comparación con el tratamiento testigo con agua, pero al igual que en la variable número de granos los mutantes PEG300-07 y PEG300-15 estos alcanzaron un peso de granos cercano al 50% en comparación con el testigo en agua. Es importante resaltar que el genotipo PEG300-04 supero al tratamiento testigo con agua ya que su número de granos llenos fue de 1523 y su peso de granos llenos fue de 35.42 g, por lo que se puede considerarse como un genotipo promisorio debido a que su producción no se vio tan afectada por la sequía, caso contrario ocurrió a los otros genotipos evaluados que si registraron pérdidas en el rendimiento.

Según Richards, (2000) el rendimiento de grano por planta es un rasgo agronómico importante en cultivares con tolerancia al estrés hídrico, por esta razón se puede atribuir algún grado de tolerancia al estrés hídrico en los 4 mutantes mencionados. Los mutantes

PEG300-04, PEG300-08, PEG300-07 y PEG300-15, que fueron los que mejor comportamiento tuvieron a nivel de producción bajo estrés hídrico, esto se puede asociar a un mecanismo de resistencia a sequía denominado tolerancia a la sequía que es la capacidad de la planta para sobrevivir y crecer durante la sequía, esto desde un punto de vista agronómico se traduce en un mayor rendimiento de una planta tolerante en comparación con un genotipo sensible (Quistián, 2010; Noelle et al., 2018).

En cuanto a las plantas mutantes que tuvieron una baja producción se atribuye a que el inicio de llenado de grano es afectado negativamente por el estrés hídrico, esto a causa de la reducción de la fertilidad de las espiguillas y a la disminución del peso seco de las espiguillas fértiles que condujo a una pérdida en el rendimiento del grano (Rang, Jagadish, Zhou, Craufurd, & Heuer, 2011), además se da una producción de obstaculizada de flores y llenado de granos, lo que resulta en granos de menor tamaño y en cantidades menores (Noelle et al., 2018; Pantuwan, Fukai, Copper, Rajatasereekul & O'Toole, 2000a).

La producción de granos de plantas en condiciones de estrés hídrico según un estudio realizado por Singh et al., (2010) donde evaluaron seis cruces de arroz en condiciones de estrés hídrico y riego encontrando que la producción de granos está relacionada con el enrollamiento de la hoja y la quema de la punta de la hoja ya que la producción de granos se ve más afectada cuando se presentan dichos síntomas con mayor severidad, Estos síntomas también se observaron en las 16 líneas mutantes evaluadas y en los testigos expuestos al estrés hídrico siendo mayormente afectados en su rendimiento de peso y número de granos llenos que los mutantes que presentaron un mayor enrollamiento y secado de la punta, mientras que los mutantes que tuvieron un mayor rendimiento fueron los que menos se vieron afectados por dichos síntomas.

La disminución en el rendimiento es resultado del efecto del estrés hídrico que involucra varios rasgos morfológicos y agronómicos, que incluyen la altura de la planta, el macollamiento, área de la hoja (Bocco et al., 2012) y otros rasgos del sistema radical como lo son la longitud, grosor y profundidad, también la fertilidad de la espiguilla, emergencia de panícula, verdor de la hoja, temperatura de la hoja, tiempo de floración, tiempo de madurez, secado de la punta de la hoja y enrollamiento de la hoja (Ndjiondjop *et al.*, 2010)

por ende los genotipos más sensibles al estrés hídrico tendrán un impacto negativo en dichos rasgos morfológicos y agronómicos. .

La reducción en el rendimiento y los componentes de rendimiento de los genotipos mutantes ante el estrés hídrico también se pueden atribuir al cierre estomático en respuesta al bajo contenido de agua en el suelo con una disminución resultante en la ingesta de dióxido de carbono y posteriormente una reducción en la fotosíntesis (Chaves, 1991a; Cornic, 2000; Flexas, Bota, , Loreto, Cornic, & Sharkey, 2004). La reducción del peso del grano en condiciones de estrés también puede deberse al hecho de que, bajo estrés hídrico, las plantas no pueden absorber suficiente nitrógeno, por lo tanto, influye en el peso de grano de las plantas de arroz. (Ding et al., 2005).

### **Peso de 100 granos**

El peso de 100 granos en el testigo con agua fue de 2,2 g (Tabla 8), en el caso de las plantas mutantes 12 alcanzaron a producir más de 100 granos, los que mostraron un mejor comportamiento fueron los mutantes PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10, todos estos mutantes registraron un peso similar o igual al tratamiento testigo con agua. Un alto valor del peso de 100 granos sugiere un mayor tamaño del grano y una mayor densidad, la cuales son características que se asocian a mayores rendimientos por hectárea en el cultivo de arroz (Noelle et al., 2018). Rahim et al., (2012) reportan al evaluar mutantes en estrés hídrico, que el peso de 100 granos no se ve afectado en plantas con tolerancia a estrés hídrico, lo que podría indicar que los mutantes PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10, pueden tener un grado de tolerancia al estrés hídrico, ya que estos mutantes mostraron un comportamiento similar en el peso de 100 granos en comparación con el testigo con agua.

Un menor peso de 100 granos como lo fue en los otros mutantes y en los que no alcanzaron a producir 100 granos se debe a que el estrés hídrico inhibe la efectividad de la distribución de productos fotosintéticos a las partes reproductivas que pueden afectar el tamaño de los granos formados en semillas (Koh, 2005; Rahum et al., 2012).

### **Granos por panícula y granos llenos por panícula**

En la tabla 8 se puede ver que el número de granos por panícula para el testigo con agua fue de 109,2 en el caso de los mutantes tres superaron esta cantidad siendo los

mutantes PEG300-07, PEG300-08, PEG300-10 y PEG300-15, en el caso de los otros mutantes y el testigo expuesto en estrés hídrico el número de granos por panícula fue menor.

En el caso de los mutantes que produjeron más granos por panícula se puede asociar a que dichos mutantes también superaron la longitud de la panícula del testigo con agua, lo que favorece a la producción de granos, lo que podría indicar que el estrés hídrico no causó una disminución en la translocación de asimilados hacia las panículas y órganos reproductivos (Rehman et al., 2002).

En los mutantes en los cuales el número de granos por panícula fue menor se puede deber a que durante el estrés hídrico en etapa reproductiva se da un crecimiento y desarrollo de la panícula lento lo que reduce el número de granos producidos por panícula (Sarkarung et al., 1995; Singh et al., 2012)

En el caso de los granos llenos por panícula como se observa en la tabla 8, para el testigo con agua fue de 28,11 y para testigo en estrés hídrico fue de 8,06 en el caso de los mutantes solamente cuatro alcanzaron a producir el 50% de los granos llenos por panícula en comparación con el testigo con agua, estos fueron PEG300-07, PEG300-08, PEG300-15 y PEG300-04 este último inclusive llegó a superar al testigo en agua debido a que registró un número de 35,42 granos llenos por panícula. El comportamiento de estos mutantes, con excepción del PEG300-04 se asemeja a los reportados por Marn et al., (2015) quien evaluó dos mutantes a condiciones de estrés hídrico el MK-D-2 y MK-D-3 estos produjeron más granos por panícula que el testigo en estrés hídrico pero su producción fue inferior al control sin estrés hídrico. La reducción del llenado de granos por panícula en la mayoría de los mutantes debido al estrés hídrico puede ser ocasionado por el aborto del polen (Nguyen & Sutton, 2009) o bien por la esterilidad de las espiguillas, que reduce el llenado de granos cuando hay escases de agua (Guimarães, De Castro, Stone & De Oliveira 2016).

### **Peso total de grano por planta**

En la tabla 8, se evidencia que el peso total de los granos en el tratamiento testigo con agua fue de 41,7 g. De los mutantes evaluados solamente 4 alcanzaron a producir el 50% en comparación con el testigo con agua siendo estos el PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08 y PEG300-15, sin embargo, valores altos del peso de granos por planta no

implican necesariamente que los genotipos puedan ser clasificados de alto rendimiento dado que existe la posibilidad de que las plantas contengan muchos granos vacíos lo que puede afectar el peso total de grano por planta (Rahim et al., 2012).

Dado que todos los mutantes evaluados mostraron un menor peso de grano total y a que la gran mayoría de estos mutantes no alcanzaron el 50% del peso total de granos en comparación con el testigo con agua es posible evidenciar el efecto que tuvo el estrés hídrico en los genotipos mutantes, esto puede deberse a que el estrés hídrico se impuso en uno de los periodos más sensibles al estrés hídrico en la etapa reproductiva donde ocurre la prefloración y la floración lo que pudo causar una disminución de la fertilidad de las espiguillas volviéndolas estériles generando que muchos granos queden vacíos (Teraza et al., 2002).

Sin embargo, es de rescatar que si bien es cierto los mutantes estudiados no lograron superar al testigo con agua en esta variable también es cierto que produjeron algunos granos llenos indicándonos que estos mutantes tolerando el estrés hídrico al cual fueron sometidos y que el rescate de estas semillas es muy importante para continuar con los estudios posteriores a esta investigación.

### **Esterilidad**

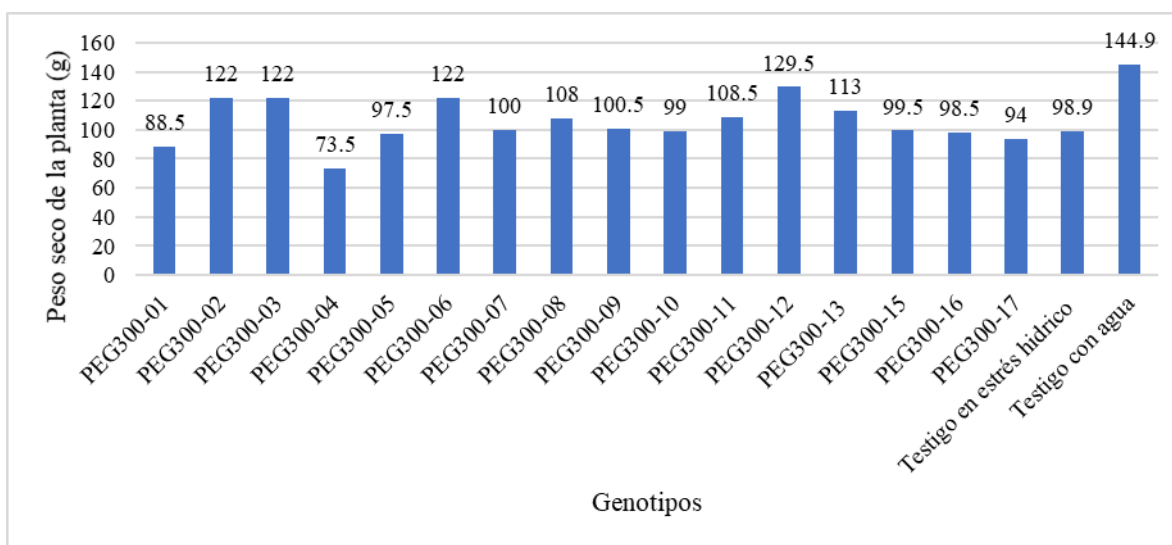
En la tabla 8, se señala que el porcentaje de esterilidad en el tratamiento testigo con agua fue de 74,25% mientras que en las mutantes la esterilidad es superior al 90% con excepción de las plantas, PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08 y PEG300-15, siendo de 88,21%, 64,22%, 87,33%, 86,3% y 86,88% respectivamente. Es importante resaltar que la planta PEG300-04 mostro una menor esterilidad que el testigo con agua lo que la convierte en una planta que bajo estrés hídrico produjo granos viables inclusive más que el testigo con agua.

Los resultados obtenidos son similares a los mostrados por Cha-um et al., (2012) quienes informaron que el número de granos fértiles disminuye cuando las plantas son sometidas a condiciones de déficit hídrico mientras que el número de granos estériles aumento, lo que ocasiona porcentajes de esterilidad altos, este comportamiento lo determinaron mediante la evaluación de 12 líneas mutantes de arroz indica.

La alta esterilidad se puede atribuir a que el estrés hídrico en la etapa de floración más sensible (Liu et al., 2006) ya que puede causar la disminución de la fertilidad de las espiguillas volviéndolas estériles lo que puede deberse a la reducción de muchas de las funciones metabólicas y fisiológicos en las plantas, lo que resulta en un menor llenado de granos ocasionando una mayor esterilidad (Teraza et al., 2002).

### Peso seco de la planta

En la figura 10, se observa que el peso seco del testigo con agua fue de 144.9 g, mientras que el peso seco de todos los mutantes y el testigo en estrés hídrico, fue inferior, por lo que pone en evidencia que el estrés hídrico en etapa reproductiva si tuvo un efecto negativo en el peso seco de los mutantes evaluados. Al respecto Ingram, Bueno, Namuco, Yambao, & Beyrouy, (1994) este comportamiento se debe a los mecanismos que el cultivo de arroz muestra para conservar el agua y aumentar la tolerancia a la sequía como lo pueden ser el enrollamiento de la hoja y el cierre de los estomas, estos mecanismos tienen un efecto no deseado sobre el crecimiento, el área foliar, el índice de área foliar y la producción de materia seca lo que a su vez repercute de manera negativa causando reducciones en el rendimientos agrícola e industrial.



**Figura 10.** Peso seco (gr) de la planta de los genotipos evaluados en condiciones de estrés hídrico.

### **Análisis comparativo de todas las variables evaluadas en la etapa reproductiva para determinar los mutantes más promisorios.**

La etapa reproductiva del cultivo del arroz es una de las etapas más sensibles al estrés hídrico debido a que afecta los órganos reproductores (Saini, 1997; Singh et al., 2012) esto ocasiona retrasos en la floración (inicio, 50% y 100%) y disminuciones en el rendimiento (Bocco et al., 2012) causado por la baja esterilidad de las espiguillas (Tezara et al., 2002; Rang et al., 2011). Dado a que el rendimiento es una de las variables que más afectación sufre por el estrés hídrico en etapa reproductiva y es la variable principal para la selección de tolerancia a condiciones de estrés hídrico en la mayoría de investigaciones que seleccionan arroz con tolerancia a estrés hídrico, esta variable fue la más importante para la selección, en esta investigación sin embargo según Fischer et al., (2003a) y Rahim et al., (2016) el rendimiento al ser un rasgo cuantitativo basar una selección solamente en el rendimiento de grano es ineficaz dado a que el valor de heredabilidad principalmente en mutantes suele ser bajo, por ende se tienen que utilizar otras variables para dicha selección que estén asociadas con el rendimiento. Por ende, para la selección de mutantes promisorios en etapa reproductiva de esta investigación se basó en 16 variables analizadas las cuales son asociadas con la tolerancia al estrés hídrico en dicha etapa del cultivo. Este análisis sirvió para describir cada uno de los mutantes promisorios seleccionados (Tabla 7, y 8; Figura 10). Se encontraron respuestas diferenciadas en cada uno de los mutantes promisorios y se destacan cuatro mutantes los cuales presentaron los mejores valores en diferentes variables.

Estos mutantes fueron PEG300-04, PEG300-07, PEG300-08 y PEG300-15, todas respondieron mejor a la mayoría de parámetros productivos y morfológicos evaluados en esta etapa. Además, fueron los que mostraron una mayor altura, mejor longitud de panículas, superando al testigo con agua, también mostraron una floración y maduración del grano más precoz que el testigo con agua. Estos 4 genotipos mutantes también mostraron un menor daño en el secado de enrollamiento y marchitamiento de las hojas, los cuales son criterios utilizados para la detección de genotipos con tolerancia a condiciones de sequía.

Es importante destacar que entre las cuatro líneas seleccionadas tomando en cuenta las variables evaluadas en etapa reproductiva la línea PEG300-08 sobresalió en 9 variables

de un total de 16, al igual que la línea PEG300-04 en 9 variables, por lo que se les puede atribuir como los mejores mutantes por evidenciar variables con valores sobresalientes, además fueron las que superaron el principal criterio de selección que correspondía a la producción de granos.

### **Selección de mutantes promisorios**

Para la selección o creación de nuevas variedades con tolerancia a condiciones de estrés hídrico es necesario utilizar las bases morfológicas y fisiológicas que ocasionan cambios en la resistencia de las plantas de arroz en condiciones de estrés hídrico (Nam, Chauhan, & Johansen, 2001; Martínez, Silva, Ledent, & Pinto, 2007). Además, es necesario la identificación de las etapas de crecimiento en las cuales el estrés hídrico va a tener un mayor impacto según sea su intensidad y duración (Jaleel, Gopi, & Panneerselvam, 2008a). En el caso del arroz las etapas más críticas al estrés hídricos son la de plántula, vegetativa y la reproductiva (Dey, 1996) además el cultivo de arroz el estrés hídrico tiene una alta sensibilidad independientemente de su intensidad ya sea leve o severa (Rehman *et al.*, 2002) sin embargo el estrés hídrico severo puede tener como resultado la detención de la fotosíntesis, alteración en el metabolismo de la planta y teniendo como resultado final la muerte de la planta (Jaleel, et al., 2009c). debido a lo anterior esta investigación por medio de la evaluación de variables morfológicas, fisiológicas y productivas fue posible la selección de cuatro mutantes promisorios de un total de 10000 mutantes candidatos, los cuales fueron evaluados bajo condiciones de estrés hídrico leve en las etapas más sensibles del ciclo de cultivo, seleccionando así solamente los mutantes que tuviera una mejor respuesta en el comportamiento de las variables evaluadas bajo condiciones de estrés hídrico, en comparación con el testigo con agua.



## CONCLUSIONES

- El potencial osmótico de -0.5 MPa seleccionado en base a la determinación de la  $DL_{50}$  del PEG8000, permitió discriminar mutantes de arroz (*Oryza sativa* var. CR 5272) tolerantes de los susceptibles.
- La exposición de una muestra de una población segregante de arroz (*Oryza Sativa* var. CR-5272) ( $M_2$ ) a un potencial osmótico de -0.5 MPa en condiciones de laboratorio y en etapa de plántula permitió seleccionar un total de 17 mutantes de arroz con tolerancia al estrés hídrico.
- El someter a un segundo proceso de selección a los mutantes obtenidos en la primera selección en el período reproductivo, permitió ser más estrictos en el proceso de selección reduciéndose a un total de 4 mutantes promisorios de arroz (*Oryza Sativa* var. CR-5272) con diferente grado de tolerancia al estrés hídrico.
- Las variables agronómicas evaluadas en los mutantes candidatos permitieron establecer en esta investigación que los mutantes de arroz (*Oryza Sativa* var. CR-5272) con mayor grado de tolerancia al estrés hídrico corresponden al PEG300-08 y el PEG300-04.
- Se demostró que la técnica de mejoramiento por mutaciones usando agentes físicos como los rayos gamma constituyen una alternativa más para provocar variación genética en la variedad de arroz CR-5272, la cual podría ser usada en la consolidación de líneas avanzadas y en cruzamientos para la producción de híbridos.
- La técnica de mejora genética por mutaciones ofrece una opción para mitigar el efecto del cambio climático en arroz, específicamente en lo que respecta a la búsqueda de resistencia a la sequía.

## RECOMENDACIONES

- Se debe seguir con la investigación de tolerancia a condiciones de sequía de las líneas que mostraron un buen comportamiento en etapa de plántula y reproductiva ya que su comportamiento se asocia a distintos mecanismos de resistencia a la sequía en el cultivo de arroz, además de que es sumamente importante corroborar la tolerancia a condiciones de sequía en dichas líneas.
- Se pueden utilizar las cuatro líneas seleccionadas en investigaciones que involucren otros tipos de estrés ya sean bióticos o abióticos.
- Es importante utilizar más parámetros de selección para la detección de genotipos tolerantes a condiciones de sequía como lo pueden ser la temperatura de la hoja, la concentración de clorofila en las hojas, y la concentración de prolina en las hojas, debido a que estas variables son muy utilizadas por los fitomejoradores en la detección de genotipos con tolerancia a sequía.
- Es importante valorar otras dosis de radiación mayores a 300 Gy y diferentes generaciones segregantes (M3, M4, M5, M6, etc.) y así aumentar la posibilidad de rescatar más mutantes candidatos tolerantes al estrés hídrico, ya que esta característica se encuentra controlada por muchos genes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahloowalia, B. S., & Maluszynski, M. (2001). Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, *118*(2), 167-173.
- Almeida Arteaga, V. H. (2009). Determinación de las condiciones adecuadas de pre-tratamiento frío y la dosis óptima de radiación gamma co “, para realizar cultivo in vitro de microsporas aisladas de maíz de las variedades INIAP-101 e INIAP-601.
- Álvarez, A., Alonso, A., Álvarez, M., Santiago, L., Coto, O., Carro, S., ... & Zamora, V. (2013). Metodología De Radiomutagénesis y Selección in vitro para la tolerancia a la sequía utilizando embriones cigóticos de aguacatero.
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, *6*(9), 2026-2032.
- Araus, J. L., Slafer, G. A., Reynolds, M. P., & Royo, C. (2002). Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for?. *Annals of botany*, *89*(7), 925-940.
- Bhadra, S., & Roy, B. (2014). Genetic diversity analysis of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under aluminium toxic hydroponic culture. *Journal of Agricultural Technology*, *1*(2), 25-32.
- Bocco, R., Lorieux, M., Seck, P. A., Futakuchi, K., Manneh, B., Baimey, H., & Ndjiondjop, M. N. (2012). Agro-morphological characterization of a population of introgression lines derived from crosses between IR 64 (*Oryza sativa indica*) and TOG 5681 (*Oryza glaberrima*) for drought tolerance. *Plant science*, *183*, 65-76.
- Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., & Handa, A. K. (1981). Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress. *Plant Science Letters*, *21*(1), 23-30.
- Champoux, M. C., Wang, G., Sarkarung, S., Mackill, D. J., O'Toole, J. C., Huang, N., & McCouch, S. R. (1995). Locating genes associated with root morphology and

- drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(7-8), 969-981.
- Chang, T. T., Loresto, G. C., O'Toole, J. C., & Armenta-Soto, J. L. (1983). Strategy and methodology of breeding rice for drought-prone areas. *Drought resistance in crops with emphasis on rice*, 217-244.
- Chaudhary, R. C., Nanda, J. S., & Tran, D. V. (2003). *Guía para identificar las limitaciones de campo en la producción de arroz* (No. SB191. R5 Ch496). FAO.
- Cha-um, S., Yooyongwech, S., & Supaibulwatana, K. (2012). Water-deficit tolerant classification in mutant lines of indica rice. *Scientia Agricola*, 69(2), 135-141.
- Chaves, M. M. (1991a). Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of experimental Botany*, 42(1), 1-16.
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., ... & Pinheiro, C. (2002b). How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of botany*, 89(7), 907-916.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003c). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 30(3), 239-264.
- Cornic, G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture—not by affecting ATP synthesis. *Trends in plant science*, 5(5), 187-188.
- CONARROZ. (2016). Informe Estadístico 2015/2016. Unidad de Inteligencia de Mercados. San José, Costa Rica
- CONARROZ. (2018). Informe Estadístico 2016/2017. Unidad de Inteligencia de Mercados. San José, Costa Rica
- CONARROZ. (2020). Informe Estadístico 2018/2019. Unidad de Inteligencia de Mercados. San José, Costa Rica.
- Cortés Enríquez, G. (1994). Atlas agropecuario de Costa Rica. San José, C.R.: EUNED, Ed. Univ. Estatal a Distancia.

- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), 850.
- Crestelo, E. S. (2006). Mejoramiento Genético Mediante Inducción de Mutaciones. *Instituto de Investigaciones del Arroz (II Arroz). Autopista del Mediodía, Km, 16(1), 2.*
- Cui, K., Huang, J., Xing, Y., Yu, S., Xu, C., & Peng, S. (2008). Mapping QTLs for seedling characteristics under different water supply conditions in rice (*Oryza sativa*). *Physiologia Plantarum*, 132(1), 53-68.
- Davatgar, N., Neishabouri, M. R., Sepaskhah, A. R., & Soltani, A. (2012). Physiological and morphological responses of rice (*Oryza sativa* L.) to varying water stress management strategies. *International Journal of Plant Production*, 3(4), 19-32.
- Dey, M. M. (1996). Yield loss due to drought, cold and submergence in Asia. *Rice research in Asia: Progress and priorities*, 291-304.
- Ding, L., Wang, K. J., Jiang, G. M., Biswas, D. K., Xu, H., Li, L. F., & Li, Y. H. (2005). Effects of nitrogen deficiency on photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. *Annals of botany*, 96(5), 925-930.
- Dunand, R., & Saichuk, J. (2014). Rice growth and development. Louisiana Rice Production Handbook. Baton Rouge, LA: Louisiana State University AgCenter Publ, 2321, 41-53.
- Emmerich, W. E., & Hardegree, S. P. (1990). Polyethylene glycol solution contact effects on seed germination. *Agronomy Journal*, 82(6), 1103-1107.
- Fanti, S. C., & Perez, A. (2004). Processo germinativo de sementes de paineira sob estresses hídrico e salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(9), 903-909.
- Fischer, K. S., Fukai, S., Kumar, A., Leung, H., & Jongdee, B. (2012b). Field phenotyping strategies and breeding for adaptation of rice to drought. *Frontiers in physiology*, 3.

- Fischer, K.S., Lafitte, R., Fukai, S., Atlin, G. & Hardy, B. (2003a). *Breeding rice for drought-prone environments*. Los Banos: IRRI.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., & Sharkey, T. D. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant biology*, 6(03), 269-279.
- Fukai, S., Pantuwan, G., Jongdee, B., & Cooper, M. (1999). Screening for drought resistance in rainfed lowland rice. *Field Crops Research*, 64(1-2), 61-74.
- García, A., Florido, M., & Lara, R. M. (2003a). Estudios bioquímicos para la selección in vitro de variedades de arroz con tolerancia a estrés hídrico. *Bioteología Vegetal*, 3(3).
- García, A., González, M. C., & Marrero, M. T. (2005b). Efecto del PEG como simulador del déficit hídrico en el crecimiento de tres variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) en la fase de plántula.
- González Cepero, M. C., & Martínez Romero, A. (2016). Selección de mutantes de arroz de buen comportamiento agronómico en condiciones de bajo suministro de agua. *Cultivos Tropicales*, 37(1), 102-109.
- González, L. M., Argentel, L., Zaldívar, N., & Ramírez, R. (2005). Efecto de la sequía simulada con PEG-6000 sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas de dos variedades de trigo. *Cultivos tropicales*, 26(4), 49-52.
- González-Jiménez, J. (2004). La tecnología nuclear en el mejoramiento de las plantas. *Ciencia*, 55(2).
- Granier, C., Inzé, D., & Tardieu, F. (2000). Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34cdc2 kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiology*, 124(3), 1393-1402.
- Guimarães, C. M., De Castro, A. P., Stone, L. F., & De Oliveira, J. P. (2016). Drought tolerance in upland rice: identification of genotypes and agronomic characteristics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 38(2), 201-206.

- Harris, D., Tripathi, R. S., & Joshi, A. (2002). On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice. *Direct seeding: Research Strategies and Opportunities, International Research Institute, Manila, Philippines*, 231-240.
- Henderson, S. A., Kamboonruang, V., & Copper, M. (1995). Evaluation of a glasshouse screening method to select for drought resistance in rainfed lowland rice. In *International Rice Research Conference on Fragile Lives in Fragile Ecosystems, Los Banos, Laguna (Philippines), 13-17 Feb 1995*. IRRI.
- Ingram, K. T., Bueno, F. D., Namuco, O. S., Yambao, E. B., & Beyrouy, C. A. (1994). Rice root traits for drought resistance and their genetic variation.
- Instituto Meteorológico Nacional (IMN). (2015). Datos climáticos. Periodo 2014-2015. Heredia: Estación Meteorológica Finca Experimental Santa Lucía, Universidad Nacional de Costa Rica.
- IRRI. 1996. International Network for Genetic E-valuation of Rice: standard evaluation system for rice. Los Banos: IRRI.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., & Panneerselvam, R. (2008a). Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of *Catharanthus roseus* to triadimefon treatment. *Comptes Rendus Biologies*, 331(4), 272-277.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Lakshmanan, G. M. A., Gomathinayagam, M., & Panneerselvam, R. (2008b). Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61(2), 298-303.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2009c). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol*, 11(1), 100-105.
- Jarma, A., Degiovanni, V & Montoya, R. (2010). Índices fisiotécnicos, fases de crecimiento y etapas de desarrollo de la planta de arroz. Centro Internacional de Agricultura

Tropical (CIAT).

- Jerez, E., & Morales, D. (1999). Comportamiento de dos variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) sometidas a estrés hídrico. *Cultivos Tropicales*, 20(3), 33-35.
- Kacem, N. S., Delporte, F., Muhovski, Y., Djekoun, A., & Watillon, B. (2017). In vitro screening of durum wheat against water-stress mediated through polyethylene glycol. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 239-247
- Kadhimi, A. A., Zain, C. R. C. M., Alhasnawi, A. N., Isahak, A., Ashraf, M. F., Mohamad, A., ... & Yusoff, W. M. W. (2016). Effect of irradiation and polyethylene glycol on drought tolerance of MR269 genotype rice (*Oryza sativa* L.). *Asian Journal of Crop Science.[Online]*, 8, 52-59.
- Kadioglu, A., & Terzi, R. (2007). A dehydration avoidance mechanism: leaf rolling. *The Botanical Review*, 73(4), 290-302.
- Kato, Y., Hirotsu, S., Nemoto, K., & Yamagishi, J. (2008). Identification of QTLs controlling rice drought tolerance at seedling stage in hydroponic culture. *Euphytica*, 160(3), 423-430.
- Kazerani, B., Navabpour, S., Sabouri, H., Ramezanpour, S. S., Zaynali Nezhad, K., & Eskandari, A. (2019). Grouping of rice mutant lines based on morphological and agronomical traits under different moisture conditions using multivariate statistical methods. *Journal of Plant Physiology & Breeding*, 9(2), 85-96.
- Khush, G. S. (2013). Strategies for increasing the yield potential of cereals: case of rice as an example. *Plant Breeding*, 132(5), 433-436.
- Kim, Y. J., Yun, S. J., Park, H. K., & Park, M. S. (2001). A simple method of seedling screening for drought tolerance in soybean. *Korean Journal of Crop Science*, 46(4), 284-288.
- Koh, A. (2005). Penilaian ciri-ciri morfologi dan agronomi titisan padi transgenik WT.53.8 pada generasi T5.



- Lafitte, H. R., & Courtois, B. (2002). Interpreting cultivar× environment interactions for yield in upland rice. *Crop Science*, 42(5), 1409-1420.
- Lafitte, R., Blum, A., & Atlin, G. (2003). Using secondary traits to help identify drought-tolerant genotypes. *Breeding rice for drought-prone environments*, 37-48.
- Lawlor, D. W. (1970). Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New phytologist*, 69(2), 501-513.
- Lemus, Y., Méndez-Natera, J., Cedeño, J., & Otahola-Gómez, V. (2002). Radiosensibilidad de dos genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) a radiaciones gamma. *Revista UDO Agrícola*, 2(1), 22-28.
- Leung, H., & An, G. (2004). F RICE UNCTIONAL GENOMICS: LARGE-SCALE GENE DISCOVERY. *Advances in Agronomy*, 55.
- Levitt, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press..
- Liu, J. X., Liao, D. Q., Oane, R., Estenor, L., Yang, X. E., Li, Z. C., & Bennett, J. (2006). Genetic variation in the sensitivity of anther dehiscence to drought stress in rice. *Field Crops Research*, 97(1), 87-100.
- Liu, J., Shen, J., Xu, Y., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2016). Ghd2, a CONSTANS-like gene, confers drought sensitivity through regulation of senescence in rice. *Journal of experimental botany*, 67(19), 5785-5798.
- Lobato, A. K. S., Costa, R. C. L., Oliveira Neto, C. F., Santos Filho, B. G., Gonçalves-Vidigal, M. C., Vidigal Filho, P. S., ... & Gonela, A. (2009). Consequences of the water deficit on water relations and symbiosis in *Vigna unguiculata* cultivars. *Plant, Soil and Environment*, 55(4), 139-145.
- Marmar, A., Baenziger, S., Dweikat, I., & El Hussein, A. A. (2013). Preliminary screening for water stress tolerance and genetic diversity in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars from Sudan. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(2), 87-94.

- Marn, S., Minn, M., Zar, K., Mar, N. (2015). Development of Drought Tolerant Mutant from Rice var. Manawthukha through Mutation Breeding Technique using  $^{60}\text{Co}$  Gamma Source. *Development*, 4(11).
- Maroco, J. P., Pereira, J. S., & Chaves, M. M. (2000). Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C4Sahelian grasses subjected to water deficits. *Journal of Arid Environments*, 45(2), 119-137.
- Martínez, J. P., Silva, H. F. L. J., Ledent, J. F., & Pinto, M. (2007). Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European journal of agronomy*, 26(1), 30-38.
- Maruyama, K., Urano, K., Yoshiwara, K., Morishita, Y., Sakurai, N., Suzuki, H., ... & Shinozaki, K. (2014). Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. *Plant Physiology*, 164(4), 1759-1771.
- Masyhudi, M. F., & Patterson, R. P. (1994). The effect of water stress on nitrogen absorption of soybean. *Indonésian journal of crop science*, 6(2), 43-63.
- Meybeck, A., Lankoski, J., Redfern, S., Azzu, N., & Gitz, V. (2012). Building resilience for adaptation to climate change in the agriculture sector. Proceedings of a Joint FAO/OECD Workshop, Rome, Italy, 23-24 April 2012. In *Building resilience for adaptation to climate change in the agriculture sector. Proceedings of a Joint FAO/OECD Workshop, Rome, Italy, 23-24 April 2012*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Michel, B. E. (1983). Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant physiology*, 72(1), 66-70.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (1991). Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. San José, Costa Rica.

- Morgan JM (1989) Physiological traits for drought resistance. In: Drought Resistance in Cereals. Baker FW (Ed). Published for ICSU Press by CAB. International. 221 pp.53-64.
- Nam, N. H., Chauhan, Y. S., & Johansen, C. (2001). Effect of timing of drought stress on growth and grain yield of extra-short-duration pigeonpea lines. *Journal of Agricultural Science*, 136(2), 179-189.
- Navarro, W. (1998a). Utilización de la energía nuclear para el mejoramiento genético de plantas.pdf. Costa Rica: Programa de Genética Vegetal. Escuela de Ciencias Agrarias.
- Navarro, W. (1999b). *Utilización de la Energía Nuclear para el Mejoramiento Genético de Plantas*. Heredia.
- Ndjiondjop, M. N., Cisse, F., Futakuchi, K., Lorieux, M., Manneh, B., Bocco, R., & Fatondji, B. (2010, March). Effect of drought on rice (*Oryza* spp.) genotypes according to their drought tolerance level. In *Second Africa Rice Congress, Bamako, Mali* (Vol. 1, pp. 1-1).
- Nelson, G. C., Rosegrant, M. W., Koo, J., Robertson, R., Sulser, T., Zhu, T., ... & Magalhaes, M. (2009). Cambio Climático: El impacto en la agricultura y los costos de adaptación. IFPRI.
- Nguyen, G. N., & Sutton, B. G. (2009). Water deficit reduced fertility of young microspores resulting in a decline of viable mature pollen and grain set in rice. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(1), 11-18.
- Noelle, N. M., Weru, W. P., Rodrigue, S. J., & Karlin, G. (2018). The effects of drought on rice cultivation in sub-Saharan Africa and its mitigation: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 13(25), 1257-1271.
- Novak, F. J., & Brunner, H. (1992). Fitotecnia: Tecnología de mutación inducida para el mejoramiento de los cultivos. *Boletín del OIEA*, 4, 24-33.

- Núñez, L. M., & Andreu, L. I. (1998). Análisis de la variabilidad isoenzimática en mutantes de arroz obtenidos por radioinducción de mutaciones. *Nucleus*, (25).
- Nurhayati, N., Rahayu, M., Syaekani, I & Ritonga, S. (2017). In Vitro Selection of Drought Stress Rice (*Oryza sativa* L) Varieties Using PEG (Polyethylene Glycol). *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research Volume 32, No 2, pp 192-208*
- Olmos, S. (2006). Apunte de morfología, fenología, ecofisiología, y mejoramiento genético del arroz. *Cátedra de Cultivos II. Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina UNNE. Corrientes*, 1-13.
- Ordaz, J. L., Mora, J., Acosta, A., Serna Hidalgo, B., & Ramírez, D. (2010). Costa Rica: efectos del cambio climático sobre la agricultura.
- O'Toole, J. C., Cruz, R. T., & Singh, T. N. (1979). Leaf rolling and transpiration. *Plant Science Letters*, 16(1), 111-114.
- Pandey, V., & Shukla, A. (2015). Acclimation and tolerance strategies of rice under drought stress. *Rice Science*, 22(4), 147-161.
- Pantuwan G, Fukai S, Copper M, Rajatasereekul & S, O'Toole J.C. (2000a). Field screening for drought resistance .in increased lowland rice production in the Mekong region. *Proceedings of international workshop* , 69-77.
- Pantuwan, G., Fukai, S., Cooper, M., Rajatasereekul, S. & O'Toole, J.C. (2002b). Yield response of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to drought under rainfed lowland. 3. Plant factors contributing to drought resistance. *Field Crop Research* 73: 181-200.
- Passioura, JB. (1996) Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regul* 20:79–83
- Pattanagul, W., & Thitisaksakul, M. (2008). Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance.

- Pirdashti, H., Sarvestani, Z. T., Nematzadeh, G. H., & Ismail, A. (2003). Effect of water stress on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Journal of Agronomy*.
- Priyanka, S., Rizwan, M., Bhatt, K. V., Mohapatra, T., & Govind, S. (2011). In-vitro response of *Vigna aconitifolia* to drought stress induced by peg 6000. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7(3).
- Quistián Martínez, D. (2010). Efecto de la inhibición de la trealasa por RNA antisentido sobre la tolerancia a sequía en arroz (*Oryza sativa* L.).
- Rahim, H. A., Zarifith, S. K., Bhuiyan, M. A. R., Narimah, M. K., Wickneswari, R., & Abdullah, M. Z. (2012). Evaluation and characterization of advanced rice mutant line of rice (*Oryza sativa*), MR219-4 and MR219-9 under drought condition. In *Proceedings of the Research and Development Seminar* (pp. 26-28).
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P., & Dhawan, A. K. (2011). Developing stress tolerant plants through in vitro selection—an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71(1), 89-98.
- Rang, Z. W., Jagadish, S. V. K., Zhou, Q. M., Craufurd, P. Q., & Heuer, S. (2011). Effect of high temperature and water stress on pollen germination and spikelet fertility in rice. *Environmental and Experimental Botany*, 70(1), 58-65.
- Rehman, M. T., Islam, M. T., & Islam, M. O. (2002). Effect of water stress at different growth stages on yield and yield contributing characters of transplanted Aman rice. *Pak. J. Biol. Sci*, 5(2), 169-172.
- Reig Valiente, J. L. (2019). *Estudio de polimorfismos asociados a caracteres de interés agronómico en arroz (Oryza sativa L.) mediante técnicas de análisis genómico* (Doctoral dissertation).
- Richards, R. A. (2000). Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *Journal of experimental botany*, 51(suppl\_1), 447-458.

- Rodríguez. Pardo, J. (2017). La ruta , D. E. S. D. E. L. A. B., & Biotecnológica, Y. S. A. Biotecnología agrícola para mejorar la tolerancia a sequía y salinidad.
- Sabesan, T., & Saravanan, K. (2016). In Vitro Screening of Indica Rice Genotypes for Drought Tolerance Using Polyethylene Glycol. *International Journal of Advances in Agricultural and Environmental Engineering*, 3(2), 2349-1523.
- Saini, H. S. (1997). Effects of water stress on male gametophyte development in plants. *Sexual Plant Reproduction*, 10(2), 67-73.
- Sarkarung, S., Singh, O. N., Roy, J. K., Vanavichit, A., & Bhekasut, P. (1995). Breeding strategies for rainfed lowland ecosystem. In *International Rice Research Conference on Fragile Lives in Fragile Ecosystems, Los Banos, Laguna (Philippines), 13-17 Feb 1995*. IRRI.
- Shehab, G. G., Ahmed, O. K., & El-Beltagi, H. S. (2010). Effects of various chemical agents for alleviation of drought stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 139-148.
- Sié, M., Futakuchi, K., Gridley, H., Mande, S., Manneh, B., Ndjiondjop, M. N., ... & Samejima, H. (2009). Drought research at WARDA: current situation and prospects. In *Drought frontiers in rice: crop improvement for increased rainfed production* (pp. 61-73).
- Singh, A. K., Mall, A. K., Singh, P. K., & Verma, O. P. (2010). Interrelationship of genetics parameters for quantitative and physiological traits in rice under irrigated and drought conditions. *Oryza-An International Journal on Rice*, 47(2), 142-147.
- Singh, C. M., Binod, K., Suhel, M., & Kunj, C. (2012). Effect of drought stress in rice: a review on morphological and physiological characteristics. *Trends in Biosciences*, 5(4), 261-265.
- Singh, D. K., Sale, P. W., Pallaghy, C. K., & Singh, V. (2000). Role of proline and leaf expansion rate in the recovery of stressed white clover leaves with increased phosphorus concentration. *The New Phytologist*, 146(2), 261-269.

- Singh, H., & Ingram, K. T. (1991). Sensitivity of rice to water deficit at different growth stages. *Philippine Journal of Crop Science (Philippines)*.
- Singh, S., Prasad, S., Yadav, V., Kumar, A., Jaiswal, B., Kumar, A., ... & Dwivedi, D. K. (2018). Effect of drought stress on yield and yield components of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 7, 2752-2759.
- Singh, T., Habirand, S., & Naik, D. S. (1986). Effect of water stress at three stages of growth on water use and water use efficiency of wof wheat. *Indian Journal plant physiology VXXIX*, 248-255.
- Subbarao, G. V., Ito, O., Serraj, R., Crouch, J. J., Tobita, S., Okada, K., ... & Berry, W. L. (2005). Physiological perspectives on improving crop adaptation to drought justification for a systematic component-based approach. *Handbook of Photosynthesis, 2nd edn. Marcel and Dekker. New York*, 577-594.
- Supriyanto, B. (2013). Pengaruh Cekaman Kekeringan terhadap Pertumbuhan dan Hasil Padi Gogo Lokal, Kultivar Jambu. *Agrifor*, 12(1), 77-82
- Swain, P., Mall, A. K., Bose, L. K., Baig, M. J., & Singh, D. N. (2010). Drought susceptibility index as a parameter to identify drought tolerant rice genotypes for rainfed uplands. In *Abs. National Symposium on Sustainable Rice Production System Under Changed Climate. CRRI, Cuttack, Orissa, India* (pp. 27-29).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. 3rd edit. Sinauer Associates Inc.
- Tardieu, F. (2005). Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geoscience*, 337(1-2), 57-67.
- Teng, S., Qian, Q., Zeng, D., Kunihiro, Y., Fujimoto, K., Huang, D., & Zhu, L. (2004). QTL analysis of leaf photosynthetic rate and related physiological traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 135(1), 1-7.
- Tezara, W., Mitchell, V., Driscoll, S. P., & Lawlor, D. W. (2002). Effects of water deficit and its interaction with CO<sub>2</sub> supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, 53(375), 1781-1791.

- Tinoco Mora, R., & Acuña Chinchilla, A. (2009). Manual de recomendaciones técnicas: cultivo de arroz (*Oryza sativa*) (No. 633.18 M294). Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, San José (Costa Rica) Instituto de Desarrollo Agrario, San José (Costa Rica).
- Tripathy, J. N., Zhang, J., Robin, S., Nguyen, T. T., & Nguyen, H. T. (2000). QTLs for cell-membrane stability mapped in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. *Theoretical and Applied Genetics*, *100*(8), 1197-1202.
- Tudela, D., & Tadeo, F. (1993). Respuestas y adaptación de las plantas al estrés. *Fisiología y Bioquímica Vegetal, Interamericano*, 537-553.
- Turner, M. G., Gardner, R. H., O'Neill, R. V., & O'Neill, R. V. (2001). *Landscape ecology in theory and practice* (Vol. 401). Springer New York.
- Venuprasad, R., Lafitte, H. R., & Atlin, G. N. (2007). Response to direct selection for grain yield under drought stress in rice. *Crop Science*, *47*(1), 285-293.
- Wang, D., Pan, Y., Zhao, X., Zhu, L., Fu, B., & Li, Z. (2011). Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. *BMC genomics*, *12*(1), 149.
- Xu, W., Cui, K., Xu, A., Nie, L., Huang, J., & Peng, S. (2015). Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. *Acta physiologiae plantarum*, *37*(2), 9.
- Yoshida, T. (1976). Climatic influence on growth and nutrient uptake of rice roots, with special reference to the growth unit theory. In Proceedings of the symposium on climate and rice. IRRI Publication, Los Banos, Philippines (pp. 265-77).
- Zamora, E. (2014). Efectos de cinco niveles de Radiaciones de Gamma en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Universidad Técnica de BABAHOYO.
- Zhou, L., Liu, Z., Liu, Y., Kong, D., Li, T., Yu, S., ... & Luo, L. (2016). A novel gene OsAHL1 improves both drought avoidance and drought tolerance in rice. *Scientific reports*, *6*, 30264.