

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE MUTANTES
M3 DE ARROZ (*Oryza sativa indica* L. VAR. CR5272) EN
CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado
de Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología con énfasis en
Genética y Biología Molecular

WILLIAM WATSON GUIDO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2019

Dedicatoria

A mi familia y amigos

Agradecimientos

El autor agradece al proyecto FEES-CONARE por brindar el financiamiento para la realización de este trabajo.

A la Escuela de Biología y el Centro en Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.

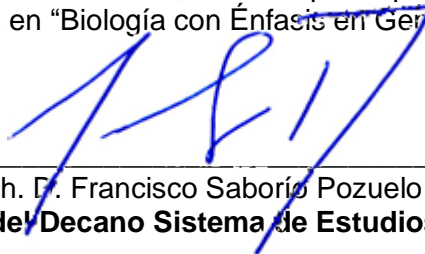
Al fondo de ayuda de proyectos de Tesis de posgrado de la Universidad de Costa Rica, por brindar parte del financiamiento para realizar el proyecto.

A Emanuel Araya, por su apoyo y disposición para los análisis en el Centro de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot).

A mis compañeros de laboratorio por la ayuda brindada.

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional en todo este tiempo.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en “Biología con Énfasis en Genética y Biología Molecular”.



Ph. D. Francisco Saborío Pozuelo

Representante del Decano Sistema de Estudios de Posgrado



Dr.sc.agr. Andrés Gatica Arias
Director de Tesis



M.Sc Griselda Arrieta Espinoza

Asesora



Dr.rer.nat. Luis Orlando Barboza Barquero

Asesor



Dra. Marta Valdez Melara

**Representante del Director
Programa de Posgrado en Biología**



William Watson Guido

Candidato

Tabla de contenido

Portada.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Tabla de contenido	v
Resumen.....	ix
Abstract	x
Lista de cuadros.....	xi
Lista Figuras	xii
Lista abreviaciones	xvii
Introducción	1
Revisión de literatura	5
Generalidades del cultivo del arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	5
Mejoramiento genético en el cultivo de arroz: inducción de mutaciones	5
Efecto exceso de NaCl en las plantas de arroz	7
Aspectos fisiológicos de la tolerancia del arroz al estrés salino	8
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9

Materiales y métodos.....	10
Obtención de callos embriogénicos a partir de semillas de arroz var. CR5272.....	10
Regeneración de embriones a plántulas de arroz.....	11
Selección dosis de trabajo para la generación de mutantes de arroz var CR5272 y selección bajo condiciones de estrés salino con NaCl	12
Selección dosis de radiación para la generación de mutantes de arroz var CR5272 ..	12
Análisis histológicos de callos embriogénicos de arroz irradiados a distintas dosis de radiación gamma	12
Selección dosis de trabajo NaCl para simular el estrés salino en plantas de arroz subespecie indica var CR5272	14
Selección bajo condiciones <i>in vitro</i> de los mutantes de arroz	15
Aclimatación de supuestos mutantes de arroz M1V1 para la obtención de semillas M315	
Selección <i>ex vitro</i> y caracterización morfológica de mutantes M3 de arroz obtenidos de callos embriogénicos de arroz subespecie indica var. CR5272	16
Caracterización molecular	18
Análisis de AFLP de mutantes M3 de arroz de la línea I	20
Análisis de los patrones de metilación por MSAP de los mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino.....	22
Análisis de los cambios de expresión de genes relacionados con la tolerancia a salinidad de mutantes M3 de arroz mediante qRT-PCR.....	24
Caracterización bioquímica de mutantes M3 de arroz de la línea I sometidos a estrés salino por NaCl.....	26
Estimación del contenido de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> en hojas de mutantes M3 I de arroz sometidos a estrés salino.....	26
Estimación del contenido de proteínas totales en hojas de mutantes de arroz M3 I sometidos a estrés salino por NaCl	27
Resultados	27
Selección dosis de trabajo para la generación de mutantes de arroz subespecie indica var CR5272 y selección bajo condiciones de estrés salino	27
Selección dosis de radiación para la generación de mutantes de arroz.....	27
Análisis histológicos de los callos embriogénicos de arroz irradiados a distintas dosis de radicación gamma	29
Selección dosis de trabajo NaCl para simular el estrés salino en plantas de arroz subespecie indica var CR5272	32

Selección <i>in vitro</i> de mutantes M1V1 a partir de callos embriogénicos irradiados de arroz var. CR5272.....	39
Selección <i>ex vitro</i> y caracterización morfológica de mutantes M3 de arroz obtenidos de callos embriogénicos de arroz var CR5272	41
Caracterización molecular de los mutantes de arroz M3 I.....	47
Análisis de los patrones de AFLP de los mutantes M3 I de arroz sometidos a estrés salino por 150 mM de NaCl.....	48
Análisis de los patrones de metilación por MSAP de los mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino.....	51
Análisis de los cambios de expresión de genes relaciones con la tolerancia a salinidad de mutantes M3 de arroz mediante qRT-PCR.....	54
Caracterización bioquímica de mutantes M3 sometidos a estrés salino	60
Estimación del contenido de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> en hojas de mutantes M3 I de arroz sometidos a estrés salino.....	60
Estimación del contenido de proteínas totales en hojas de mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino.....	62
Discusión.....	62
Selección dosis de radiación para la generación de mutantes de arroz var CR5272 .	62
Análisis histológicos de los callos embriogénicos de arroz irradiados a distintas dosis de radicación gamma	64
Selección dosis de trabajo NaCl para simular el estrés salino en plantas de arroz subespecie indica var CR5272	64
Selección <i>in vitro</i> de mutantes M1V1 a partir de callos embriogénicos irradiados de arroz subespecie indica var. CR5272.....	65
Selección <i>ex vitro</i> y caracterización morfológica de los supuestos mutantes M3 de arroz obtenidos de callos embriogénicos de arroz subespecie indica var. CR5272	66
Análisis de AFLP de los mutantes M3 I de arroz.....	69
Análisis de los patrones de metilación por MSAP de los mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino.....	70
Análisis de los cambios de expresión de genes relaciones con la tolerancia a salinidad de mutantes M3 de arroz mediante qRT-PCR.....	71
Caracterización bioquímica de mutantes M3 sometidos a estrés salino	74
Estimación del contenido de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> en hojas mutantes M3 I de arroz sometidos a estrés salino	74
Estimación del contenido de proteínas totales en hojas de mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino.....	75

Conclusiones	75
Recomendaciones	76
Bibliografía	78
Anexos	91

Resumen

El arroz es un cultivo de gran importancia a nivel mundial, ya que es la base de la alimentación de 2/3 partes de su población. En Costa Rica este grano representa el 20 % de la ingesta calórica diaria, por lo que es imprescindible garantizar la producción de este alimento frente a problemas ambientales como la salinidad. Desde la década de 1920 se ha utilizado la inducción de mutaciones para generar variedades nuevas, en arroz la metodología más utilizada es la inducción de mutaciones por radiación gamma. Las técnicas moleculares y el cultivo *in vitro* se han empleado para reducir el tiempo en la selección y caracterización de mutantes con características de interés. En el presente trabajo se regeneraron mutantes de arroz a partir de callos embriogénicos irradiados a 40 Gy y seleccionados con 150 mM de NaCl. Se lograron obtener 7 plantas hermanas de la línea I de las cuales 5 mostraron tolerancia a la salinidad y 2 plantas sensibilidad. Se determinaron los cambios genéticos por AFLP, así como los cambios en los patrones de metilación, expresión relativa de los genes *CYSB*, *SAMDC*, *SAMS* y *HKT2* y concentración de proteínas totales y contenido de clorofila *a* y *b* en los mutantes M3 de la línea I. Las características diferenciales más evidentes se observaron en el cambio de los niveles de expresión de los genes *CYSB*, *SAMDC*, *SAMS* y *HKT2*, así como una mayor concentración de clorofila en las plantas tolerantes, respecto a los controles, también se encontró una mayor concentración de proteínas totales en las plantas tolerantes, en comparación a las plantas control en salinidad.

Abstract

Rice is a crop of great worldwide importance, because it is the basis of the diet of 2/3 of its population. In Costa Rica this grain represents 20% of the daily caloric intake, so it is essential to guarantee the production of this food against environmental problems such as salinity. Since the decade of the 20's has been used the induction of mutations to generate new varieties, in rice the methodology most used is gamma radiation. Molecular techniques and *in vitro* culture have been used to reduce the time in the selection and characterization of mutants with characteristics of interest. In the present work, rice mutants were regenerated from embryogenic calli irradiated at 40 Gy and selected with 150 mM NaCl. We managed to obtain 7 sister plants of line I of which 5 showed tolerance and 2 plants sensitivity to salinity. The genetic changes were determined by AFLP, as well as changes in methylation patterns by MSAP, relative expression of the CYSB, SAMDC, SAMS and HKT2 genes and total protein concentration and chlorophyll *a* and *b* content in the M3 mutants of line I. The most evident differential characteristics were observed in the change of the expression levels of the CYSB, SAMDC, SAMS and HKT2 genes, as well as a higher concentration of chlorophyll in the tolerant plants, compared to the controls, as well as a higher concentration of total proteins in tolerant plants, compared to control plants in salinity.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Cebadores utilizados en la amplificación selectiva del análisis de AFLP, de los mutantes de arroz M3 de la línea I y plantas arroz control sometidos a estrés salino con NaCl.	21
Cuadro 2. Cebadores utilizados en la amplificación selectiva del análisis de patrones de metilación de mutantes M3 de arroz y plantas de arroz control bajo estrés salino en etapa de pre y postfloración.	22
Cuadro 3. Cebadores para genes relacionados con la respuesta a estrés salino y tres “housekeeping gene”, utilizados en el estudio de los cambios de expresión génica en plantas mutantes de arroz sometidas a estrés salino.....	26
Cuadro 4. Brotes obtenidos in vitro de plantas regeneradas de callos embriogénicos de arroz irradiados a 40 Gy.	40
Cuadro 5. Cantidad de semilla obtenida por línea mutante obtenidas de plantas regeneradas de callos embriogénicos de arroz subespecie indica var. CR5272 irradiados a 40 Gy sin NaCl.....	41
Cuadro 6. Producción, promedio del tamaño y peso de 10 semillas de plantas de arroz mutantes M3 de la línea I y controles bajo condiciones de estrés salino.	47
Cuadro 7. Número de bandas observadas y bandas polimórficas por combinación de cebadores, para el análisis de AFLP de 7 mutantes M3 y 4 controles de arroz var CR5272.	50

Lista Figuras

- Figura 1. Sistema de hidroponía utilizado para la evaluación de los mutantes M3 I de arroz bajo condiciones de estrés salino simulado con NaCl.....17
- Figura 2. Plataformas utilizadas para la evaluación de mutantes de arroz M3 en condiciones de estrés salino con NaCl en un sistema hidropónico. A) germinación, B) plataforma 1, C) plataforma 2.18
- Figura 3. Apariencia de callos embriogénicos de arroz indica var. CR5272, 30 días después de ser irradiados con distintas dosis de radiación gamma de una fuente de Co60. El número 1 indica la apariencia normal de un callo embriogénico y el número 2 la apariencia de un callo oxidado.28
- Figura 4. Efecto de la dosis de radiación gamma en la de sobrevivencia y regeneración promedio de callos irradiados con radiación gamma (Co60). La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p>0,05$) según la prueba de Tukey.....29
- Figura 5. Apariencia macro y microscópica de callos embriogénicos control de arroz var CR5272 sin irradiar: A) oxidado, B) crema y C) verde. Con el número 1 se identifican las células embriogénicas, con 2 las células no embriogénicas y con 3 las zonas de células muertas. Dentro del círculo se identifican las células con núcleos sin límites definidos. ...30
- Figura 6. Cortes transversales de 5 μ m de espesor de callos embriogénicos de arroz irradiados a distintas dosis de radiación gamma: A) oxidado, B) crema y C) verde. Con el número 1 se identifican las células embriogénicas, con 2 las células no embriogénicas y con 3 las zonas de células muertas.32
- Figura 7. Apariencia del tejido evaluado en medio de inducción y proliferación de callos embriogénicos en condiciones de salinidad con NaCl. El asterisco señala una zona oxidada en los callos embriogénicos.32
- Figura 8. Porcentaje promedio de respuesta al proceso de callogénesis de semillas en medio MSP suplementado con distintas concentraciones de NaCl. La misma letra indica

que no hay diferencia estadística significativa ($p>0,05$) según el análisis de varianza de Tukey.	33
Figura 9. Promedio del peso fresco y seco del tejido formado luego de 4 semanas de cultivo un medio MSP con distintas concentraciones de NaCl. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p>0,05$) según el análisis de varianza de Tukey.	34
Figura 10. Apariencia de los callos embriogénicos de arroz var. CR5272 luego de 15 días en medio de regeneración con NaCl (0-300 mM). Las flechas señalan los brotes desarrollados.	35
Figura 11. Regeneración de plántulas en distintas concentraciones de NaCl en el segundo subcultivo.	35
Figura 12. Comparación del efecto promedio en la formación de callo y en la oxidación de la sal de mesa y el NaCl grado reactivo en distintas concentraciones. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p>0,05$), según el análisis de varianza de Tukey.	36
Figura 13. Supervivencia de plantas de arroz de 5 y 15 días de edad a dos meses de cultivo in vitro bajo estrés salino simulado con distintas concentraciones de NaCl. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p>0,05$), según el análisis de varianza de Tukey.	37
Figura 14. Desarrollo de las plantas en distintas concentraciones de NaCl, luego de 30 días de cultivo.	38
Figura 15. Comparación del promedio de brotes, altura (cm), longitud de raíces (cm) y número de hojas desarrollados in vitro para plantas de arroz subespecie indica var. CR5272 de 5 y 15 días, en distintas dosis de NaCl. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p>0,05$), según el análisis de varianza de Tukey.	39
Figura 16. Apariencia de callos embriogénicos de arroz subespecie indica var. CR5272 irradiados a 40 Gy después de 15 días de cultivo in vitro con 150 mM de sal de mesa. Las flechas indican el tejido regenerante seleccionado en condiciones de salinidad.	40

Figura 17. Plantas mutantes de arroz de 30 días de edad provenientes de callos irradiados a 40 Gy y seleccionados en 150 mM de NaCl.....	41
Figura 18. Apariencia de mutantes M3, bajo estrés salino con 150 mM de sal, plantas control de arroz bajo estrés salino y controles absolutos de arroz, respectivamente, luego de 21 días de germinación en sistema de hidroponía. A) Mutantes M3, B) Control sal y C) Control absoluto.....	42
Figura 19. A) Planta de arroz control marchita por estrés salino; B) planta de arroz control sobreviviente a estrés salino con marchitamiento parcial y C) flores abortadas por estrés salino con 150 mM de sal de plantas control.....	43
Figura 20. Crecimiento foliar y radical en cm de plantas mutantes M3 provenientes de la línea I evaluadas en cultivo hidropónico bajo estrés salino (150 mM de sal), así como plantas control no mutantes con y sin estrés salino.....	44
Figura 21. Número de hojas y brotes desarrollados en plantas mutantes M3 provenientes de la línea I, luego de un mes de cultivo hidropónico bajo estrés salino (150 mM de sal), así como plantas control no mutantes con y sin estrés salino.....	44
Figura 22. Desarrollo radicular de plantas control A) sin salinidad y B) con salinidad, así como de los C) mutantes M3 tolerantes a la salinidad (I-1 al I-5) y D) mutantes M3 sensibles a la salinidad (I-6 y I-7) bajo estrés salino por NaCl, luego de 3 meses de cultivo hidropónico.....	45
Figura 23. A) Acumulación de sales observada como una capa blanca en el tallo de los mutantes M3 de arroz sobrevivientes al estrés salino y B) apariencia promedio de los mutantes M3 sobrevivientes a 90 días de cultivo hidropónico salino.....	46
Figura 24. ADN extraído de mutantes y controles. 1) Hoja pool mutantes tolerantes sin salinidad, 2) Raíz pool mutantes tolerantes sin salinidad, 3) Hoja pool mutantes sensibles sin salinidad, 4) Raíz pool mutantes sensibles sin salinidad, 5) Hoja pool control sin salinidad, 6) Raíz pool control sin salinidad, 7) Hoja pool control con salinidad, 8) Raíz pool control con salinidad, 9) Hoja pool mutantes tolerantes con salinidad, 10) Raíz pool mutantes tolerantes con salinidad, 11) Hoja pool mutantes sensibles con salinidad, 12) Raíz	

pool mutantes sal 2, 13) Hoja pool control sin salinidad, 14) Raíz pool control sin salinidad, 15) Hoja pool control con salinidad, 16) Raíz pool control con salinidad y M) Marcador 1kb Thermo Fisher Scientific.47

Figura 25. ARN extraído de mutantes y controles. 1) Hoja pool mutantes tolerantes prefloración, 2) Raíz pool mutantes tolerantes prefloración, 3) Hoja pool mutantes sensibles prefloración, 4) Raíz pool mutantes sensibles prefloración, 5) Hoja pool control absoluto prefloración, 6) Raíz pool control absoluto prefloración, 7) Hoja pool control sal prefloración, 8) Raíz pool control sal prefloración, 9) Hoja pool mutantes tolerantes postfloración, 10) Raíz pool mutantes tolerantes postfloración, 11) Hoja pool mutantes sensibles postfloración, 12) Raíz pool mutantes sensibles postfloración, 13) Hoja pool control absoluto postfloración, 14) Raíz pool control absoluto postfloración, 15) Hoja pool control sal 2 postfloración, 16) Raíz pool control sal postfloración y M) Marcador 1kb Thermo Fisher Scientific.48

Figura 26. Segmento del electroferograma de los productos de PCR de la combinación AGG*CAA (azul), ACA*CAA (amarillo) ACC*CAA (verde) de plantas A) control no mutante, B) mutantes tolerantes a la salinidad y C) mutantes sensibles a salinidad por NaCl. La flecha indica las diferentes señales observadas.49

Figura 27. Dendograma generado del análisis de las 763 bandas de AFLP de los mutantes M3 y plantas de arroz var. CR5272, utilizando el índice de Jaccard, donde se observan 4 grupos genéticos.....51

Figura 28. Diferencias en el patrón de electroferograma observado en la amplificación de los fragmentos de MSAP obtenidos de la amplificación selectiva con los cebadores AGG*CAC (azul), ACA*CAC (amarillo) ACC*CAC (verde) de plantas control sometidas a estrés salino. A) ADN de tejido foliar digerido por MspI, B) ADN de tejido radical digerido con MspI, C) ADN de tejido foliar digerido con HpaII y D) ADN de tejido radical digerido con HpaII.....52

Figura 29. Cambios en los patrones de metilación observados por análisis de MSAP en tejidos foliares de plantas mutantes M3 de 2 meses de edad sometidas a estrés salino por NaCl y plantas no mutantes control de 2 meses de edad con estrés salino por NaCl y sin él.53

Figura 30. Cambios en los patrones de metilación observados por análisis de MSAP en tejidos radicales de plantas mutantes M3 y plantas control no mutantes de arroz con estrés salino por NaCl y sin él.	54
Figura 31. Curva de disociación para los genes A) EFa, B) ACT y C) TUB, observada en la amplificación de ADNc de plantas de arroz no mutantes con y sin estrés salino por NaCl.	55
Figura 32. Curva de disociación para los genes A) CYSB, B) SAMDC, C) SAMS y D) HKT2, obtenida del qPCR del ADNc de muestras foliares y radicales de plantas de arroz mutantes M3 I y controles no mutantes sometidos a estrés salino por NaCl y sin él.	56
Figura 33. Expresión relativa del gen CYSB, en plantas mutantes M3 I bajo estrés salino y plantas control no mutantes con y sin salinidad a los 60 días (prefloración) y a los 75 días (postfloración).	57
Figura 34. Expresión relativa del gen SAMDC, en plantas mutantes M3 I bajo estrés salino y plantas control no mutantes con y sin salinidad antes y después de la floración a los 60 días (prefloración) y a los 75 días (postfloración).	58
Figura 35. Expresión relativa del gen SAMS, en plantas mutantes M3 I bajo estrés salino y plantas control no mutantes con y sin salinidad antes y después de la floración a los 60 días (prefloración) y a los 75 días (postfloración).	59
Figura 36. Expresión relativa del gen HKT2, en plantas mutantes M3 I bajo estrés salino y plantas control no mutantes con y sin salinidad antes y después de la floración a los 60 días (prefloración) y a los 75 días (postfloración).	60
Figura 37. Concentración de clorofila a, b y ab en muestras foliares de arroz bajo condiciones de estrés salino por NaCl de plantas mutantes de arroz M3 I y plantas control no mutantes con y sin estrés salino.	61

Lista abreviaciones

AFLP: Amplificación de polimorfismos de longitud variable.

MSAP: Amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Co⁶⁰: Isotopo cobalto 60

Gy: Gray

MS: Murashige & Skoog

NaCl: Cloruro de sodio

FAA: Formaldehído-ácido acético glacial-alcohol etílico

AFLP: Amplificación de polimorfismos de longitud de fragmentos

MSAP: Amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación

qRT-PCR: Retrotranscripción con PCR cuantitativo

DDG: días después de la germinación

Introducción

El arroz junto con el trigo, la carne y el pescado conforman la base de la alimentación humana, lo cual es un reflejo de la domesticación de este cultivo desde tiempos antiguos. Se cree que su domesticación data de los 10 000 a.C. en áreas húmedas de Asia tropical y subtropical desde donde se extendió a Europa y África hace unos 3000 a.C. La domesticación produjo las dos especies de arroz de las que derivan las variedades que se cultivan comercialmente en la actualidad; la especie africana *Oryza glaberrima* y la asiática, *Oryza sativa*, cuyo proceso de selección dio origen a tres subespecies: indica, japónica y javánica (Franquet-Bernis & Borràs-Pàmies, 2004).

El cultivo de arroz se estableció en Costa Rica justo después de la colonia en las zonas montañosas de topografía irregular ubicadas principalmente en el valle central, en el siglo XIX, siendo las zonas de mayor relevancia Atenas, Turrúbares, Cebadilla, Ciruelas, Puriscal y Santa Ana (Tinoco-Mora & Acuña-Chinchilla, 2009). La colonización de nuevas zonas, efecto de la expansión de la población, facilitó que el arroz fuera introducido a zonas más bajas como Guanacaste, donde ha tenido su mayor expansión por las condiciones favorables para el desarrollo de este cultivo. Cabe destacar que esta región concentró el 54 % de la producción nacional en el 2016. Actualmente, el consumo *per capita* es de 48,45 Kg/año en el período 2017-2018, que representa en Costa Rica, aproximadamente, un 20 % del suministro calórico (CONARROZ, 2018).

No obstante, la producción de arroz se enfrenta a varias circunstancias adversas, de las cuales la de mayor impacto es el estrés ocasionado por los altos niveles de salinidad en el suelo (INTA, 2009). El 6% de los suelos a nivel mundial, de los cuales corresponden a un 2 % de los suelos de cultivo en secano y cerca del 20 % de los suelos irrigados son afectados por esta condición (Mishra, Mishra, Takabe, Rai, & Singh, 2016).

Los suelos bajos y planos que son periódicamente inundados de forma natural, las zonas costeras, así como los suelos agrícolas con sistemas de irrigación y un uso excesivo de fertilizantes, corren el riesgo de llegar a concentrar altos niveles de sales solubles. Estas altas concentraciones disminuyen la fertilidad de los suelos agrícolas, ocasionando dificultades e incluso pueden imposibilitar la producción (Villalobos, 2009). En Costa Rica

las zonas afectadas por altos niveles de salinidad se encuentran predominantemente en la zona de Guanacaste, debido a las bajas precipitaciones, altas temperaturas y condiciones deficientes de drenaje (Montes de Oca, Mata, & Chaves, 1996).

El mejoramiento de cultivos es uno de los mecanismos más utilizados para solventar diversos problemas, al generar variedades resistentes a condiciones adversas capaces de lograr niveles de productividad aceptables para lograr suplir la demanda de alimentos, que para el 2030 se estima, deberá aumentar un tercio de la actual sin aumentar el área de siembra a nivel mundial (Tinoco-Mora & Acuña-Chinchilla, 2009; Villalobos, 2009). Para lograr identificar estas variantes resistentes en un tiempo reducido, es necesario conocer a fondo los mecanismos de resistencia y en la medida de lo posible la genética involucrada. La expresión diferencial de genes bajo condiciones de estrés es un método, relativamente rápido, para identificar los individuos resistentes a un factor de estrés (De Souza et al., 2014).

Desde 1927 la inducción de mutaciones ha sido utilizada para generar variabilidad heredable de forma rápida y a bajo costo en comparación a la transgénesis. Al combinar esta técnica con la de cultivo de tejidos las posibilidades de mejoramiento se incrementan en gran medida. En la actualidad muchas variedades comerciales de diversos cultivos han sido obtenidas de esta manera y el arroz no es la excepción (Pabón-Calderón, 2011). Las mutaciones afectan caracteres poligenéticos, como la tolerancia a la salinidad, que se manifiestan en forma casi imperceptible, además algunos autores sostienen que es posible generar variabilidad génica que no existe o no está al alcance del fitomejorador, además de generar un bajo desequilibrio génico, una vez estandarizadas las dosis y condiciones de mutación (Lamz-Piedra, Reyes-Guerrero, & Cepero-González, 2013).

Las mutaciones por agentes físicos son inducidas por partículas cargadas generadas dentro de los mutágenos físicos. Este tipo de radiación es generada por radioisótopos como el cesio 137 (^{137}Cs) Cobalto 60 (^{60}Co), la mayoría de los equipos de irradiación utilizan el ^{60}Co por tener un precio menor al ^{137}Cs , a pesar de tener una vida media menor (Pardo, 2015). El ^{60}Co es un metal obtenido al exponer ^{59}Co a un flujo de neutrones, los átomos de ^{59}Co que adsorben un neutrón se transforman en ^{60}Co , una forma radiactiva que al

descomponerse en ^{60}Ni , genera una partícula β o electrón y dos rayos gamma (CAEBIS, 2015).

En una célula viva, los rayos gamma pueden afectar de manera directa al actuar sobre las moléculas que componen la hebra de ADN o indirecta al actuar sobre otras moléculas, como el agua, que a su vez afectan el ADN. La intensidad es medida en Gray (Gy) que representa a 1 J/Kg (Menéndez, 2008). Múltiples estudios sugieren que los efectos de la radiación gamma dependen de la especie, el tejido, la edad y la dosis, por lo que se plantea que se debe de dilucidar mediante ensayos la dosis de trabajo ideal para el material sometido al programa de mejora (Martirena-Ramírez et al., 2015).

El mejoramiento genético de variedades de arroz mediante mutagénesis inducida por agentes físicos ya ha dado buenos resultados para obtener variedades resistentes a la salinidad. Un caso concreto es la obtención de la variedad resistente a la salinidad generada por González y colaboradores del Instituto Nacional de Ciencias Agrarias de Cuba, al irradiar semillas con una dosis de 200 Gy y seleccionando los mutantes resistentes al germinar y evaluar el material irradiado en suelo salino (González, Pérez, & Cristo, 2009).

En nuestro país, el mejoramiento del arroz se vio marcado por las políticas que impulsaron programas de mejoramiento con el fin de lograr variedades con mayor resistencia a plagas y enfermedades, sumado al creciente interés de mantener la seguridad alimentaria del país frente a una posible catástrofe. Este ha sido un proceso constante donde se liberan variedades en busca de una heterogeneidad que logre suplir las necesidades de la industria y los consumidores, además de asegurar al menos un porcentaje de la producción en caso del ataque de una plaga (Guzmán-Bermúdez, 2006).

En este sentido, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales permite inducir la formación de callos embriogénicos a partir de tejidos somáticos y la regeneración de estas células embriogénicas a plantas (García-Arias, 2011). Al irradiar callos embriogénicos cada célula es sometida a un proceso mutagénico de forma individual, por lo que cada planta regenerada es considerada como un evento distinto, así de cada callo se podrían obtener, teóricamente, miles de plantas mutantes distintas entre sí. Por otro lado, la constante división de las células del callo embriogénico antes de su regeneración permiten, en cierta medida, la fijación de los cambios genéticos inducidos, permitiendo realizar una selección

de material a nivel *in vitro*, aun así es necesario la evaluación de la segunda o tercera generación obtenida a partir del material irradiado para asegurar que la estabilidad génica del material (Shu, Forster, & Nakagawa, 2011; Gallego, 2014).

Es por esta razón que los cambios genéticos generados en los tejidos irradiados son un factor que, combinado con el cultivo *in vitro* en medios selectivos, es utilizado para seleccionar y caracterizar aquellos mutantes con características de interés, mediante la caracterización de polimorfismos, cambios epigenéticos y de expresión.

Los estudios en variedades de arroz resistentes a la salinidad han dilucidado varios mecanismos metabólicos de respuesta a la salinidad para sobreponerse al estrés, entre los que se pueden mencionar están, el desarrollo vegetativo, el ajuste osmótico, el mantenimiento de los parámetros fotosintéticos y de homeostasis iónica. Estos involucran mecanismos de reconocimiento y transmisión de señales que modifican la expresión génica (Nounjan et al., 2018).

Cabe destacar que la variabilidad generada por la radiación puede ser medida mediante la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés). Esta técnica genera marcadores moleculares bialélicos dominantes que permiten la detección simultánea de la variación de múltiples loci, en regiones genómicas desconocidas. Con la información generada al utilizar esa herramienta se puede calcular las diferencias génicas entre poblaciones e identificar mutantes (Pilling & Rischkowsky, 2010). Debido a que los cambios epigenéticos inducidos por la mutagénesis pueden afectar los patrones de metilación en el ADN, la expresión de genes y su efecto en el fenotipo, la identificación de las zonas ricas metilcitocina (mC) mediante la técnica conocida como amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación o MSAP, por sus siglas en inglés, permite una caracterización de individuos mutantes (Sanchez-Serrano & Salinas, 2014).

Por otra parte, la combinación de la técnica de retrotranscripción y PCR en tiempo real (qRT-PCR), se ha utilizado para identificar cambios en los niveles de expresión de genes seleccionados al cuantificar la cantidad de ARN mensajero (ARNm) derivada de los mismos (Nolan, Hands, & Bustin, 2006; Sigma-Aldrich, 2018). En el caso específico del arroz, se han reportado que genes como los que codifican para las enzimas Cistationina beta-sintasa y la Serina hidroximetil transferasa, sus niveles de expresión varían en según la sensibilidad

de las plantas al estrés salino, lo que permite diferenciar las plantas resistentes de las tolerantes (Reyes, Mazorra, & Núñez, 2008; Mishra et al., 2016).

Revisión de literatura

Generalidades del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)

El arroz es una planta perteneciente a la familia Poacea que presenta una fenología anual y un crecimiento que va desde 1 hasta 1,8 m de altura, Sus semillas son monocotiledonares y con dimensiones entre 5 a 12 mm de largo y 3,2 mm de ancho, que se desarrolla en una inflorescencia tipo espiga (Campos-Gorgona, 2013).

El ciclo fenológico del arroz se puede dividir en 3 etapas: crecimiento vegetativo, reproductivo y maduración. La etapa de crecimiento vegetativo comprende desde la germinación, hasta el macollamiento, se da durante los primeros 60 días después de la germinación (DDG). La etapa reproductiva se extiende desde la iniciación de los primordios de la espiga hasta la floración, entre los 60 y 75 DDG. La última etapa, la maduración, se ubica desde la formación de la espiga hasta su madurez de los 75 a los 90 DDG. Los días transcurridos para cada etapa pueden variar dependiendo de la variedad en cuestión y de las condiciones agroecológicas presentes durante el cultivo (Campos-Gorgona, 2013).

El aseguramiento de la producción mundial de arroz es de vital importancia para la seguridad alimentaria, ya que es el principal sustento en países en vías de desarrollo. Actualmente con el rápido aumento de la población y el cambio climático, la producción de este cereal enfrenta múltiples desafíos para lograr la producción necesaria en cantidad y calidad, por ello se ha vuelto imperativo los programas de mejoramiento genético para la generación de variedades que logren superar estos desafíos (Chaudhary, Nanda, & Tran, 2003).

Mejoramiento genético en el cultivo de arroz: inducción de mutaciones

Existen 22 especies del género *Oryza* representando un recurso genético muy importante que se ve reflejado en las más de 108 000 accesiones que posee el instituto internacional de investigación del arroz (IRRI), además de otras importantes colecciones en centros como

CGIAR, WARDA, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) e IITA. De las 22 especies reportadas únicamente *Oryza sativa* y *Oryza glaberrima* son cultivadas de manera comercial las cuales poseen la capacidad de hibridación con pocas variedades silvestres, limitando el aprovechamiento del recurso génico de los bancos de germoplasma, mediante sistemas de mejoramiento convencional e hibridación (Carena, 2009). Por esta limitante se han empleado mecanismos artificiales para aumentar la variabilidad genética disponible en estas dos especies comerciales, siendo la inducción de mutaciones la más utilizada.

El descubrimiento de la metodología para la inducción de mutaciones de manera artificial fue descrita por primera vez en los años 30, siendo una variedad de tabaco obtenida por mutagénesis la primera variedad mutante reportada en 1934 (Yusuff et al., 2015). Actualmente se conocen más de 3000 variedades comerciales registradas obtenidas por esta metodología (Fenoll & Candelas, 2010), siendo el cultivo de arroz uno con la mayor cantidad de mutantes registrados (822) (IAEA, 2018).

Los programas de mejoramiento de arroz por inducción de mutaciones han empleado varios agentes mutagénicos que pueden ser agrupados en agentes químicos y físicos. Los agentes químicos son moléculas con la capacidad de interactuar con las moléculas de ADN y modificar las bases nitrogenadas desencadenando en mutaciones puntuales y por su alta tasa mutagénica se ha utilizado para el estudio de funcionalidad génica. Se ha reportado trabajos con el etilmetano sulfonato (EMS), N-Metil-N-nitrosourea (MNU), azida de sodio (NaN_3), N-nitroso-N-etil urea (NEU), N-Etil-Nitrosourea (ENH), protoporfirina de manganeso IX (MNH), dimetil sulfito (DMS), etilenimina (EI), dietilsulfato (DES) y pingyangmicina (PYM). Por su parte los agentes físicos son haces de energía con capacidad de modificar las moléculas de ADN ya sea mediante ionización o sin mediar esta. Entre en los agentes físicos más utilizados en arroz son las radiaciones ionizantes como las generadas por rayos X, iones acelerados, haces de neutrones y protones, así como los rayos gamma. Estos últimos son los más utilizados para en proceso de mutagénesis en arroz (Suarez, 2006; NBRP-Rice, 2018). Mediante mutagénesis por rayos gamma se han registrado más de 100000 variedades desde 1980 (Wang & Jia, 2014).

La radiosensibilidad del material vegetal, utilizado para la inducción de mutaciones dependerá del porcentaje de humedad, el estadio de desarrollo y el grosor del tejido

utilizado. Además, existe un período entre la radiación y la aparición de la mutación que puede variar según la dosis y el material utilizado (Bayo, 2001).

Los programas de mejoramiento están enfocados en la producción de variedades capaces de tolerar condiciones agroambientales adversas como las altas temperaturas, poca humedad y altas concentraciones de salinidad. La inducción de mutaciones toma como base los mecanismos fisiológicos de respuesta a estrés presentes en la planta donde gracias los cambios en la secuencia de los genes por las mutaciones, se puede modificar la respuesta de estos mecanismos y mediante procesos de selección identificar a los individuos con la mejor respuesta fisiológica hacia el estrés (Cubero, 2013).

Efecto exceso de NaCl en las plantas de arroz

El exceso de sales causa la reducción en el desarrollo de las plantas que son generados por una inducción de estrés hídrico, toxicidad iónica específica por el exceso de sodio y cloro, reducción en la captación de K^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , entre otros nutrientes que ocasionan un desbalance nutricional, además del incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), causantes de daño oxidativo en las macromoléculas (Lamz-Piedra et al., 2013).

El estrés hídrico se produce cuando la tasa de respiración excede la captación de agua, que puede deberse al exceso de sales en el suelo que reducen el potencial hídrico a valores menores a los -20 bares que, para plantas mesófitas como el arroz, pueden ser perjudiciales o hasta mortales. El potencial osmótico de las células radicales al ser inferior al del suelo imposibilita la captación de moléculas de agua. El déficit de moléculas de agua en la célula ocasiona desordenes metabólicos que involucran la forma y turgencia de la célula, como el crecimiento, endo y exocitosis, así como procesos que involucran la capacidad del agua como solvente universal tales como, señalización molecular, comunicación hormonal, entre otros (Moreno, 2009).

La toxicidad iónica se da por la acumulación de sales principalmente de NaCl, que es la sal más común en el suelo, en la célula. La incapacidad de la célula de compartimentar el exceso de iones Na^+ y Cl^- en la vacuola desencadena la inhibición de la funcionalidad de la membrana, inhibición de la fotosíntesis y alteraciones en las enzimas involucradas en el

transporte selectivo. Generalmente se asume que mucho de los efectos de la toxicidad iónica del Na^+ se debe a la competencia de este con el K^+ en el sitio de activación de varias enzimas. Por otro lado el exceso de iones entorpece la captaciones de nutrientes como K^+ , NO_3^- , PO_4^- , Ca^{2+} y Mn^{2+} por el desequilibrio hídrico y la afectación de canales de aniones y cationes en la rizosfera (Reyes et al., 2008; Lamz-Piedra et al., 2013).

El estrés salino provoca un aumento en la concentración de especies reactivas del oxígeno (ROS) por los efectos de la toxicidad iónica, estrés osmótico y deficiencias nutricionales. ROS como el H_2O_2 , O_2^- y $\cdot\text{OH}$, ocasionan reacciones fitotóxicas como la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y mutaciones del ADN (Peralta-Pérez & Volke-Sepúlveda, 2012; Lamz-Piedra et al., 2013).

Aspectos fisiológicos de la tolerancia del arroz al estrés salino

La tolerancia a la salinidad es la capacidad de las plantas para completar su ciclo fenológico y producir semillas viables bajo un estrés salino. A esta definición se le agrega la capacidad de la planta de sobrevivir y generar rendimientos económicos aceptables que sean comparables a los obtenidos en condiciones sin estrés salino. Los mecanismos fisiológicos descritos para la tolerancia al exceso de sales son el ajuste osmótico, exclusión de iones a nivel radicular, retención de iones en vacuolas y la pérdida de sales a través de la caída de hojas y frutos (Reyes et al., 2008).

Las plantas que crecen en condiciones salinas pueden reducir el potencial osmótico interno, para contrarrestar el externo, manteniendo las funciones metabólicas normales y evitar la deshidratación. Esto se logra gracias a la acumulación de solutos orgánicos como la betaína, prolina y sacarosa, además se ha reportado la acumulación de iones inorgánicos para estabilizar la estructura cuaternaria de las proteínas y fungir como aceptores de radicales libres. La acumulación de prolina estabiliza las membranas y sus componentes incluyendo el complejo II de la cadena de transporte de electrones. Además de fungir como aceptor final de los radicales libres, también induce la expresión de genes de respuesta a estrés salino ya que estos poseen elementos de respuesta a prolina en sus promotores (Reyes et al., 2008).

Además, la exclusión de iones a nivel radical y retención en vacuolas de las raíces y demás órganos es la estrategia más utilizada en plantas glicófitas (como el arroz) para tolerar la salinidad. Esta se da gracias a la actividad del antitransportador Na^+/H^+ SOS1 que es la única proteína caracterizada hasta el momento, involucrada en el eflujo de Na^+ de la membrana plasmática de las células vegetales. Se ha demostrado que plantas de *Arabidopsis* mutantes para este gen son más sensibles a la salinidad. Por otro lado, se ha verificado que esta respuesta es muy costosa metabólicamente ya que es necesario generar un gradiente de protones para la actividad antitransporte Na^+/H^+ (Reyes et al., 2008; Lamz-Piedra et al., 2013).

La desintoxicación de especies reactivas de oxígeno es otro mecanismo estudiado en la tolerancia a la salinidad. Se ha reportado que plantas de arroz tolerantes al exceso de sales presentan una sobreexpresión del sistema antioxidante involucrados en la síntesis de ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, catalasas, así como enzimas involucradas en la síntesis de carotenoides (Lamz-Piedra et al., 2013).

Basado en la información recolectada la presente investigación pretende inducir mutagénesis en callos embriogénicos de arroz CR5272 con radiaciones gamma y preseleccionarlos *in vitro* bajo condiciones de estrés salino por NaCl. Para luego, caracterizar de manera molecular por AFLP, MSAP y qRT-PCR los cambios en la expresión génica de genes relacionados a la resistencia a esta condición, así como determinar la concentración de proteínas totales en una población M3.

Objetivo general

Analizar a nivel molecular y bioquímico mutantes M3 de arroz (*Oryza sativa indica* L. var CR5272), generados por radiación gamma de una fuente de cobalto 60, seleccionados bajo condiciones de estrés salino inducido con NaCl.

Objetivos específicos

Generar variabilidad genética en callos embriogénicos de arroz, var. CR5272 por medio de la irradiación gamma con una fuente de cobalto 60 (Co60).

Evaluar mediante la técnica de AFLP y MSAP la variabilidad genética de mutantes M3 de arroz (*Oryza sativa indica* L. var CR5272) seleccionado bajo estrés salino con NaCl.

Comparar la expresión de algunos genes relacionados con la respuesta al estrés salino en plantas mutantes M3 de arroz (*Oryza sativa indica* L. var CR5272) bajo condiciones de estrés salino con NaCl mediante qRT-PCR.

Determinar la concentración de clorofila *a* y *b* en hojas de plantas mutantes M3 de arroz (*Oryza sativa indica* L var CR5272) bajo estrés salino con NaCl.

Cuantificar los niveles de proteínas totales en tejido foliar de plantas mutantes M3 de arroz (*Oryza sativa indica* L var CR5272) bajo estrés salino con NaCl.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético del Arroz del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular y en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica. Se contó con la colaboración del Laboratorio de Irradiación Gamma del Instituto Tecnológico de Costa Rica en el marco del proyecto de investigación FEES-CONARE 801-B6-655 titulado “Generación de variabilidad genética en arroz: una alternativa para enfrentar el cambio climático y favorecer la seguridad alimentaria en Costa Rica”. Así mismo se contó con la colaboración de Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas, CENIBiot.

El material experimental utilizado fue semilla certificada de arroz (*Oryza sativa indica* L.) de la variedad CR5272 facilitadas por el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia Agropecuaria (INTA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica.

Obtención de callos embriogénicos a partir de semillas de arroz var. CR5272.

Los medios de cultivo utilizados para la inducción de callos embriogénicos tanto para la selección de dosis de trabajo como para obtención de mutantes fue el descrito por Bai et al. (2014), que consistió en un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 2,5

mg/L de 2,4-D, 30 g/L sacarosa, 0,3 g/L de caseína hidrolizada, 0,5 g/L de prolina y el pH se ajustó a 5,8.

Las semillas de arroz var. CR5272 se pelaron y se colocaron en un frasco de vidrio estéril con tapa, se les añadieron 25 mL de hipoclorito de sodio al 3,5% i.a y 5 gotas de Tween® 20 y se agitó por 20 min. Transcurrido este tiempo se eliminó el hipoclorito de sodio y se enjugaron las semillas con agua destilada estéril dos veces para eliminar el cloro. Este procedimiento se realizó una vez más, para luego colocar las semillas desinfectadas en una placa con papel toalla estéril, para eliminar el exceso de humedad (García-Arias, 2011).

Las semillas desinfectadas se colocaron en placas Petri con 20 mL de medio de inducción de callos embriogénicos en oscuridad por dos semanas a 25°C, tiempo necesario para la aparición de callos con apariencia embriogénica (color crema claro, textura suave y granulosa).

Regeneración de embriones a plántulas de arroz

Los callos embriogénicos obtenidos en el paso anterior se subcultivaron a placas Petri con 20 mL medio de regeneración constituido por un medio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con 30 g/L de maltosa, 0,3 g/L de BAP, 0,5 g/L de ANA y 0,1 g/L de caseína hidrolizada con pH 8 (Bai et al., 2014). Se subcultivaron únicamente los callos con apariencia embriogénica eliminando el tejido oxidado. Se incubaron por un mes a 25°C con un régimen lumínico de 16 h luz. Transcurrido este mes los callos que se tornaron de color verde se subcultivaron a una placa Petri con medio fresco de regeneración por otro mes en las mismas condiciones que el paso anterior, para la obtención de plántulas.

Las plántulas regeneradas se separaron del resto del tejido callogénico y se subcultivaron a un frasco de 500 mL con 50 mL de medio fresco de regeneración por un mes a 25°C con régimen lumínico de 16 h luz, para culminar el desarrollo de estas plántulas. Una vez que las plantas desarrollaran raíces, al cabo de dos meses, se procedió a su aclimatación, aquellas plantas que aún no tenían un buen desarrollo radical se subcultivaron a medio de regeneración fresco por un mes más en las mismas condiciones (García-Arias, 2011).

Selección dosis de trabajo para la generación de mutantes de arroz var CR5272 y selección bajo condiciones de estrés salino con NaCl

Selección dosis de radiación para la generación de mutantes de arroz var CR5272

Se irradiaron callos embriogénicos de 15 días de edad en el Gamacel del Laboratorio de Irradiación Gamma del Instituto Tecnológico de Costa Rica, diseñado y construido por la compañía IZOTOP (Institute of Isotopes Co. Ltd.), de Hungría. Se utilizaron dosis de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 Gray (Gy).

Se irradiaron un total de 120 callos por dosis, agrupados en placas Petri con 20 mL de medio de inducción de embriogénesis con 20 callos embriogénicos cada una. Se colocaron 10 placas en la cámara del Gamacel por ronda de irradiación. Los controles constaron de 120 callos que se llevaron hasta las instalaciones del Gamacel, pero no se irradiaron. Se realizaron 3 repeticiones de cada dosis.

Los callos irradiados y no irradiados se colocaron en oscuridad por 3 días a 25°C y luego se subcultivaron a placas Petri con medio de regeneración fresco. Se evaluó la sobrevivencia de callos y la regeneración de embriones somáticos después de un mes de ser subcultivados al medio fresco. Además, se realizaron cortes histológicos de callos embriogénicos irradiados al mes de ser subcultivados, para determinar el efecto a nivel celular de la radicación gamma en estos.

Se analizó la normalidad de los datos obtenidos de la sobrevivencia y el porcentaje de regeneración de los callos irradiados con ayuda del programa estadístico InfoStat®, mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se utilizó el análisis de varianza que se ajustó a la normalidad de los datos.

Análisis histológicos de callos embriogénicos de arroz irradiados a distintas dosis de radiación gamma

Se tomaron 5 callos embriogénicos de arroz luego de 15 día de ser irradiados a dosis de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 Gy y se fijaron químicamente por inmersión de los callos embriogénicos de arroz luego de 15 días de ser irradiados a, tomando, en la medida de lo posible, callos

oxidados, con coloración verde (regenerantes) y con coloración crema o blanca (embriogénicos). La fijación se realizó sumergiendo los callos en un buffer FAA (10% de formaldehído al 37% v/v, 5% de ácido acético glacial y 85% alcohol etílico al 70% v/v), por un período de 24 h a 25°C (Sandoval, 2005). Transcurrido este tiempo se procedió a procesar el material para realizar los cortes histológicos.

Las muestras se deshidrataron sumergiéndolas por 5 min en una secuencia creciente de soluciones de alcohol etílico (60%, 70%, 80% y 90% v/v). Luego los callos embriogénicos irradiados y no embriogénicos se sumergieron en alcohol etílico al 95% v/v por 10 min, seguido por dos cambios en alcohol etílico anhidro por 10 min. Luego el material se colocó en una solución de xileno:alcohol anhidro en proporción 1:1 por 10 min, seguido de dos cambios en xileno puro, sumergiendo el tejido 10 min entre cada cambio.

Una vez el material se deshidrato se procedió a realizar la infiltración en parafina Paraplast Plus de la casa comercial Leica®. Los tejidos se colocaron en una solución 1:1 de xileno:parafina por 40 min a 60°C y luego se realizaron dos cambios en parafina pura por una hora a 60°C. Finalizado este proceso los tejidos se incluyeron en un bloque de parafina para proceder con los cortes en micrométricos de 5 µm con ayuda de un micrótopo de rotación HistoStat 820 Reichehr®. Los cortes se almacenaron en una estufa a 60°C hasta que se procedió a realizar la tinción (R. García, 1993; Prophet, Mills, Arrington, & Sobin, 1995; Sandoval, 2005). Previo a la tinción, se eliminó la parafina de los cortes con dos cambios de xileno puro por 10 min y se procedió a realizar una rehidratación con un gradiente decreciente de alcohol etílico. Para ello, se usaron las mismas concentraciones de alcohol y tiempos utilizados en la deshidratación.

Se utilizó una tinción general de Azul de Toluidina al 0,2% m/v en solución acuosa saturada con ácido bórico. Las muestras se sumergieron por 20 min en la solución de tinción y se eliminó el exceso de colorante con ayuda de agua corriente por 2 min (Lillie, 1977); Prophet et al., 1995; Sandoval, 2005).

Posteriormente, las muestras teñidas se deshidrataron nuevamente utilizando gradiente de alcohol ascendente como en las deshidrataciones anteriores y se aclararon con dos cambios de xileno y se montaron de forma permanente en medio soluble de xileno (Etellán®). Las muestras se secaron a temperatura ambiente por 3 h (Sandoval, 2005).

Los cortes histológicos procesados se llevaron al Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica, donde se observaron en un microscopio invertido OLYMPOS IX51 y las imágenes de las micrografías se tomaron con una cámara OLYMPOS DP17.

Selección dosis de trabajo NaCl para simular el estrés salino en plantas de arroz subespecie indica var CR5272

Se determinó la tolerancia *in vitro* de los callos embriogénicos, así como de plántulas de arroz var CR5272 de 5 y 15 días de edad, a distintas concentraciones de NaCl grado reactivo de la casa comercial SIGMA® (0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM). Se evaluó la capacidad de formación de callo embriogénico y regeneración de plántulas, así como la sobrevivencia de los callos y las plántulas en estas condiciones, luego de 30 días de cultivo.

Se comparó el efecto de la sal de mesa en las variables evaluadas para NaCl grado reactivo (SIGMA®). La sal de mesa (marca SABEMAS®) utilizada contenía además de NaCl, flúor en una concentración de 175-225 mg/Kg y Yodo a 30-60 mg/Kg.

La formación de callos embriogénicos se evaluó cuantificando la cantidad de callos formados, así como el peso fresco y seco de una submuestra. Para determinar el peso seco se colocaron 12 callos embriogénicos en un sobre de aluminio y se secaron a 80°C por 24 h en una estufa Dalvo® modelo TDE/70. Se evaluaron un total de 120 callos por dosis para la formación de callos y 10 paquetes de 12 callos para la determinación del peso fresco y seco. El experimento se repitió en 3 ocasiones, para un total de 360 callos y 30 paquetes por dosis de NaCl.

Además, se evaluó la sobrevivencia y el crecimiento de las hojas y las raíces de plantas de arroz luego de un mes de cultivo de *in vitro* plantas cultivadas en medio MS a la mitad de las sales con distintas dosis de NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300mM). Estas evaluaciones se realizaron en *in vitro* plantas de 5 y 15 días de edad. Se analizó un total de 40 *in vitro* plantas por tratamiento, considerando cada planta como una unidad experimental.

Se analizó la normalidad de los datos obtenidos formación de callo, el peso fresco y seco, así como los promedios de los datos obtenidos para las evaluaciones de las *in vitro* plantas

con la ayuda del programa estadístico InfoStat®, mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se utilizó el análisis de varianza que se ajustó a la normalidad de estos.

Selección bajo condiciones *in vitro* de los mutantes de arroz

Los mutantes se obtuvieron al irradiar 300 callos embriogénicos de arroz de 15 días de edad con la dosis de radiación seleccionada y subcultivarlos a medio de cultivo de regeneración suplementado con la dosis de NaCl elegida en la sección anterior. Los callos se cultivaron en un fotoperíodo de 16 h luz a 25°C. Luego de dos, semanas los tejidos sobrevivientes se separaron y se subcultivaron a un medio de regeneración y posterior aclimatación en el invernadero, manteniendo las condiciones de salinidad en el medio de cultivo.

Aclimatación de supuestos mutantes de arroz M1V1 para la obtención de semillas M3

La aclimatación se llevó a cabo únicamente en plantas con un sistema radical visiblemente desarrollado, para asegurar su sobrevivencia al proceso. Las plantas se sacaron del medio de cultivo, se eliminaron los restos del medio de cultivo y se sembraron en bandejas de 190 cc con una dimensión de 50 cm x 30 cm con sustrato estéril compuesto de suelo y fibra de coco en una proporción de 1:1, las cuales se colocaron en una cámara de humedad con una película de agua de 1 cm de altura y en la parte superior se colocó un papel plástico con agujeros de 50 mm separados equidistantemente en toda la superficie del papel plástico y se fueron agrandando 50 mm cada semana durante un mes, manteniendo la altura de la película de agua en 1 cm.

Transcurrido el mes en la cámara húmeda, las plantas mutantes M1 se trasplantaron a macetas de 15 cm de diámetro y 12,3 cm de altura con el mismo sustrato que el utilizado para las bandejas para que completaran su ciclo de desarrollo. Luego de 30 días de siembra se aplicó 50 mg de fertilizante NPK 12:24:12 (Abopac®) para solventar los requerimientos nutricionales de las plantas de arroz mutantes M1. Como control se sembraron 100 semillas certificadas de arroz var CR5272.

Al cabo de dos meses de cultivo se obtuvieron las semillas M2 y se sembró en macetas de 15 cm de diámetro y 12,3 cm de altura con el mismo sustrato utilizado en las etapas anteriores, dos terceras partes de las semillas obtenidas, el resto se almacenaron bolsas de papel y se almacenaron un lugar fresco y seco. Se sembraron 5 semillas por maceta, colocadas de manera equidistante. A los 30 días de siembra se aplicaron 50 mg de fertilizante NPK 12:24:12 y la semilla M3 se obtuvo a los 3 meses de cultivo.

Se realizó una caracterización morfométrica de los descriptores mínimos de las plantas mutantes siguiendo la guía del IBPGR-IRRI (1980). Esto se realizó para las plantas M1 y M2. Para las plantas M3, no fue posible obtener los datos para todas las variables, ya que se tomaron muestras foliares y radicales para los análisis moleculares y bioquímicos en fechas previas a las establecidas en la guía del IBPGR-IRRI.

Selección *ex vitro* y caracterización morfológica de mutantes M3 de arroz obtenidos de callos embriogénicos de arroz subespecie indica var. CR5272

Dos terceras partes de las semillas M3 de los mutantes regenerados de la etapa anterior, se colocaron en un sistema de hidroponía para su germinación y posterior selección, así como caracterización morfológica y bioquímica. Para ello se siguió el protocolo descrito en el manual de protocolos para la selección pre campo de mutantes de arroz y trigo tolerantes a sal (Bado et al., 2016). La dosis de NaCl para la selección de los mutantes M3 tolerantes a NaCl fue la seleccionada previamente como dosis de trabajo y se agregó en la solución hidropónica Yoshida (Anexo 1). El ensayo se diseñó con dos tipos de control, uno bajo estrés salino y otro sin este, en ambos casos se utilizaron semillas de arroz subespecie indica var. CR5272. El sistema de hidroponía se encontraba en un invernadero con un rango de temperatura promedio entre 20 y 39,7°C y un porcentaje de humedad ambiental entre 21 y 77%.

El sistema hidropónico constó de cajas plásticas tipo Mérida cerrada con dimensiones de 71,5 x 41,5 cm con 25,5 cm de altura, conectadas con un sistema de llenado y desagüe construido con tubos PVC de ½". Las plataformas de germinación y de sostén de las plantas constó de láminas de estereofón de 2" de ancho y se utilizaron tiras de 10 x 2 x 2 cm de espuma para ajustar las plantas en los agujeros de las plataformas de cultivo.



Figura 1. Sistema de hidroponía utilizado para la evaluación de los mutantes M3 I de arroz bajo condiciones de estrés salino simulado con NaCl.

La base de germinación se construyó recortando cuadrados de 3 cm con una base de sarán de 70% (Figura 2). La tercera parte de las semillas de M3 de cada mutante se colocó en una cama de germinación, colocando menos de 200 semillas por recuadro. Para los controles se utilizaron 100 semillas tanto para el control con salinidad como el control sin esta. Las cajas se llenaron con 20 L de solución hidropónica y las plataformas de germinación se colocaron justo por encima de la superficie del líquido, sin dejar que las semillas se cubrieran por completo para evitar el crecimiento de algas.



Figura 2. Plataformas utilizadas para la evaluación de mutantes de arroz M3 en condiciones de estrés salino con NaCl en un sistema hidropónico. A) germinación, B) plataforma 1, C) plataforma 2.

Luego de 21 días se contabilizó el porcentaje de germinación y se procedió al trasplante de las plantas a la plataforma de cultivo 1. Esta constó de una lámina de estereofón de 2" de ancho con 24 agujeros de 2 cm de diámetro distribuidos por toda la plataforma de manera equidistante (Figura 2), las cajas se llenaron con 30 L de solución hidropónica. Se trasplantaron 50 plantas de arroz indica var. CR5272 de cada control (con y sin salinidad), así como 30 plantas de la línea mutante I, 21 de la línea II, 12 de la línea III, 45 de la línea IV y 17 de la línea V.

Se dejaron en estas plataformas por 60 días, donde al finalizar este tiempo se evaluó la sobrevivencia de las plantas de cada línea mutante, así como los controles con y sin salinidad. También se midió el crecimiento vegetativo, el crecimiento radical y el desarrollo de brotes, así como la apariencia de los mutantes sobrevivientes, estos datos se compararon con los recopilados de las plantas control con y sin salinidad.

Las únicas 7 plantas sobrevivientes al estrés salino de la línea mutante I, así como 20 plantas de ambos controles se trasplantaron a la plataforma de cultivo 2, similar a la de cultivo 1, con la diferencia que el diámetro de los agujeros se aumentó a 4 cm y el número se redujo a 18 (Figura 2). En estas condiciones se mantuvieron por 30 días para que se llevara a cabo la floración y producción de semilla. Culminado los 30 días se contabilizaron las semillas producidas y se comparó con el promedio de 20 plantas control con y sin salinidad.

Caracterización molecular

El ADN genómico del tejido foliar y radical de los supuestos mutantes seleccionados bajo estrés salino, así como de los controles absolutos, se extrajo por el método CTAB modificado por Araya (Araya, Murillo, Aguilar, & Rocha, 2005). Se tomaron 100 mg de tejido vegetal, se macero con ayuda de nitrógeno líquido y se colocaron en 750 μ L de buffer de extracción (100 mM de Tris HCl pH 8, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA pH 8, 2% m/v de CTAB, 2% m/v de PVP, diluidos en agua) en un tubo de 2 mL.

Las muestras se incubaron por 20 min a 65°C en agitación constante. Luego de este tiempo se dejó a enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 750 µL de cloroformo:octanol en proporción 24:1. Se homogenizó por inversión durante 1 min y se centrifugó a 130000 rpm. Concluido la centrifugación se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL y se añadió un volumen de isopropanol, mezclando por inversión. Esta mezcla se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, terminado este tiempo se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70% frío y se dejó reposar en frío por 2 min para luego centrifugar a 13000 rpm por 5 min. Se eliminó el etanol y se dejó secar en pellet por 30 min a 45°C. El pellet de ADN se resuspendió en agua libre de nucleasas y se agregó 1 µL de ARNasa 10U/ µL de la casa comercial Thermo Fisher Scientific®.

Se determinó la concentración y la calidad del ADN en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®) y se seleccionaron las muestras como una relación 260/280 cercana a 1,8, así mismo la integridad se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% m/v a 90V por 45 minutos.

Se extrajeron los ARN totales de muestras foliares y radicales de los mutantes M3 de arroz y de plantas de arroz control. CR5272 con y sin estrés salino. Se tomaron muestras en dos estadios de desarrollo que fueron prefloración (60 días después de la germinación) y postfloración (90 días después de la geminación) mediante el método de Trizol®.

Se determinó la calidad y concentración del ARN en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®), donde se seleccionaron únicamente las muestras con una relación 260/280 cercana a 2. Para determinar la integridad del ARN se preparó un gel desnaturalizante. Para ello, se pesaron 1,2 g de agarosa y se disolvieron en 98 mL de buffer FA 1X (FA 10X: 200 mM de ácido 3-[N-morfolino]propanesulfónico (MOPS), 50 mM acetato de sodio, 10mM de EDTA, pH 7) y se le añadieron 2 mL de formaldehído al 37%. Se tomaron 3 µL de ARN y se mezclaron con 3 µL buffer de carga de ARN 2X (Thermo Scientific®). Cada muestra se cargó en el gel de agarosa desnaturalizante y se corrió la electroforesis a 90 V por 45 min.

Para los análisis de MSAP y qRT-PCR se realizaron mezclas por separado de los ADN y ARN extraídos de las plantas de arroz controles con y sin estrés salino, así como de 7 mutantes M3 sobrevivientes al proceso de selección hidropónico con NaCl. Las mezclas

fuero de no más de 5 individuos, tomando en cuenta el aspecto fenotípico, mezclando los que presentaran un aspecto similar.

Análisis de AFLP de mutantes M3 de arroz de la línea I

Se utilizó el protocolo descrito por Vos y colaboradores para el análisis de AFLP (Vos et al., 1995)., con reactivos Thermo Scientific®. El ADN extraído de 4 plantas control de arroz y de 7 mutantes de arroz M3 de la línea I, sobrevivientes a 8 semanas de cultivo hidropónico bajo estrés salino, se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y Msel. Para lo cual se preparó una reacción de restricción compuesta por buffer Tango 2X, 10U de EcoRI, 1U de Msel y 1800 ng de ADN. Esta reacción se incubó a 37°C por 3 h seguido de una inactivación enzimática a 80°C por 20 min.

Una vez digerido el ADN se procedió a ligar los adaptadores para EcoRI (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5') y Msel (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'/3'-TACTCAGGACTCAT-5') para lo cual se tomaron 10µL de ADN digerido y se mezcló con una reacción de ligación compuesta por 50 mM de NaCl, 0,05 mg/µL de BSA, buffer de ligasa T4 1X, 1U de ligasa T4, 2 µmol de adaptador Msel y 0,2 µmol de adaptador EcoRI para un volumen final de 25 µL. La ligación se llevó a cabo a 37°C por 3 h, luego a 18°C por 2 h y finalmente a 15°C por 2 h. La reacción de ligación se diluyó a una quinta parte para utilizarla en la amplificación preselectiva.

La amplificación preselectiva se llevó a cabo al mezclar 4 µL de la reacción de ligación diluida 1:5 con buffer Taq polimerasa 1X, 1,5 µM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTPs, 0,025 mg/µL de BSA, 0,2 µM de cebador complementario a los adaptadores EcoRI y Msel (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 5'-TACTCAGGACTCAT-3'), así como 0,1 U de Taq polimerasa, para un volumen final de 25 µL. La reacción de PCR se llevó bajo las siguientes condiciones, 20 ciclos de 72°C por 2 min, 94°C por 30 s, 56°C por 1 min, seguido 72°C por 2 min y 60°C por 15 min.

La amplificación selectiva se realizó con una dilución 1:10 de los productos de las reacciones de amplificación preselectiva, mezcladas con buffer Taq polimerasa 1X, 1,5 µM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTPs, 0,025 mg/µL de BSA, 0,2 µM de cebadores (Cuadro 1), así como 0,1 U de Taq polimerasa, para un volumen final de 25 µL. Cada cebador de EcoRI se

combinó con cada uno de los cebadores para MseI de manera separada, para un total de 12 combinaciones distintas.

Cuadro 1. Cebadores utilizados en la amplificación selectiva del análisis de AFLP, de los mutantes de arroz M3 de la línea I y plantas arroz control sometidos a estrés salino con NaCl.

EcoRI* (5'-3)'	MseI (5'-3)'
CTCGTAGACTGCGTACCACA (6-FAM)	TACTCAGGACTCATCAA
CTCGTAGACTGCGTACCACC (NED)	TACTCAGGACTCATCAT
CTCGTAGACTGCGTACCAGG (VIC)	TACTCAGGACTCATCAG
	TACTCAGGACTCATCAC

* Los cebadores están marcados con fluoróforos indicados entre paréntesis.

La reacción selectiva de PCR se corrió bajo el siguiente programa de termociclado, 94°C por 2 min, seguido de 13 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 30 s y 72°C por 2 min, luego 24 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 2 min, finalizando con 60°C por 30 min.

Para el análisis de los productos de la amplificación selectiva en el secuenciador Genetic Analyzer 3130xl de Applied Biosystems del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas, CENIBIOT, se mezclaron los productos de PCR de cada combinación de cebadores (Cuadro 1), de las mismas muestras de ADN. Luego se tomaron 1,5 µL de esta mezcla y se combinó con 0,4 µL de marcador Liz 600 y 8,5 µL de formamida desionizada.

Los datos obtenidos se codificaron en una matriz de 0 y 1. Donde 1 representa la presencia y 0 ausencia de la señal en el patrón del electroferograma. El análisis estadístico y la construcción del dendograma se realizó con el programa DARwin® versión 6.0.14 y como parámetro de estimación se utilizó el índice de Jaccard (1908) y un bootstrap de 30000.

Análisis de los patrones de metilación por MSAP de los mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino

Se analizó el patrón de metilación de 7 plantas mutantes, luego de 60 días en cultivo hidropónico bajo estrés salino y se comparó con el patrón de 4 plantas no mutantes sin estrés salino (control absoluto) y bajo estrés salino (control sal). Se utilizó el protocolo descrito por Lu y colaboradores (Lu et al., 2006). Los reactivos utilizados en este análisis fueron marca Thermo Scientific®.

La restricción y ligación de adaptadores se llevó a cabo mezclando 500ng de ADN con buffer Tango 2X, buffer T4 ligasa 1X, 50 mM de NaCl, 0.05 mg/μL, 5 U de Ligasa T4, 5 U de EcoRI, 5 U de MspI/HpaII, 0,25 mM de adaptador de EcoRI (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3') y 2,5 mM de adaptador de MspI/HpaII (5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'/5'-CGAGCAGGACTCATGA-3'). La mezcla se incubó a 37°C por 2,5 h, seguido de una inactivación enzimática a 80°C por 20 min.

La amplificación preselectiva se preparó mezclando 4 μL de la reacción de ligación diluida 1:5 con buffer Taq polimerasa 1X, 1,5 μM de MgCl₂, 0,2 μM de dNTPs, 0,025 mg/μL de BSA, 0,2 μM de cebador complementario a los adaptadores EcoRI y MspI/HpaII (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' y 5'-CGAGCAGGACTCATGA-3'), así como 0,1U de Taq polimerasa, para un volumen final de 25 μL. La reacción de PCR se dio bajo las siguientes condiciones, 25 ciclos de 72°C por 2 min, 94°C por 30 s, 56°C por 1,5 min, seguido 72°C por 1,5 min y 60°C por 15 min.

La amplificación selectiva se realizó con una dilución 1:10 de los productos de las reacciones de amplificación preselectiva, mezcladas con buffer Taq polimerasa 1X, 1,5 μM de MgCl₂, 0,2 μM de dNTPs, 0,025 mg/μL, 0,2 μM de cada cebador (Cuadro 2), así como 0,1 U de Taq polimerasa, para un volumen final de 25 μL. Cada cebador de EcoRI se combinó con cada uno de los cebadores para MspI/HpaII de manera separada, para un total de 12 combinaciones distintas.

Cuadro 2. Cebadores utilizados en la amplificación selectiva del análisis de patrones de metilación de mutantes M3 de arroz y plantas de arroz control bajo estrés salino en etapa de pre y postfloración.

EcoRI*	MspI/HpaII
CTCGTAGACTGCGTACCACA (6-FAM)	CGAGCAGGACTCATGACAC
CTCGTAGACTGCGTACCACC (NED)	CGAGCAGGACTCATGATTA
CTCGTAGACTGCGTACCAGG (VIC)	CGAGCAGGACTCATGACAG
	CGAGCAGGACTCATGATCG

* Los cebadores están marcados con fluoróforos, indicados entre paréntesis.

La reacción de PCR selectivo se corrió bajo el siguiente programa de termociclado, 94°C por 2 min, seguido de 13 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 30 s y 72°C por 2 min, luego 24 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 2 min, finalizando con 60°C por 30 min. Los productos de PCR se analizaron en el secuenciador Genetic Analyzer 3130xl de Applied Biosystems en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas, CENIBIOT.

Para el análisis de los productos de la amplificación selectiva en el secuenciador, como cebador paso se mezclaron todos productos de PCR, de cada combinación de cebadores, de las mismas muestras de ADN. Luego se tomaron 1,5 µL de esta mezcla y se combinó con 0,4 µL de marcador Liz 600 y 8,5 µL de formamida desionizada.

Los datos obtenidos se codificarán en una matriz de 0 y 1, donde 1 representa la presencia y 0 ausencia de la señal en el patrón del electroferograma. El análisis del patrón de metilación se realizó siguiendo los criterios descritos por Zheng et al., 2013 y Fulneček & Kovařík, 2014, donde las bandas obtenidas se clasificaron en grupos según su aparición en cada digestión. Las bandas que aparecieron tanto en la digestión doble de MspI/HpaII, así como en las digestiones por separado, se identificaron como tipo I. Las de tipo II fueron las que únicamente aparecieron en la digestión con MspI, por su parte las de tipo III fueron las que aparecieron únicamente en la digestión con la enzima HpaII. Por último, las bandas que únicamente aparecieron en la doble digestión se catalogaron como tipo IV.

Para calcular el porcentaje de metilación se utilizó la siguiente fórmula: $\{(I \times 2 + III + IV) / [(I + II + III + IV)] \times 2\} \times 100$. El porcentaje de metilación completa se calculó con la fórmula $[(III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100$ y el porcentaje de hemimetilación con la fórmula: $[III / (I + II + III + IV)] \times 100$.

Análisis de los cambios de expresión de genes relacionados con la tolerancia a salinidad de mutantes M3 de arroz mediante qRT-PCR

Se tomaron los extractos de ARN de plantas de 60 y 75 DDG cultivo hidropónico (pre y postfloración), de los cuales fueron 7 mutantes bajo estrés salino y 4 controles absolutos, así como 4 controles bajo salinidad. Se mezclaron los extractos de ARN de mutantes con tolerancia aparente, así como los susceptibles y los controles absoluto y control sal por separado. Se realizó una retrotranscripción con PCR en un solo paso, utilizando el kit AccessQuick™ RT-PCR System de Promega®. La reacción de retrotranscripción y PCR se llevó a cabo a 45°C por 45 min, seguido de 95°C por 15 min, luego 40 ciclos de 94°C por 15 s, 56°C por 30 s, 72°C por 30 s y finalmente 72°C por 3 min.

Los productos de la retrotranscripción se utilizaron para realizar un qPCR, utilizando cebadores de genes con relación reportada con la tolerancia a estrés salino (*CYSB*, *SAMDC*, *SAMS*, *HKT2*, Cuadro 3). Se realizaron pruebas para determinar la eficiencia y estabilidad de la expresión de los genes endógenos de referencia ("*housekeeping gene*", *ACT*, *Efa* y *TUB*, ver Cuadro 3) en plantas control con y sin estrés salino, esto se realizó para cada tejido (hoja y raíz). Una vez determinado esto el valor de C_T de cada gen se normalizó con el valor del gen de referencia elegido para obtener el valor de ΔC_T . Se utilizaron valores de $\Delta\Delta C_T$ relativa al control para el cálculo de la expresión génica relativa (Rodríguez *et al.*, 2013).

Para seleccionar el mejor gen de referencia, se analizó estadísticamente con el complemento de Excel NormFinder (Andersen, Jensen, & Ørntoft, 2004), la estabilidad de la expresión de ARNm de cada gen candidato. Para lo cual se prepararon cantidades de ARN estándar diluyendo ADNc (1/1, 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625, cada muestra de gen por triplicado). Sólo se utilizaron valores de ciclo de cuantificación (Cq) inferiores a 40 para calcular los coeficientes de correlación (Bennett, Hondred, & Register, 2015).

La cuantificación relativa se llevó a cabo utilizando los cebadores descrito en el Cuadro 3, utilizando el programa de termociclado estándar del equipo StepOne™ Real-Time PCR System, modificando únicamente la temperatura de alineación. El cual consistió en 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 56°C por 1 min y 30 s a 72°C, seguido de un

ciclo para determinar la curva de disociación a 95°C por 15 s, 60°C a 1 min y 95°C por 15 s.

Cuadro 3. Cebadores para genes relacionados con la respuesta a estrés salino y tres “housekeeping gene”, utilizados en el estudio de los cambios de expresión génica en plantas mutantes de arroz sometidas a estrés salino.

Nombre cebador	Accesión NCBI gen	Nombre del gen y función	Secuencia	Tamaño esperado	Referencia
Genes housekeeping					
ACT	AF237672	Actina. Síntesis de actina	F_GAAGATCACTGCCTTGCTCC R_CGATAACAGCTCCTCTTGCC	250pb	(Faye, 2011)
EFa	Os03g0178000	Factor de enlongación α	F_TTTCACCTTTGGAGTGAAGCAGAT R_GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA	103pb	(Niazi, Ramezani, & Dinari, 2014)
TUB	isotig08544	Tubulina. Síntesis de β Tubulina	F_TCAGGTGCATCAGGATGATT R_ACCCTCCAGCAAAGTATGA	100pb	(Borges, Tsai, & Caldas, 2012)
Genes relacionados con la respuesta a estrés salino					
CYSB	Os09g0115500	Cistationina beta-sintasa. Síntesis de cisteína a partir de homocisteína.	F_CGCACAACAACGGAGTCTAC R_GAGTCAAGTGCTAACAGATCATAAT	250pb	(Mishra et al., 2016)
SAMDC	Os02g0611200	S-adenosilmetionin descarboxilasa. Síntesis de poliaminas	F_CGGGTTTGAGGGATATGAGA R_GAGGCTCGATTACAGAAAGGA	235pb	(Mishra et al., 2016)
SAMS	Os01g0323600	S-adenosilmetionina sintetasa. Síntesis de S-adenosil-L-metionina.	F_TCATCTCCACCCAGCAGC R_AGGGGTTGAGGTGGAAGAT	128pb	(Pushpalatha & Harish Kumar, 2018)
HKT2 2	AB061313	Transportador Sodio/Potasio	F_GGGAGCATCTGCCAGGACAA R_TTCTTATTCTACGATTCAAAGGC	235pb	(Faye, 2011)

Caracterización bioquímica de mutantes M3 de arroz de la línea I sometidos a estrés salino por NaCl

Estimación del contenido de clorofila *a* y *b* en hojas de mutantes M3 I de arroz sometidos a estrés salino.

Para la estimación del contenido de clorofila se siguió la metodología descrita por Arnon, 1949. Se tomó un disco de 1 cm de diámetro de la hoja anterior a la hoja bandera de 7 plantas mutantes de arroz y de controles absolutos y controles sal, de 2 meses y medio de edad. Cada disco se homogenizó con 5 mL de etano 80% v/v. El macerado se trasvasó a un tubo de centrifuga de 15 mL, manteniendo las muestras en oscuridad durante todo el proceso.

Las muestras se agitaron a 130 rpm por 30 min y finalizado este tiempo se centrifugaron a 3500 rpm por 8 min. Se tomaron 2 mL del sobrenadante y se midió su absorbancia en un

espectrofotómetro marca Implem ® modelo P300 a 645 y 663 nm. El blanco utilizado fue etanol 80% v/v.

La concentración de clorofila *a* y *b* se calculó utilizando las siguientes fórmulas, que expresan la concentración en mg/ µL (Arnon, 1949).

$$[Chl\ a] = 12.70 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$[Chl\ b] = 22.90 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

$$[Chls\ a + b] = 20.21 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

Estimación del contenido de proteínas totales en hojas de mutantes de arroz M3 I sometidos a estrés salino por NaCl

Se tomaron muestras foliares de unos 5 cm, tanto de plantas los controles (plantas no mutantes) con y sin estrés salino como de los 5 mutantes M3 I sometidos a estrés salino sobrevivientes luego de 3 meses y se colocaron en un liofilizador por 4 días para eliminar completamente la humedad. El material liofilizado se mezcló de tal manera que únicamente se analizó en los laboratorios del CINA, UCR, tres muestras etiquetadas como control absoluto (5 plantas), control sal (5 plantas) y mutantes M3 tolerantes a la salinidad (5 plantas). Cada paquete contenía 100 g de tejido liofilizado. En este laboratorio se determinó el total de proteína cruda mediante el método de combustión AOAC-990.03 (Latimer, 2019).

Resultados

Selección dosis de trabajo para la generación de mutantes de arroz subespecie indica var CR5272 y selección bajo condiciones de estrés salino

Selección dosis de radiación para la generación de mutantes de arroz

Los resultados del ensayo para determinar la radiosensibilidad de los callos embriogénicos de arroz de 15 días mostraron que la sobrevivencia disminuyó conforme se aumentó la dosis de radiación, lo mismo sucedió con la capacidad regenerativa de los callos (Figura 3

y 4). Se observó un aumento en las áreas oxidadas en los tejidos irradiados a dosis mayores respecto al control sin irradiar, así mismo una incapacidad de regeneración en los tejidos sobrevivientes.

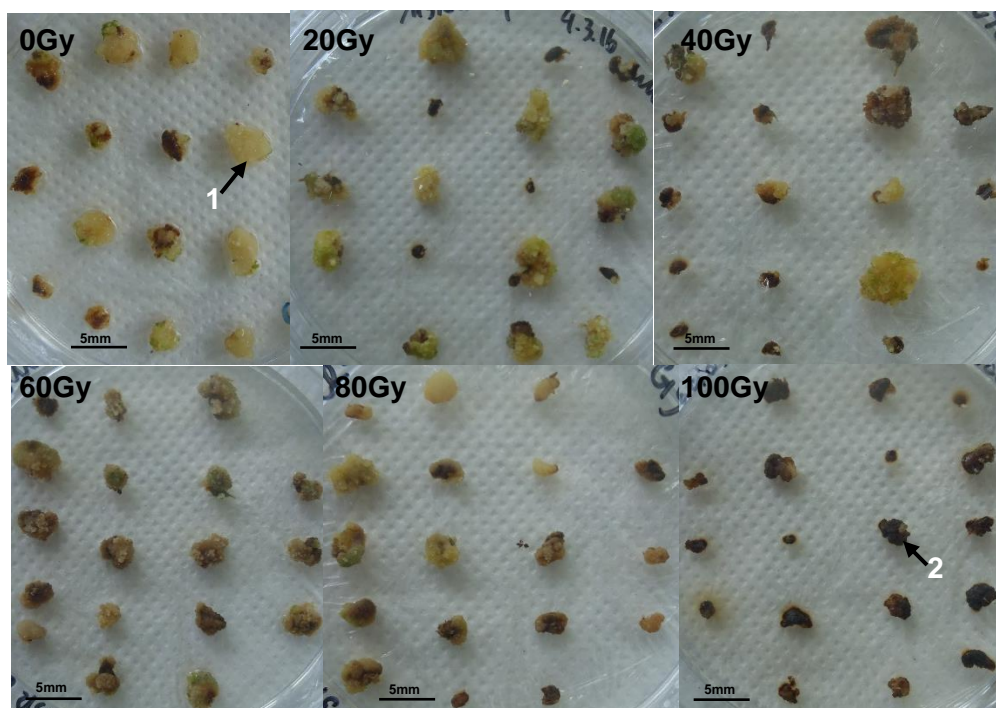


Figura 3. Fenotipo de callos embriogénicos de arroz indica var. CR5272, 30 días después de ser irradiados con distintas dosis de radiación gamma de una fuente de Co60. El número 1 indica la apariencia normal de un callo embriogénico y el número 2 la apariencia de un callo oxidado.

El análisis de la normalidad con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks para los datos obtenidos de la sobrevivencia y la capacidad regenerativa, reflejó un valor de $p < 0,05$ en ambos casos, por lo que se infiere con certeza estadística que los datos poseen una distribución normal por lo que se realizó un análisis de varianza de Tukey y una comparación a pares, que mostró un valor de $p < 0,05$, por lo que se infiere, con suficiente evidencia estadística que las diferencias observadas en la sobrevivencia y regeneración de callos embriogénicos es debido a la dosis de radiación utilizada (Figura 4). Se observó una disminución lineal en el porcentaje de callos sobrevivientes llegando a 52,6 % de sobrevivencia cuando se aplicó una dosis de 60 Gy. Por otro lado, la regeneración fue de

un 35 % de los callos en la misma dosis, mientras que en una dosis de 40 Gy se observó que una sobrevivencia del 67 % y un porcentaje de regeneración del 60 %.

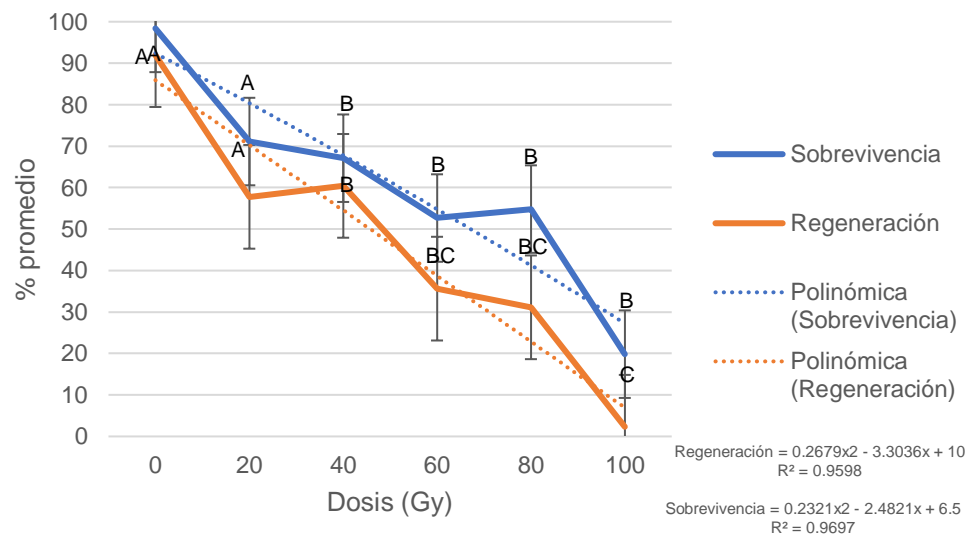


Figura 4. Efecto de la dosis de radiación gamma en la sobrevivencia y regeneración promedio de callos irradiados con radiación gamma (Co60). La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) según la prueba de Tukey.

Se tomó como dosis de trabajo, considerando la sobrevivencia y la capacidad regenerativa de los callos sobrevivientes, la dosis de 40 Gy. Esto al considerar el efecto en la letalidad y la cantidad de callos irradiados a esta dosis que pueden regenerar plantas.

Análisis histológicos de los callos embriogénicos de arroz irradiados a distintas dosis de radiación gamma

Al realizar cortes histológicos en los callos embriogénicos no irradiados se observó que la zona interna de los callos oxidados corresponde a estructuras vacías de las células muertas, donde no se aprecian núcleos, además de células nucleadas en la periferia, pero con una apariencia anormal típica de células en proceso necrótico, con estructuras nucleares sin límites definidos. También se analizaron callos color crema y verdes, y se observaron agrupaciones de células con características de células con un alto índice de

división típicas de tejido embriogénico ya que son densas y con núcleo bien definido, este tipo de tejido es mucho mayor en callos verdes que en callos color crema (Figura 5).

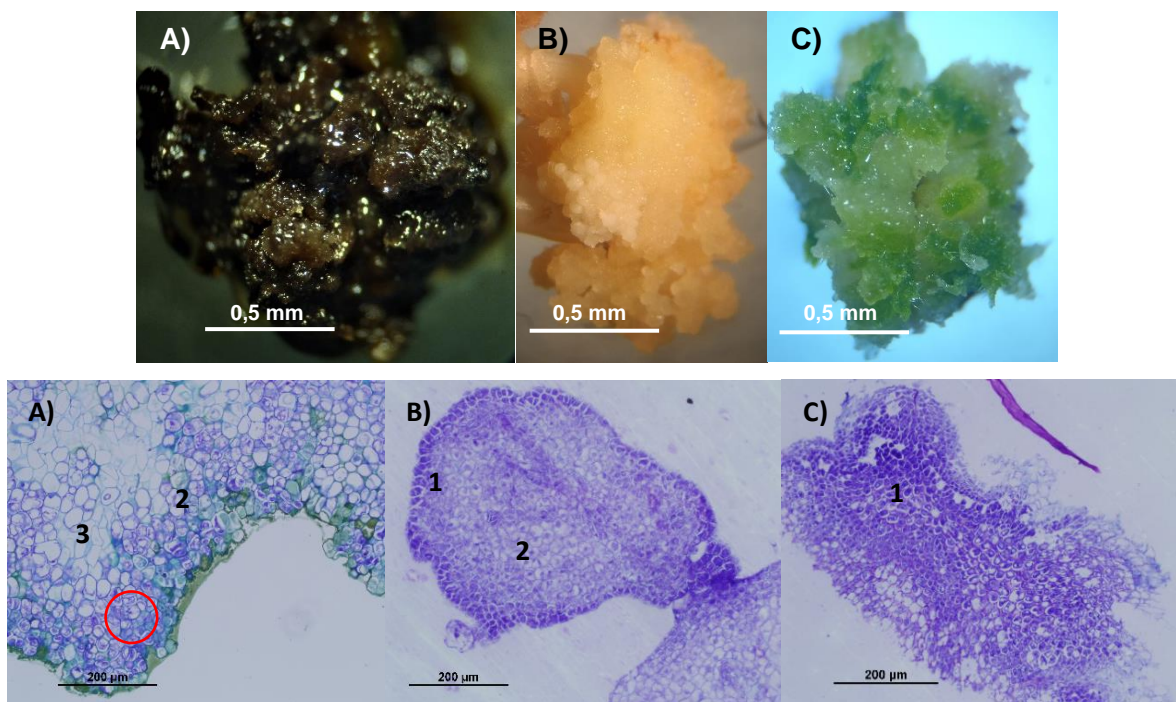


Figura 5. Apariencia macro y microscópica de callos embriogénicos control de arroz var CR5272 sin irradiar: A) oxidado, B) crema y C) verde. Con el número 1 se identifican las células embriogénicas, con 2 las células no embriogénicas y con 3 las zonas de células muertas. Dentro del círculo se identifican las células con núcleos sin límites definidos.

En las dosis de 60 Gy solo se lograron fijar callos embriogénicos oxidados, además en las dosis de 80 y 100 Gy sólo se fijaron callos embriogénicos oxidados y de color crema, ya que fueron los únicos obtenidos en estas dosis. Los callos embriogénicos después de 15 días de su irradiación a distintas dosis mostraron estructuras vacías correspondientes a células muertas, tanto en los callos oxidados como en los crema y verdes (Figura 6. Además, se observaron células embriogénicas que presentaban un citoplasma denso y un núcleo bien definido, así como una forma circular. También se observaron células alargadas con vacuolas grandes que se identificaron como células no embriogénicas (Figura 6, número 2). Las zonas con estructuras vacías aumentaron conforme aumento la dosis aplicada. Así mismo, la capa de células periféricas con características típicas de células

embriogénicas en la periferia se apreció más delgada con forme se aumentó la dosis de radiación.

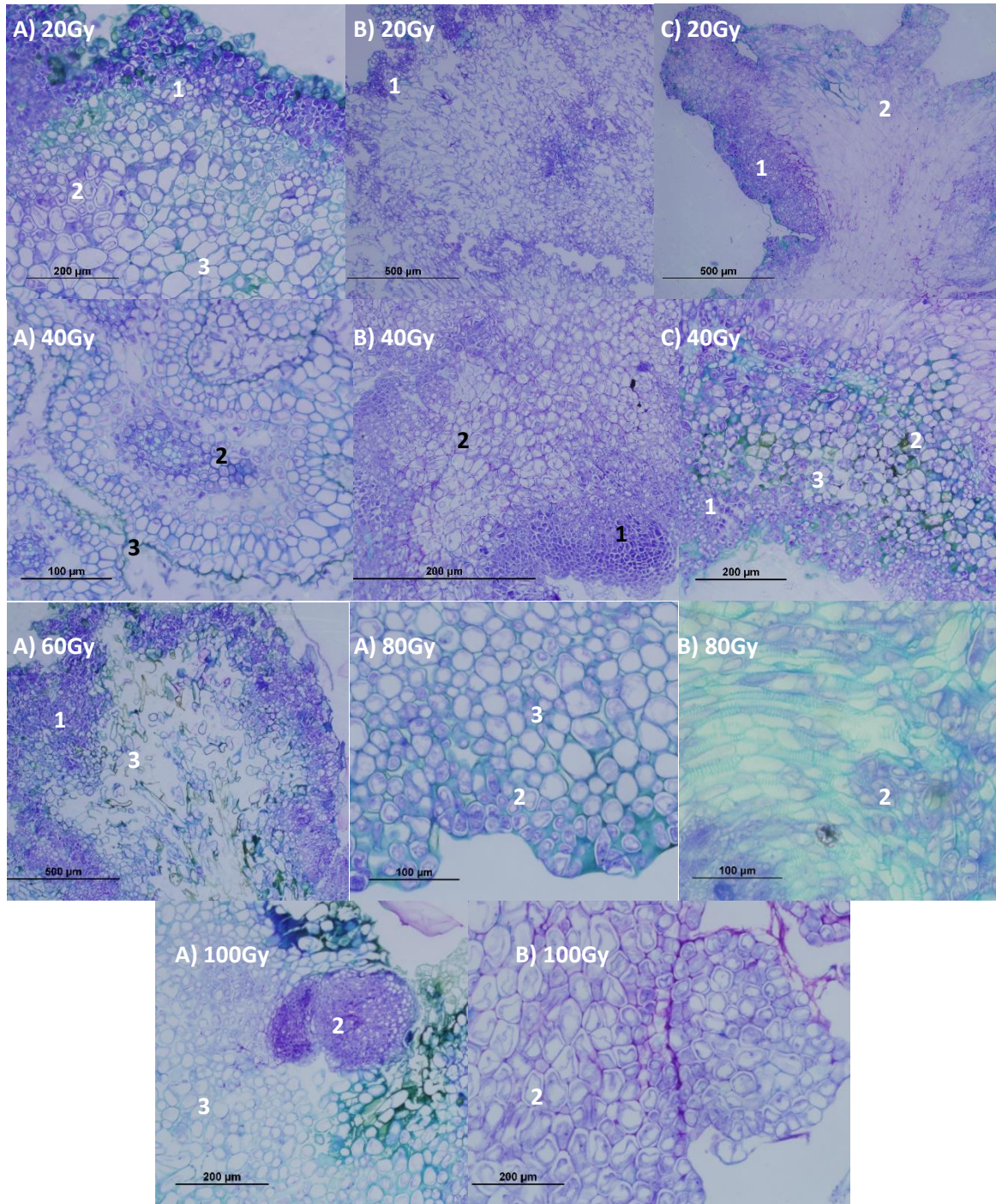


Figura 6. Cortes transversales de 5 μ m de espesor de callos embriogénicos de arroz irradiados a distintas dosis de radiación gamma: A) oxidado, B) crema y C) verde. Con el número 1 se identifican las células embriogénicas, con 2 las células no embriogénicas y con 3 las zonas de células muertas.

Selección dosis de trabajo NaCl para simular el estrés salino en plantas de arroz subespecie indica var CR5272

La oxidación apreciada entre los 0 y los 100mM de NaCl luego de un mes de cultivo fue poca y se concentró en zonas pequeñas, aumentado con la dosis de NaCl (Figura 7).

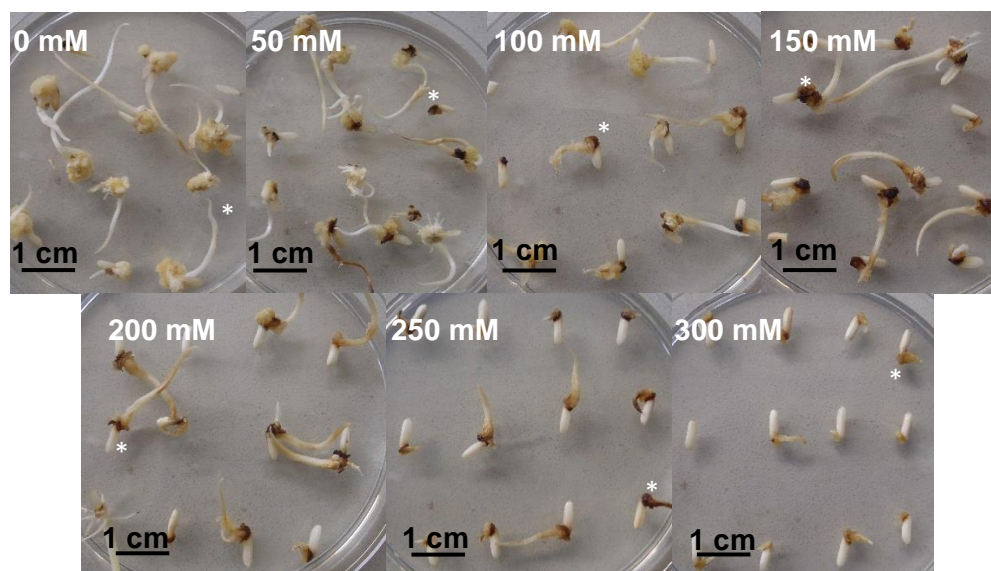


Figura 7. Apariencia del tejido evaluado en medio de inducción y proliferación de callos embriogénicos en condiciones de salinidad con distintas dosis de NaCl. El asterisco señala una zona oxidada en los callos embriogénicos.

Se determinó que el porcentaje de respuesta de las semillas al medio de inducción de calogénesis disminuye al aumentar la concentración de NaCl, siendo más notable luego de los 150 mM de NaCl, donde la calogénesis fue de 56%, cayendo hasta un 2% a 300 mM. La oxidación siguió un patrón donde a mayor concentración de NaCl, mayor oxidación (Figura 8).

La prueba de normalidad Shapiro-Wilks para los datos analizados de la formación de callo, reflejó un valor de $p > 0,05$, por lo que se infiere con certeza estadística que los datos presentan una distribución normal por lo que se realizó un análisis de varianza de Tukey y se obtuvo un valor de $p < 0,0001$, permitiendo afirmar con suficiente certeza estadística que las variaciones en las características evaluadas son causadas por las distintas concentraciones de NaCl utilizados en el medio de cultivo.

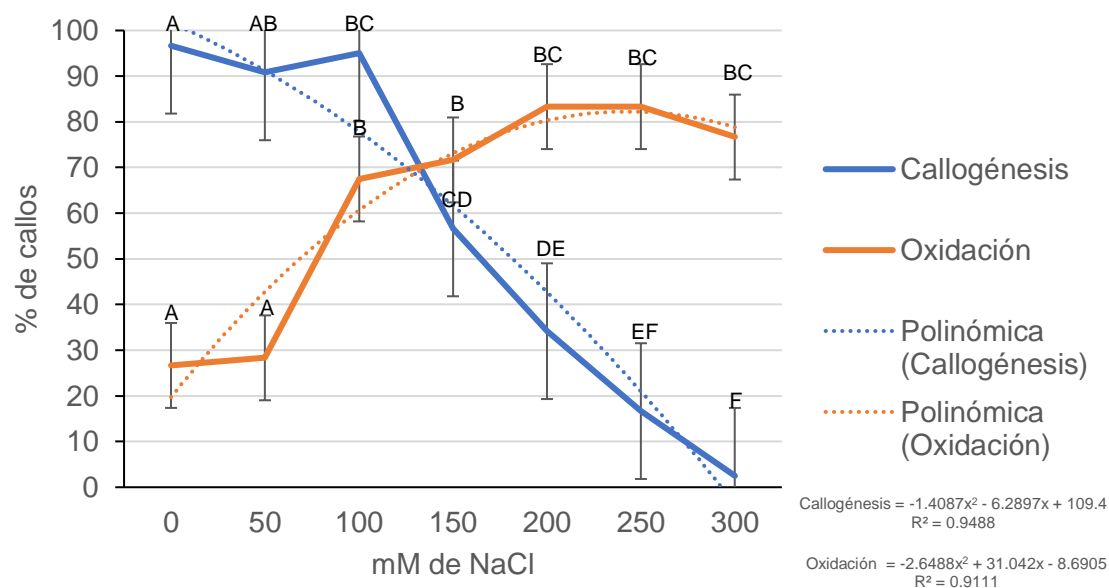


Figura 8. Porcentaje promedio de respuesta al proceso de calogénesis de semillas en medio de inducción y multiplicación de calogénesis suplementado con distintas concentraciones de NaCl. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) según el análisis de varianza de Tukey.

El peso fresco y seco varió con la concentración de NaCl adicionada al medio (Figura 9), se observó una disminución de 400 mg, aproximadamente, entre el control y el promedio del peso fresco obtenido de 12 callo en un medio con 50 mM de NaCl, disminuyendo 200 mg entre cada dosis de hasta los 250 mM. Entre los callos evaluados en 250 mM y 300 mM de NaCl, se observó una diferencia de 30 mg en el peso fresco promedio. La disminución del promedio del peso seco fue menos drástica, siendo la mayor de 30 mg, entre 0 y 50 mM y la menor de 7mg, entre 250 y 300 mM.

La prueba de normalidad Shapiro-Wilks para los datos analizados del peso fresco y seco, reflejó un valor de $p > 0,05$, por lo que se infiere con certeza estadística que los datos poseen una distribución normal por lo que se realizó un análisis de varianza de Tukey un valor de $p < 0,0001$, por lo que se puede afirmar con certeza estadística que la reducción en el peso fresco y seco observado en los callos es debido al aumento en la concentraciones de NaCl en el medio de cultivo.

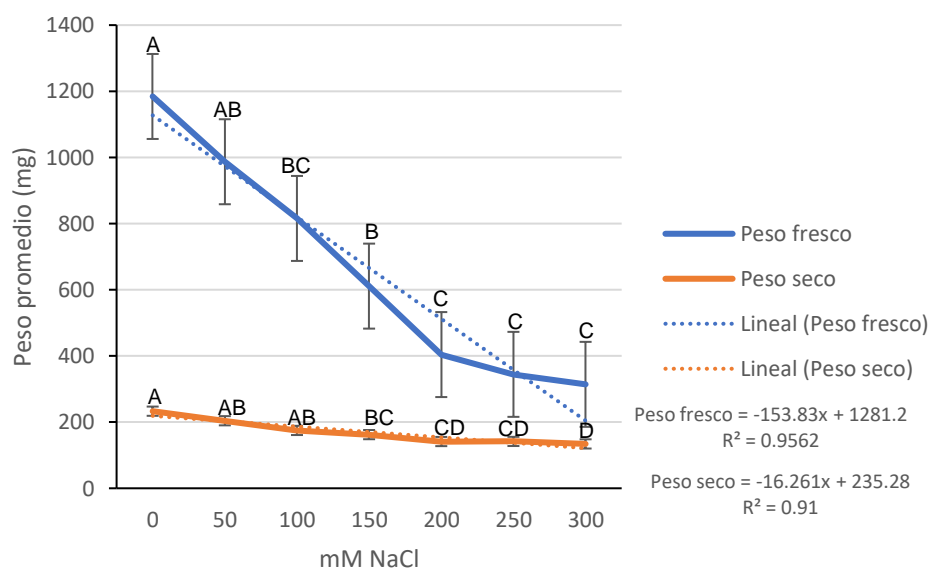


Figura 9. Promedio del peso fresco y seco del tejido formado luego de 4 semanas de cultivo un medio de inducción y multiplicación de callogénesis con distintas concentraciones de NaCl. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) según el análisis de varianza de Tukey.

La regeneración de los callos embriogénicos no se vio afectada por la adición de NaCl al medio de regeneración, ya que los callos que no se oxidaron a causa del NaCl en el medio presentaron una coloración verdosa y luego del segundo subcultivo al medio de regeneración empezaron con la regeneración de plántulas de una manera más evidente (Figura 10). Esto se observó en todas las concentraciones de NaCl utilizadas.

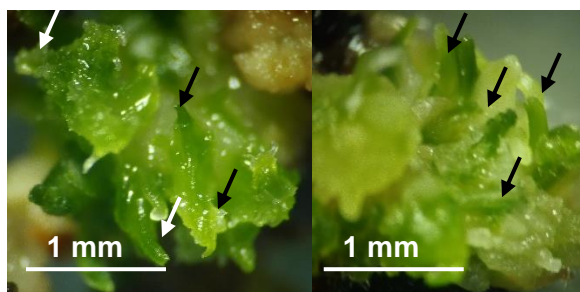


Figura 10. Apariencia de los callos embriogénicos de arroz var. CR5272 luego de 15 días en medio de regeneración con NaCl (0-300 mM). Las flechas señalan los brotes desarrollados.

En la Figura 11 se observa un mayor desarrollo vegetativo de las plántulas obtenidas en medios de regeneración con dosis de 250 y 300 mM de NaCl, respecto a los controles en mismo período de tiempo. Una vez que estas plantas se separaron del resto del callo y se subcultivaron a un medio fresco de regeneración con la misma dosis de NaCl, murieron luego de 15 días. En las dosis entre 50 y 200 mM de NaCl se observó un desarrollo de los brotes comparable con el control (0 mM).

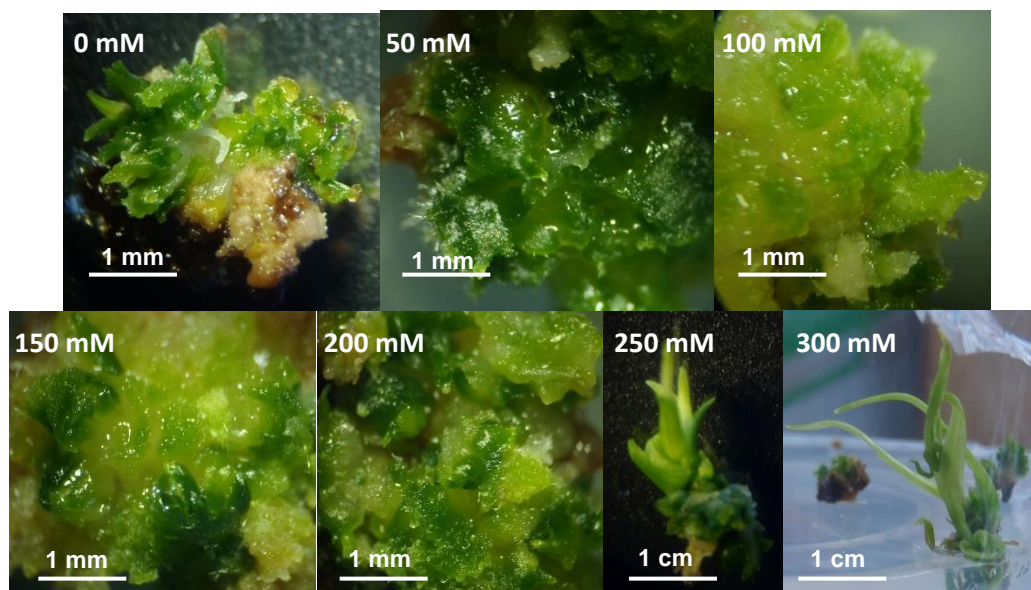


Figura 11. Regeneración de plántulas en distintas concentraciones de NaCl en el segundo subcultivo.

Al comparar el efecto de la sal de mesa y el NaCl grado reactivo no se observaron diferencias significativas entre ellas (Figura 12). El coeficiente de correlación entre los valores obtenidos fue mayor a 0,95, lo que indica que la relación es muy cercada a 1, así se afirma con certeza estadística que no existen diferencias en el efecto de las concentraciones equivalentes de sal de mesa y NaCl grado reactivo en la oxidación y callogénesis. Esta afirmación se ve reflejada en la similitud de las ecuaciones de regresión calculadas para las curvas de oxidación y callogénesis de sal de mesa y NaCl grado reactivo.

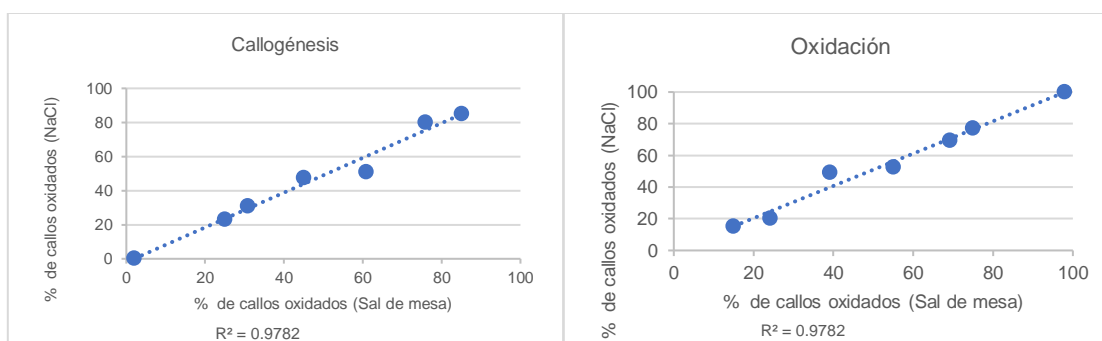


Figura 12. Comparación del efecto promedio en la formación de callo y en la oxidación de la sal de mesa y el NaCl grado reactivo en distintas concentraciones. R^2 coeficiente de correlación.

La sobrevivencia de plantas de 5 y 15 días se vio disminuida conforme el aumento de la concentración de NaCl (Figura 13). La sobrevivencia a 150 mM de NaCl fue de 45 y 51 % en plantas de 5 y 15 días, respectivamente. La sobrevivencia a 300 mM fue menor a 10 % en ambos casos. La prueba de normalidad Shapiro-Wilks para los datos analizados de la sobrevivencia de *vitro* plantas a distintas concentraciones de NaCl, reflejó un valor de $p > 0,05$, tanto para las plantas de 5 como las de 15 días, por lo que se infiere con certeza estadística que los datos poseen una distribución normal por lo que se realizó una análisis de varianza de Tukey y se obtuvo un valor de $p < 0,001$, lo que indica con certeza estadística que si existen diferencias en la sobrevivencia de las plantas a distintas dosis de NaCl. La apariencia de las plantas, tanto de 5 y 15 días de edad, mostró un mayor daño foliar y menor desarrollo radical, proporcional a la dosis de NaCl utilizada, aumentando conforme se aumentó la dosis de NaCl (Figura 14).

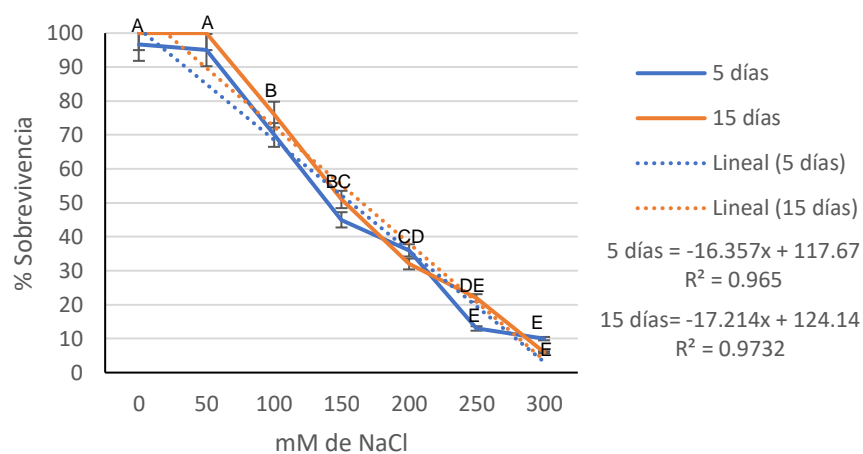


Figura 13. Sobrevivencia de plantas de arroz de 5 y 15 días de edad a dos meses de cultivo in vitro bajo estrés salino simulado con distintas concentraciones de NaCl. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0,05$), según el análisis de varianza de Tukey.

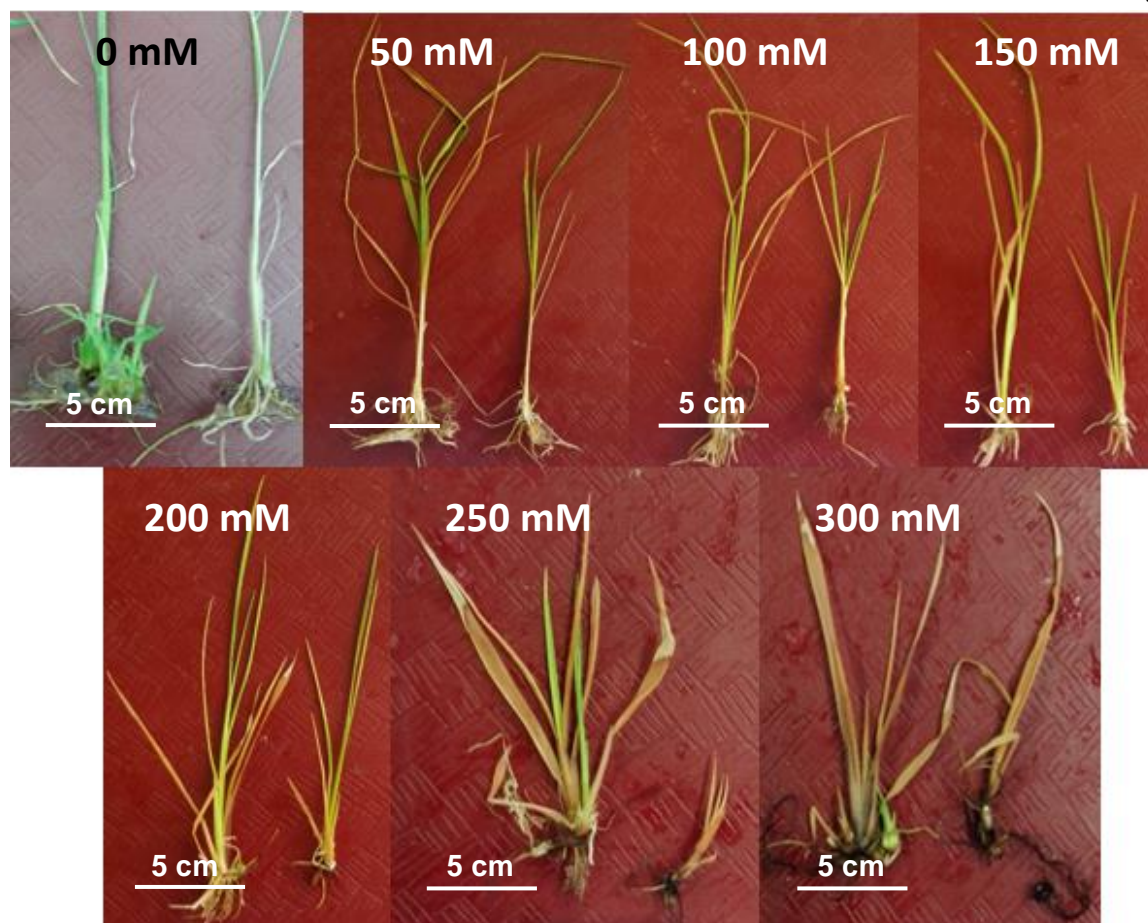


Figura 14. Desarrollo de las plantas en distintas concentraciones de NaCl, luego de 30 días de cultivo.

Las evaluaciones del desarrollo de las plantas de 5 y 15 días de edad bajo condiciones de cultivo salino mostraron una disminución en la altura, número de brotes, hojas y longitud radical (Figura 15). En las plantas de 5 días de edad se observó un efecto de hormesis en el crecimiento en las dosis de 50, ya que mostraron una altura de 2 cm mayor al control. Además, de un aumento en la cantidad de brotes y una longitud radical de 4 cm mayor al control.

El análisis de la normalidad de los datos de Shapiro-Wilks para los datos analizados, reflejó un valor de $p > 0,05$, por lo que se infiere con certeza estadística que los datos presentan una distribución normal y se procedió a realizar una prueba de Tukey, donde se calculó un valor de $p < 0,05$ para la altura de las plantas, número de brotes, número de hojas y longitud

radical de plantas de 5 y 15 días de edad, por lo que se infiere con certeza estadística que las diferencias observadas en estos parámetros son dados por la concentración de NaCl utilizada.

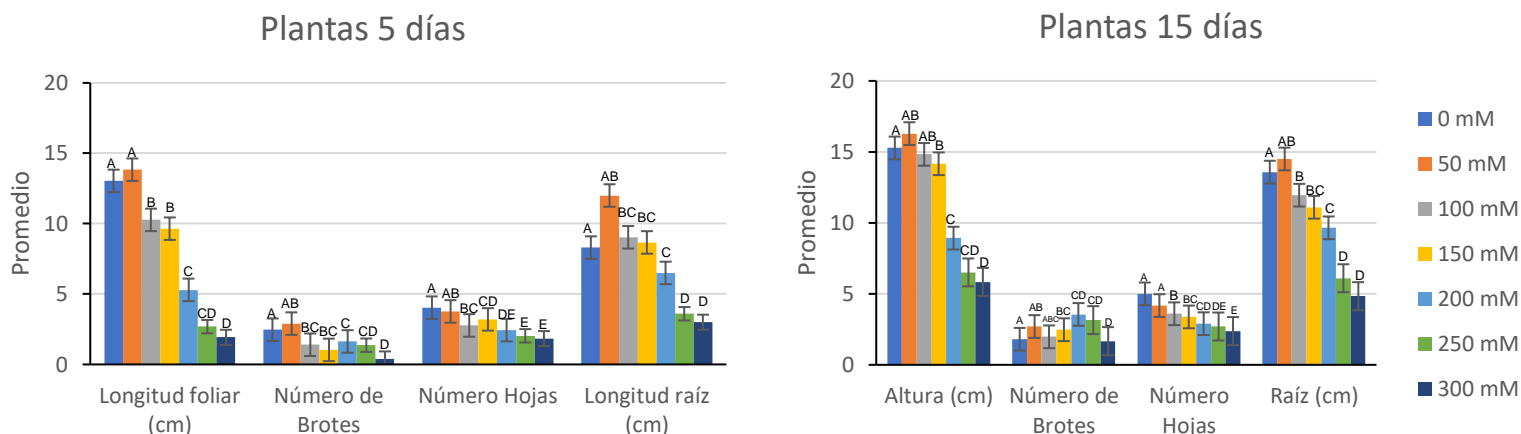


Figura 15. Comparación del promedio de brotes, altura (cm), longitud de raíces (cm) y número de hojas desarrollados *in vitro* para plantas de arroz subespecie indica var. CR5272 de 5 y 15 días, en distintas dosis de NaCl. La misma letra indica que no hay diferencia estadística significativa ($p > 0,05$), según el análisis de varianza de Tukey.

Los datos obtenidos permitieron seleccionar como dosis de trabajo las concentraciones de 150mM de NaCl. Además, al no encontrarse diferencias estadísticas significativas entre los efectos de la concentración de NaCl grado reactivo y su equivalente de sal de mesa sobre los tejidos de arroz, se utilizará sal de mesa en los ensayos de selección *ex vitro*.

Selección *in vitro* de mutantes M1V1 a partir de callos embriogénicos irradiados de arroz var. CR5272

Luego de 15 días de cultivo en medio de regeneración suplementado con 150mM de sal de mesa se observó la sobrevivencia de solo algunos de los segmentos del callo, entre un 10 a 50 % del callo, como puede ser observado en la Figura 16.

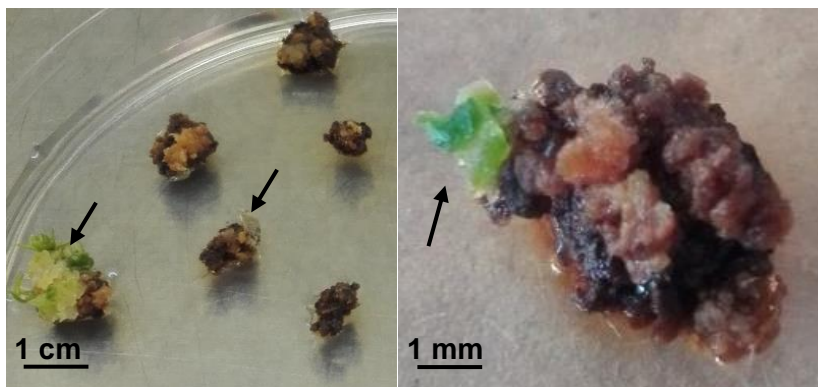


Figura 16. Apariencia de callos embriogénicos de arroz subespecie indica var. CR5272 irradiados a 40 Gy después de 15 días de cultivo *in vitro* con 150 mM de sal de mesa. Las flechas indican el tejido regenerante seleccionado en condiciones de salinidad.

Al separar los tejidos sobrevivientes, indicados con las flechas en la Figura 16, y colocarlos en un medio fresco de regeneración, se lograron regenerar 5 plantas de distintos callos embriogénicos irradiados a 40Gy, seleccionados bajo 150 mM NaCl. Además de cada planta se lograron obtener, al menos, 3 clones, por la formación de brotes, exceptuando la planta mutante identificada como I, donde solo se obtuvo una planta (Cuadro 4).

Cuadro 4. Brotes obtenidos *in vitro* de plantas regeneradas de callos embriogénicos de arroz irradiados a 40 Gy.

Plantas mutantes (M1V1)	Número de brotes aclimatados
I	1
II	3
III	5
IV	8
V	5

Selección *ex vitro* y caracterización morfológica de mutantes M3 de arroz obtenidos de callos embriogénicos de arroz var CR5272

Las 5 plantas M1 regeneradas (Figura 17) se aclimataron y produjeron distintas cantidades de semilla entre 135 y 3318 (Cuadro 5), excepto por el mutante identificado como III que fue estéril. Las mediciones morfológicas realizadas para las plantas M1 y M2 pueden ser consultadas en el Anexo 2.



Figura 17. Plantas mutantes de arroz de 30 días de edad provenientes de callos irradiados a 40 Gy y seleccionados en 150 mM de NaCl.

La producción de semilla M2 de las plantas M1 fue muy baja, entre 1 y 8, aumentado considerablemente la producción de semilla por planta M2, así mismo se observó una pequeña variación en el peso y el tamaño de la semilla M3 obtenida, respecto al control no mutante (Cuadro 5).

Cuadro 5. Cantidad de semilla obtenida por línea mutante obtenidas de plantas regeneradas de callos embriogénicos de arroz subespecie indica var. CR5272 irradiados a 40 Gy sin NaCl.

Plantas M1V1 derivadas de callos embriogénicos irradiados a 40Gy	Cantidad de semilla M2	Cantidad de Semillas M3	Peso promedio de 10 semillas M3 (g)	Longitud promedio semillas M3 (cm)
I	1	135	0,2	1,0
II	7	189	0,2	1,0
III	Estéril	-	-	-
IV	8	2848	0,2	0,9
V	8	3318	0,2	0,8

Los controles mostraron una germinación del 50 % luego de 15 días de cultivo en el sistema de hidroponía con 150mM de sal y 100 % en los controles sin estrés salino. Para los mutantes M3 con estrés salino se observó una germinación de un 95 % en promedio. Transcurrido un mes de cultivo hidropónico, se observó la muerte de la mayoría de mutantes M3, sobreviviendo únicamente 30 plantas de 4326 evaluadas, (Figura 18A). Estas mostraron daños foliares, al igual que las plantas control en condiciones de salinidad, pero esto no fue observado en los controles no mutantes cultivados sin estrés salino, como se puede apreciar en la Figura 18.

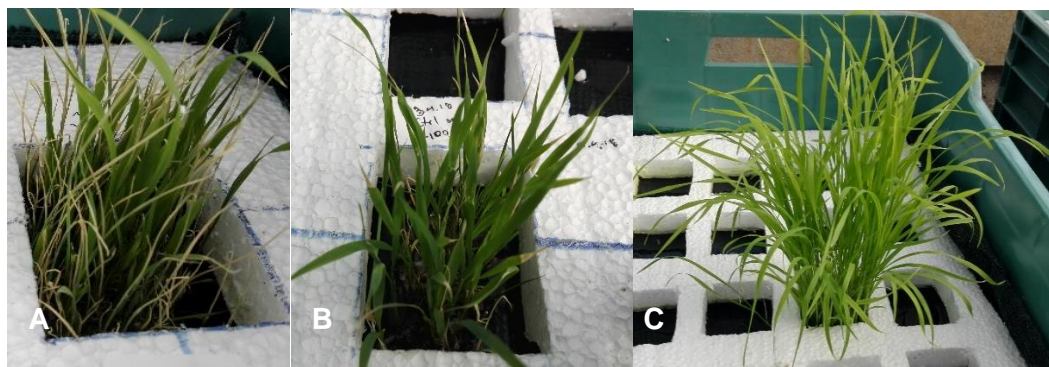


Figura 18. Apariencia de mutantes M3, bajo estrés salino con 150 mM de sal, plantas control de arroz bajo estrés salino y controles absolutos de arroz, respectivamente, luego de 21 días de germinación en sistema de hidroponía. A) Mutantes M3, B) Control sal y C) Control absoluto.

Luego de una semana de haber sido colocados en la plataforma 1, sobrevivieron únicamente 7 mutantes M3, correspondientes a la línea I y se identificaron como M3 I-1, M3 I-2, M3 I-3, M3 I-4, M3 I-5, M3 I-6 y M3 I-7. Transcurridos 90 días de cultivo hidropónico un

75% de las plantas de arroz controles en salinidad evaluadas se marchitaron completamente, los controles sobrevivientes mostraron marchitamiento bastante marcado en las hojas más viejas, pero con una clorosis de más del 50% en las hojas jóvenes, así como aborto de las flores (Figura 19).

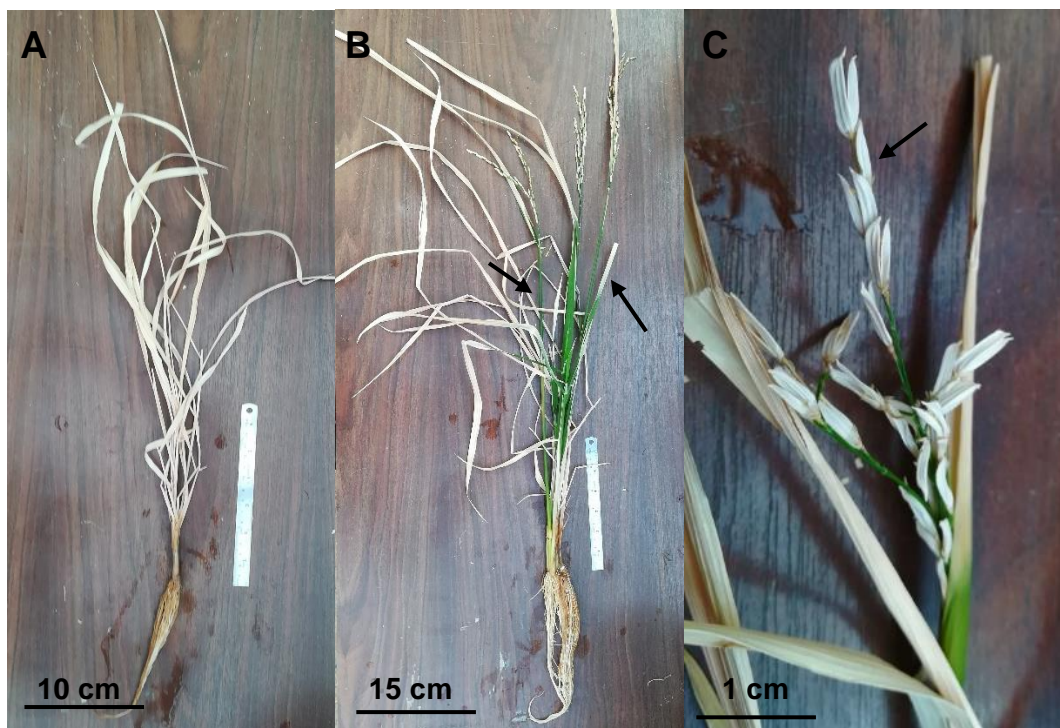


Figura 19. A) Planta de arroz control marchita por estrés salino; B) planta de arroz control sobreviviente a estrés salino con marchitamiento parcial y C) flores abortadas por estrés salino con 150 mM de sal de plantas control.

El crecimiento foliar, radical, así como la brotación mostraron diferencias significativas entre el promedio de las plantas control no mutantes con y sin estrés salino y los mutantes evaluados. Los mutantes tuvieron un mayor crecimiento foliar y radical. La longitud foliar de los mutantes varió entre 34,3 y 67,4 cm, mientras que la foliar varió entre 8,2 y 19,0 cm. El Mutantes M3 I-6 mostró los valores más bajos y el mutante M3 I-3 los más altos. Los controles mostraron un crecimiento foliar promedio de 46,9 cm y radical de 10,8 cm cuando no fueron sometidos a estrés salino. Al someterse a estrés salino estos valores variaron a 50,1 y 6,8 cm, respectivamente. (Figura 20).

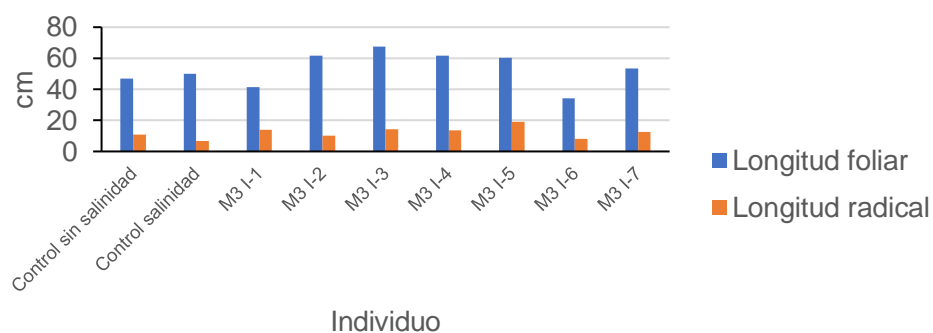


Figura 20. Crecimiento foliar y radical en cm de plantas mutantes M3 provenientes de la línea I evaluadas en cultivo hidropónico bajo estrés salino (150 mM de sal), así como plantas control no mutantes con y sin estrés salino.

En relación con el número de brotes, los mutantes M3I-3,4 y 5 mostraron una mayor capacidad de macollamiento con respecto a los controles sin salinidad, luego de 3 meses de cultivo hidropónico bajo condiciones de salinidad. Mientras que los mutantes M3 I-6 y M3 I-7 tuvieron los menores valores de número de brotes en comparación a los otros mutantes y controles. No se observó un cambio significativo en el número de hojas desarrolladas entre los mutantes M3 y los controles, con excepción del mutante M3 I-1 que desarrolló 1 hoja más, comparado con el promedio de los controles (Figura 21).

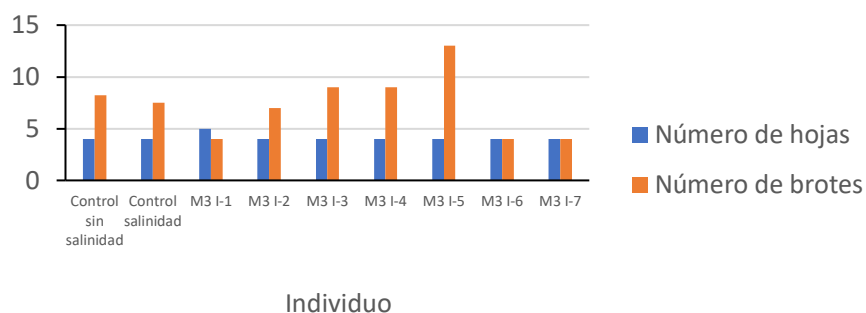


Figura 21. Número de hojas y brotes desarrollados en plantas mutantes M3 provenientes de la línea I, luego de un mes de cultivo hidropónico bajo estrés salino (150 mM de sal), así como plantas control no mutantes con y sin estrés salino.

En la figura 22, se muestra las diferencias en el crecimiento radicular de los mutantes y controles en las condiciones hidropónicas. El desarrollo radicular en las plantas mutantes mostró un crecimiento mayor, de hasta 9 cm, con respecto a los controles (Figuras 22C y 22A, respectivamente). Excepto por el M3 I-6 cuya longitud radical fue 2 cm menor al control absoluto (Figura 22D). En las plantas de arroz control sometidas a estrés salino el crecimiento de las raíces se vio reducido en promedio casi 5 cm, respecto al promedio de las plantas de arroz control sin estrés salino (Figura 22B).

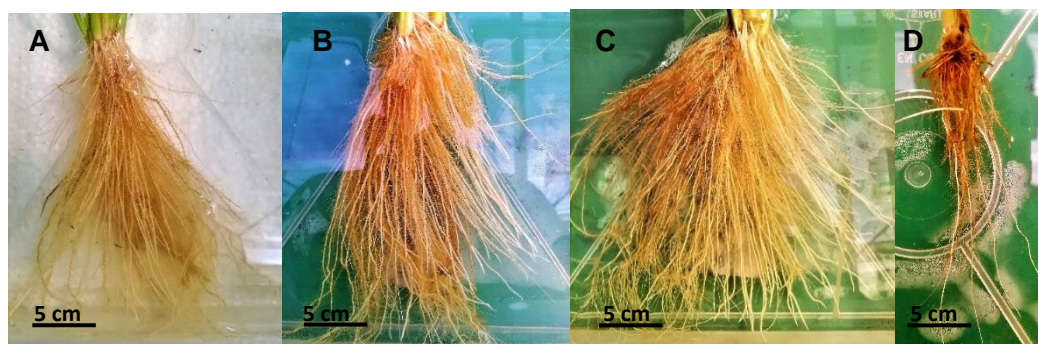


Figura 22. Desarrollo radicular de plantas control A) sin salinidad y B) con salinidad, así como de los C) mutantes M3 tolerantes a la salinidad (I-1 al I-5) y D) mutantes M3 sensibles a la salinidad (I-6 y I-7) bajo estrés salino por NaCl, luego de 3 meses de cultivo hidropónico.

Además, se observó, que el grupo de mutantes tolerantes (M3 I-1 al M3 I-5) secretaron sales en el tallo, además de presentar un marchitamiento en las hojas bajas, siendo la menos afectadas la hoja bandera y las hojas más jóvenes (Figura 23).

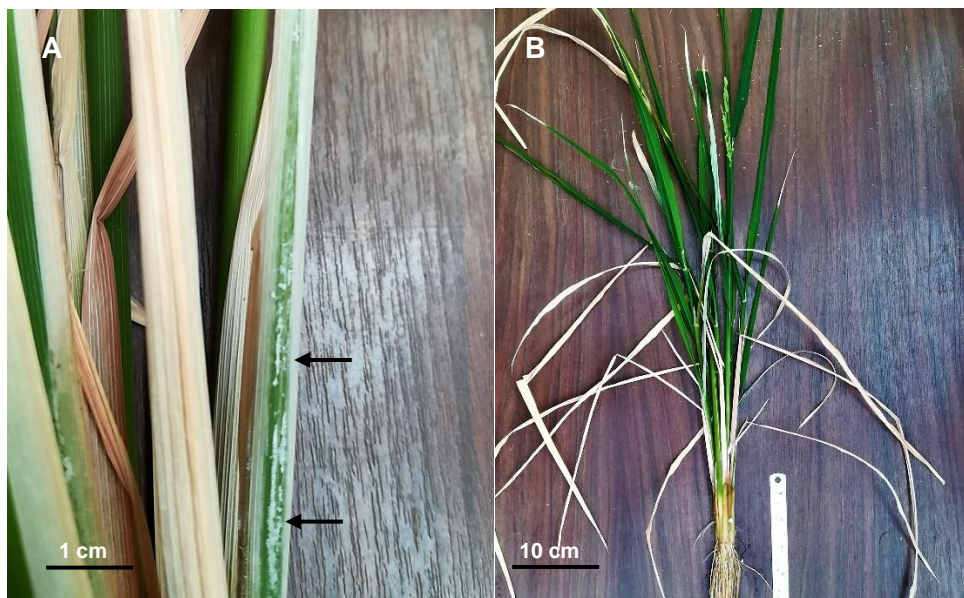


Figura 23. A) Acumulación de sales observada como una capa blanca en el tallo de los mutantes M3 de arroz sobrevivientes al estrés salino y B) apariencia promedio de los mutantes M3 sobrevivientes a 90 días de cultivo hidropónico salino.

La producción de semilla de los mutantes M3 I sobrevivientes y que lograron completar su ciclo de vida, fue considerablemente distinta a la producción en los controles con y sin estrés. Las plantas control bajo estrés salino prácticamente no produjeron semilla. Pero, en lo que respecta a los mutantes se observó una producción de semilla variable en los mutantes tolerantes (M3 I-1 AL M3 I-5) y nula en los sensibles (M3 I-6 Y M3 I-7 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Producción, promedio del tamaño y peso de 10 semillas de plantas de arroz mutantes M3 de la línea I y controles bajo condiciones de estrés salino.

Individuo	Cantidad de semillas	Promedio de la longitud de las semillas (cm)	Peso de 10 semillas (g)
Promedio control absoluto	690	0,99	0,2
Promedio control sal	10	0,80	0,2
M3 I-1	200	0,95	0,2
M3 I-2	250	0,87	0,15
M3 I-3	350	0,93	0,2
M3 I-4	100	0,92	0,18
M3 I-5	400	0,89	0,2
M3 I-6	0	-	-
M3 I-7	0	-	-

Caracterización molecular de los mutantes de arroz M3 I

El ADN de tejido radical y foliar de los 7 mutantes M3 I sobrevivientes a 2 meses y medio de cultivo hidropónico salino (150 mM de sal), presentó poca degradación (Figura 24, Anexo 4). La extracción de ARN totales fue de buena calidad e integridad como se puede observar en el gel de electroforesis y en el análisis por Nanodrop (Figura 25, Anexo 4).

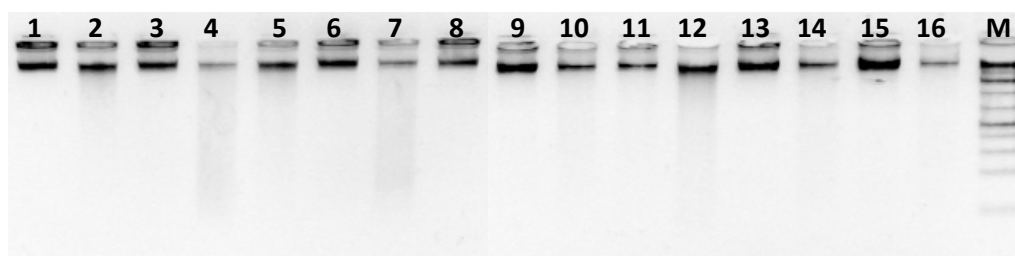


Figura 24. ADN extraído de mutantes y controles. 1) Hoja pool mutantes tolerantes sin salinidad, 2) Raíz pool mutantes tolerantes sin salinidad, 3) Hoja pool mutantes sensibles sin salinidad, 4) Raíz pool mutantes sensibles sin salinidad, 5) Hoja pool control sin salinidad, 6) Raíz pool control sin salinidad, 7) Hoja pool control con salinidad 2, 8) Raíz pool control con salinidad, 9) Hoja pool mutantes tolerantes con salinidad, 10) Raíz pool

mutantes tolerantes con salinidad, 11) Hoja pool mutantes sensibles son salinidad , 12) Raíz pool mutantes sal 2, 13) Hoja pool control sin salinidad, 14) Raíz pool control sin salinidad, 15) Hoja pool control con salinidad, 16) Raíz pool control con salinidad y M) Marcador 1kb Thermo Fisher Scientific.

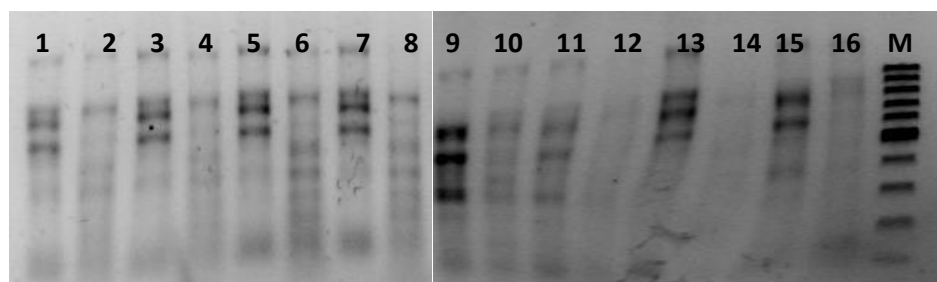


Figura 25. ARN extraído de mutantes y controles. 1) Hoja pool mutantes tolerantes prefloración, 2) Raíz pool mutantes tolerantes prefloración, 3) Hoja pool mutantes sensibles prefloración, 4) Raíz pool mutantes sensibles prefloración, 5) Hoja pool control absoluto prefloración, 6) Raíz pool control absoluto prefloración, 7) Hoja pool control sal prefloración, 8) Raíz pool control sal prefloración, 9) Hoja pool mutantes tolerantes postfloración, 10) Raíz pool mutantes tolerantes postfloración, 11) Hoja pool mutantes sensibles postfloración, 12) Raíz pool mutantes sensibles postfloración, 13) Hoja pool control absoluto postfloración, 14) Raíz pool control absoluto postfloración, 15) Hoja pool control sal 2 postfloración, 16) Raíz pool control sal postfloración y M) Marcador 1kb Thermo Fisher Scientific.

Análisis de los patrones de AFLP de los mutantes M3 I de arroz sometidos a estrés salino por 150 mM de NaCl.

En primera instancia el análisis por AFLP mostró diferentes patrones de bandas en los controles, los mutantes M3 tolerantes y los sensibles a salinidad, que indican una implementación óptima en las condiciones experimentales (Figura 26).

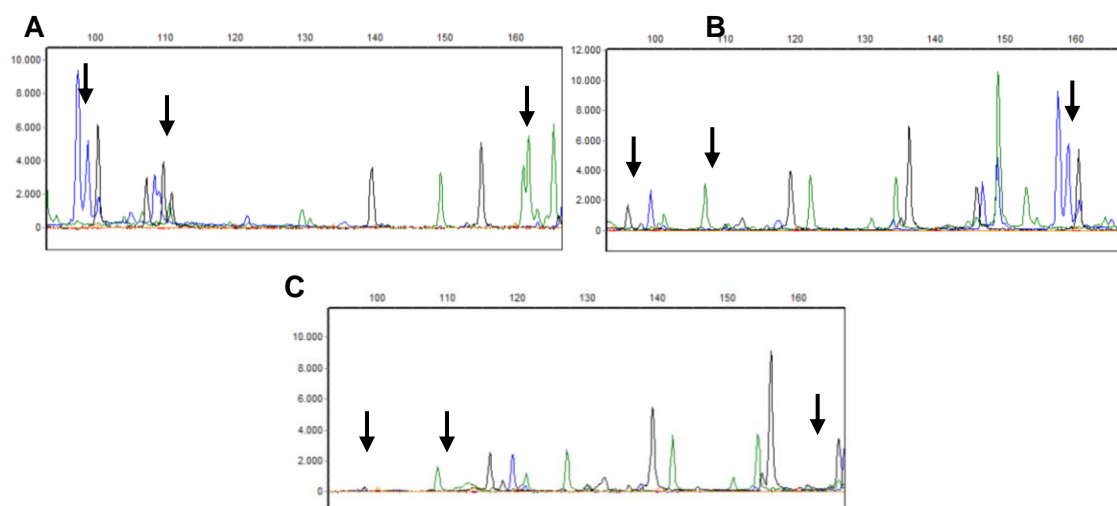


Figura 26. Segmento del electroferograma de los productos de PCR de la combinación AGG*CAA (azul), ACA*CAA (amarillo) ACC*CAA (verde) de plantas A) control no mutante, B) mutantes tolerantes a la salinidad y C) mutantes sensibles a salinidad por NaCl. La flecha indica las diferentes señales observadas.

En el Cuadro 7 se observan el número de bandas obtenidas por cada combinación de cebadores utilizadas en la amplificación selectiva del análisis de AFLP, donde se muestra que se obtuvieron valores entre 16 y 71 %, porcentajes importantes de polimorfismos en las bandas obtenidas por las diferencias genéticas presentes entre los mutantes M3 I y las plantas de arroz control evaluadas.

Cuadro 7. Número de bandas observadas y bandas polimórficas por combinación de cebadores, para el análisis de AFLP de 7 mutantes M3 I y 4 plantas control no mutantes.

Combinación	Número de bandas	Número de bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas
AGG*CAA	85	59	69
ACC*CAA	118	83	70
ACA*CAA	84	60	71
AGG*CAT	56	40	71
ACC*CAT	73	46	63
ACA*CAT	52	31	60
AGG*CAG	25	4	16
ACC*CAG	55	26	47
ACA*CAG	34	14	41
AGG*CAC	63	34	54
ACC*CAC	79	46	58
ACA*CAC	39	16	41
Total/Promedio	763	459	60

El Coeficiente de similitud de Jaccard al analizar las 763 bandas obtenidas con el programa Darwin® mostró la existencia de 4 grupos genéticos. Los mutantes tolerantes a la salinidad (M3-I1 al M3-I5), resaltados en verde, se agrupan separados de las plantas control, resaltadas en azul y de los mutantes sensibles (M3-I7 y M3-I6), resaltados en negro, los cuales mostraron mayor similitud genética a las plantas de arroz var. CR5272 (Figura 27).

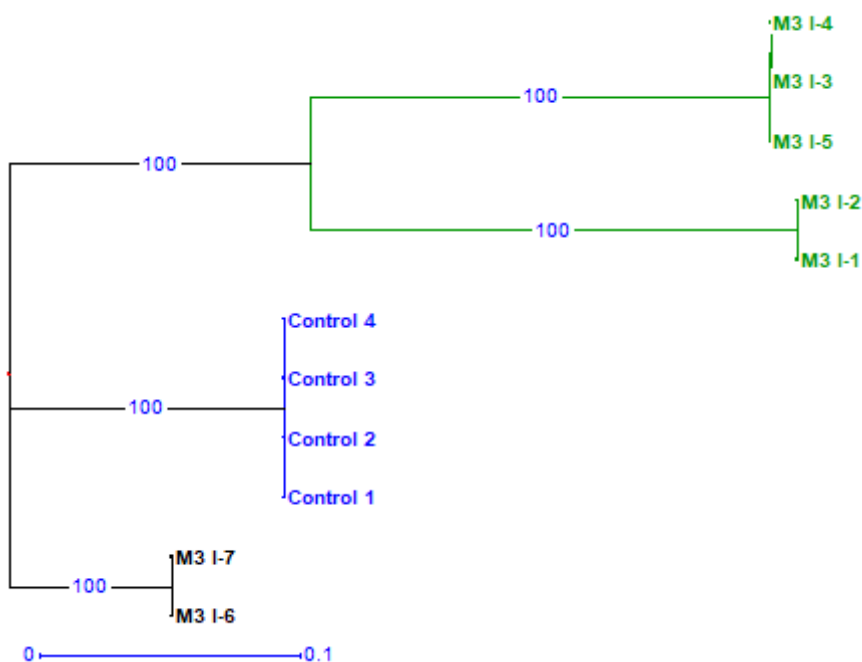


Figura 27. Dendrograma generado del análisis de las 763 bandas de AFLP de los mutantes M3 y plantas de arroz var. CR5272, utilizando el índice de Jaccard, donde se observan 4 grupos genéticos. Los números en las ramas corresponden al valor de confianza del análisis de bootstrap.

La agrupación observada en la Figura 27, se debe a que las plantas agrupadas presentan fragmentos comunes que no se encontraron en el patrón de bandas de las plantas de los otros grupos, el primer grupo de mutantes M3 (I-3 al I-5) presenta 58 fragmentos distintivos, el segundo grupo mutante M3 (I-1 y I-2), presenta 60 y el tercer grupo mutante M3 (I-6 y I-7) solo presentó 10 fragmentos únicos. Por su parte el control mostró 13 fragmentos únicos.

Análisis de los patrones de metilación por MSAP de los mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino

Al analizar los resultados del ensayo de MSAP se observaron cambios en los patrones de metilación distintos al comparado observado en las plantas de arroz var. CR5272 con y sin estrés salino y los mutantes M3 luego de 3 meses en cultivo hidropónico salino. Así mismo se observó un patrón distinto dependiendo del tejido (radical o foliar) (Figura 28).

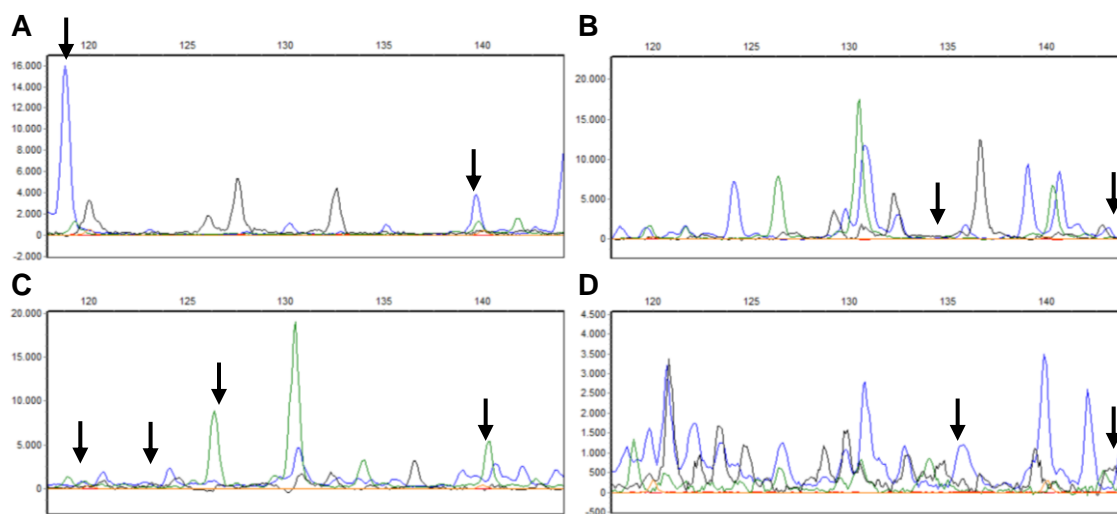


Figura 28. Diferencias en el patrón de electroferograma observado en la amplificación de los fragmentos de MSAP obtenidos de la amplificación selectiva con los cebadores AGG*CAC (azul), ACA*CAC (amarillo) ACC*CAC (verde) de plantas control sometidas a estrés salino. A) ADN de tejido foliar digerido por MspI, B) ADN de tejido radical digerido con MspI, C) ADN de tejido foliar digerido con HpaII y D) ADN de tejido radical digerido con HpaII.

En la Figura 29, se muestran los cambios en el porcentaje de los sitios metilados, metilados de manera completa y hemimetilados analizados en el tejido foliar de los mutantes M3 bajo estrés salino por NaCl y plantas control no mutantes de arroz con y sin estrés salino. Se apreciaron pocos cambios en la metilación total, así como de metilación completa de las plantas control y los mutantes con y sin sal ya que solo se detectó una disminución de un 1 % entre los porcentajes de metilación y hemimetilación. Se destaca que una clara diferencia en el comportamiento fue en el porcentaje de hemimetilación en los mutantes y las plantas control bajo condiciones de estrés salino; por cuanto este valor aumentó un 2 % en los mutantes sometidos a estrés salino, mientras que en las plantas de arroz control este porcentaje disminuyó un 1 %.

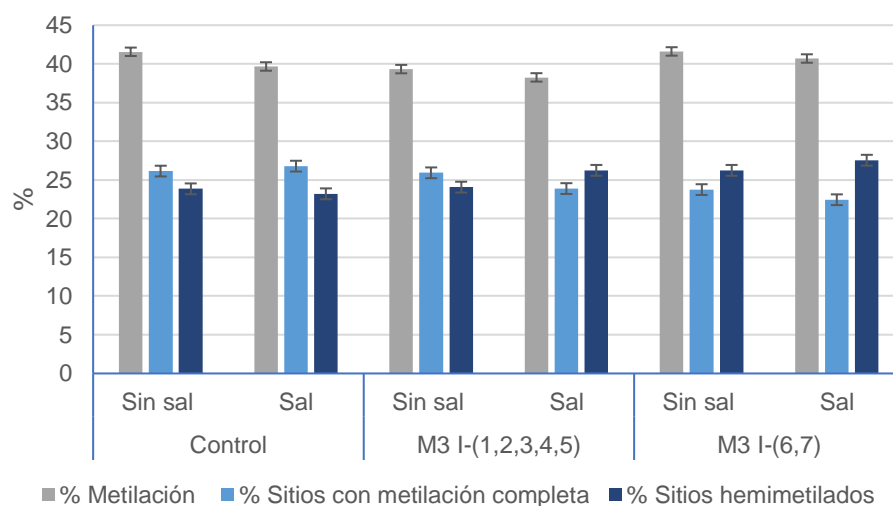


Figura 29. Cambios en los patrones de metilación observados por análisis de MSAP en tejidos foliares de plantas mutantes M3 de 2 meses de edad sometidas a estrés salino por NaCl y plantas no mutantes control de 2 meses de edad con estrés salino por NaCl y sin él.

En los tejidos radicales analizados se observaron cambios más evidentes con respecto al tejido foliar (Figura 30). Las plantas control de arroz var. CR5272 aumentaron el porcentaje de metilación un 2 %, así como los sitios con metilación completa un 3 %. Por su parte en los mutantes M3 se observó un comportamiento similar a las plantas control, siendo los mutantes tolerantes, los que presentaron los valores más bajos de metilación completa, durante el estrés salino siendo de un 29 %, mientras que en las plantas control de arroz var CR5272 y los mutantes sensibles (M3 I-6 y 7) fueron de un 41 y 38 %, respectivamente.

El porcentaje de hemimetilación en el tejido radical de los mutantes tolerantes (M3 I-1 al 5), fue mayor al observado en las plantas control y los mutantes sensibles a la salinidad (Figura 30). Se calculó un 23 % de hemimetilación en los mutantes tolerantes sin el estrés salino, el cual aumentó a 25 % cuando estas plantas fueron sometidas a estrés salino. Los mutantes sensibles (M3 I-6 y 7) mostraron un aumento en el porcentaje de hemimetilación de un 2% durante el estrés salino, respecto al calculado sin el estrés salino; en el caso de los controles no se apreciaron cambios en el porcentaje de hemimetilación, manteniéndose en 18 % con y sin el estrés.

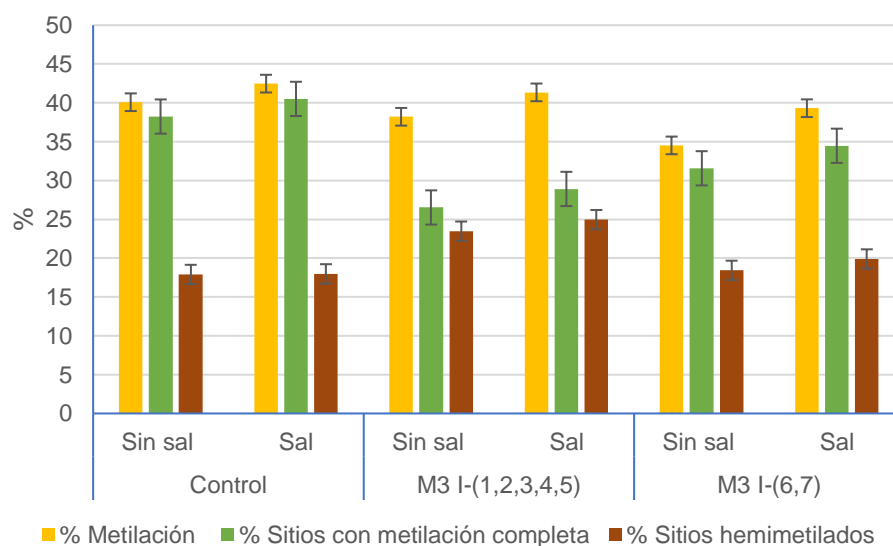


Figura 30. Cambios en los patrones de metilación observados por análisis de MSAP en tejidos radicales de plantas mutantes M3 y plantas control no mutantes de arroz con estrés salino por NaCl y sin él.

Análisis de los cambios de expresión de genes relaciones con la tolerancia a salinidad de mutantes M3 de arroz mediante qRT-PCR

Las curvas de disociación para los genes candidatos de referencia, *EFa*, *ACT* y *TUB*, mostraron una única temperatura de disociación, 79,31°C, 80,31°C y 80,19°C, respectivamente como se puede observar en la Figura 31.

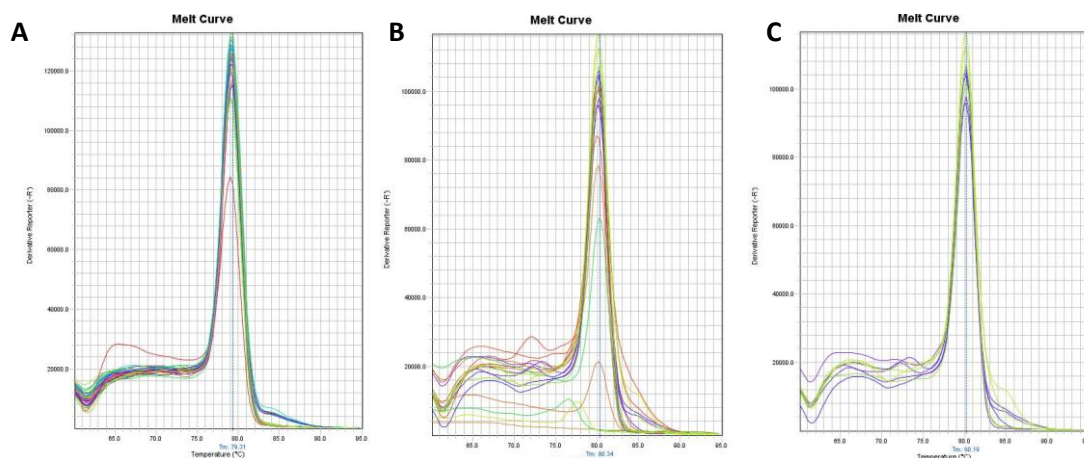


Figura 31. Curva de disociación para los genes A) *Efa*, B) *ACT* y C) *TUB*, observada en la amplificación de ADNc de plantas de arroz no mutantes con y sin estrés salino por NaCl.

El análisis de estabilidad para los genes *Efa*, *ACT* y *TUB* (calculado con el complemento de Excel NormFinder) mostró valores de estabilidad de 0,121 para los cebadores de *TUB*, 0,115 para los cebadores de *ACT* y 0,076 para los cebadores de *Efa*. Por esta razón este último juego de cebadores que mostraron la mayor estabilidad, se eligió como gen de referencia para los análisis de expresión relativa en mutantes de arroz M3 I sometidos a estrés salino antes y después de la floración.

Los resultados del análisis de la expresión de los genes relacionados con la tolerancia al estrés salino mostraron una única temperatura de disociación, mayoritariamente, en las muestras de ADNc de mutantes de arroz M3 utilizados en el análisis de expresión relativa, como se puede apreciar en la Figura 32.

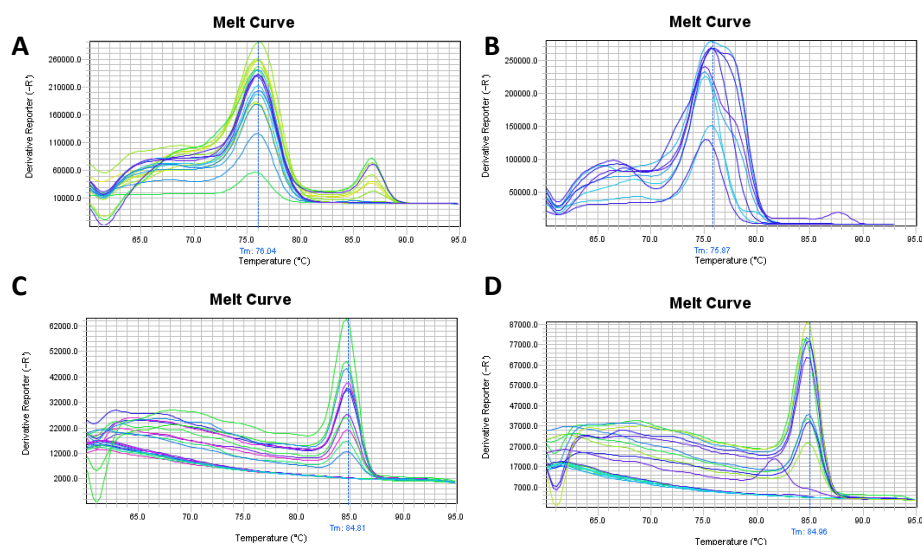


Figura 32. Curva de disociación para los genes A) *CYSB*, B) *SAMDC*, C) *SAMS* y D) *HKT2*, obtenida del qPCR del ADNc de muestras foliares y radicales de plantas de arroz mutantes M3 I y controles no mutantes sometidos a estrés salino por NaCl y sin él.

La expresión relativa de los genes *CYSB*, *SAMDC*, *SAMS* y *HKT2* respecto al gen de referencia *EFa*, varió dependiendo si la planta estaba en la etapa de desarrollo vegetativo o prefloración, o en su etapa reproductiva o postfloración. A continuación, se presentarán los resultados obtenidos para cada gen estudiado.

La expresión del gen *CYSB* fue distinta para los controles no mutantes con y sin salinidad, así como entre los mutantes sensibles y tolerantes. Se observó en tejido foliar una sobreexpresión del gen *CYSB* de casi 4,0 X en los mutantes sensibles a la salinidad (M3 I-6 y I-7) durante la prefloración y una disminución considerable en la expresión postfloración de casi 0,5 X, respecto a los controles utilizados. Un comportamiento similar se observó en el tejido radical de estos mutantes siendo 0,3 X mayor la expresión en prefloración, respecto al control absoluto. La expresión del gen *CYSB* en los mutantes tolerantes a la salinidad (M3 I-1, I-2, I-3, I-4 y I-5), fue de 0,3 X antes de la floración para los tejidos foliares, aumentando después de la floración a 1,8 X, fue mayor la expresión que en los controles absolutos y los controles sal. En el tejido radical se observó un aumento de casi el doble en la expresión en los mutantes tolerantes luego de la floración. La mayor expresión observada fue en el tejido radical del control sal, que fue de 14,5 X luego de la floración. Los cambios

en el comportamiento de la expresión del gen *CYSB*, se observa con más detalle en la Figura 33, tanto para el tejido radical como foliar.

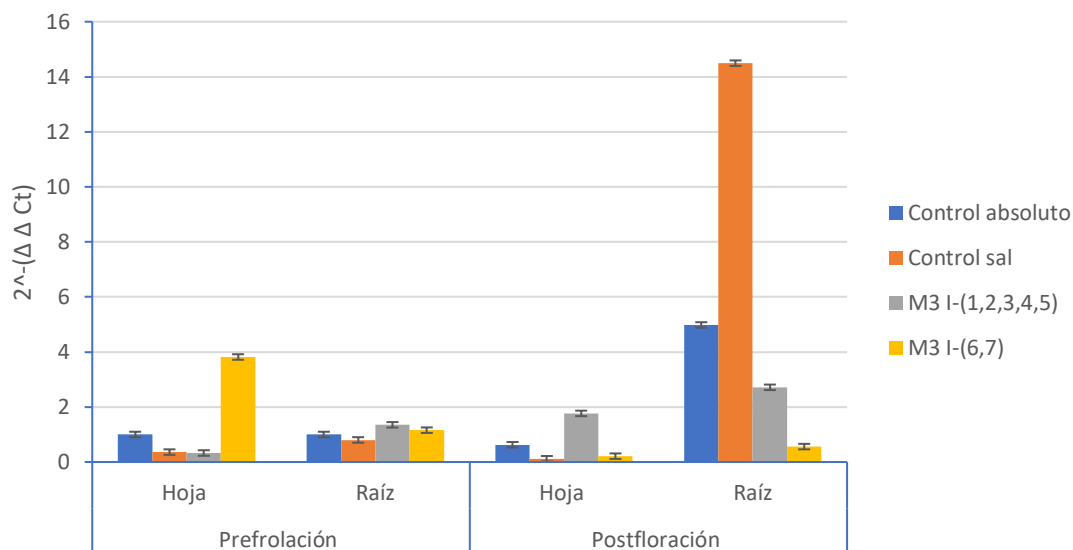


Figura 33. Expresión relativa del gen *CYSB*, en plantas mutantes M3 I bajo estrés salino y plantas control no mutantes con y sin salinidad a los 60 días (prefloración) y a los 75 días (postfloración).

La expresión del gen *SAMDC* en el tejido foliar y radical de los mutantes M3 y de las plantas control de arroz CR5272 con y sin salinidad, antes y después de la floración, se presentan en la Figura 34. El tejido foliar de los mutantes tolerantes M3 I (1, 2, 3, 4, y 5) mostró una expresión similar a los controles absolutos previo a la floración, siendo cercano a 1,0 X, respecto al gen de referencia. Posterior a la floración se mantuvo esta similitud, aunque la expresión se triplicó, respecto al gen de referencia.

La expresión en el tejido radical se vio considerablemente aumentada después de la floración en los controles bajo estrés salino y en los mutantes M3 sensibles a la salinidad (I-6 y I-7), siendo de 3,0 y 3,5 X, respectivamente. La expresión en los mutantes tolerantes a la salinidad del gen *SAMDC*, se mantuvo cercano a 1,0 X tanto antes como después de la floración, siendo ligeramente menor antes de la floración (0,7 X).

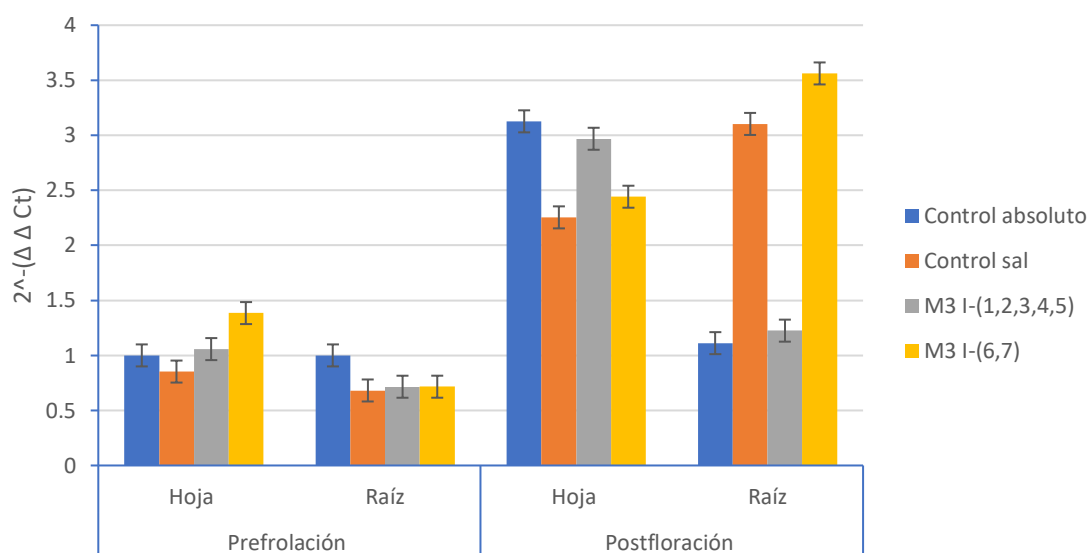


Figura 34. Expresión relativa del gen *SAMDC*, en plantas mutantes M3 I bajo estrés salino y plantas control no mutantes con y sin salinidad antes y después de la floración a los 60 días (prefloración) y a los 75 días (postfloración).

La expresión relativa del gen *SAMS*, mostró una marcada diferencia entre los valores obtenidos antes y después de la floración, como se observa en la Figura 35. Los mutantes sensibles al estrés salino (M3 I-6 y I-7) mostraron una sobreexpresión del gen *SAMS* en el tejido foliar y radical de 3,5 y 8,0 X, respectivamente. La expresión de este gen fue mayor al resto de muestras analizadas y considerablemente por debajo de la expresión del control absoluto luego de la floración en el caso del tejido foliar y manteniéndose similar al control absoluto en el tejido radical, fue menor a 1,0 X en ambos casos.

La expresión del gen *SAMS* en los mutantes tolerantes (M3 I-1 al I-5) fue menor en comparación a la del control absoluto, pero fue similar en la fase de postfloración para el tejido foliar y radical, con un valor menor a 1,0 X en la prefloración y cercano a este valor en la floración.

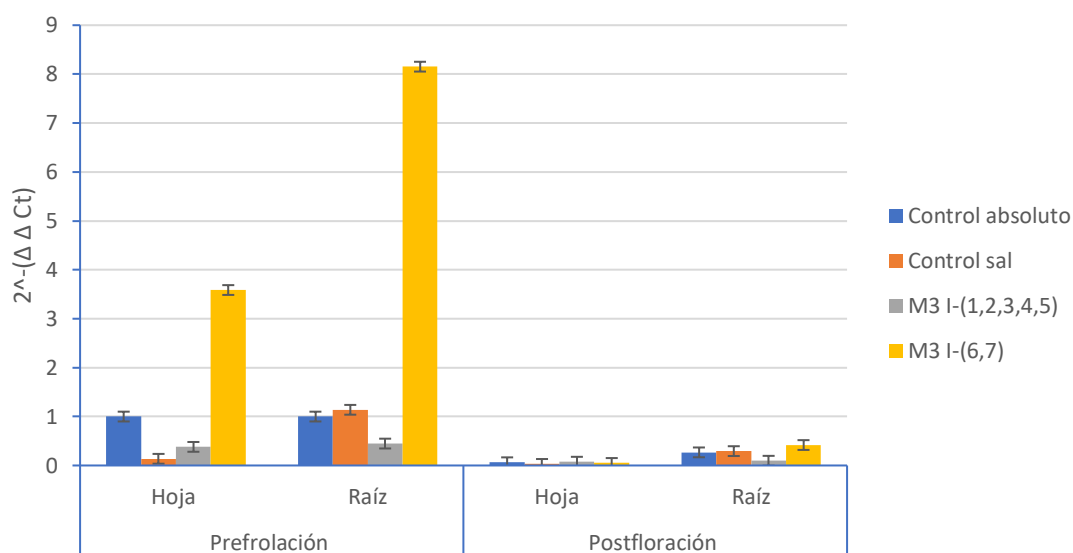


Figura 35. Expresión relativa del gen *SAMS*, en plantas mutantes M3 I bajo estrés salino y plantas control no mutantes con y sin salinidad antes y después de la floración a los 60 días (prefloración) y a los 75 días (postfloración).

Los resultados de la expresión del gen *HKT2* mostraron en las plantas control sin salinidad una disminución de la expresión de 1,0 X en prefloración, a 0,12 y 0,6 X para el tejido foliar y radical luego de la floración. En los tejidos foliares de las plantas control con estrés salino, este gen mostró una expresión casi nula antes de la floración y aumentó a 0,3 X en la postfloración. En el tejido radical de estas plantas se observó un comportamiento contrario al foliar, donde la expresión disminuyó de 0,6 X antes de la floración a 0,3 X después de esta (Figura 36).

Ahora bien, en el tejido foliar de los mutantes sensibles (M3 I-6 y I-7) mostró una sobreexpresión del gen *HKT2* de más del doble antes de la floración y disminuyó a 0,05 X luego de esta fase. Por su parte, el gen *HKT2* en el tejido radical siempre mantuvo una expresión de más de 2,0 X en ambos estadios de desarrollo.

Los mutantes tolerantes a la salinidad expresaron poco este gen antes y después de la floración en el tejido foliar, siendo menor de 0,5 X en la prefloración y 0,09X después de la floración. En el tejido radical de los mutantes M3 tolerantes a la salinidad (M3 I-1 al I-5), se

observó una expresión de 1,2 X prefloración, disminuyendo a 0,9 X postfloración, respecto al gen de referencia.

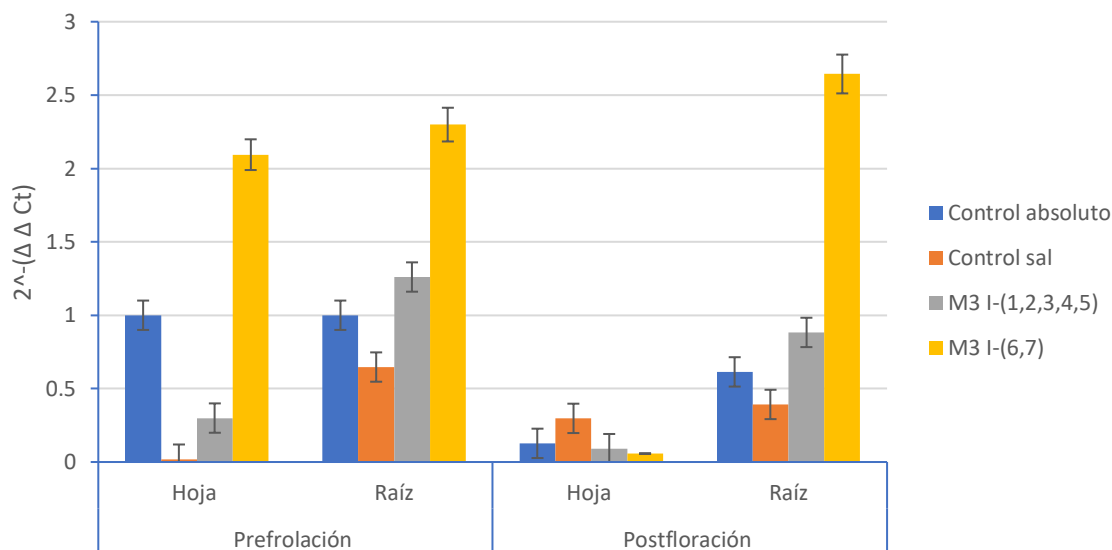


Figura 36. Expresión relativa del gen *HKT2*, en plantas mutantes M3 I bajo estrés salino y plantas control no mutantes con y sin salinidad antes y después de la floración a los 60 días (prefloración) y a los 75 días (postfloración).

Caracterización bioquímica de mutantes M3 sometidos a estrés salino

Estimación del contenido de clorofila *a* y *b* en hojas de mutantes M3 I de arroz sometidos a estrés salino

La estimación de clorofila *a* y *b* mostró una disminución de estas moléculas en las plantas control bajo estrés salino con respecto a los controles de arroz sin estrés salino, como se muestra en la Figura 37. La concentración de clorofila *a* disminuyó un 20 % (1,7 mg/μL a 1,5 mg/μL) en las plantas control al someterse a estrés salino, en comparación a los controles sin estrés salino. Un comportamiento similar se observó en los cambios en la concentración de clorofila *b*, que disminuyó de 0,7 mg/μL a 0,5 mg/μL.

La concentración de clorofila *a* y *b* en los mutantes M3 tolerantes (I-1 al I-5) mostró una mayor concentración respecto a las plantas control no mutante de arroz var. CR5272. Los

mutantes M3 I-4 y I-5 presentaron la mayor concentración (2,5 mg/ μ L) para clorofila *a* en ambos y 0,9 y 1,0 mg/ μ L para clorofila *b*, respectivamente.

Los mutantes sensibles a la salinidad (M3 I-6 y I-7) mostraron los valores más bajos para clorofila *a* y *b*, con valores entre 0,9-1,4 y 0,5-0,6 mg/ μ L, de los 7 mutantes M3 I evaluados. Los valores de clorofila *a* fueron incluso menores a los registrados para los controles bajo estrés salino (1,4 mg/ μ L).

Se observó que la reducción en la concentración conjunta de clorofilas fue de un 20 y 40 % en el control no mutante sometido a estrés salino y los mutantes sensibles a la salinidad (M3 I-6 y I-7), respecto al control no mutante sin estrés salino. En la Figura 37, se pueden observar las diferencias en la concentración conjunta de clorofila *a* y *b*, manteniendo relaciones similares a las observadas en la clorofila *a* y *b* de manera separada.

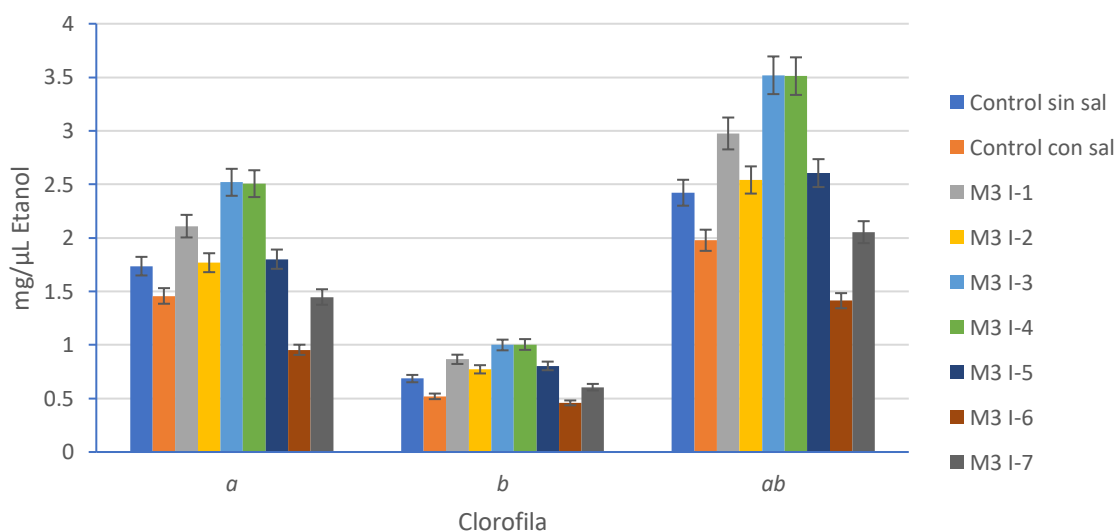


Figura 37. Concentración de clorofila *a*, *b* y *ab* en muestras foliares de arroz bajo condiciones de estrés salino por NaCl de plantas mutantes de arroz M3 I y plantas control no mutantes con y sin estrés salino.

Estimación del contenido de proteínas totales en hojas de mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino

El análisis del laboratorio del CINA, UCR determinó una concentración de $20,04 \pm 0,45$ g/100 g proteínas totales para las plantas control de sin salinidad y $19,01 \pm 0,31$ g/100 g para estas mismas, pero con estrés salino. Las plantas mutantes M3 mostraron una concentración de $20,94 \pm 0,34$ g/100 g en tejido foliar.

Discusión

Selección dosis de radiación para la generación de mutantes de arroz var CR5272

Se observó que la mortalidad de los callos embriogénicos aumentó y la regeneración de estos callos disminuyó, conforme la dosis de radiación aplicada aumentó. Esto se debe a que la dosis de radiación es proporcional al daño causado en el ADN, por lo que en dosis altas se espera un mayor daño que lleven a la célula a la muerte por desórdenes metabólicos o daños irreparables en el genoma. Por otro lado, dosis intermedias generan daños que pueden ser reparados por los mecanismos celulares pero puede incurrir en errores con efectos, relativamente, inocuos para la sobrevivencia de la célula, pero lo suficientemente notorios para tener un efecto en su fenotipo (Hernández-Muñoz et al., 2017).

Los daños mencionados que son causados por la radiación ionizante se definen como determinísticos, ya que son los que están ligados con la dosis y es posible determinar el umbral del efecto según la dosis recibida. Además, estos efectos son visibles de forma inmediata. Por otro lado, están los efectos no determinísticos o estocásticos, que corresponden a lesiones de aparición tardía. Estos efectos pueden ser roturas simples y dobles de la cadena de ADN, así como alteración química y destrucción de nucleótidos. Estas alteraciones se dan a lo largo de todo el genoma de la célula irradiada (Lodish et al., 2016). Además las mutaciones generadas pueden ser dominantes, cuyos efectos se perciben de manera inmediata, o bien ser recesivas, siendo las que requieren más generaciones para poder evaluar el efecto fenotípico (Silvera, 2017). Esto se puede relacionar con los resultados obtenidos ya que se observan rasgos fenotípicos desde la

generación M1 como la tolerancia a la salinidad y rasgos que aparecen en las siguientes generación producto de la recombinación genética, como la variación en la altura de las plantas y la concentración de clorofila.

En trabajos de inducción de mutaciones se han utilizado dosis de radiación gamma donde la sobrevivencia del material se reduce al 50 %, para la generación de mutantes, pero trabajos más recientes como el de Álvarez-Holguín, Corrales-Lerma, Morales-Nieto, Avendaño-Arrazate, & Villarreal-Guerrero (2017), tomaron en cuenta otros parámetros para la elección de la dosis de radiación gamma en varias semillas de gramíneas, entre ellas el arroz, como la capacidad de regeneración de callos embriogénicos y la viabilidad de las plántulas resultantes. Así, seleccionaron dosis entre 300 y 600 Gy para la inducción. Para el caso de semillas de arroz reportaron una dosis de 350 Gy como la dosis idónea para la inducción de mutagénesis ya que se consideró la reducción en un 50 % de la capacidad regenerativa de los callos irradiados. Esta dosis es menor a la reportada como dosis letal media que ronda los 400 Gy (Álvarez-Holguín et al., 2018).

Los callos embriogénicos poseen un mayor contenido de agua en sus células, respecto a las semillas, por lo que las dosis de radiación utilizadas en la mutagénesis son menores debido a los efectos secundarios en el ADN por la ionización de las moléculas de agua. En caña de azúcar se ha determinado que dosis entre 20 y 40 Gy son las adecuadas para la mutagénesis por radiación gamma en callos embriogénicos (Fuchs, González, Castroni, Díaz, & Castro, 2002). En frijol se ha determinado que dosis mayores a 100 Gy reducen considerablemente la capacidad de formación y regeneración de embriones somáticos en callos embriogénicos irradiados, así como su sobrevivencia (Martirena-Ramírez et al., 2015), concordando con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde la reducción en un 40 % en la regeneración de los callos embriogénicos se encontró a los 40 Gy.

Tomando en consideración estos trabajos fue que se seleccionó la dosis de 40 Gy por ser una dosis con un porcentaje de regeneración de alrededor de 60 % y una sobrevivencia del 67 %, para la mutagénesis inducida por radiación gamma en callos embriogénicos de arroz subespecie indica var. CR5272.

Análisis histológicos de los callos embriogénicos de arroz irradiados a distintas dosis de radicación gamma

La apariencia de los callos embriogénicos con coloración crema y verde apreciada en esta investigación es típica de callos embriogénicos de arroz, con una apariencia granular y una coloración crema. Estas observaciones coincidieron con las echas por Vega y colaboradores (2009) de callos embriogénicos de arroz var. CR5272, confirmando la condición embriogénica de los callos obtenidos en este trabajo.

Los resultados obtenidos en el análisis histológico de los callos de arroz muestran células periféricas isodiamétricas de citoplasma denso típicas de células somáticas embrionarias. Además, cerca de las estructuras vacías de células muertas se observaron células alargadas con vacuolas grandes que corresponden a células no embriogénicas (Vega et al., 2009; Fernandez et al., 2017).

Las zonas de células muertas en el centro del tejido callogénico observadas en este trabajo, son similares a las zonas de células muertas por estrés observadas por (Fernandez et al., 2017) en callos de arroz sometidos a estrés hídrico, que aumentaron conforme el estrés hídrico se intensificó. Además, estos autores indican que la zona de muerte celular se extiende desde el centro del callo, manteniendo una capa de células vivas en la periferia. Este resultado es similar a daño celular observado en los callos embriogénicos de arroz al aumentar la dosis de radiación en este estudio.

Selección dosis de trabajo NaCl para simular el estrés salino en plantas de arroz subespecie indica var CR5272

La disminución paulatina en la sobrevivencia y el desarrollo, así como en la regeneración de callos embriogénicos de arroz y de las plantas evaluadas *in vitro*, se debió a que las altas concentraciones de sales como el NaCl generan tanto estrés osmótico como toxicidad iónica, inhibiendo el crecimiento y la división celular (Kumar, Kumar, Kim, Ryu, & Cho, 2013).

Estos efectos negativos se dan porque a la planta le resulta difícil mantener un equilibrio homeostático, sufriendo lo que se conoce como sequía fisiológica, debido al bajo potencial

osmótico del medio, pudiendo llegar a ser, inclusive, menor al de la célula, limitando la absorción de agua. Por otro lado, la alta concentración de iones Na^+ está asociado a perturbaciones de la membrana plasmática y a un desequilibrio metabólico por la competencia con los sitios de enlace del K. Por su parte, el Cl^- en altas concentraciones ocasiona quemaduras en hojas, disminuyendo la actividad fotosintética y absorción de nitratos (Martínez-Villavicencio, López-Alonzo, Basurto-Sotelo, & Pérez-Leal, 2011).

El efecto de potenciamiento en el crecimiento vegetativo en las primeras etapas de regeneración observadas (Figura 4) también conocido como hormesis es un efecto observado cuando una dosis subletal de un compuesto es puesta en contacto con un tejido que desencadena una serie de respuestas morfogénicas para contrarrestar el efecto negativo (Abbas, Nadeem, Tanveer, & Chauhan, 2017). Dentro de los efectos horméticos se pueden mencionar un aumento en el crecimiento vegetativo, en el número de hojas o número de brotes (Martínez-Villavicencio et al., 2011), en arroz se han identificado mecanismos codificados en el genoma involucrados con la respuesta a estrés salino (Reyes et al., 2008), estos mecanismos son los responsables del efecto hormético observado en los callos embriogénicos durante la etapa de regeneración y en las evaluaciones de las *in vitro* plantas sometidas a estrés salino, donde se observó un incremento en la velocidad del desarrollo vegetativo de las plántulas durante la regeneración y en la altura de las plantas sometidas a estrés salino.

Es importante destacar que el efecto hormético no garantiza la sobrevivencia de las plantas afectadas por el estrés (Martínez-Villavicencio et al., 2011), como se observó en las *in vitro* plantas evaluadas en dosis de 200 y 250mM donde se observó el mayor número de brotes por *in vitro* planta, pero aun así el porcentaje de sobrevivencia fue muy bajo.

Selección *in vitro* de mutantes M1V1 a partir de callos embriogénicos irradiados de arroz subespecie indica var. CR5272

La selección *in vitro* en condiciones de salinidad por NaCl mostró la sobrevivencia únicamente de algunos segmentos de callos embriogénicos. Este resultado se debe a que la irradiación generara múltiples mutantes a partir de cada célula del callo, que da a lugar a un proceso mutagénico aleatorio individual. Es decir, solo algunas células obtuvieron una

presunta tolerancia a la salinidad. Además, por esa razón cada planta regenerada de estos embriones es un mutante distinto lo que elimina la aparición de quimeras. Los resultados obtenidos se sustentan con el hecho de que la selección del material tolerante a la salinidad se da una vez iniciado el proceso de regeneración (Suprasanna, Jain, Ochatt, Kulkarni, & Predieri, 2012).

El cultivo *in vitro* ha demostrado ser una metodología útil para la simulación de estrés y la selección de material tolerante (Taleisnik & Lavado, 2017). Además, en arroz se ha demostrado que es una herramienta muy eficiente para la selección de individuos tolerantes al estrés salino como lo demuestra el trabajo realizado por (Pérez & González, 2003), también se puede mencionar el trabajo de González et al (2009), donde lograron obtener un mutante con potencial tolerancia a la salinidad a partir de cultivo *in vitro* de semillas irradiadas con protones. Estos trabajos validan los resultados obtenidos durante la selección *in vitro* de mutantes de arroz tolerante a la salinidad regenerados de callos embriogénicos irradiados a 40 Gy y seleccionados en 150 mM de NaCl.

Selección *ex vitro* y caracterización morfológica de los supuestos mutantes M3 de arroz obtenidos de callos embriogénicos de arroz subespecie indica var. CR5272

En el presente trabajo, la baja tasa de sobrevivencia *ex vitro* de los mutantes sometidos a estrés salino donde solo una línea de 5 sobrevivió a pesar de que estas fueron previamente seleccionados en condiciones *in vitro*, se debe a que algunas deficiencias fisiológicas pueden ser enmascaradas por la técnica de cultivo de tejidos, ya que se presentan condiciones idóneas y controladas para el desarrollo de las plántulas generando un mínimo de estrés fisiológico. Las deficiencias fisiológicas en la regulación osmótica se pueden ver enmascaradas en el cultivo *in vitro* aun cuando el tejido es sometido a estrés salino, ya que las condiciones *in vitro* aún permiten mantener un porcentaje de humedad cercana al 100% reduciendo el efecto del estrés osmótico lo suficiente para que estas plantas sobrevivan. Por lo que al trasladarlas a condiciones *ex vitro* y someterlas a estrés salino estas deficiencias fisiológicas salen a la luz y ocasionan la muerte del mutante (Mendoza-Tovar, 2016). Se ha reportado además, que la radiación acelera la división celular y la actividad de las auxinas, además de modificar la señalización hormonal, así como aumentar la

capacidad antioxidante de las células, permitiendo enmascarar los efectos del estrés generado por la salinidad en *Laelia autumnalis* (Hernández-Muñoz et al., 2017).

El efecto negativo de la alta concentración de sales ocasiona una reducción del desarrollo vegetativo, debido a una disminución del potencial osmótico del medio que genera un efecto de sequía fisiológica, así como una absorción pobre de nutrientes esenciales por interferencia de iones salinos, también se reporta clorosis y reducción de crecimiento radical en varias especies vegetales incluyendo el arroz (Martínez-Villavicencio et al., 2011), lo cual fue observado claramente en las plantas de arroz var CR5272 control bajo estrés salino y en los mutantes M3 sensibles (M3 I-6 y 7) obtenidos en este trabajo.

La reducción en el crecimiento foliar en plantas de arroz bajo estrés salino se ha ligado al mal funcionamiento estomático reportado en la literatura. Los estomas se mantienen cerrados, propiciando al aumento de la temperatura en la hoja, inhibiendo la elongación de estas (Reddy, Kim, Yoon, Kim, & Kwon, 2017), pudiendo explicar la reducción en la elongación foliar observada en este trabajo en las plantas de arroz var CR5272 control bajo estrés salino y en los mutantes M3 sensibles (M3 I-6 I-7). Por otro lado, el exceso de sales también ocasiona la inviabilidad del polen, por lo que a pesar de que algunas plantas control lograron sobrevivir, no les fue posible generar descendencia.

Las plantas de arroz que logran desarrollarse en condiciones de estrés salino, pueden ser consideradas como altamente tolerantes, tolerantes o moderadamente tolerantes dependiendo del daño en los órganos vegetales observado y el retraso en el crecimiento (Bado et al., 2016). Tomando en consideración lo anterior se considera a los mutantes de arroz M3 I-1, I-2, I-3, I-4 y I-5 generados en este trabajo, como mutantes tolerantes ya que, a pesar de presentar daños en hojas viejas, no se observó un retraso en el crecimiento y lograron completar su ciclo fenológico.

Las afirmación de la tolerancia a la salinidad de los mutantes M3 I-1 al I-5, es respaldada por resultados similares reportados en la literatura por Deus et al. (2002) y González et al (2009) para plantas de arroz, donde a pesar del daño foliar por el exceso de sales las plantas tolerantes lograron completar su ciclo fenológico y generar una producción de semilla similar a la obtenida bajo condiciones sin estrés salino.

El comportamiento de los mutantes de arroz M3 identificados como tolerantes (M3 I-1 al 5) coincide como lo reportado en la literatura para plantas de arroz tolerantes a la salinidad, como la muerte de hojas viejas, secreción del exceso de sales y la sobrevivencia de la hoja bandera y hojas jóvenes. Se han descrito mecanismos de exclusión y traslocación de iones más eficientes en las plantas tolerantes que en las plantas sensibles a salinidad, este mecanismo es el responsable de la muerte de hojas viejas por la acumulación de sales para reducir la concentración en hojas jóvenes y en la hoja bandera, garantizando el buen funcionamiento metabólico en estos tejidos. También se ha reportado la secreción del exceso de sales en hojas o en tallos, además de un aumento en el desarrollo radical para aumentar la superficie de absorción y solventar la dificultad de absorción de nutrientes en condiciones salinas (L. M. González, González, & Ramírez, 2002). Estas respuestas metabólicas al estrés salino se deben a los mecanismos de mantenimiento osmótico mediada por el genoma vegetal (Reddy et al., 2017).

La variación observada en las características fenotípicas entre los mutantes M3, aun siendo descendientes de la misma planta madre, se debe a la variación genética propia de la recombinación alélica y generación de organismos heterocigotas. Durante el proceso de meiosis, en la etapa reproductiva, se generan gametos con distinto material genético (mutante y sin mutar) que al combinarse para generar la semilla fértil, generan individuos con combinaciones de alelos distintas y por lo tanto, un comportamiento metabólico y fenotípico distinto (Contreras, Caro, & Quevedo, 2006). Este punto también podría explicar la baja producción de semilla de los mutantes M3 respecto a los controles absolutos, ya que algunas combinaciones de alelos pueden ser deletéreas y originen infertilidad de la panícula, como lo reportado en el trabajo de Zamora-Cruz (2014), en plantas de arroz, donde se determinó que hasta un 24,0 % de infertilidad en la panícula de mutantes obtenidos de semillas de arroz irradiadas a dosis entre 100 y 500 Gy y sembradas en una parcela experimental. También se ha reportado altos porcentajes de infertilidad en el polen en plantas de arroz sensibles a la salinidad. Trabajos como el de Gerona, Deocampo, Egdane, Ismail, & Dionisio-Sese (2019), reportaron reducciones entre un 37 a 50 % de la viabilidad del polen estudiado provenientes de distintas variedades de arroz sometidas a estrés salino.

La segregación fenotípica observada en la población mutante M3 en este trabajo se ha observado y estudiado a detalle en trabajos como el de Cáceres, 2011, donde al evaluar mutantes de tomate generados por EMS, se determinó que aún en la tercera generación filial es posible observar diferencias en el tamaño del fruto y en el desarrollo vegetativo, ocasionadas por la segregación genética. En la investigación de Yu et al (2007) en arroz, se observó segregación en el tamaño, forma y color de la hoja, entre otras características en la M3, así mismo se observó variación genética entre algunas plantas hermanas tanto en el fenotipo como en los patrones de AFLP.

Análisis de AFLP de los mutantes M3 I de arroz

El método AFLP es una técnica confiable con alta repetitividad para la detección de diferencias genéticas en una población determinada. Permite la detección de variaciones en múltiples loci de manera simultánea sin necesidad de tener conocimiento del genoma (Pilling & Rischkowsky, 2010), por lo que permite el uso para la caracterización molecular de mutantes como los del presente trabajo, ya que se desconoce la posición y número de mutaciones, además de que estas están distribuidos en todo el genoma de manera aleatoria. La principal desventaja que presenta esta metodología es que es imposible distinguir si una variación está en estado de hetero u homocigosis, ya que es un marcador molecular de tipo dominante, además de tener una complejidad técnica bastante elevada en comparación con otros marcadores moleculares como los RAPD (Narváez, Valenzuela, Muñoz, & Hinrichsen, 2000).

La metodología de AFLP ha mostrado ser útil para encontrar las diferencias genéticas producidas durante la inducción de mutagénesis, trabajos como los de Kurowska, Labocha-Pawłowska, Gnizda, Maluszynski, & Szarejko (2012) en mutantes de cebada producidos por MNU, así como en mutantes de *Arabidopsis thaliana* inducidos por un haz de iones de baja energía (K. Li, Nie, Zhang, Zhang, & Zhang, 2007). En ambos casos fue posible detectar cambios generados por el proceso mutagénico. En arroz los AFLPs se ha utilizado para el análisis de mutantes con muy buenos resultados como lo demuestra Yu et al. (2007) quienes lograron caracterizar una población mutante de arroz por medio de este marcador. Además, considerando la cantidad de fragmentos de AFLP analizados por Yu et al (479), se puede asegurar que la cantidad de fragmentos analizados (763) en el presente proyecto,

fueron suficientes para lograr una caracterización molecular de las diferencias genéticas de los mutantes M3 I respecto a los controles no mutantes.

Las agrupaciones observadas en el dendograma responden a las diferencias en los fragmentos observados, donde entre mayor es la cantidad de fragmentos únicos de cada grupo mayor es la diferencia genética con el grupo control (plantas de arroz var. CR5272 de semilla certificada), siendo el grupo correspondiente a los mutantes M3 sensibles el que presentó menos diferencias con el grupo control, este tipo de agrupación responde a las distancias genéticas calculadas durante la construcción del dendograma (Pérez-Almeida & Torres, 2011).

Es posible afirmar que la tolerancia a los altos niveles de salinidad observada en algunos mutantes de arroz se deben a cambios de secuencia en genes o factores de transcripción relacionados a la respuesta a estrés salino, reflejados en los fragmentos privados observados gracias a la metodología de AFLP empleada, como lo fue observado en el trabajo de (Titov et al., 2018), donde realizaron una selección fenotípica y genotípica de plántulas de arroz tolerantes a salinidad.

Análisis de los patrones de metilación por MSAP de los mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino

Los cambios en los patrones de metilación es uno de los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de genes durante la respuesta a estrés ambiental, como el estrés ocasionado por la acumulación de sales, en forma específico para los tejidos y la etapa desarrollo en la que se encuentra (Karan, DeLeon, Biradar, & Subudhi, 2012), por ello se observó patrones de metilación distintivos de cada tejido de las plantas mutantes y controles analizadas en el presente trabajo.

La hemimetilación es una marca epigenética involucrada en la metilación de *nov*, a partir de una hebra de ADN metilada molde, por lo que está asociada a la división celular regular y el crecimiento vegetativo (Parejo-Farnés, Aparicio, & Albaladejo, 2019). Gracias a estos estudios es posible asociar el comportamiento del porcentaje de sitios hemimetilados observado en este trabajo con un mayor crecimiento vegetativo de los individuos sometidos a estrés salino, siendo más evidente en el tejido radical de los mutantes tolerantes (M3 I-1

al 5), donde se observó un mayor porcentaje de hemimetilación y un mayor desarrollo radical en condiciones de estrés salino.

En la literatura se reporta que los cambios más significativos en los patrones de metilación son detectados en las raíces de las plantas de arroz sometidas a estrés salino, esto debido a que funcionan como la primera línea de respuesta a este estrés, modificando la expresión génica para regular el metabolismo en aras de reducir los efectos nocivos del exceso de sales (W. Wang et al., 2015), explicando los cambios más evidentes en la metilación completa en los tejidos radicales de las plantas evaluadas en este trabajo.

Los patrones de metilación diferenciales observados en el presente trabajo, pueden deberse a efectos aleatorios y por la falta de repeticiones, no fue posible realizar un ANOVA para separar el efecto de aleatorio del causado por el estrés salino. Esta información es útil para generar una visión panorámica del comportamiento de los individuos analizados, como lo fue demostrado por Bednarek, Orłowska, & Niedziela (2017), así como en el trabajo de García (2017) en *Silene latifolia*, donde se logró una caracterización de dos poblaciones de esta especie vegetal, aunque llegando a la conclusión de la necesidad de metodologías más específicas para lograr una mejor caracterización.

La poca diferenciación entre los patrones de metilación de las plantas mutantes tolerante (M3 I-1 al 5) y sensibles (M3 I-6 y 7) bajo estrés salino, respecto a los controles con y sin salinidad se debe a que estudios en arroz han mostrado que los patrones de metilación pueden no estar, necesariamente, ligados con las condiciones de cultivo bajo estrés salino (Karan et al., 2012). Se ha observado que menos del 10,5 % de los sitios de metilación detectados por la metodología de MSAP, es dependiente del genotipo en plantas de arroz (W. Wang et al., 2015). Es por lo anterior que es necesario enfocar la búsqueda de sitios de metilación específicos para lograr una caracterización más adecuada de los mutantes tolerantes a la salinidad.

Análisis de los cambios de expresión de genes relaciones con la tolerancia a salinidad de mutantes M3 de arroz mediante qRT-PCR

El estudio de numerosos genes de mantenimiento celular (*“housekeeping genes”*) ha demostrado que los niveles de expresión pueden variar según las condiciones a las que es

sometido el tejido, esto es explicado a que estos genes no están implicados únicamente en el mantenimiento de las funciones celulares. El trabajo realizado por Jain, Nijhawan, Tyagi, & Khurana (2006), donde se evaluaron 10 *housekeeping* comúnmente utilizados en ensayos de expresión relativa, entre ellos *ACT*, *UBQ*, *Efa*, y *TUB*, y que los evaluaron en 25 tejidos de arroz bajo distintas condiciones de estrés como de salinidad, sequía y temperatura obtuvieron valores de estabilidad entre 1,0 y 0,3. Ellos determinaron que los valores de estabilidad más aptos para este tipo de ensayos los poseían los genes de *Efa* y *UBQ5*, coincidiendo con los resultados del presente trabajo, donde se determinó que el gen de *Efa* presenta el valor de estabilidad más apto, entre los candidatos evaluados.

La cisteína beta sintasa (*CYSB*), convierte la cisteína en homocisteína, vital para la síntesis de metionina (Mishra et al., 2016), aminoácido involucrado en la respuesta al estrés abiótico, es responsable del retraso en la senescencia de las hojas, en un mayor desarrollo radical y de biomasa (R. Kumar et al., 2018). Se ha reportado una alta expresión de la Cistationina- β sintasa plastídica en líneas tolerantes de arroz (Reddy et al., 2017). Este comportamiento fue observado en el tejido foliar a los tres meses (después de la floración) en los mutantes M3 identificados como tolerantes. Por otro lado, se espera que un metabolismo con desarrollo normal la expresión en raíz de este gen sea menor después de la floración, respecto a la expresión observada antes de la floración (NCBI, 2018b). La expresión observada en el control sal fue opuesta a la reportada, lo que sugiere un descontrol metabólico que culminó con la muerte de estos individuos.

La enzima S-adenosil metionina descarboxilasa (*SAMDC*), se relaciona con la vía de biosíntesis de poliaminas, como la espermidina y espermina, donde la región ascendente del gen desempeña un papel importante en la regulación génica transcripcional y postranscripcional, respondiendo a perturbaciones ambientales, reprimiéndose bajo estrés salino (Mishra et al., 2016). En condiciones sin estrés salino se espera un ligero aumento en la expresión de este gen en tejido radical luego de la floración de plantas de arroz (NCBI, 2018a), como fue observado en los mutantes M3 tolerantes. En los mutantes sensibles y los controles sal se dio una sobreexpresión de hasta 3,5 X, lo que se debe a una respuesta al elevado estrés metabólico que sufren estos individuos buscando la restitución del equilibrio osmótico y la función celular, aunque de manera no efectiva, comportamiento

estudiado en el trabajo de Roy & Wu, 2002, donde observaron el cambio en la expresión de *SAMDC* en plantas de arroz tolerantes y sensibles a estrés salino.

La S-adenosil metionina sintasa (*SAMS*) codifica para la enzima catalizadora de la S-adenosil-L-metionina (AdoMet), a partir de L-metionina. La AdoMet funge como donador de grupos metilo en reacciones de transmetilación, importantes en la síntesis de lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos secundarios; también es requerida para la producción de fenilpropanoides que constituyen la pared celular (Reyes et al., 2008). Se ha reportado en literatura que los niveles de expresión del gen *SAMS* están involucrados en la configuración de la cromatina en plantas de arroz (W. Li, Han, Tao, & Chong, 2011), por la interacción con los niveles de concentración de ácido giberélico y brasinoesteroides (L. Wang et al., 2009). Una sobreexpresión del gen *SAMS* en cultivares susceptibles de arroz al estrés salino se ha reportado por Mishra et al (2016), concordando con lo observado en los mutantes M3 sensibles. La sobreexpresión de este gen lleva a un desequilibrio en la respuesta hormonal, generando un retraso en el crecimiento y en la respuesta al estrés salino adecuada para mantener el funcionamiento celular correcto (Javid, Sorooshzadeh, Moradi, Modarres Sanavy, & Allahdadi, 2011).

El gen *HKT2* codifica para un transportador de membrana de sodio/potasio, con una mayor afinidad por los iones sodio, por lo que en condiciones de estrés salino se dificulta la absorción de potasio del suelo, ya que este gen se expresa mayoritariamente en la raíz (Faye, 2011). Los cambios en los niveles de expresión y selectividad de este gen están estrechamente involucrados en la tolerancia al estrés salino. Los niveles de expresión similares al control absoluto sugieren que el mecanismo de tolerancia de estas plantas es el de mantener un número de transportadores estables evitando así la absorción excesiva de iones de sodio, esto tampoco excluye la posibilidad de un cambio en la selectividad de la enzima de manera que permita la absorción de K^+ aún con altas concentraciones de Na^+ (Oomen et al., 2012), este comportamiento ya ha sido reportado en plantas de arroz tolerantes a la salinidad (Gerona et al., 2019). La sobreexpresión observada del gen *HKT2* tanto en pre como en postfloración en los mutantes susceptibles (M3 I-5 y I-6) es una respuesta inefectiva ante la dificultad de mantener una homeostasis iónica por la falta de absorción de K^+ , como la respuesta que fue estudiada por Huang, Spielmeier, Lagudah, & Munns (2008) en arroz, sorgo y trigo sometidos a estrés salino, donde observaron que en

materiales susceptibles la salinidad sobre expresaron este gen en respuesta a la deficiencia en la absorción de K⁺.

Caracterización bioquímica de mutantes M3 sometidos a estrés salino

Estimación del contenido de clorofila a y b en hojas mutantes M3 I de arroz sometidos a estrés salino

Se ha reportado en la literatura que en variedades de arroz sensibles a la salinidad la concentración de clorofila total se reduce entre un 20 y 50 % cuando la planta enfrenta el estrés salino, siendo la reducción más drástica en las hojas bajas o más viejas (Gerona et al., 2019), este comportamiento fue observado en las plantas control bajo estrés salino por NaCl y en los mutantes sensibles a la salinidad (M3 I-6 y 7) ya que se redujo la concentración entre un 20 y 40 %, a pesar de no tener valores cuantitativos para las hojas más viejas, visualmente se observó un marchitamiento más marcado en las hojas de estas plantas, lo que se traduciría en una menor concentración de clorofila. La baja concentración de clorofila *a* y *b* en los mutantes sensibles, así como en el control sal, respecto al control absoluto, observado en el presente trabajo, se debe a una reducción en la actividad de la biosíntesis de estas moléculas o en el aumento en la actividad de la clorofilasa, por un exceso de iones en las hojas (Mishra et al., 2016).

La poca concentración de clorofila en las hojas se traduce en poca energía metabólica que a largo plazo lleva a la senescencia prematura de las hojas y a una debilidad general del organismo que culmina con la muerte de este (Amirjani, 2011), como se observó en este trabajo en los controles sal y en los mutantes M3 sensibles a la salinidad, siendo más evidente en estos últimos.

El mayor contenido de clorofila en los mutantes M3 I-3 y M3 I-4 se debe a una respuesta a la alta demanda energética que representa combatir el estrés salino, concordando con las evaluaciones realizadas por Ashraf & Bhatti (2000) en hojas de arroz sometido a estrés salino. Además se ha descrito que un mecanismo muy recurrente en la tolerancia a la salinidad en arroz, es el aumento de la actividad fotosintética, que responde a una mayor concentración de pigmentos fotosintéticos (Nounjan et al., 2018), como las altas

cuantificaciones observadas en las plantas de arroz mutantes M3 tolerantes a estrés salino (M3 I-1 al I-5).

Estimación del contenido de proteínas totales en hojas de mutantes de arroz M3 sometidos a estrés salino

La disminución de la cantidad de proteínas totales de las plantas de arroz control sometidas a estrés salino, respecto al control absoluto, observado en este trabajo, se debe a cambios en procesos celulares que son afectados por el estrés osmótico o la alta concentraciones de iones ocasionados por la salinidad. Se plantea que procesos que implica la síntesis activa de proteínas como la división celular se reducen, así como otros procesos como los involucrados en la respuesta a estrés sufren una sobreexpresión de los genes involucrados, como de enzimas antioxidantes, ATPasas, transportadores iónicos y acuaporinas (Lamz-Piedra et al., 2013).

En este trabajo la concentración de proteínas totales de los mutantes M3 tolerantes es similar a los controles sin salinidad y mayor que la cuantificada en los controles con salinidad. Esto muestra que el organismo de estas plantas a pesar de sufrir un efecto negativo derivado del estrés salino, reflejado en el marchitamiento parcial de las hojas jóvenes y total de las hojas viejas, muestra que estas plantas presentan un mecanismo de respuesta, como la reducción del daño oxidativo o traslocación del exceso de sales para reducir la toxicidad iónica, lo suficientemente efectivo para lograr sobrellevar estos efectos negativos y lograr un desarrollo comparable a los controles absolutos (Jamil et al., 2012).

Conclusiones

La dosis de 40 Gy fue efectiva para la generación de variabilidad genética, evidenciado por los cambios en los patrones de AFLP de los mutantes M3.

El ensayo de MSAP no fue concluyente por la falta de repeticiones, pero fue posible detectar ligeros cambios en los porcentajes de metilación de lo mutantes tolerantes respecto a los controles y mutantes sensibles.

El análisis de expresión relativa mostró diferencias en los niveles de expresión de los genes *CYSB*, *SAMDC*, *SAMS* y *HKT2* para las muestras evaluadas, mostrando niveles de expresión para los mutantes tolerantes y sensibles, comparables con los reportados en la literatura.

La caracterización bioquímica mostró una mayor concentración de clorofila en los mutantes tolerantes, así como una mayor concentración de proteínas totales en tejido foliar, respecto a las plantas control de arroz con y sin estrés salino.

Se lograron obtener 5 plantas mutantes M3 hermanas tolerantes de la línea I, así como una caracterización molecular y bioquímica de estos, concordante con lo reportado en la literatura para líneas tolerantes al estrés salino. Así mismo, se obtuvieron mutantes M3 de la línea I con una mayor sensibilidad aparente a la salinidad que permitieron comparar el comportamiento entre los controles no mutantes, individuos tolerantes y sensibles.

Recomendaciones

El autor recomienda continuar con la reproducción de los mutantes identificados como tolerantes para realizar pruebas en condiciones de altas temperaturas y sequía, además del material que resultó susceptible en otras condiciones agroambientales. Al contar con mayor material también se recomienda volver a realizar los ensayos de MSAP para lograr diferenciar los efectos aleatorios de los causados por el estrés salino simulado en los patrones de metilación.

Se recomienda también, realizar la caracterización molecular y bioquímica de las plantas mutantes M3 tolerantes de manera individual para poder realizar una mejor caracterización de estos individuos.

El uso de distintos análisis para la caracterización de los mutantes tolerantes, como la determinación de la concentración de prolina y glicina, permitirá una diferenciación más evidente entre las plantas control y los mutantes.

También, es pertinente realizar pruebas de campo con el material seleccionado, para evaluar su comportamiento en condiciones menos controladas y detectar cambios

fenotípicos y fenológicos que pudieron verse enmascarados en el cultivo hidropónico en invernadero.

Bibliografía

Abbas, T., Nadeem, M. A., Tanveer, A., & Chauhan, B. S. (2017). Can hormesis of plant-released phytotoxins be used to boost and sustain crop production? *Crop Protection*, 93, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.020>

Álvarez-Holguín, A., Corrales-Lerma, R., Morales-Nieto, C. R., Avendaño-Arrazate, C. H., & Villarreal-Guerrero, F. (2017). Optimal dose of gamma irradiation with ⁶⁰Co for mutagenesis induction in grasses. *Nova Scientia*, 9(19), 65-82. <https://doi.org/10.21640/ns.v9i19.886>

Álvarez-Holguín, A., Morales-Nieto, C. R., Avendaño-Arrazate, C. H., Santellano-Estrada, E., Melgoza-Castillo, A., Burrola-Barraza, M. E., & Corrales-Lerma, R. (2018). Dosis letal media y reducción media del crecimiento por radiación gamma en pasto africano (*Eragrostis lehmanniana* Ness). *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 5(13), 81-88.

Amirjani, M. R. (2011). Effect of Salinity Stress on Growth, Sugar Content, Pigments and Enzyme Activity of Rice. *International Journal of Botany*, 7(1), 73-81. <https://doi.org/10.3923/ijb.2011.73.81>

Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245-5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>

Araya, E., Murillo, O., Aguilar, G., & Rocha, O. (2005). Uso de marcadores genéticos en silvicultura clonal. *Kurú: Revista Forestal*, 2(6).

Arnon, D. I. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>

Ashraf, M. Y., & Bhatti, A. S. (2000). Effect of salinity on growth and chlorophyll content in rice. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 43(2), 130-131.

Bado, S., Forster, B. P., Jankowicz-Cieslak, J., Ghanim, A., Günter, B., Luxiang, L., & Springer International Publishing AG. (2016). *Protocols for Pre-Field Screening of Mutants for Salt Tolerance in Rice, Wheat and Barley*. Recuperado de <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:1111-20160223192>

Bai, C., Rivera, S. M., Medina, V., Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., ... Zhu, C. (2014). An in vitro system for the rapid functional characterization of genes involved in carotenoid biosynthesis and accumulation. *The Plant Journal*, *77*(3), 464-475. <https://doi.org/10.1111/tpj.12384>

Bayo, N. A. (2001). *Reacción celular ante la radiación*. 4.

Bednarek, P. T., Orłowska, R., & Niedziela, A. (2017). A relative quantitative Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) method for the analysis of abiotic stress. *BMC Plant Biology*, *17*. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1028-0>

Bennett, J., Hondred, D., & Register, J. C. (2015). Keeping qRT-PCR rigorous and biologically relevant. *Plant Cell Reports*, *34*(1), 1-3. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1692-6>

Borges, A., Tsai, S. M., & Caldas, D. G. G. (2012). Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, *31*(5), 827-838. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1204-x>

Cáceres, A. (2011). *Caracterización fenotípica y genética de mutantes EMS de tomate (Lycopersicon esculentum L.)* (Mestría en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria, Universidad de Almería). Recuperado de <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/389/CARACTERIZACION%20FENOTIPICA%20Y%20GENETICA%20DE%20MUTANTES%20EMS%20DE%20TOMATE-CACERES%20BURBANO%20ANDRES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

CAEBIS. (2015). Cobalto-60 - EcuRed. Recuperado 25 de junio de 2018, de Cobalto-60 website: <https://www.ecured.cu/Cobalto-60>

Campos-Gorgona, N. (2013). *Aislamiento y caracterización del gen de la transglutaminasa de arroz (Oryza sativa)* (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona, España.

Carena, M. J. (2009). *Cereals*. Springer Science & Business Media.

Chaudhary, R. C., Nanda, J. S., & Tran, D. V. (2003). *Guía para identificar las limitaciones de campo en la producción de arroz*. Roma: FAO.

CONARROZ. (2018). *Informe anual estadístico período 2017-2018* (p. 57) [Anual]. Recuperado de CONARROZ website: https://www.conarroz.com/UserFiles/File/INFORME_ANUAL_ESTADISTICO-PERODO_2017%202018.pdf

Contreras, Á. B., Caro, Y. P., & Quevedo, L. A. (2006). *Guía para la inducción de mutaciones en el mejoramiento genético del arroz*. Recuperado de <https://www.librosyeditores.com/tiendalemoine/agronomia/1461-guia-para-la-induccion-de-mutaciones-en-el-mejoramiento-9588247578.html>

Cubero, J. I. (2013). *Introducción a la mejora genética vegetal* (3a ed.). España: Mundi-Prensa Libros.

De Souza, M. da G., Fernandes, N., Dejalma, P., Meneghello, G. E., Ferrari, C., & Rodrigues, C. (2014). Detection of genes providing salinity-tolerance in rice. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 36(1), 79-85. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v36i1.15437>

Deus, J. E., Pérez, R., Alfonso, R., Avila, J., Hernández, J. L., & Pérez, A. V. (2002). Resultados del programa de mejoramiento genético del arroz (*Oryza sativa* L.) en Vuba durante el período 93-97. *Revista Grano*, 3(1), 6.

Faye, J. (2011). *Role and control of HKT in Oryza sativa & Arabidopsis thaliana* (Doctor of Philosophy, University of Adelaide). Recuperado de <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/68832/8/02whole.pdf>

Fenoll, C., & Candelas, F. G. (2010). *Transgénicos*. Editorial CSIC - CSIC Press.

Fernandez, R., Ramírez, P., Silva, J., Storaci, V., Cuamo, L., De Guglielmo, Z., & Smits, G. (2017). Establecimiento de un sistema de selección in vitro de variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.) resistentes al hongo *Pyricularia grisea*. *Acta Biológica Colombiana*, 22(1), 85. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n1.56933>

Franquet-Bernis, J. M., & Borràs-Pàmies, C. (2004). Variedades y mejora del arroz: *Oryza sativa*, L. Tortosa: Els autors.

Fuchs, M., González, V., Castroni, S., Díaz, E., & Castro, L. (2002). Efecto de la radiación gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos¹. *Agronomía Tropical*, 52(3), 311-324.

Fulneček, J., & Kovařík, A. (2014). How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics*, 15(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-2>

Gallego, A. (2014). *Efectos Biológicos de las radiaciones ionizantes*. Recuperado de https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-19202/Efectos%20de%20las%20RI_UCM_27%20nov%202014_A%20Real_.pdf

García, M. (2017). *¿Diferencias genéticas o epigenéticas entre poblaciones de «Silene latifolia» sometidas a condiciones litorales y continentales?* Recuperado de <http://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/19602>

García, R. (1993). *Laboratorio de anatomía patológica*. España: McGraw Hill.

García-Arias, A. C. (2011). *Transformación del genoma de arroz (Oryza sativa L.) con el gen vip3A de Bacillus thuringiensis para conferir tolerancia a Spodoptera frugiperda (J.E. SMITH)*. (Maestría). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Gerona, M. E. B., Deocampo, M. P., Egdane, J. A., Ismail, A. M., & Dionisio-Sese, M. L. (2019). Physiological Responses of Contrasting Rice Genotypes to Salt Stress at Reproductive Stage. *Rice Science*, 26(4), 207-219. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.05.001>

González, L. M., González, M. C., & Ramírez, R. (2002). Aspecto generales sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas cultivadas. *Cultivos Tropicales*, 23(2), 27-37.

González, M. C., Pérez, N., & Cristo, E. (2009). Gines: Primer mutante de arroz obtenido a partir de la irradiación con protones. *Cultivos Tropicales*, 30(3), 59-59.

Guzmán-Bermúdez, D. (2006). *Manejo agronómico del cultivo de arroz (Oryza sativa L.) Sembrado bajo riego en finca Ranchos Horizonte; Cañas, Guanacaste, Costa Rica.* (Bachillerato en Ingeniería en Agronomía). Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.

Hernández-Muñoz, S., Pedraza-Santos, M. E., López, P. A., Cruz-Torres, E. D. L., Fernández-Pavía, S. P., Martínez-Palacios, A., ... Martínez-Trujillo, M. (2017). Determinación de la DL50 Y GR 50 con rayos gamma (60Co) en protocormos de *Laelia autumnalis* in vitro. *Agrociencia*, 51(5), 507-524.

Huang, S., Spielmeier, W., Lagudah, E. S., & Munns, R. (2008). Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na⁺ transport, and salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 59(4), 927-937. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern033>

IAEA. (2018). Mutant Variety Search. Recuperado 19 de noviembre de 2018, de Mutant Variety Search website: [https://mvd.iaea.org/#!/Search?page=1&size=15&sortby=Name&sort=ASC&Criteria\[0\]\[field\]=LatinName&Criteria\[0\]\[val\]=109](https://mvd.iaea.org/#!/Search?page=1&size=15&sortby=Name&sort=ASC&Criteria[0][field]=LatinName&Criteria[0][val]=109)

IBPGR-IRRI. (1980). *Descriptors for Rice, Oryza Sativa L.* Philippines: Int. Rice Res. Inst.

Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K., & Khurana, J. P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2), 646-651. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.140>

Jamil, M., Bashir, S., Anwar, S., Bibi, S., Bangash, A., Ullah, F., & Rha, E. S. (2012). Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 7-13.

Javid, M. G., Sorooshzadeh, A., Moradi, F., Modarres Sanavy, S. A. M., & Allahdadi, I. (2011). The Role of Phytohormones in Alleviating Salt Stress in Crop Plants. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), 726.

Karan, R., DeLeon, T., Biradar, H., & Subudhi, P. K. (2012). Salt Stress Induced Variation in DNA Methylation Pattern and Its Influence on Gene Expression in Contrasting Rice Genotypes. *PLOS ONE*, 7(6), e40203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040203>

Kumar, K., Kumar, M., Kim, S.-R., Ryu, H., & Cho, Y.-G. (2013). Insights into genomics of salt stress response in rice. *Rice*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-6-27>

Kumar, R., Subba, A., Kaur, C., Ariyadasa, T. U., Sharan, A., Pareek, A., ... Singla-Pareek, S. L. (2018). OsCBSCBSPB4 is a Two Cystathionine- β -Synthase Domain-containing Protein from Rice that Functions in Abiotic Stress Tolerance. *Current Genomics*, 19(1), 50-59. <https://doi.org/10.2174/1389202918666170228141706>

Kurowska, M., Labocha-Pawłowska, A., Gnizda, D., Maluszynski, M., & Szarejko, I. (2012). Molecular analysis of point mutations in a barley genome exposed to MNU and gamma rays. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 738-739, 52-70. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.08.008>

Lamz-Piedra, A., Reyes-Guerrero, Y., & Cepero-González, M. (2013). Indicadores bioquímicos para la selección temprana de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) con tolerancia a la salinidad. *Cultivos Tropicales*, 34(1), 11-17.

Latimer, G. W. (Ed.). (2019). *AOAC Official Methods of Analysis* (21.^a ed., Vols. 1–3). Recuperado de https://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imis/AOAC_Member/Pubs/OMA/AOAC_Official_Methods_of_Analysis.aspx?WebsiteKey=2e25ab5a-1f6d-4d78-a498-19b9763d11b4&hkey=5142c478-ab50-4856-8939-a7a491756f48&New_ContentCollectionOrganizerCommon=3#New_ContentCollectionOrganizerCommon

Li, K., Nie, Y., Zhang, D., Zhang, J., & Zhang, G. (2007). AFLP Analysis of Arabidopsis Thaliana Treated by Low-Energy Ion Beam. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 35(2), 454-459. <https://doi.org/10.1109/TPS.2007.893267>

Li, W., Han, Y., Tao, F., & Chong, K. (2011). Knockdown of SAMS genes encoding S-adenosyl-l-methionine synthetases causes methylation alterations of DNAs and histones and leads to late flowering in rice. *Journal of Plant Physiology*, 168(15), 1837-1843. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.05.020>

Lillie, R. (1977). *Biological Stains*. Estados Unidos de América: The Williams & Wilking Company.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., ... Scott. (2016). *Biología celular y molecular* (7.ª ed.). Ed. Médica Panamericana.

Lu, G., Wu, X., Chen, B., Gao, G., Xu, K., & Li, X. (2006). Detection of DNA methylation changes during seed germination in rapeseed (*Brassica napus*). *Chinese Science Bulletin*, 51(2), 182-190. <https://doi.org/10.1007/s11434-005-1191-9>

Martínez-Villavicencio, N., López-Alonzo, C., Basurto-Sotelo, M., & Pérez-Leal, R. (2011). Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo. *Tecnociencia*, 5(3), 156-161.

Martirena-Ramírez, A., Veitía, N., García, L. R., Collado, R., Torres, D., Rivero, L., & Ramírez-López, M. (2015). Efecto de radiaciones gamma ⁶⁰Co sobre la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar «ICA Pijao» vía organogénesis indirecta. *Biotecnología Vegetal*, 15(4). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/498>

Mendoza-Tovar, J. A. (2016). *Algunas características fisiológicas de plantas de vid variedad Pedro Ximénez en el proceso de aclimatación al exterior tras su propagación in vitro* (Trabajo Fin de Grado, Universidad de Sevilla). Recuperado de <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/49054>

Menéndez, F. (2008). *Higiene industrial: manual para la formación del especialista* (7ma ed.). Recuperado de <https://www.casadellibro.com/libro-higiene-industrial-manual-para-la-formacion-del-especialista-7-ed/9788484068730/1190998>

Mishra, P., Mishra, V., Takabe, T., Rai, V., & Singh, N. K. (2016). Elucidation of salt-tolerance metabolic pathways in contrasting rice genotypes and their segregating progenies. *Plant Cell Reports*, 35(6), 1273-1286. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1959-1>

Montes de Oca, P., Mata, R., & Chaves, M. A. (1996). Estudios de salinidad en la provincia de Guanacaste (Costa Rica) y caracterización de algunos suelos con influencia salina. *AGRONOMIA MESOAMERICANA*, 7(2), 77-83.

Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Narváez, C., Valenzuela, J., Muñoz, C., & Hinrichsen, P. (2000). Comparación de RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de vid basados en el estudio de fragmentos genómicos anónimos. *Agricultura Técnica*, 60(4), 320-340. <https://doi.org/10.4067/S0365-28072000000400002>

NBRP-Rice. (2018). Rice Database Oryzabase. Recuperado 20 de junio de 2018, de <https://shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/>

NCBI. (2018a). LOC4329955 S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme-like [*Oryza sativa Japonica* Group (Japanese rice)].

NCBI. (2018b). LOC4346410 CBS domain-containing protein CBSX1, chloroplastic [*Oryza sativa Japonica* Group (Japanese rice)]. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Os09g0115500>

Niazi, A., Ramezani, A., & Dinari, A. (2014). GSTF1 Gene Expression Analysis in Cultivated Wheat Plants under Salinity and ABA Treatments. *Molecular Biology Research Communications*, 3(1), 9-19.

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559-1582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236>

Nounjan, N., Chansongkrow, P., Charoensawan, V., Siangliw, J. L., Toojinda, T., Chadchawan, S., & Theerakulpisut, P. (2018). High Performance of Photosynthesis and Osmotic Adjustment Are Associated With Salt Tolerance Ability in Rice Carrying Drought Tolerance QTL: Physiological and Co-expression Network Analysis. *Frontiers in Plant Science*, 9(1135). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01135>

Oomen, R. J. F. J., Benito, B., Sentenac, H., Rodríguez-Navarro, A., Talón, M., Véry, A.-A., & Domingo, C. (2012). HKT2;2/1, a K⁺-permeable transporter identified in a salt-tolerant rice cultivar through surveys of natural genetic polymorphism. *The Plant Journal*, 71(5), 750-762. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05031.x>

Pabón-Calderón, L. A. (2011). *Inducción de mutaciones mediante radiaciones gamma de (Passiflor edulis Sim var. edulis)* (Magister en Ciencias en Biología). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Pardo, A. A. (2015). Mutagénesis inducida en microbulbos de *Allium sativum* L. *Acta Agronómica*, 64(3), 254-259. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n3.44792>

Parejo-Farnés, C., Aparicio, A., & Albaladejo, R. G. (2019). An approach to the ecological epigenetics in plants. *Ecosistemas*, 28(1), 69-74. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1605>

Peralta-Pérez, M. del R., & Volke-Sepúlveda, T. L. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 75-88.

Pérez, P. O., & González, P. L. P. (2003). Caracterización in vitro de la respuesta al NaCl en callos en las fases de multiplicación y regeneración de varios genotipos de arroz.

Pérez-Almeida, I., & Torres, E. (2011). Diversidad genética entre cultivares de arroz de Venezuela con base a la estimación del coeficiente de parentesco y análisis con marcadores moleculares microsatélites (SSR). *INTERCIENCIA*, 36(7), 545-551.

Pilling, D., & Rischkowsky, B. (2010). *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura: Informe*. Roma: FAO.

Prophet, E., Mills, B., Arrington, J., & Sobin, L. (1995). *Métodos histotecnológicos*. Estados Unidos de América: Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América.

Pushpalatha, G., & Harish Kumar, G. (2018). Gene expression analysis reveals diversified responsiveness to salt stress in rice genotypes. *Indian Journal of Plant Physiology*, 23(4), 833-843. <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0424-2>

Reddy, I. N. B. L., Kim, B.-K., Yoon, I.-S., Kim, K.-H., & Kwon, T.-R. (2017). Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches. *Rice Science*, 24(3), 123-144. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.09.004>

Reyes, Y., Mazorra, L. M., & Núñez, M. (2008). Del arroz al estrés salino y su relación con los brasinoesteroides. *Cultivos Tropicales*, 29(4), 67-65.

Roy, M., & Wu, R. (2002). Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. *Plant Science*, 163(5), 987-992. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00272-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00272-8)

Sanchez-Serrano, J. J., & Salinas, J. (Eds.). (2014). *Arabidopsis Protocols* (3.^a ed.). Recuperado de <https://www.springer.com/us/book/9781627035798>

Sandoval, E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. México: UNAM.

Shu, Q. Y., Forster, B. P., & Nakagawa, H. (Eds.). (2011). *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i2388e.pdf>

Sigma-Aldrich. (2018). Quantitative PCR [PCR Technologies Guide]. Recuperado 15 de febrero de 2019, de Sigma-Aldrich website: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/quantitative-pcr.html>

Silvera, B. (2017). Mutaciones mediante radiaciones gamma en arroz. *Observatorio Economía Latinoamericana*. Recuperado de <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/ec/2017/mutaciones-arroz-ecuador.html>

Suarez, E. (2006). *Mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones. I Curso de capacitación en mejoramiento genético de arroz, Cuba*.

Suprasanna, P., Jain, S. M., Ochatt, S. J., Kulkarni, V. M., & Predieri, S. (2012). Applications of in vitro techniques in mutation breeding of vegetatively propagated crops. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*, 371-385.

Taleisnik, E., & Lavado, R. S. (Eds.). (2017). *Ambientes salinos y alcalinos de la Argentina: Recursos y aprovechamiento productivo* (Primera edición). [Córdoba, Argentina]: Buenos Aires, Argentina: Universidad Católica de Córdoba, Universidad Jesuita; Orientación Gráfica Editora.

Tinoco-Mora, R., & Acuña-Chinchilla, A. (2009). *Manuel de recomendaciones técnicas: Cultivo de Arroz (Oryza sativa)*. Recuperado de http://www.platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/2018/Cultivo_de_arroz_Tinoco_2009_min_edited.pdf

Titov, S., Bhowmik, S. K., Islam, M. M., Siddika, A., Sultana, S., & Haque, M. S. (2018). Phenotypic and genotypic screening of rice genotypes at seedling stage for salt tolerance | Selección fenotípica y genotípica de genotipos de arroz para tolerancia a la salinidad en la etapa de plántulas. *UDO Agrícola*, 9(4). Recuperado de <http://ojs.udo.edu.ve/index.php/udoagricola/article/view/3169>

Vega, R., Vásquez, N., Espinoza, A. M., Gatica, A. M., & Valdez-Melara, M. (2009). Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* CR. 5272). *Revista de Biología Tropical*, 57, 141-150.

Villalobos, F. J. (2009). *Fitotecnia: Bases y tecnologías de la producción agrícola*. Madrid: Mundi-Prensa.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., ... Kuiper, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414.

Wang, L., Wang, Z., Xu, Y., Joo, S.-H., Kim, S.-K., Xue, Z., ... Chong, K. (2009). OsGSR1 is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice. *The Plant Journal*, 57(3), 498-510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03707.x>

Wang, W., Huang, F., Qin, Q., Zhao, X., Li, Z., & Fu, B. (2015). Comparative analysis of DNA methylation changes in two rice genotypes under salt stress and subsequent recovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(4), 790-796. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.089>

Wang, Z., & Jia, Y. (2014). 16. Development and characterization of rice mutants for functional genomic studies and breeding. *Mutagenesis: exploring novel genes and pathways*, 307-332. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-787-5_16

Yoshida, Shou., Forno, D. A., Cock, J. H., & Gomez, K. A. (1976). *Laboratory Manual For Physiological Studies Of Rice* (3.^a ed.). Philippines: IRRI.

Yu, X., Wu, H., Wei, L. J., Cheng, Z. L., Xin, P., Huang, C. L., ... Sun, Y. Q. (2007). Characteristics of phenotype and genetic mutations in rice after spaceflight. *Advances in Space Research*, 40(4), 528-534. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2007.06.022>

Yusuff, O., Rafii, M., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., A. Rahim, H., ... Usman, M. G. (2015). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 1-16. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1087333>

Zamora-Cruz, E. M. (2014). *Efecto de cinco niveles de radiación gamma en el cultivo de arroz (Oryza sativa L.)* (Tesis de Grado). Universidad Técnica de Babahoyo, Ecuador.

Zheng, X., Chen, L., Li, M., Lou, Q., Xia, H., Wang, P., ... Luo, L. (2013). Transgenerational variations in DNA methylation induced by drought stress in two rice varieties with distinguished difference to drought resistance. *PloS One*, 8(11), 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080253>

Anexos

Anexo 1. Composición de la solución hidropónica utilizada para el cultivo de arroz.

Solución	Reactivo	cantidad/5 L
1	NH_4NO_3	457 g
2	$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$	201,5 g
3	K_2SO_4	357 g
4	CaCl_2	443 g
5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1620 g
6	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7,5 g
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,37 g
	H_3BO_3	4,67 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,175 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,155 g
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	38,5 g
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	59,5 g
	1 M H_2SO_4	250 mL

Fuente: (Yoshida, Forno, Cock, & Gomez, 1976).

De cada solución se añadieron 37,5 mL para cada recipiente de 30 L y se completó el volumen con agua.

Anexo 2. Medidas morfológicas tomadas de las plantas de arroz mutantes M1 y M2 de las líneas I, II, IV y V así como el promedio de plantas control.

M1								
ID	Promedio lígula (cm)	Promedio largo Culm (cm)	Promedio número de Culm	Promedio ancho Culm (cm)	Promedio largo hoja (cm)	Promedio ancho hoja (cm)	Promedio número de brotes	Días para la floración
Control	2,7	19,6	3,2	0,4	60,0	1,6	5,5	75
I	2,5	20,0	3,0	0,4	62,9	1,9	3,0	75
II	2,8	20,3	3,7	0,5	48,8	1,5	1,8	75
IV	2,2	16,6	3,1	0,5	51,0	1,2	1,9	72
V	2,7	19,1	3,3	0,4	42,4	1,7	1,4	72
M2								
	Promedio lígula (cm)	Promedio largo Culm (cm)	Promedio número de Culm	Promedio ancho Culm (cm)	Promedio largo hoja (cm)	Promedio ancho hoja (cm)	Promedio número de brotes	Días para la floración
Control	2,7	19,6	3,2	0,4	60,4	1,6	5,4	72
I	2,5	20,0	3,0	0,4	60,0	1,9	3,0	75
II	2,8	20,3	3,7	0,5	69,0	1,5	5,0	75
IV	2,2	16,6	3,1	0,5	56,0	1,2	6,4	70
	2,7	19,1	3,3	0,4	65,8	1,7	5,3	72

Anexo 3. Apariencia de las plantas de arroz control con y sin salinidad y mutantes M3 I.



Anexo 4. Concentración (ng/ μ L) y relación 260/280 de las extracciones de ADN y ARN.

ID	ADN		ARN	
	Concentración (ng/ μ L)	260/280	Concentración (ng/ μ L)	260/280
Hojas mutantes tolerantes a salinidad (prefloración)	1481,4	2,02	1084,9	1,95
Raíces mutantes tolerantes a salinidad (prefloración)	479,0	1,97	342,6	1,96
Hojas mutantes sensibles a salinidad (prefloración)	551,8	1,99	342,1	2,08
Raíces mutantes sensibles a salinidad (prefloración)	369,7	1,96	73,3	1,98
Hoja control sin salinidad (prefloración)	1922,3	2,06	835,1	2,06
Raíz control sin salinidad (prefloración)	414,7	1,99	140,3	2,05
Hoja control con salinidad (prefloración)	1143,7	2,00	366,5	2,11
Raíz control con salinidad (prefloración)	293,2	1,94	87,4	2,07
Hojas mutantes tolerantes a salinidad (prefloración)	2230,1	1,85	1037,2	2,06
Raíces mutantes tolerantes a salinidad (post floración)	555,6	1,94	154,3	1,81
Hojas mutantes sensibles a salinidad (post floración)	943,1	1,92	551,1	1,99
Raíces mutantes sensibles a salinidad (post floración)	539,1	1,92	141,5	1,69
Hoja control sin salinidad (post floración)	1953,8	1,92	1548,8	1,83
Raíz control sin salinidad (post floración)	259,5	1,98	197,6	1,68
Hoja control con salinidad (prefloración)	843,6	1,93	511,5	2,01
Raíz control con salinidad (prefloración)	623,5	1,90	73,3	1,86

Anexo 5. Cambios en los patrones de metilación observados en controles y mutantes con y sin estrés salino.

Tipo de banda MSAP	Control		Mut (1,2,3,4,5)		Mut (6,7)	
	Control	Sal	Control	Sal	Control	Sal
A. Hoja						
I	1046	1021	1026	1123	1046	1107
II	499	474	494	591	549	610
III	353	422	438	535	351	412
IV	194	125	94	3	146	85
Total de bandas amplificadas	2092	2042	2052	2252	2092	2214
% Metilación	41,56	39,67	39,33	38,25	41,61	40,70
% Bandas con metilación completa	26,15	26,79	25,93	23,89	23,76	22,45
%Bandas hemimetiladas	23,85	23,21	24,07	26,24	26,24	27,55
B. Raíz						
I	951	993	918	1061	822	920
II	388	430	431	574	303	401
III	696	766	433	576	509	607
IV	133	203	54	89	10	88
Total de bandas amplificadas	2168	2392	1836	2300	1644	2016
% Metilación	40,08	42,47	38,21	41,35	34,52	39,31
% Bandas con metilación completa	38,24	40,51	26,53	28,91	31,57	34,47
%Bandas hemimetiladas	17,90	17,98	23,47	24,96	18,43	19,89

