



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Generación de nuevas líneas de arroz mejoradas mediante la introgresión de caracteres de interés agronómico

Liceth Leaños Machuca

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Generación de nuevas líneas de arroz mejoradas mediante la introgresión de caracteres de interés agronómico

Liceth Leños Machuca



Generación de nuevas líneas de arroz mejoradas mediante la introgresión de caracteres de interés agronómico

Memoria presentada por la MSc. Liceth Leños Machuca para optar al título de Doctor por la *Universitat de Barcelona*. Este trabajo se enmarca dentro del programa de doctorado de “*Ecologia, Ciències Ambientals i Fisiologia Vegetal*” correspondiente al periodo 2017-2020 del Departamento de ‘*Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals*’ de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado en el *Departamento de ‘Biologia Evolutiva, Ecologia i Ciències Ambientals’* de la *Facultad de Biología* de la *Universidad de Barcelona* bajo la dirección del Dr. Salvador Nogués Mestres y el Dr. Xavier Serrat Gurrera.



Doctoranda

Director y Tutor de Tesis

Co-Director de Tesis

MSc. Liceth Leños Machuca

Dr. Salvador Nogués Mestres

Dr. Xavier Serrat Gurrera

BARCELONA, NOVIEMBRE DE 2020



*“No es la más fuerte de las especies la que sobrevive,
tampoco es la más inteligente la que sobrevive.
Es aquella que se adapta mejor al cambio”.*

Charles Darwin

Agradecimiento

Soy creyente católica por lo tanto empezaré agradeciendo a Dios por la salud, la sabiduría y ese apoyo incondicional (aunque no se lo ve) se puede sentir en todos los momentos para la realización y finalización de la presente tesis.

Agradecer a mi madre por haberme apoyado incondicional y económicamente cuando decidí cruzar de continente (el charco) y empezar con este nuevo reto en un país y ciudad totalmente diferente y desconocida, pero con nuevas oportunidades hacía mi persona. También, agradezco a mi padre, hermanos y tía por sus ánimos y buenos deseos.

Le dedico un párrafo entero a mi novio Carlos por aguantarme todos mis cambios de temperamentos que ocasionan una tesis, además del carácter que a veces tengo y yo misma desconozco, pero sobre todo porque aparte de ser mi amor, es ese amigo que necesitas y te da esa palmadita en la espalda para transmitirme paciencia y serenidad, en estos últimos años hemos vivido muchas cosas buenas, como también situaciones que en la vida pensamos que pasarían y gracias a Dios, la familia y los amigos hemos logrado superar, experiencias que te hacen ver de una forma distinta la vida, pero que sabes que siempre encontraras esa luz al final del túnel y te hacen más fuerte.

Agradecer a Salvador Nogues y Xavier Serrat por haberme dado la oportunidad de ser parte de su grupo y haber trabajado para ellos y también nombrar a mi Comisión de Seguimiento de la UB, la Dra. Maria Isabel Trillas, la Dra. Marta Lopez, y la Dra. Teresa Sauras por su tiempo, consejos y asesoramiento para la elaboración de esta tesis.

Dar las gracias a Roser Llaó de la Cámara Arrocerera del Montsià por su confianza y enseñanzas en los ensayos de campos y Alfredo Vidal por hacer que esos días tan calurosos sean más ameno a la hora de trabajar. De igual manera agradecer a Mar Català del IRTA por su cooperación y espontaneidad en la realización del trabajo de campo, Andrea y a los integrantes del trabajo de equipo del IRTA. Igualmente, a Mireia Bundó una excelente científica que se dio tiempo para enseñarme un poco de su sabiduría, en la realización de una buena selección de las nuevas líneas *Saltol*.

Así pues, al Departamento de Fisiología Vegetal donde he convivido con mucha gente profesionales como la Dra Lluïsa Moysset dando un consejo para mejorar cada día y que esos días grises cambien de color, a Susana Mangas, Marta Pintó y al personal administrativo. Por otro lado, a las chicas Munné que siempre me las encontraba en la quinta planta trabajando como un gran equipo, a Virginia una de las personas más

transparentes y buena compañera de oficina. Nombrar también al personal de Servicio de Campos Experimentales de la UB Josep, Marta y en especial a Francesc que siempre me echaba una mano cuando tenía problemas en el invernadero.

A los grandes protagonistas, mis colegas y amigos de grupo en especial a Irene por ser una luchadora en todo sentido, Isidre porque su ambición investigativa y al tenerlo en el mismo equipo me contagio esa forma de trabajar y comerse el mundo, a Camilo por su enseñanzas informáticas y bioquímicas. A mis 3 amigos incondicionales que siempre están en las buenas y en las malas Aïda, Gustavo y más en especial a Julen (por ser una persona que siempre te ayuda y te extiende la mano para ayudarte en todo momento tanto profesional como personalmente sobre todo en los momentos más difíciles). Además, como olvidar a antiguos integrantes del equipo investigativo como Edu y Mirari las personas más profesionales y trabajadoras que he conocido (aparte de mí claro), a Albert y Mauro por tener esas ansias de aprender y trabajar cada día más y ser muy responsables (mis chicos de equipo), y todos los que tuve el gusto de conocer en el laboratorio Carol, Raimon, Jenni, Pol, Javi, David E. y Ettore.

A mis amigos de Máster Gloria y Sergi con los que pase 6 meses juntos en la realización de nuestros TFM, mis compañeras del grado de Biología María C. y María S.

No quisiera olvidarme de nadie así que agradezco a todo aquel que estuvo ahí y si no lo e nombrado me disculpe, que después de haber escrito la Tesis no me acordaba ni mi número de NIE de tantas cosas que daban vueltas en mi cabeza.

Abstract

Rice (*Oryza sativa*) is a crop with a major economic interest and the projection of global world growth make the increase of the food production an imminent need. Framed in the gramineous family (Poaceae), this crop is a diploid species with 24 chromosomes, and it is the most important basic harvesting plant in the world, as it satisfies the caloric needs of half of the world's population. The *Oryza* genus includes 24 species, but just two of them are cultivated: *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima*. Firstly, *O. sativa* is characterized by its length, approximately about 0.4 to 2 meters and its semiaquatic nature. *O. sativa* cultivars are classified in five subspecies, corresponding to *indica*, *aus*, *aromatic*, *temperate japonica* and *tropical japonica*. The *aus* are minor groups commonly considered subspecies or ecotypes *indica* (from the Himalayan region), the *temperate japonica* (from China, Korea, Japan and Europe), *tropical japonica* (from Malaysia, Indonesia and Philippines) and *aromatic* (from Pakistan, India and some other countries). Secondly, *O. Glaberrima* is cultivated in a minority way in west Africa. The *japonica* subspecies is the most cultivate in Europe due to its adaptation to temperate climates and its use as an ingredient of local typical dishes worldwide known as the Italian *risotto* or the Spanish *paella*. The global rice production in 2019 reached the 500.6 millions of tons, a value 0.8% lower than the historical maximum of 2018, with 506.3 millions of tons, due to climatic factors. In Europe, the production of rice only reaches the 0.6% of the global production, with Italy and Spain as the main producers.

This Thesis is part of the NEURICE project (*New commercial European RICE*), a HORIZON 2020 project funded by the European Union. We used two varieties *japonicas* sensitive temperate salinity provided by Càmara Arrossera of the Montsià a long grain PL12 and one medium grain PM37, were crossed with two *Indica* donors carrying *Saltol*: FL478, a salinity-tolerant RIL obtained from the Pokkali x IR29 cross and IR64- *Saltol*, a salt-tolerant NIL obtained from the cross FL478 x IR64 . The crosses between PL12 and FL478 were called LP, and the crosses between PM37 and IR64- *Saltol* were called MS. This thesis has managed to evaluate, for the first time, tolerance to salinity in the new *Saltol* LP and MS lines from the crosses between the parents and to obtain the new *Saltol* lines. Therefore, the thesis is divided into three research areas or experiments: 1) The introgression of a QTL *Saltol* to obtain new lines of rice tolerant to salinity verified through two years of field trials where interesting morphological analogies were found with respect to the number of shoots / plants, number

of panicles / plants, length of the plant and panicle fertility percentage to mitigate the adverse impact of salinity and avoid the loss of apple snail production in the Ebro delta. 2) *in vitro* optimization for six different varieties of Mediterranean template *japonica* and a tropical *indica* by the addition of an adjustable concentration design such as 2.50 μM , 3.00 μM , 3.25 μM and 3.50 μM (concentration at the limit of lethality) of the herbicide Cycloxiidim to select resistant individuals, 3) the crossing of a herbicide-resistant tropical *indica* line with six commercial Mediterranean elite lines by forced hybridization following a backcrossing scheme, using an optimized embryo rescue technique to accelerate the process and CAPS selection of the descendants presenting the mutant OsACC2 allele of resistance to the herbicide Cicloxiidim.

Índice

Agradecimiento	1
Abstract.....	3
Índice.....	5
Abreviaciones	9
Lista de figuras.....	11
Lista de tablas.....	16
Tablas Complementarias	18
1. Introducción	20
1.1. Importancia del arroz	20
1.1.1 <i>El cultivo de Arroz</i>	20
1.1.2 <i>Fisiología del arroz</i>	21
1.1.3 <i>Producción del arroz</i>	21
1.2. Cambio Climático y sus Consecuencias	26
1.2.1 <i>Estrés abiótico: Sequía y salinidad</i>	27
1.2.2 <i>La región Saitol, un QTL para la tolerancia a la salinidad en el arroz</i>	31
1.2.3 <i>El Caracol Manzana</i>	35
1.2.4 <i>Proyecto NEURICE H2020</i>	38
1.2.5 <i>Malas hierbas</i>	39
1.3. Resistencia a herbicidas	41
1.3.1 <i>Tipos de Herbicidas</i>	41
1.3.2 <i>El sistema Clearfield®</i>	44
1.3.3 <i>El sistema Provisia®</i>	44
1.4. Importancia de los Lípidos en las Plantas.	48
1.4.1 <i>Síntesis de los ácidos grasos: La AcetilCoA carboxilasa</i>	48
1.4.2 <i>Estructuras cuaternarias de la ACCasa</i>	50
1.4.3 <i>Inhibidores de la Acetil CoA Carboxilasa</i>	51

1.5. Mejora del Arroz por Hibridación	52
1.5.1 <i>Cultivo de embriones</i>	52
1.5.2 <i>Programa de retro-cruzamientos asistidos por marcadores moleculares</i>	53
1.6. Marcadores Genéticos	55
1.6.1 <i>Tipos de marcadores genéticos</i>	55
1.6.2 <i>Cartografiado de loci para caracteres cuantitativos (QTL)</i>	56
1.6.3 <i>Polimorfismo de nucleótido simple</i>	56
1.6.4 <i>Digestión de secuencias amplificadas polimórficas (CAPS)</i>	57
1.6.5 <i>Sistema de Genotipificación KASP</i>	57
2. Objetivos	60
I. Objetivo principal:	60
II. Objetivos específicos:	60
3. Materiales y Métodos	61
3.1 Experimento 1: Validación de la región <i>Saltol</i>, retorno al parental recurrente y ensayos de campo de las nuevas líneas de arroz	61
3.1.1 <i>Material vegetal</i>	61
3.1.2 <i>Introgresión del <i>Saltol</i></i>	63
3.1.3 <i>Hibridación forzada</i>	63
3.1.4 <i>Rescate de embriones</i>	64
3.1.5 <i>Extracción y amplificación de ADN</i>	66
3.1.6 <i>Genotipado Final KASP</i>	67
3.1.7 <i>Evaluación de tolerancia a salinidad en cultivo hidropónico</i>	68
3.1.8 <i>Ensayos de campo</i>	68
3.1.9 <i>Diseño y ensayos de campo de las líneas seleccionadas</i>	69
<i>Análisis estadístico</i>	71
3.2 Experimento 2: Optimización <i>in vitro</i> de la resistencia al herbicida	72
3.3.1 <i>Material vegetal y condiciones de crecimiento</i>	72
3.3.2 <i>Hibridación forzada y rescate de embriones</i>	72

3.3.3	<i>Extracción del ADN</i>	73
3.2.4	<i>Amplificación PCR del Exón 1 de OsACC2</i>	73
3.2.5	<i>Digestión del producto de PCR</i>	74
3.2.6	<i>Análisis estadístico</i>	75
3.3	Experimento 3: Estudio de la resistencia al herbicida en líneas europeas de arroz	76
3.3.1	<i>Material vegetal</i>	76
3.3.2	<i>Introgresión del alelo mutante OsACC2</i>	76
3.3.3	<i>Análisis estadísticos</i>	78
4.	Resultados	79
4.1	Experimento 1: Validación de la región <i>Saltol</i>, retorno al parental recurrente y ensayos de campo de las nuevas líneas de arroz	79
4.1.1	<i>Validación de KASP para el genotipado de las nuevas líneas de arroz</i>	79
	80
4.1.2	<i>Resultados de campo de las líneas seleccionadas</i>	80
4.2	Experimento 2: Optimización <i>in vitro</i> de la resistencia al herbicida	96
4.2.1	<i>Cruzamiento de las seis líneas elite</i>	96
4.2.2	<i>Supervivencia de los embriones en el cultivo <i>in vitro</i> con herbicida</i>	96
4.2.3	<i>Confirmación molecular de la introgresión del alelo OsACC2</i>	98
4.3	Experimento 3: Estudio de la resistencia al herbicida en líneas europeas de arroz	99
4.3.1	<i>Retrocruzamiento asistido de seis líneas europeas de arroz</i>	99
4.3.2	<i>Eficiencia del retrocruzamiento</i>	101
4.3.3	<i>Confirmación molecular de las plántulas supervivientes</i>	103
5.	Discusión	105
5.1	Experimento 1: Validación de la región <i>Saltol</i>, retorno al parental recurrente y ensayos de campo de las nuevas líneas de arroz	105
5.2	Experimento 2: Optimización <i>in vitro</i> de la resistencia al herbicida	110
5.3	Experimento 3: Estudio de la resistencia al herbicida en líneas europeas de arroz	114
6.	Conclusiones	118

7. Bibliografía.....	120
8. ANEXOS	131
Experimento 1: Validación de la región <i>Saltol</i>, retorno al parental recurrente y ensayos de campo de las nuevas líneas de arroz	131
Experimento 2: Optimización <i>in vitro</i> de la resistencia al herbicida	157
Experimento 3: Estudio de la resistencia al herbicida en líneas europeas de arroz	161

Abreviaciones

ACC	Acetil CoA Carboxilasa
ACP	Proteína Portadora de Acilo
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AHAS	Acetohidroxiácido Sintasa
ALS	Acetolactato Sintasa
AOPP	Ariloxifenoxipropionatos
ATP	Adenosín Trifosfato
BC	Biotina Carboxilasa
BCCP	Proteína Transportadora de Carboxilo de Biotina
BCs	<i>Backcross</i> (retrocruzamientos)
CAPs	Secuencia Polimórfica Amplificada y Clivada
CDH	Ciclohexanodionas
CT	Carboxilo Transferasa
DAG	Diacylglycerol
EPSP	Enolpiruvilshikimato 3-Fosfato Sintasa
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FD	Ferredoxina
HRC	Cultivos Resistentes a los Herbicidas
HRAC	Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas
HPPD	Hidroxifenilpiruvato Dioxigenasa
IRRI	Instituto Internacional de Investigación del Arroz
KASP	Alelo competitivo PCR específica
KAS	3-cetoacil-ACP sintasa
LP:	cruce entre las variedades PL12 y FL478
MS:	cruce entre las variedades PM37 y IR64-Saltol
MAS	Selección Asistida por Marcadores
NEURICE	Proyecto Europeo H2020 ' <i>New European Rice</i> '
NILs	Líneas Casi Isogénicas
OGM	Organismos Genéticamente Modificados
PA	ácido fosfatídico
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PD	Parental Donador

PDS Fitoeno Desaturasa
PPO Protoporfirilpiruvato Dioxigenasa
PR Parental Recurrente
PSII Fotosistema II
QTL Cartografía de loci para Caracteres Cuantitativos
SES Sistema de visualización estándar
TAG Triacilglicerol

Lista de figuras

FIGURA 1. - CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA DEL ARROZ. DATOS ADAPTADOS DE GARRIS ET AL. (2005).	20
FIGURA 2. ETAPAS DE CRECIMIENTO DE LA PLANTA DEL ARROZ. DATOS ADAPTADOS DE HARDKE ET AL. (2018).....	21
FIGURA 3. – PRINCIPALES PRODUCTORES DE ARROZ. DATOS ADAPTADOS FAOSTAT (2018).	23
FIGURA 4. - DISTRIBUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN (T) DE ARROZ POR COMUNIDAD AUTÓNOMA. DATOS ADAPTADOS DE GUERRERO (2017).	24
FIGURA 5. - DISTRIBUCIÓN DE LA SUPERFICIE CULTIVADA DE ARROZ (HA) DE LAS COMUNIDADES AUTÓNOMAS DE ESPAÑA. DATOS ADAPTADOS DE GUERRERO (2017).25	25
FIGURA 6. PREDICCIÓN HASTA EL AÑO 2050 DEL CLIMA GLOBAL, LA AGRICULTURA Y LA SEGURIDAD ALIMENTARIA. (A) LA ESCASEZ DE AGUA AUMENTARÁ EN LOS PRÓXIMOS AÑOS, DEBIDO AL CRECIMIENTO CONTINUO DE LA POBLACIÓN MUNDIAL, LA PRODUCCIÓN DE CULTIVOS TAMBIÉN DEBE AUMENTAR PARA SATISFACER LAS NECESIDADES BÁSICAS. B) LA FLECHA INDICA EL NÚMERO ESTIMADO DE PERSONAS QUE VIVEN EN ZONAS CON ESCASEZ DE AGUA. (C) LA FLECHA INDICA LA DEMANDA PREVISTA DE TIERRA CULTIVABLE PARA GARANTIZAR LA SEGURIDAD ALIMENTARIA. (D) LA FLECHA INDICA LA DISMINUCIÓN PREVISTA EN LA DISPONIBILIDAD DE AGUA DULCE PARA LA AGRICULTURA, DADAS LAS TENDENCIAS ACTUALES DE CAMBIO CLIMÁTICO Y PRECIPITACIÓN. FIGURA MODIFICADA DE GUPTA ET AL. (2020).....	29
FIGURA 7.- PATRÓN DE ACUMULACIÓN DE SAL, MAL SISTEMA DE RIEGO; CUALQUIER PLANTA QUE CREZCA EN LA ZONA SE VERÁ ALTAMENTE AFECTADA. FIGURA MODIFICADA DE ZAMAN ET AL. (2018).....	31
FIGURA 8. - UBICACIÓN DEL QTL SALTOL (CUADRADO CELESTE) EN EL BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA 1 FLANQUEADO POR LOS MARCADORES SSR RM1287 Y RM6711. MODIFICADO DE WAZIRI ET AL. (2016).	33
FIGURA 9. POMÁCEA MACULATA JUNTO A UNA PUESTA DE SUS HUEVOS (FUENTE GENERALITAT DE CATALUÑA PROGRAMA NACIONAL PARA LA APLICACIÓN DE LA NORMATIVA FITOSANITARIA. PLAN NACIONAL DE CONTINGENCIA DE POMACEA SP. 2018).	35
FIGURA 10.- DIANAS CELULARES DE ACCIÓN DE LOS HERBICIDAS Y SU CLASIFICACIÓN POR SU MODO DE ACCIÓN SEGÚN EL COMITÉ DE ACCIÓN DE RESISTENCIA A HERBICIDAS (HRAC). LOS HERBICIDAS SE DIRIGEN SOLO A UNAS POCAS PROTEÍNAS O PROCESOS ENTRE LA ENORME VARIEDAD PRESENTE EN LAS PLANTAS. MODIFICADO DE DÉLYE ET AL., (2013).	42
FIGURA 11. ESTRUCTURA BÁSICA DE LAS CICLOHEXANODIONAS. ESQUEMA ADAPTADO DE GRONGRALD & FREEMAN (1995).	45
FIGURA 12. - ACCIÓN DE LA ACCASA EN LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS. ESQUEMA ADAPTADO DE HARWOOD (1988).	46
FIGURA 13. - ASPECTOS PRINCIPALES DE LA RESISTENCIA A HERBICIDAS QUE INHIBEN LA ACETILCOENZIMA A CARBOXILASA (ACCASA) EN LOS PASTOS Y LAS DIFERENTES FORMAS QUE LA RESISTENCIA PUEDE EVOLUCIONAR. 1 (I) INTERACCIÓN DE INHIBIDORES DE LA ACCASA Y UNA ENZIMA SALVAJE, 2 (II) RESISTENCIA POR MUTACIONES DE LA ACCASA, 3 (III) MAYOR NÚMERO DE COPIAS DE LA ACCASA SALVAJE, 4 (IV) RESISTENCIA METABÓLICA POR DESINTOXICACIÓN DE LOS HERBICIDAS, 5 (V) ABSORCIÓN REDUCIDA Y 6 (VI) TRANSLOCACIÓN REDUCIDA. MODIFICADO DE TAKANO ET AL., (2020).	47

FIGURA 14.- REPARTICIÓN DE DOS FORMAS DE ACCASA EN PLANTAS. MODIFICADA DE SASAKI & NAGANO (2014).....	49
FIGURA 15.- LA SÍNTESIS Y EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS TIENEN LUGAR EN VARIOS ORGÁNULOS. ACETYL-COA ES EL MATERIAL DE PARTIDA PARA LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS, TAMBIÉN DURANTE LA RESPIRACIÓN, LA ACETIL-COA ES LA FUENTE DE ENTRADA DE CARBONO EN EL CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO EN LAS MITOCONDRIAS. MODIFICADO DE BUCHANAN ET AL. (2015).....	50
FIGURA 16. - REACCIONES DE ACETIL-COA CARBOXILASA (ACCASA). MODIFICADO DE BUCHANAN ET AL. (2015).....	51
FIGURA 17. DETALLE DE LAS ISOFORMAS DE ACETIL COENZIMA A CARBOXILASA (ACC) PRESENTES EN LAS PLANTAS. TP, PÉPTIDO DE TRÁNSITO; DOMINIOS FUNCIONALES ACC: BCC, BIOTINA CARBOXILO-PORTADOR; BC, BIOTINA CARBOXILASA; CT, CARBOXILO TRANSFERASA. HAY QUE TENER EN CUENTA QUE EL TP PODRÍA CORTARSE DESPUÉS DE QUE LA ISOFORMA ACC PLASTÍDICA SE HAYA IMPORTADO AL CLOROPLASTO. MODIFICADA DE (DÉLYE, 2005).	52
FIGURA 18. - EVOLUCIÓN DEL NÚMERO DE ESPECIES DE MALEZAS RESISTENTES A VARIOS TIPOS DE HERBICIDAS (1970-2016) DATOS MODIFICADOS DE VRBNIČANIN ET AL. (2017).....	52
FIGURA 19. - ESQUEMA DE RETRO-CRUZAMIENTO ASISTIDO DONDE PL12 Y PM37 SE UTILIZARON COMO PADRES RECURRENTE FEMENINOS (PR), MIENTRAS QUE FL478 E IR64-SALTOL COMO DONANTES MASCULINOS (PD), LLEVADO A CABO EN ESTE TRABAJO. REPRESENTACIÓN EN COLORES DEL GENOMA DE LA PLANTA (VERDE OSCURO PARA EL GENOMA JAPONICA Y VERDE CLARO PARA EL GENOMA INDICA). EN EL LOCUS QTL, AA SE REFIERE AL ALELO TOLERANTE MIENTRAS QUE aa AL ALELO SUSCEPTIBLE. LA PRIMERA SELECCIÓN (SCREENING) SE REALIZÓ MEDIANTE EL USO DE UNA PCR SIMPLE ENFOCADA AL CENTRO DEL QTL SALTOL. LA CUANTIFICACIÓN DEL RETORNO AL PARENTAL RECURRENTE Y COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA TOTAL DE LA REGIÓN SALTOL SE REALIZÓ CON EL ANÁLISIS KASP.....	54
FIGURA 20. - DIAGRAMA QUE DETALLA EL ENSAYO KASP. LOS COMPONENTES CONSISTEN EN: DOS CEBADORES ESPECÍFICOS DE ALELOS (UNO PARA CADA ALELO SNP), CADA CEBADOR CONTIENE UNA SECUENCIA DE COLA ÚNICA SIN MARCAR EN EL EXTREMO 5', UN CEBADOR COMÚN (INVERSO), DOS OLIGONUCLEÓTIDOS MARCADOS CON FLÚOR EN EL EXTREMO 5', UNO ETIQUETADO CON FAM, Y EL OTRO HEX. ESTAS SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESTÁN DISEÑADAS PARA INTERACTUAR CON LAS SECUENCIAS DE LAS COLAS DE LOS CEBADORES ESPECÍFICOS DE LOS ALELOS, DOS OLIGONUCLEÓTIDOS, APAGADORES UNIDOS EN LOS EXTREMOS 3'. ESTAS SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS SON COMPLEMENTARIAS A LAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS MARCADOS CON FLÚOR (Y, POR LO TANTO, TAMBIÉN SON COMPLEMENTARIAS A LAS COLAS DE LOS CEBADORES ESPECÍFICOS DE ALELO). ESTOS OLIGONUCLEÓTIDOS APAGADOS, POR LO TANTO, UNEN SUS COMPLEMENTOS MARCADOS CON FLÚOR Y TODAS LAS SEÑALES FLUORESCENTES SE APAGAN HASTA QUE SE REQUIEREN. MODIFICADO DE LGC (2017).	58
FIGURA 21. PLANTAS DE ARROZ (O. SATIVA) ACLIMATADAS A LAS CONDICIONES DE INVERNADERO, EN SUS CORRESPONDIENTES MACETAS CON SUSTRATO.....	62
FIGURA 22. – (A) IMAGEN DE LA PANÍCULA INMADURA ELEGIDA PARA LA EMASCULACIÓN, (B) PROCESO DE EMASCULACIÓN EN LA PANÍCULA CORTADA USANDO UNA BOMBA DE VACÍO (C) POLINIZACIÓN MANUAL DE LA PANÍCULA EMASCULADA (D) EMBRIONES INMADUROS OBTENIDOS DEBIDO AL PROCESO DE FECUNDACIÓN FORZADA.....	64
FIGURA 23. -(A) PREPARACIÓN DEL MATERIAL EN LA CABINA DE FLUJO LAMINAR PARA PROCEDER CON EL PROCESO DE RESCATE EMBRIONARIO IN VITRO. (B) IMAGEN DEL	

EMBRIÓN INMADURO A RESCATAR (C) IMAGEN DE PLÁNTULAS EN DESARROLLO EN TUBOS IN VITRO. (D) PLÁNTULAS ACLIMATADAS EN INVERNADERO.....	65
FIGURA 24.- UBICACIÓN DE LOS ENSAYOS DE CAMPO. EL CAMPO NO SALINO SE HALLA LOCALIZADO HACIA EL CENTRO DEL DELTA DEL EBRO, EN CAMBIO EL CAMPO SALINIZADO SE SITÚA MUY CERCA DE LA COSTA NORTE DEL DELTA MUY PRÓXIMO AL MAR.	68
FIGURA 25.- UBICACIÓN DE LOS DIFERENTES SENSORES EN EL CAMPO SALINO. LOS SENSORES QUE SE ENCUENTRAN EN LA ENTRADA Y SALIDA MIDEN LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DEL AGUA. LOS SENSORES 3, 4 Y 5 SON SENSORES DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DEL SUELO. EL SENSOR NÚMERO 6 HACE LA LECTURA DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DEL AGUA Y LA MEDICIÓN DE PROFUNDIDAD DEL AGUA.....	69
FIGURA 26.- IMAGEN AÉREA DE LOS ENSAYOS DE CAMPO NO SALINO (IZQUIERDA) Y SALINO (DERECHA) 2018.....	70
FIGURA 27.- IMAGEN AÉREA DE LOS ENSAYOS DE CAMPO NO SALINO (IZQUIERDA) Y SALINO (DERECHA) 2019. SE OBSERVAN LAS 4 RÉPLICAS Y LA PROXIMIDAD DEL MAR EN EL TRATAMIENTO SALINO.	70
FIGURA 28. ENZIMA DE RESTRICCIÓN APOI UTILIZADO EN ESTE EXPERIMENTO	74
FIGURA 29. ESQUEMA DE RETRO-CRUZAMIENTO ASISTIDO MEDIANTE EL PROTOCOLO DE SECUENCIA POLIMÓRFICA AMPLIFICADA ESCINDIDA (CAPS) LLEVADO A CABO EN ESTE TRABAJO. REPRESENTACIÓN EN COLORES DEL GENOMA DE LA PLANTA (AZUL OSCURO PARA EL GENOMA JAPÓNICA Y AMARILLO PARA EL GENOMA INDICA). LA PRIMERA SELECCIÓN (SCREENING) MEDIANTE EL USO DE MEDIOS CON CICLOXIDIM IN VITRO, POSTERIOR PCR Y DIGESTIÓN PARA CONFIRMAR LA PRESENCIA DE LA MUTACIÓN OSACC2 EN LAS LÍNEAS TOLERANTES YA SELECCIONADAS IN VITRO. EN EL LOCUS, AA SE REFIERE AL ALELO TOLERANTE MIENTRAS QUE aa AL ALELO SUSCEPTIBLE.....	77
FIGURA 30. NÚMERO BROTES (AHIJADO) OBTENIDO EN EL EXPERIMENTO 1. LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO CONTROL (NO SALINO) ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR NEGRO Y LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO SALINO ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR GRIS. LOS DATOS APARECEN COMO LA MEDIA (N = 24 CONTROL), (N = 17 SALINO) ± EL ERROR ESTÁNDAR (2018). LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON UN P-VALOR < 0,05 SE HAN REPRESENTADO CON LETRAS DISTINTAS DENTRO DE LOS TRATAMIENTOS. ADEMÁS, SE HA AÑADIERON LOS DATOS DE LA REDUCCIÓN PORCENTUAL DEL TRATAMIENTO SALINO.	81
FIGURA 31. NÚMERO DE BROTES (AHIJADO) OBTENIDO EN EL EXPERIMENTO 1. LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO CONTROL ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR NEGRO Y LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO SALINO ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR GRIS. LOS DATOS APARECEN COMO LA MEDIA (N = 32 CONTROL), (N = 28 SALINO) ± EL ERROR ESTÁNDAR (2019). LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON UN P-VALOR < 0,05 SE HAN REPRESENTADO CON LETRAS DISTINTAS DENTRO DE LOS TRATAMIENTOS. ADEMÁS, SE HA AÑADIERON LOS DATOS DE LA REDUCCIÓN PORCENTUAL DEL TRATAMIENTO SALINO.....	83
FIGURA 32. NÚMERO DE BROTES (AHIJADO) OBTENIDO EN EL EXPERIMENTO 1. LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS MS DEL TRATAMIENTO CONTROL ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR NEGRO Y LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS MS DEL TRATAMIENTO SALINO ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR GRIS. LOS DATOS APARECEN COMO LA MEDIA (N = 34 CONTROL), (N = 31 SALINO) ± EL ERROR ESTÁNDAR (2019). LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON UN P-VALOR < 0,05 SE HAN REPRESENTADO CON LETRAS DISTINTAS DENTRO DE LOS TRATAMIENTOS. ADEMÁS, SE HA AÑADIERON LOS DATOS DE LA REDUCCIÓN PORCENTUAL DEL TRATAMIENTO SALINO.....	84

- FIGURA 33.** LONGITUD EN CM DE LAS PLANTAS OBTENIDO EN EL EXPERIMENTO 1. LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO CONTROL ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR NEGRO Y LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO SALINO ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR GRIS. LOS DATOS APARECEN COMO LA MEDIA (N = 77 CONTROL), (N = 69 SALINO) ± EL ERROR ESTÁNDAR (2018). LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON UN P-VALOR < 0,05 SE HAN REPRESENTADO CON LETRAS DISTINTAS DENTRO DE LOS TRATAMIENTOS. ADEMÁS, SE HA AÑADIERON LOS DATOS DE LA REDUCCIÓN PORCENTUAL DEL TRATAMIENTO SALINO. 85
- FIGURA 34:** LONGITUD EN CM DE LAS PLANTAS OBTENIDO EN EL EXPERIMENTO 1. LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO CONTROL ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR NEGRO Y LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO SALINO ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR GRIS. LOS DATOS APARECEN COMO LA MEDIA (N = 90 CONTROL), (N = 79 SALINO) ± EL ERROR ESTÁNDAR (2019). LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON UN P-VALOR < 0,05 SE HAN REPRESENTADO CON LETRAS DISTINTAS DENTRO DE LOS TRATAMIENTOS. ADEMÁS, SE HA AÑADIERON LOS DATOS DE LA REDUCCIÓN PORCENTUAL DEL TRATAMIENTO SALINO. 88
- FIGURA 35.** LONGITUD EN CM DE LAS PLANTAS OBTENIDO EN EL EXPERIMENTO 1. LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS MS DEL TRATAMIENTO CONTROL ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR NEGRO Y LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS MS DEL TRATAMIENTO SALINO ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR GRIS. LOS DATOS APARECEN COMO LA MEDIA (N = 92 CONTROL), (N = 86 SALINO) ± EL ERROR ESTÁNDAR (2019). LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON UN P-VALOR < 0,05 SE HAN REPRESENTADO CON LETRAS DISTINTAS DENTRO DE LOS TRATAMIENTOS. ADEMÁS, SE HA AÑADIERON LOS DATOS DE LA REDUCCIÓN PORCENTUAL DEL TRATAMIENTO SALINO. 90
- FIGURA 36.** NÚMERO DE PANÍCULAS OBTENIDO EN EL EXPERIMENTO 1. LA PARENTAL PL12 Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO CONTROL ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR NEGRO Y LAS LÍNEAS PARENTALES Y SUS HÍBRIDAS LP DEL TRATAMIENTO SALINO ESTÁN REPRESENTADAS EN COLOR GRIS. LOS DATOS APARECEN COMO LA MEDIA (N = 21 CONTROL), (N = 20 SALINO) ± EL ERROR ESTÁNDAR (2018). LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON UN P-VALOR < 0,05 SE HAN REPRESENTADO CON LETRAS DISTINTAS DENTRO DE LOS TRATAMIENTOS. ADEMÁS, SE HA AÑADIERON LOS DATOS DE LA REDUCCIÓN PORCENTUAL DEL TRATAMIENTO SALINO. 91
- FIGURA 37.** MEDIA DE EMBRIONES OBTENIDOS POR CRUZAMIENTO ASISTIDO DE CADA LÍNEA. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO MOSTRÓ QUE NO HABÍA DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS LÍNEAS (P = 0,8490) Y TODAS PERTENECEN A UN MISMO GRUPO. 96
- FIGURA 38.** TASA DE SUPERVIVENCIA OBSERVADA EN CADA CONCENTRACIÓN DE CICLOXIDIM. LAS LETRAS INDICAN GRUPOS CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS POR EL TEST χ^2 (P < 0,05). 97
- FIGURA 39.** ELECTROFORESIS EN GEL DEL ADN AMPLIFICADO Y DIGERIDO. ENCIMA DE CADA CARRIL MOSTRAMOS EL GENOTIPO RESULTANTE DE CADA INDIVIDUO ANALIZADO. R/S: INDIVIDUO HETEROCIGOTO RESISTENTE; S/S: INDIVIDUO HOMOCIGOTO SENSIBLE; (-): CONTROL NEGATIVO (H₂O MILIQ); R/R: CONTROL HOMOCIGOTO RESISTENTE; S/S: CONTROL DE HOMOCIGOTO SENSIBLE; M: MARCADOR MOLECULAR. EL ASTERISCO CORRESPONDE A UN INDIVIDUO HETEROCIGOTO QUE SE CONFIRMÓ REPITIENDO LA AMPLIACIÓN. A LA DERECHA, SE INDICAN LOS PESOS DE LAS PRINCIPALES BANDAS DEL MARCADOR MOLECULAR. 98
- FIGURA 40.** RATIO MEDIA DE EMBRIONES POR CRUZAMIENTO/GENERACIÓN OBTENIDO POR DOS LÍNEAS DE GRANO LARGO (L01, L02) Y UNA LÍNEA DE GRANO MEDIO (C997) A LO LARGO DE LOS CINCO PERIODOS. LAS BARRAS INDICAN EL ERROR ESTÁNDAR. 100

FIGURA 41. RATIO MEDIA DE EMBRIONES POR CRUZAMIENTO/GENERACIÓN OBTENIDO POR UNA LÍNEA DE GRANO LARGO (L03), UNA LÍNEA DE GRANO MEDIO (XF) Y UNA LÍNEA DE GRANO REDONDO (RP01) A LO LARGO DE LOS CUATRO PERIODOS. LAS BARRAS INDICAN EL ERROR ESTÁNDAR.....	101
FIGURA 42. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LAS PLÁNTULAS MUTANTES. EL CONTROL POSITIVO MUTANTE HOMOCIGOTO LIH MUESTRA DOS BANDAS DE ADN (153 PARES DE BASES Y 291 PARES DE BASES). LOS CONTROLES POSITIVOS HOMOCIGOTOS DE TIPO SALVAJE L01 Y L02 MUESTRAN UNA ÚNICA BANDA DE 444 PB NO DIGERIDA. LAS MUTANTES HETEROCIGOTAS MUESTRAN TRES BANDAS CORRESPONDIENTES A LA BANDA DE 444 PB NO DIGERIDA Y LAS BANDAS DE 153 Y 291 PB DIGERIDAS. EL CONTROL NEGATIVO ES LA MIX DE PCR Y MEZCLA DE DIGESTIÓN CON AGUA MILLIQ COMO MUESTRA (C-).	104

Lista de tablas

TABLA 1. - PRODUCCIÓN DE ARROZ A NIVEL MUNDIAL, PRINCIPALES PAÍSES LÍDERES EN PRODUCCIÓN (PROMEDIO DE 2018-2020). DATOS MODIFICADOS DE BEDFORD ET AL. (2020).....	22
TABLA 2. – PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE ARROZ EN EUROPA FAOSTAT (2013)..	24
TABLA 3. PERSPECTIVAS ALIMENTARIAS DEL MERCADO MUNDIAL DE ARROZ. DATOS ADAPTADOS DE BEDFORD ET AL. (2020). 1/ LOS DATOS SOBRE PRODUCCIÓN SE REFIEREN AL PRIMER AÑO INDICADO. POR PRODUCCIÓN DE ARROZ SE ENTIENDE PRODUCCIÓN DE ARROZ ELABORADO. 2/ PRODUCCIÓN MÁS EXISTENCIAS AL INICIO DEL EJERCICIO. 3/ LOS DATOS SOBRE COMERCIO SE REFIEREN A LAS EXPORTACIONES DURANTE LA CAMPAÑA COMERCIAL, QUE VA DE JULIO A JUNIO EN EL CASO DEL TRIGO Y LOS CEREALES SECUNDARIOS Y DE ENERO A DICIEMBRE EN EL CASO DEL ARROZ (SEGUNDO AÑO INDICADO). 4/ PUEDE NO SER IGUAL A LA DIFERENCIA ENTRE SUMINISTROS Y UTILIZACIÓN DEBIDO A LAS DIFERENCIAS EN LAS CAMPAÑAS COMERCIALES DE LOS DISTINTOS PAÍSES. 5/ LOS CINCO MAYORES EXPORTADORES DE GRANOS SON LA ARGENTINA, AUSTRALIA, CANADÁ, LA UNIÓN EUROPEA Y LOS ESTADOS UNIDOS; LOS MAYORES EXPORTADORES DE ARROZ SON LA INDIA, PAKISTÁN, TAILANDIA, LOS ESTADOS UNIDOS Y VIETNAM. POR “DESAPARICIÓN” SE ENTIENDE LA UTILIZACIÓN INTERNA MÁS LAS EXPORTACIONES PARA UNA CAMPAÑA DADA.	25
TABLA 4. - MODO DE ACCIÓN DE LOS HERBICIDAS. DATOS MODIFICADOS DE DÉLYE ET AL., (2013).....	42
TABLA 5. SOLUCIÓN DE FERTILIZACIÓN SEGÚN LA ETAPA DE CRECIMIENTO Y CONCENTRACIÓN ESTÁNDAR	62
TABLA 6. PROTOCOLO DE ANÁLISIS PARA LA HOMOGENEIDAD, LOS NÚMEROS DE TALLOS, EL MINADOR DEL TALLO Y EL AÑUBLO DE ARROZ, DATOS ADAPTADOS DE LANCASHIRE ET AL. (1991).....	71
TABLA 7. COMPONENTES DEL MEDIO CON HERBICIDA (PARA UN VOLUMEN FINAL 1.000 ML) EMPLEADO PARA EL CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES DE ARROZ. LAS CANTIDADES DE CICLOXIDIM USADAS EN ESTE EXPERIMENTO FUERON 2,50 μ M (202,5 μ L) 3,00 μ M (243 μ L) 3,25 μ M (263,25 μ L) 3,50 μ M (283,5 μ L).	72
TABLA 8. PRIMERS UTILIZADOS EN ESTE EXPERIMENTO	74
TABLA 9. - EJEMPLO DE LA SELECCIÓN DE RETORNO AL PARENTAL RECURRENTE POR MARCADORES POLIMÓRFICOS INDICA/JAPONICA EN LÍNEAS MS. %PR REPRESENTA EL PORCENTAJE DE MARCADORES JAPONICA DETECTADOS EN CADA LÍNEA SIN TENER EN CUENTA LA REGIÓN SALTOL, %H REPRESENTA EL PORCENTAJE DE MARCADORES EN HETEROCIGOSIS INDICA/JAPONICA. %IR64-SALTOL REPRESENTA EL PORCENTAJE DE MARCADORES INDICA EN HOMOCIGOSIS PRESENTES EN CADA LÍNEA:	79
TABLA 10. CRITERIOS CUALITATIVOS PARA EL ESTUDIO DE LAS VARIEDADES DEL ARROZ.	92
TABLA 11. EVALUACIÓN DE CAMPO DE LAS LÍNEAS FL478, PL12 Y SUS HÍBRIDAS LP, EN AMBOS CAMPOS DE CULTIVOS (NO SALINO Y SALINO).	92
TABLA 12. EVALUACIÓN DE CAMPO DE LAS 4 PARENTALES FL478, IR64SALTOL, PL12, PM37 Y SUS HÍBRIDAS LP Y MS, EN AMBOS CAMPOS DE CULTIVOS (NO SALINO Y SALINO) 2019.	93
TABLA 13. PORCENTAJES DE SUPERVIVENCIA DE LAS PLANTAS DE CADA LÍNEA CULTIVADAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE HERBICIDA. LAS CONCENTRACIONES CON ASTERISCO PRESENTAN TASAS DE SUPERVIVENCIA SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES AL RESTO (P <0,05).	96

TABLA 14. PARÁMETROS UTILIZADOS EN ESTE EXPERIMENTO. NÚMERO DE PANÍCULAS EMASCULADAS Y POLINIZADAS, NÚMERO DE EMBRIONES OBTENIDOS, PLANTAS MUTANTES EN CADA GENERACIÓN Y LA EFICIENCIA DE LOS EMBRIONES SEGÚN LA ÉPOCA ESTACIONAL.	101
--	-----

Tablas Complementarias

TABLA SM 1.- SELECCIÓN DE LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL LP, MARCADORES INTERNOS, FLANQUEANTES DE LA REGIÓN SALTOL Y MARCADORES POLIMÓRFICOS INDICA/JAPÓNICA.....	131
TABLA SM 2.- SELECCIÓN DE LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL MS, MARCADORES INTERNOS, FLANQUEANTES DE LA REGIÓN SALTOL Y MARCADORES POLIMÓRFICOS INDICA/JAPÓNICA.....	133
TABLA SM 3.- PROMEDIOS DE LAS MEDIDAS DE SALINIDAD EN LA TEMPORADA 2018-2019	135
TABLA SM 4.- VALORES ESTADÍSTICO DE LOS BROTES 2018, COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS SALINO Y NO SALINO.....	137
TABLA SM 5.- DIFERENCIAS DE LOS BROTES DEL PARENTAL FL478 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL LP 2018.....	138
TABLA SM 6.- DIFERENCIA EN EL NÚMERO DE BROTES DEL PARENTAL PL12 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL LP 2018	139
TABLA SM 7.- VALORES ESTADÍSTICOS DE LOS BROTES 2019, COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS SALINO Y NO SALINO.....	140
TABLA SM 8.- DIFERENCIAS DE LOS BROTES DEL PARENTAL FL478 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL LP 2019.....	141
TABLA SM 9.- DIFERENCIAS DE LOS BROTES DEL PARENTAL PL12 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL LP 2019.....	143
TABLA SM 10.- VALORES ESTADÍSTICO DE LOS BROTES 2019, COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS SALINOS Y NO SALINO LÍNEAS SALTOL MS.....	145
TABLA SM 11.- DIFERENCIAS DE LOS BROTES DEL PARENTAL IR64-SALTOL CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL MS 2019	145
TABLA SM 12.- DIFERENCIAS DE LOS BROTES DEL PARENTAL PM7 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL MS 2019	146
TABLA SM 13.- VALORES ESTADÍSTICOS DE LA LONGITUD DE LAS PLANTAS 2018, COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS SALINO Y NO SALINO LÍNEAS LP.....	147
TABLA SM 14.- DIFERENCIAS EN LA LONGITUD DE LAS PLANTAS DEL PARENTAL FL748 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL LP 2018.....	147
TABLA SM 15.- DIFERENCIAS EN LA LONGITUD DE LAS PLANTAS DEL PARENTAL PL12 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL LP 2018.....	148
TABLA SM 16.- VALORES ESTADÍSTICOS DE LA LONGITUD DE LAS PLANTAS 2019, COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS SALINO Y NO SALINO LÍNEAS LP.....	149
TABLA SM 17.- DIFERENCIAS EN LA LONGITUD DE LAS PLANTAS DEL PARENTAL FL478 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL LP 2019.....	150
TABLA SM 18.- DIFERENCIAS EN LA LONGITUD DE LAS PLANTAS DEL PARENTAL PL12 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL LP 2019.....	152
TABLA SM 19.- VALORES ESTADÍSTICOS DE LA LONGITUD DE LAS PLANTAS 2019, COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS SALINO Y NO SALINO LÍNEAS MS	154
TABLA SM 20.- DIFERENCIAS EN LA LONGITUD DE LAS PLANTAS DEL PARENTAL IR64-SALTOL CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL MS 2019	155
TABLA SM 21.- DIFERENCIAS EN LA LONGITUD DE LAS PLANTAS DEL PARENTAL PM37 CON LAS NUEVAS LÍNEAS SALTOL MS 2019.....	156
TABLA SM 22.- PRUEBA DE χ^2 PARA LAS CUATRO CONCENTRACIONES DE HERBICIDA Y EL TRATAMIENTO SIN HERBICIDA ($P < 0.05$).....	157

TABLA SM 23. - PRUEBA DE χ^2 PARA TODAS LAS CONCENTRACIONES DE HERBICIDAS (P <0.05).....	157
TABLA SM 24. - PRUEBA DE χ^2 PARA TODAS LAS PLANTAS SUPERVIVENCIAS ENTRE LÍNEAS (P <0.05).	159
TABLA SM 25. - PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA TODAS LAS PLANTAS HOMOCIGOTAS Y HETEROCIGOTAS SEGÚN LAS CONCENTRACIONES DE HERBICIDAS (P <0.05).....	159
TABLA SM 26. - PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA EL RESULTADO DE LA PCR PLANTAS HOMOCIGOTAS Y HETEROCIGOTAS PARA CADA TIPO DE LÍNEAS (P <0.05).....	160
TABLA SM 27. - PRUEBA DE χ^2 PARA LAS LÍNEAS COMERCIALES DURANTE LAS CUATRO ESTACIONES DEL AÑO Y LA GENERACIÓN DE LOS CRUCES DESDE LA F1 HASTA EL BC4F1 (P <0.05).	161
TABLA SM 28. - PRUEBA DE χ^2 PARA LA CONFIRMACIÓN DE PLANTAS HETEROCIGOTAS MEDIANTE UNA PCR-DIGESTIÓN.	162

1. Introducción

1.1. Importancia del arroz

1.1.1 El cultivo de Arroz

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los cultivos más antiguos y en la actualidad está considerado como uno de los alimentos principales de la humanidad (Bernis & Pàmies, 2004). El origen de la domesticación de este cereal se estima en ~ 8,200-13,500 años A.C., según los datos arqueológicos conocidos sugieren que el arroz se cultivó por primera vez en el valle de Yangtzé en China (Molina et al., 2011). Retrospectivamente y llegando a la actualidad, hoy solo se cultivan dos especies: *O. sativa* y *O. glaberrima*. Estas dos especies diploides ($2n = 24$) fueron domesticadas en diferentes condiciones ambientales. *O. sativa* fue domesticada en el sur y sureste de Asia y se cultiva ampliamente en todo el mundo, mientras que *O. glaberrima* fue domesticada y solo se cultiva de manera minoritaria en África occidental. Los cultivares de *O. sativa* se clasifican en cinco subespecies, que corresponden a *indica*, *aus*, *aromatica*, *japonica templada* y *japonica tropical* (Figura 1).

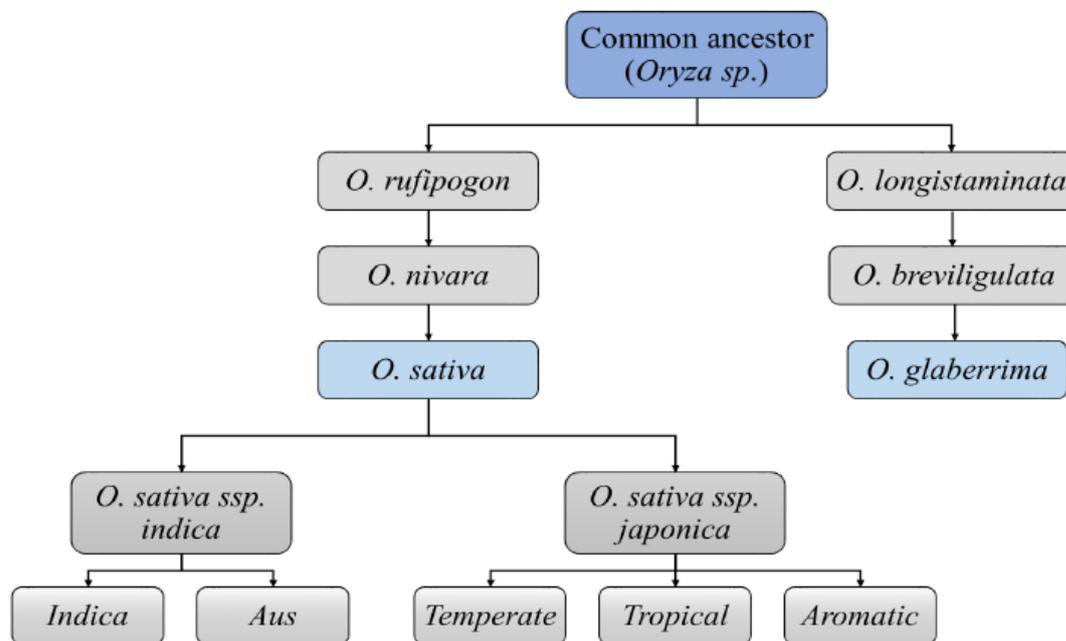


Figura 1. - Clasificación filogenética del arroz. Datos adaptados de Garris et al. (2005).

De hecho, las subespecies de *O. Sativa* como los *aus* son grupos menores que generalmente se consideran *ecotipos indica* y se encuentran en el Himalaya. Después la *japonica templada* situada en China, Corea, Japón y Europa. La *japonica tropical* ubicada entre Malasia, Indonesia y Filipinas) y la *aromatica* localizada entre Pakistán,

India y algunos otros países (Garris et al., 2005). Sin embargo, la clasificación fenotípica tradicional simplemente distingue dos subespecies: *O. sativa* ssp. *indica* y *O. sativa* ssp. *japonica* (Parray et al., 2019).

1.1.2 Fisiología del arroz

El arroz es una planta monocotiledónea que es miembro del género *Oryza* y la familia Poaceae, de 40-150 cm de alto, que se cultiva en diferentes ambientes desde suelos inundados, a suelos secos (Molina et al., 2011; Vaughan et al., 2003). El ciclo de crecimiento del arroz se divide en tres etapas de crecimiento: a) etapa germinación, b) etapa reproductiva y c) etapa de maduración (Fageria et al., 2006). En la primera fase, las semillas germinan mediante la absorción rápida del agua, dando lugar a la aparición del coleóptilo, seguido de las hojas verdaderas y con la aparición del primer macollo se completa la primera fase. La segunda fase o etapa reproductiva comienza con la iniciación de la panícula dentro de la vaina, la cual una vez formada saldrá dando lugar a la floración de dicha panícula. Finalmente, durante la tercera fase, el grano está completamente desarrollado cambiando su tonalidad verdosa y alcanzando su maduración en más del 80% de las espiguillas de la panícula (Figura 2).

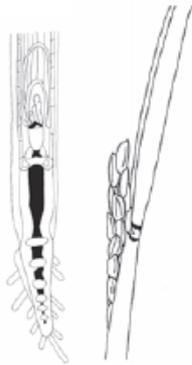
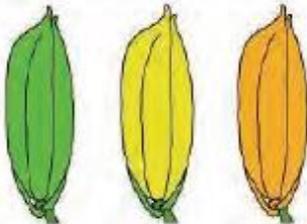
Etapas de crecimiento	Etapa 0	Etapa 1 o fase Germinación	Etapa 2 o fase Reproductiva	Etapa 3 o fase Maduración
Ilustración				

Figura 2. Etapas de crecimiento de la Planta del Arroz. Datos adaptados de Hardke et al. (2018)

1.1.3 Producción del arroz

En la actualidad, el arroz es el segundo cereal más producido en el mundo, justo por detrás del maíz, con 506,3 millones de toneladas (de arroz blanqueado) recogidas en la campaña de 2018 y en el 2019 se situó con 500,6 millones de toneladas (de arroz blanqueado), o sea, un 0,8 % menos que el máximo histórico de 2018, (Tabla 1) (Bedford et al., 2020; Bedford et al., 2019). No obstante, se pronostica que la producción mundial de arroz en 2020 superarán el nivel de 2019 (Marocco & Milo, 2019).

Tabla 1. - Producción de arroz a nivel mundial, principales países líderes en producción (promedio de 2018-2020). Datos modificados de Bedford et al. (2020).

	2018	2019	2020	Cambios 2019 a 2020
	millones de toneladas			%
China	145.3	143.6	144.2	0.4
India	116.5	117.9	119.2	1.1
Bangladesh	36.4	36.9	36.9	-0.2
Indonesia	37.9	35	34.6	-1.1
Vietnam	28.6	28.2	28.3	0.3
Tailandia	21.4	18.8	21.4	13.7
Myanmar	15.7	15.4	15.8	3.1
Filipinas	12.2	12.3	12.4	0.9
Brasil	8.2	7.1	7.4	3.9
Pakistán	7.2	7.2	7.9	10.1
Japón	7.4	7.4	7.4	0.7
EE. UU.	7.1	5.9	6.9	17.1
Camboya	6.5	6.5	6.6	1.5
Nigeria	5	5.1	5.1	1
Egipto	2.8	4.6	5	7.6
Mundial	506.3	500.6	508.7	1.6

El arroz se cultiva en todos los continentes menos la Antártida (Figura 3), desde las tierras secas hasta los humedales y desde las orillas del río Amur (frontera entre Rusia y China) a 53° de latitud norte hasta el centro de Argentina a 40° de latitud sur, en climas fríos como las montañas de Nepal a altitudes de más de 2.600 m sobre el nivel del mar, así como en los desiertos cálidos de Egipto. Sin embargo, la mayor parte de la producción anual proviene de zonas de clima tropical (Nguyen, 2004). El arroz ha formado parte de las identidades culturales de muchas civilizaciones, se ha convertido en una fuente de divisas para varios países y está desempeñando un papel fundamental en sus economías (Chauhan et al., 2017).

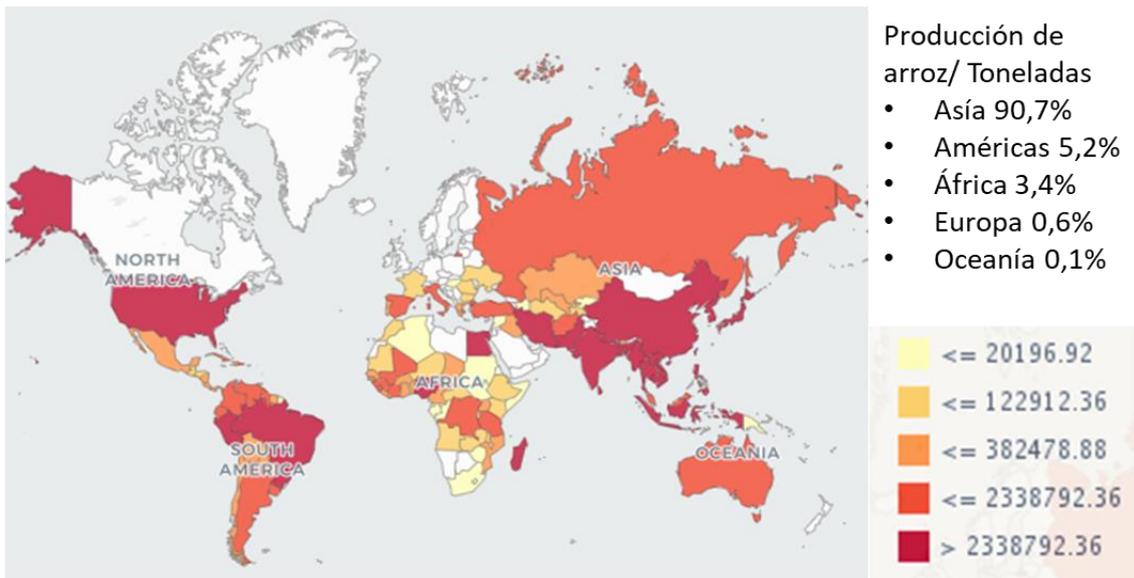


Figura 3. – Principales productores de arroz. Datos adaptados FAOSTAT (2018).

En Europa el arroz tiene una gran importancia sociocultural porque es uno de los alimentos básicos de la dieta mediterránea, pese a que el consumo anual de arroz per cápita es de 6 a 18 kg en las regiones del sur y tan sólo de 3,5 a 5,5 kg en las regiones del norte (McLean et al., 2013), siendo la producción de aproximadamente 437.000 ha. Además, el consumo de arroz en Europa es muy inferior en comparación con Asia. Los principales productores europeos son Italia (220.000 ha) y España (110.000 ha), estos dos países producen más del 75% del arroz europeo (FAO, 2018), mientras que Grecia, Portugal y Francia (30.000 ha cada uno) (Frouin et al., 2018).

El cultivo del arroz en Europa tiene una gran importancia ecológica porque ha generado humedales artificiales, los cuales están sustituyendo a humedales naturales ya extinguidos, y así se constituyen en un hábitat clave para las aves migratorias (Kraehmer et al., 2017). Entre el 70-80% del cultivo en Europa son variedades de grano redondo y medio (Bernis & Pamies, 2008; Ferrero, 2007). España produce una cantidad alta de arroz de grano largo en comparación con la media europea (Tabla 2). El rendimiento promedio de las variedades de grano medio y redondo oscila entre 6,5-6,7 t/ha, mientras que para las variedades de grano largo es de 7,1-7,8 t/ha.

Tabla 2. – Principales países productores de arroz en Europa FAOSTAT (2013).

País	Superficie (ha)	Producción (t)	Rendimientos (t/ha)
Italia	212500	1339000	6.3
España	113200	851500	7.52
Portugal	31200	168300	5.39
Grecia	29200	227000	7.77
Francia	20300	82000	4.04
Rumanía	11579	54646	4.71
Bulgaria	10000	54900	5.49
Hungría	2500	9800	3.92

De hecho, las principales regiones productoras de arroz españolas en cuanto a superficie cultivada son Andalucía, Extremadura, Cataluña en el Delta del Ebro, la Comunidad Valenciana, Aragón y Navarra (Figura 4 y 5).

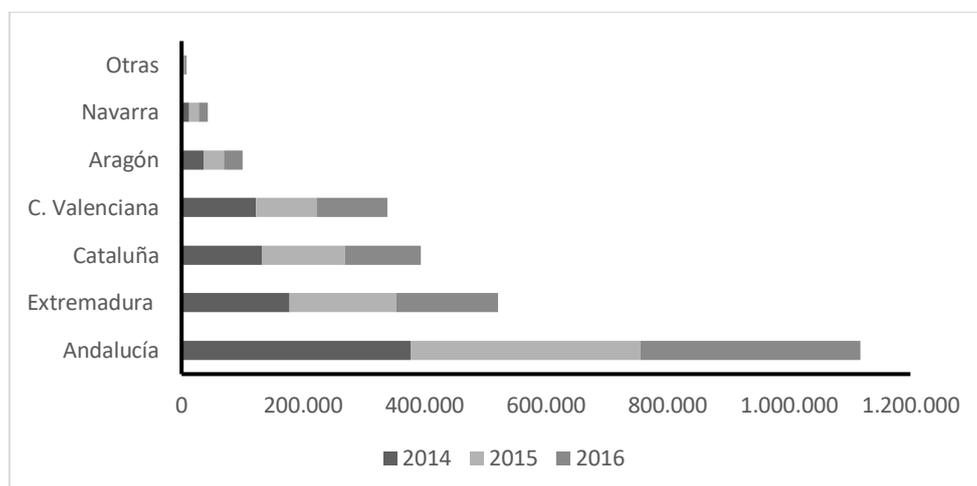


Figura 4. - Distribución de la producción (t) de arroz por Comunidad Autónoma. Datos adaptados de Guerrero (2017).

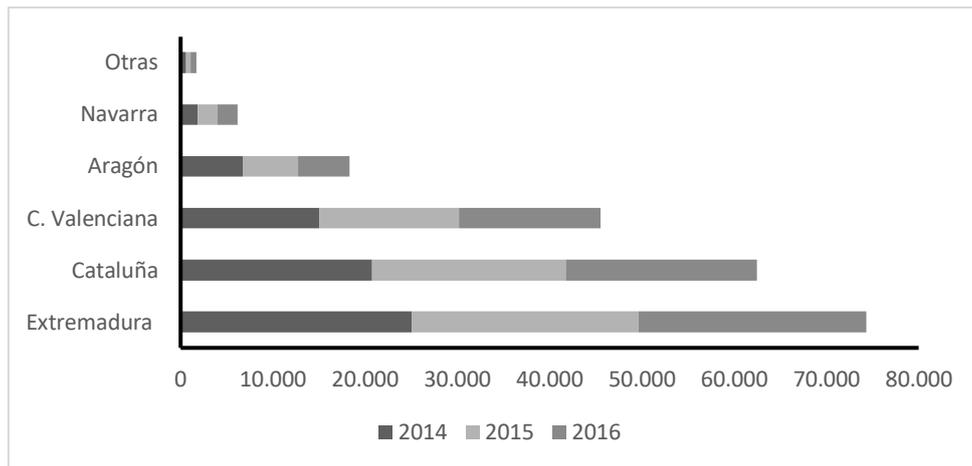


Figura 5. - Distribución de la superficie cultivada de arroz (ha) de las Comunidades Autónomas de España. Datos adaptados de Guerrero (2017).

Además se observaron aumentos repentinos en la demanda interna de arroz *indica* los primeros 5 meses del 2020 por el COVID-19, y algunas restricciones temporales de exportación establecidas por algunos países exportadores como Vietnam (Bedford et al., 2020). Asimismo, se espera que la producción mundial de arroz se mantenga equilibrada y viable a pesar de las preocupaciones sobre los impactos de COVID-19 (Tabla 3). Si bien las interrupciones localizadas en gran parte es debido a problemas logísticos, estos podrían plantear desafíos para la producción, pero es poco probable que lleguen a suponer daños significativos en el abastecimiento europeo (FAOSTAT, 2019).

Tabla 3. *Perspectivas alimentarias del mercado mundial de arroz. Datos adaptados de Bedford et al. (2020). 1/ Los datos sobre producción se refieren al primer año indicado. Por producción de arroz se entiende producción de arroz elaborado. 2/ Producción más existencias al inicio del ejercicio. 3/ Los datos sobre comercio se refieren a las exportaciones durante la campaña comercial, que va de julio a junio en el caso del trigo y los cereales secundarios y de enero a diciembre en el caso del arroz (segundo año indicado). 4/ Puede no ser igual a la diferencia entre suministros y utilización debido a las diferencias en las campañas comerciales de los distintos países. 5/ Los cinco mayores exportadores de granos son la Argentina, Australia, Canadá, la Unión Europea y los Estados Unidos; los mayores exportadores de arroz son la India, Pakistán, Tailandia, los Estados Unidos y Vietnam. Por “desaparición” se entiende la utilización interna más las exportaciones para una campaña dada.*

	Producción 1/	Suministros 2/	Utilización	Comercio 3/	Existencias al final del ejercicio 4/	Relación mundial existencias- utilización	Relación existencias- desaparición principales exportadores 5/
	(..... millones toneladas (t))					(... por ciento (%)...)	
2011/12	480.0	609.0	462.0	40.6	146.6	31.2	25.2
2012/13	484.9	631.5	469.1	40.2	162.1	33.7	28.0
2013/14	490.6	652.6	480.2	45.5	171.6	35.2	29.0
2014/15	490.1	661.6	486.8	45.1	173.6	35.4	24.6
2015/16	488.6	662.2	490.3	41.4	172.0	34.8	19.7
2016/17	496.5	668.5	494.1	48.4	173.0	34.8	18.9
2017/18	499.4	672.3	497.3	48.5	176.3	35.3	18.1
2018/19	506.3	682.5	499.9	44.1	184.6	36.8	22.6
2019/20	500.6	685.2	502.0	44.9	183.4	36.0	25.1
2020/21 (04 junio 2020)	508.7	692.1	510.0	47.6	182.0	35.3	25.1

La producción de arroz sufre alteraciones negativas por diversos factores climáticos que no se pueden controlar como, por ejemplo, el fenómeno del niño, el cual afectó el resultado final de la temporada de 2019 (Bedford et al., 2020). Por tanto, podemos considerar que el cambio climático originará un riesgo para el abastecimiento alimentario en gran parte de la población mundial (Cheeseman, 2016; Lal, 2014). En resumen, el arroz es uno de los principales cultivos básicos que se requiere para alimentar diariamente a casi la mitad de la población mundial (Dawe et al., 2010), la cual se estima que alcance los 7.794 millones de personas durante este año (FAOSTAT, 2019).

1.2. Cambio Climático y sus Consecuencias

El cambio climático ha generado variabilidad en las estaciones del año, lo cual ha provocado que en las últimas décadas existan efectos directos e indirectos, entre ellos podemos mencionar: los cambios en los regímenes pluviométricos, sequías, inundaciones y la redistribución geográfica de plagas y enfermedades (FAOSTAT, 2019; Jagadish et al., 2015). Además, la contaminación y disminución de la biodiversidad han acelerado el aumento de las temperaturas lo cual ha generado escases en la disponibilidad del agua, siendo un riesgo importante y creciente para los próximos años. También, se ha incrementado el riesgo de inundaciones debido al aumento en el nivel del mar lo que ha ocasionado el desborde a los deltas provocando su salinización y cambios en sus ecosistemas terrestres (Futhazar et al., 2018).

Aproximadamente 500 millones de personas viven en zonas afectadas por la desertificación. Las regiones que experimentan ese problema y las tierras áridas también son más vulnerables al cambio climático y los fenómenos extremos, como sequías, olas de calor y tormentas de polvo. Además, el aumento de la población mundial no hace sino someter esas zonas a más presión. También se observa un agravamiento en la escasez de agua en tierras áridas, daños por incendios e inestabilidad del sistema alimentario, incluso en un escenario de calentamiento global de aproximadamente 1,5-2 °C, con una estimación para el 2100 de incremento de la temperatura promedio entre 1,4 y 5,8 °C y un aumento del nivel del mar entre 10 y 20 cm (IPCC, 2014; IPCC, 2019). Las oscilaciones naturales de temperatura en las últimas décadas deben tenerse en cuenta para evitar la subestimación del calentamiento global de la cuenca mediterránea para evitar mayores consecuencias en el futuro (Macias et al., 2013). Probablemente el aumento de la temperatura alrededor de las costas mediterráneas sea mayor que los observados en otras regiones de la misma latitud (Parray et al., 2019). Los eventos extremos del cambio climático como el aumento de CO₂, la temperatura, las inundaciones, las sequías y ciclones, el aumento del nivel del mar y otros problemas relacionados, como la salinidad, representan el verdadero desafío para el cultivo de arroz, en las diferentes zonas productoras a nivel mundial (Chen et al., 2020).

Un ejemplo reciente del cambio climático ha ocurrido en el mes de enero (2020), el delta del Ebro ha sufrido uno de los temporales más graves de los últimos años (temporal Gloria), quedando completamente inundado por el mar 3.000 hectáreas de arrozales y penetrando 3 kilómetros tierra adentro, haciendo desaparecer playas y arrozales (La Vanguardia, 2020). Sin lugar a duda el cambio climático está más cerca de lo que pensamos.

1.2.1 Estrés abiótico: Sequía y salinidad

1.2.1.1 Estrés abiótico

El estrés abiótico en las plantas origina una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que reducen el crecimiento y el rendimiento de sus funciones normales, esta serie de cambios actúan principalmente cuando existe un déficit en parámetros como la luz, el agua, el CO₂, el oxígeno, la temperatura, las toxinas, el contenido de nutrientes y la disponibilidad del suelo (Taiz et al., 2015).

Los mecanismos de respuesta en las plantas actúan de manera constante es decir que, si son afectadas o sometidas por el estrés abiótico, ellas regularán tempranamente su metabolismo energético y sintetizarán sus proteínas para ayudar a la conservación

energética de la planta y otros mecanismos de protección. Sin embargo, a pesar de los mecanismos de respuesta, se reflejarán cambios en el desarrollo vegetativo, reproductivo, celular, enzimático, canales iónicos, acumulación de metabolitos y modificaciones de la estructura del ADN o ARN pero sin llegar a afectar la secuencia genética de las plantas (Cramer et al., 2011).

En efecto, el estrés abiótico tiene un impacto negativo en el rendimiento de los cultivos, lo cual provoca numerosas reacciones de estrés fisiológico en las plantas que pueden verse alteradas en su composición química y por tanto en la calidad final de sus cultivos. Por tanto, citaremos algunas de las respuestas fisiológicas más habituales de la planta: 1) La regulación molecular de los procesos genéticos y enzimáticos involucrados en la biosíntesis de compuestos como almidón, lípidos y antioxidantes, los cuales inducen cambios en la calidad del cultivo. 2) la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) produce un estrés oxidativo, el cual acelera los procesos como la muerte celular programada y la senescencia foliar de las plantas. 3) la senescencia acelerada produce trastornos de los nutrientes y acorta el tiempo en el proceso de maduración final. 4) la reducción del contenido del agua aumenta la concentración de los nutrientes. 5) la absorción y translocación alterada de minerales por falta de agua, nutrientes y superficies salinizadas. 6) la reducción de la biomasa debido a la insuficiencia del carbono fotosintético afecta el rendimiento y los rasgos de calidad del cultivo final (Wang & Frei, 2011).

Cabe señalar que el arroz es uno de los cultivos más sensibles a la salinidad y se estima que su productividad disminuirá a medida que aumente la temperatura. Además, los regímenes de temperatura influyen no solo en la duración del crecimiento, sino también en el patrón de crecimiento y la productividad de los cultivos de arroz. Las temperaturas extremas, ya sean bajas o altas causan daños a la planta. En las regiones tropicales, las altas temperaturas son una limitación para su producción. Así pues, El efecto más dañino está en la esterilidad del grano; es decir, solo 1 o 2 horas de alta temperatura (superior a 40°C) en la antesis, desde que empieza el espigado hasta que completa la floración, dan como resultado en gran porcentaje la esterilidad del grano de arroz (Nguyen, 2004).

1.2.1.2 Sequía

El agua es un elemento esencial para la supervivencia de las plantas, por tanto, los déficits hídricos limitan su crecimiento y producción. De hecho, la demanda de agua para la agricultura podría duplicarse para el año 2050, mientras que para los recursos de agua dulce se prevé una disminución del 50% debido al cambio climático (Figura 6). Sin

embargo, las plantas han desarrollado estrategias naturales de adaptación con el fin de evitar la pérdida de agua, equilibrar su suministro óptimo a los órganos vitales, mantener el contenido de agua celular, perdurar durante períodos de sequía y acelerar la fase reproductiva antes de ver afectada su supervivencia (Gupta et al., 2020).

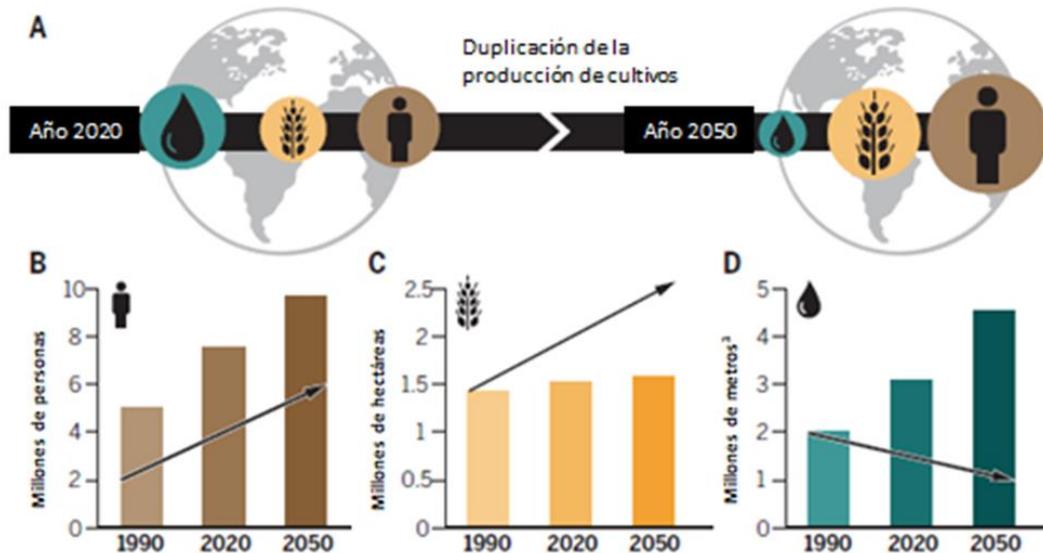


Figura 6. Predicción hasta el año 2050 del clima global, la agricultura y la seguridad alimentaria. (A) La escasez de agua aumentará en los próximos años, debido al crecimiento continuo de la población mundial, la producción de cultivos también debe aumentar para satisfacer las necesidades básicas. (B) La flecha indica el número estimado de personas que viven en zonas con escasez de agua. (C) La flecha indica la demanda prevista de tierra cultivable para garantizar la seguridad alimentaria. (D) La flecha indica la disminución prevista en la disponibilidad de agua dulce para la agricultura, dadas las tendencias actuales de cambio climático y precipitación. Figura modificada de Gupta et al. (2020).

La sequía acarrea consecuencias severas, a medida que la temperatura se ha incrementado en el transcurso de las últimas décadas, su duración se ha prolongado durante periodos con ausencia o deficiencia marcada de precipitación que resulta en escasez de agua y a su vez provoca un desequilibrio hidrológico alarmante (Henry et al., 1996). La constante sequía también está influenciada por el aumento de la concentración de dióxido de carbono atmosférico (CO₂), metano y óxido nitroso. La liberación indiscriminada de gases ha alterado el equilibrio de radiación de la atmósfera, provocando el aumento gradual de la temperatura (FAO, 2001).

En tal sentido, la sequía sin lugar a dudas afecta severamente al arroz en comparación con otros cultivos porque su efecto negativo reduce los recursos acuíferos, los cuales son requeridos en mayor volumen por los cultivos de arroz. En consecuencia, la planta de arroz ha desarrollado modificaciones al estrés por sequía en los siguientes niveles:

a) nivel morfológico, se produce una reducción en la germinación, el número y tamaño de la hoja, la biomasa y en el crecimiento celular (además, se cierran las estomas y se observan necrosis foliares). b) nivel fisiológico y bioquímico, desarrollan reducciones en la transpiración, la fotosíntesis, en el contenido de la clorofila, en la conductancia estomática y en la actividad del PSII (fotosistema II). c) nivel molecular, desarrolla cambios en la expresión genética y se activan los factores de transcripción y las vías de señalización. Sin duda los efectos negativos de la sequía condicionan las características y el rendimiento en el cultivo del arroz (Ndjondjop et al., 2018).

1.2.1.3 Salinidad

Paralelamente a la sequía, el cambio climático acarrea otras consecuencias como las variaciones en el ciclo hidrológico, aumento en el nivel del mar, erosión de las costas y sobre todo la salinización de los suelos a causa de las inundaciones con mareas que se adentran en terrenos fértiles, los cuales se ven afectados tanto en la capa superficial como en las capas subterráneas donde existen reservorios de agua dulce. Estas al ser inundadas son contaminadas con agua salada de mar que aumenta su concentración de sales solubles en el agua del suelo y a su vez provocan un cambio negativo para sus nutrientes (Daliakopoulos et al., 2016).

La salinidad del suelo es un problema global muy importante debido a su impacto adverso en la productividad y sostenibilidad agrícola. Los problemas salinos ocurren en diferentes condiciones climáticas y pueden resultar de acciones tanto naturales como inducidas por el hombre. En general, los suelos salinos lixivian sales minerales y se encuentran en regiones áridas y semiáridas, donde la lluvia es insuficiente para satisfacer las necesidades acuíferas de los cultivos. Por su parte, la salinidad en el suelo dependerá de las diferentes texturas de sus capas, su conductividad hidráulica, el tipo de sistema y la calidad de riego utilizado para el crecimiento de las plantas (Figura 7). Por estas razones se reduce la productividad de los cultivos en campos salinos porque los agricultores se ven obligados abandonar sus tierras por el alto coste en la recuperación y tratamiento (con materia orgánica y nutrientes) de estos suelos salinizados (Zaman et al., 2018).



Figura 7.- Patrón de acumulación de sal, mal sistema de riego; cualquier planta que crezca en la zona se verá altamente afectada. Figura modificada de Zaman et al. (2018).

La salinidad es la segunda restricción más devastadora en la producción de arroz, después de la sequía, generando estrés osmótico, desequilibrio nutricional y toxicidad iónica, lo que afecta el crecimiento y desarrollo en la planta causando una disminución en la productividad (Ismail & Horie, 2017). Pero ambos estreses actúan de manera conjunta, debido al efecto producido por el cambio climático. Por ejemplo, en algunos lugares existen sequías extremas y en otras, lluvias abundantes. Además, el avance del mar está provocando uno de los problemas más importantes para las zonas costeras del mundo, sobre todo en los deltas, debido al aumento del nivel del mar, las inundaciones por mareas y el movimiento de las aguas subterráneas salinas, que aumenta la sal soluble del suelo, produciendo a largo plazo la degradación de la calidad del suelo y así mismo eliminando los acuíferos subterráneos de agua dulce y afectando la capacidad en la producción de arroz (Kakar et al., 2019; Rahman et al., 2018; Zelm et al., 2000). De hecho, cada vez se observan inviernos más cortos y junto a la reducción del flujo de agua dulce, haciendo que el proceso de salinización del suelo sea más acelerado (Rahman et al., 2018).

Se calcula que el incremento salino afectará más de 600 millones de personas, que podría llegar a mil millones para 2050, sobre todo los que viven en zonas costeras (Paper, 2014; Haque, 2006). Por su parte, el mal uso de efluente de drenaje de las áreas de riego de cultivos intensivos como es el arroz, el efluente industrial y las aguas residuales domésticas pueden también contener altos niveles de sal. Además, el exceso de productos agroquímicos en el cultivo del arroz origina esterilidad en el suelo por la acumulación de sales y residuos. En consecuencia, la eliminación o liberación incontrolada de estas aguas y desechos puede conducir a la introducción de sales en el sistema de aguas subterráneas (Weert, 2009).

1.2.2 La región Saltol, un QTL para la tolerancia a la salinidad en el arroz

Entre los principales cultivos de cereales, el arroz es el más sensible al estrés por salinidad (Thomson et al., 2010). Por tanto, los investigadores y agricultores invierten mucho esfuerzo en desarrollar soluciones orientadas a la tolerancia de la salinidad. De hecho, esto es posible mediante la caracterización de genes o caracteres de rasgos cuantitativos (QTL, *Quantitative Trait Locus*) que confieran resistencia al estrés salino. Dentro de este marco de caracterización, Rahman y colaboradores (2017) estudiaron QTLs de tolerancia a la salinidad en los 12 cromosomas del arroz utilizando una población F5 derivada de

una variedad tolerante Hesawi y una variedad sensible IR29 a la salinidad, posteriormente en la población F5 se encontraron 34 QTLs en 10 de los cromosomas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12), de los cuales 9 QTLs destacaron por presentar 5 rasgos importantes: 2 QTL para el SES (Sistema de visualización estándar), 2 QTL para la longitud de los brotes, 2 QTL para la longitud de la raíz, 2 QTL para el peso fresco de los brotes y 1 QTL para el peso seco de los brotes (Rahman et al., 2017).

Debido a la importancia del arroz se han descrito muchos QTL de tolerancia a la salinidad en los diferentes cromosomas. Sin embargo, en su gran mayoría los autores coinciden que los más importantes se encuentran en los cromosomas 1, 4, 6 y 7 los cuales han aportado el mayor número de genes tolerantes al estrés salino (Negrão et al., 2011). Asimismo, Thomson y colaboradores (2010) realizaron un detallado estudio en los 12 cromosomas de arroz, en cruces previamente de las subespecies *indica* y *japonica* para localizar caracteres de interés que mejoren la tolerancia a la salinidad. Con esta información, Thomson y colaboradores (2010) realizaron cruces de variedades de interés agronómicos tradicionales con variedades tolerantes a la salinidad actualmente conocidas (como Nona Bokra, Pokkali, Cheriviruppu, SR26B o sus variedades derivadas) (Thomson et al., 2010). A su vez, el QTL *Saltol* de tolerancia a la salinidad ha sido estudiado frecuentemente en Pokkali, el cual tiene una capacidad para mantener la relación baja de Na^+/K^+ en la parte aérea (brotes) y una tasa de crecimiento más rápida en condiciones salinas distribuyendo la toxicidad en todo el tejido (Walia et al., 2005). También, Lin y colaboradores (2003) han estudiado el QTL *Saltol* de tolerancia a la salinidad, utilizando una población F2 derivada de la variedad *indica* tolerante Nona Bokra y una variedad *japonica* sensible Koshihikari donde se identificaron tres QTL en los cromosomas 1, 6 y 7. Asimismo, Dentro de los tres QTLs, el de mayor efecto fue el QTL en el cromosoma 1 aumentando la supervivencia de las plántulas en 1,92 días. Por otro lado, el QTL del cromosoma 7 obtuvo la mayor concentración de Na^+ y el QTL del cromosoma 1 para K^+ , ambos en los brotes. Cabe añadir, que los QTL detectados en los brotes difieren por muy poco en su ubicación respecto al de las raíces, indicando que son distintos los genes que controlan el transporte de Na^+ y K^+ en brotes y raíces (Lin et al., 2003). Mientras que Chattopadhyay encontró que el QTL *Saltol* de Pokkali contiene una variabilidad de 64,3-80,2% en la relación Na^+/K^+ de los brotes. Sin embargo, él observó que hay otros alelos presentes en Pokkali, pero no en su línea derivada FL478, el cual confiere tolerancia a la salinidad a los nuevos cruces (Chattopadhyay et al., 2014). Cabe destacar que el QTL *Saltol* se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 1 (Figura 8). De hecho Bonilla y

colaboradores (2002) mapearon el QTL *Saltol* entre RM23 y RM140 (10,7–12,2 Mb) y descubrieron una variación fenotípica del 43% en la relación Na^+/K^+ de los brotes (Bonilla et al., 2002). Por último, autores como Soda (2013), Waziri (2016) y sus colaboradores coinciden que el QTL *Saltol* dentro del perfil de expresión de genes se encuentra entre los marcadores de repetición de secuencia simple (SSR) RM1287 y RM6711 con una longitud aproximada de 10,8-16,4 Mb (Soda et al., 2013; Waziri et al. 2016).

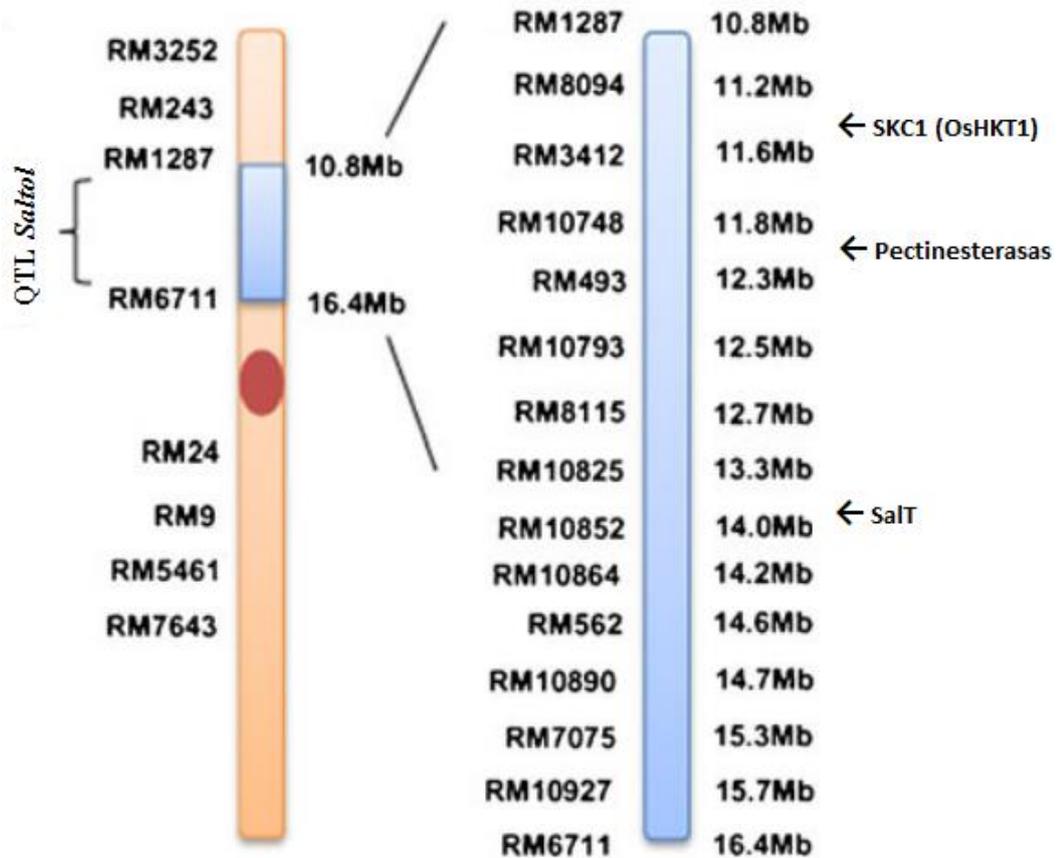


Figura 8. - Ubicación del QTL *Saltol* (cuadrado celeste) en el brazo corto del cromosoma 1 flanqueado por los marcadores SSR RM1287 y RM6711. Modificado de Waziri et al. (2016).

Los múltiples estudios realizados en el QTL *Saltol* han permitido identificar el gen SKC1, el cual se encuentra localizado en la región 11,46 Mb (Thomson et al., 2010), y cuya principal función es la homeostasis de K^+ y Na^+ entre raíces y brotes impidiendo que el Na^+ sea traslocado hacia los brotes (Ren et al., 2005; Thomson et al., 2010; Platten et al. 2013). Además, es importante mencionar a la familia de genes transportadores de K^+ de alta afinidad (HKT) porque poseen características valiosas para la tolerancia al estrés salino (Horie et al., 2009; Rubio et al., 2019; Campbell et al., 2017). También, Ren y colaboradores (2005) estudiaron algunos genes transportadores de potasio (HKT) para

demostrar la relevancia de genes como OsHKT1 y AtHKT1, los cuales son transportadores selectivos de Na⁺. Entonces, Ren y colaboradores determinan que el gen OsHKT2 interviene como un transportador acoplado de Na⁺ y K⁺ que pueden actuar simultáneamente en el arroz Pokkali (de la subespecie *indica*) tolerante a la salinidad, por ende, el adecuado funcionamiento del gen SKC1 y el estudio individual de los genes HKT ayudaran a mejorar la tolerancia a la salinidad en los cultivos de arroz (Ren et al., 2005; Horie et al., 2001). En retrospectiva, el primer gen HKT fue TaHKT2;1, el cual fue descubierto en la planta de trigo (*Triticum aestivum*), como un mediador de transporte de Na⁺/K⁺ (Rubio et al., 1995). Además, la familia de genes HKT se clasifican en al menos dos subfamilias: la primera subfamilia HKT1 se encuentra en las especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, los cuales son transportadores selectivos de Na⁺ y tienen un papel crucial en la tolerancia al estrés salino de las plantas. La segunda subfamilia son los HKT2 solo descritos en especies monocotiledóneas las cuales son selectivas tanto para Na⁺ como para K⁺ (Hauser & Horie, 2010; Platten et al., 2006). En estudios recientes se detectaron diferentes variantes de vinculación del gen OsHKT1;1 en una línea Pokkali de arroz *indica* tolerante a la sal y además sugieren una mejor atribución de tolerancia a la salinidad en el comportamiento de arroz *indica* (Imran et al., 2019). Los mecanismos de exclusión de Na⁺ que están intervenidos por transportadores HKT1 han sido estudiados en varias especies de plantas, como Arabidopsis (*A. thaliana*), Trigo (*T. aestivum*) y Arroz (*O. Sativa*) este último sugiere ser un transportador selectivo de Na⁺ OsHKT1;4 para desempeñar la exclusión de Na⁺ de las hojas y tallos sometidos al estrés salino en las primeras etapas de crecimiento (plántula) y en la etapa reproductiva (Suzuki et al., 2015). Además, la expresión predominante del gen OsHKT1;1 en el floema evoca su posible participación en el mecanismo de recirculación de Na⁺ desde los brotes hasta las raíces (Wang et al., 2015); sin embargo, las funciones fisiológicas detalladas de OsHKT1;1 aún no se han esclarecido.

Finalmente, señalaremos al gen *Salt* solo como referencia porque se encuentra ubicado dentro de la región del QTL *Saltol* y consideran que tiene una respuesta específica sobre el patrón de acumulación de Na⁺ (ajuste osmótico) durante el estrés salino (Claes et al., 1990). Y algo semejante ocurre con otro gen llamado Pectinesterasa localizado también dentro de la región *Saltol*, el cual parece ser un otro gen relevante al estrés salino durante la etapa de plántula (Kumar et al., 2015; Thomson et al., 2010) aunque estos dos últimos genes aún no se han estudiado en profundidad.

1.2.3 El Caracol Manzana

El caracol manzana es un molusco gasterópodo de agua dulce perteneciente al género *Pomacea sp.*, son nativos de los humedales y ambientes acuáticos de América del Sur. Este llega a medir hasta quince centímetros de longitud (adulto) y presenta una concha de forma globosa de color beige a marrón, la abertura de la concha puede ser oval o redondeada y el pie es de color gris amarronado con manchas oscuras. Cabe destacar su sistema respiratorio doble porque posee un sistema branquial y otro pulmonar. Por último, su sistema de reproducción se lleva a cabo mediante la copulación acuática entre macho y hembra, su puesta de huevos es terrestre y masiva (alcanza un promedio de 324 a 800 huevos) sobre todo la adhieren en plantas acuáticas y rocas formando una masa ovigera de color rosa-rojo brillante que al contacto con el aire calcifican y eclosionan aproximadamente de 7 a 15 días (Figura 9; Maceda-Veiga et al., 2013).



Figura 9. *Pomacea maculata* junto a una puesta de sus huevos (Fuente Generalitat de Catalunya Programa nacional para la aplicación de la normativa fitosanitaria. Plan nacional de contingencia de *Pomacea sp.* 2018).

El caracol manzana tiene una dieta omnívora, es decir, se alimenta principalmente de algas marinas, peces y crustáceos, aunque puede diversificar su dieta para adaptarse al entorno y carece de depredadores naturales en Europa, mientras que en Sudamérica el águila caracolera (*Rostrhamus sociabilis*) y el caimán (*Caiman sp.*) son sus principales depredadores. Entonces debemos señalar que el cultivo de arroz en condiciones de inundación supone un ambiente idóneo para la reproducción del caracol manzana, utilizando los brotes tiernos y más jóvenes de la planta de arroz como alimento, pudiendo acabar con cosechas enteras (SIN, 2003). Por esta razón, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) solicitó el 2014 al Panel de Sanidad Vegetal (PSV) realizar una evaluación de riesgos ambientales (ERA) del caracol manzana para la Unión

Europea UE y la consideró una de las peores plagas por gasterópodos en los cultivos de arroz introducidas en la Unión Europea en los últimos tiempos, lo que podría provocar daños inmensurables en la biodiversidad y la producción de arroz de los humedales de Europa (EFSA, 2011, 2016).

El caracol manzana se encuentran entre las 100 especies exóticas invasoras del mundo, *Pomacea canaliculata* y *Pomacea maculata* (también conocida como *Pomaceae insularum*) (Weijden et al., 2014). En el mundo, se ha informado de invasiones a países tales como: a) países del este y sudeste asiático, donde el sur de china está siendo gravemente afectado, y b) América del Norte en Los Estados Unidos en zonas como Luisiana y el norte de Florida y además en países de Centroamérica donde está provocando graves problemas y pérdidas superiores al 50% en cosechas de arroz.

En Europa se detectó por primera vez en el año 2009 en España en la zona de Cataluña más propiamente en el Delta del Ebro y también está presente en Georgia (López et al., 2010). Por consiguiente, se han seguido estudios moleculares para la clasificación del género, distribución e invasión. No obstante, en el del Delta del Ebro debido a la similitud en la morfología de las especies parece ser que existe un híbrido de *P. insularum* x *P. canaliculata* (Ravindra et al., 2017) al hallar cierta discrepancia en la identificación, se realizó un análisis molecular y se concluyó que era *P. maculata* (López et al., 2010). En la actualidad se siguen varias acciones para controlar la población del caracol manzana en el río Ebro, pero la distribución de *P. maculata* aumenta constantemente (Oosterom et al., 2019). Por su parte, en Francia se informó del primer brote en el 2018 en el lago St. Esprit (Fréjus) (Reporting Service, 2018), solo a 100 km de Ventimiglia (Italia). La posibilidad de que esta plaga se disperse y acceda a otras zonas arroceras de Europa como Italia, primer productor de arroz, que permanece en constante alerta para evitar la invasión de dicha plaga en el Delta del Po, ha llevado a la Unión Europea a considerar la erradicación del caracol manzana como un asunto prioritario (Silva et al., 2019; Yang et al., 2018; Lo & Mun, 2019; Brito & Joshi, 2016).

Teniendo en cuenta las diferencias biológicas y ecológicas entre las especies de *Pomacea* sp., sus adaptaciones y tolerancias a las condiciones ambientales pueden llegar a ser diferentes, así como sus niveles de afectación con respecto a sus patrones de propagación y distribución. Además la tolerancia al frío de *P. insularum* y *P. canaliculata*, las convierte en especies invasoras aún más difíciles de eliminar (Yoshida et al., 2014; Weijden et al., 2014). De hecho, se plantean la exploración de otras opciones de eliminación como el control físico, biológico y químico. En tal sentido, en el río Ebro se empezó con la

erradicación manual, que ha sido el método más efectivo para controlar nuevos asentamientos y causando el menor daño posible a los ambientes naturales, pero llega a ser muy laborioso y costoso. También se probó la instalación de mallas metálicas y otras estructuras para evitar la entrada de caracoles en la red de riego y así evitar la reinfestación de los campos a través de la red de drenaje, aunque se demostró que era insuficiente. También se aplicó la limpieza de maquinaria agrícola, siendo obligatoria hoy en día. El drenaje de los campos durante el invierno fue una estrategia adoptada durante los primeros años de la plaga, y pareció reducir en gran medida las poblaciones de caracoles en el campo, eliminando al 65-99% de los individuos, aunque los especímenes más grandes se entierran y sobreviven. Desde 2016, esta medida es opcional, debido a los costos asociados, ya que los agricultores no perciben las subvenciones otorgadas por la Unión Europea para mantener los campos inundados durante el invierno, a fin de mantener la población de aves migratoria (MAAMA, 2015; MINECO, 2018).

Sin embargo, la estrategia más efectiva ha sido la inundación de los campos con agua de mar porque ha producido una mortalidad del 100% de la especie debido a su sensibilidad salina con una tasa de 20,4% de concentración salina (Ramakrishnan, 2007). El mar Mediterráneo tiene una concentración de salinidad de 38% (Borghini et al., 2014). Estas inundaciones de agua de mar se mantuvieron 30 días como máximo, y luego los campos se lavaron con agua dulce. Aunque al principio fueron muy efectivos, los agricultores se quejaron de los problemas que causaron la salinidad residual en sus campos.

Por otro lado, en Hawái y el sudeste asiático y en alguna granja ecológica de Francia los patos se usan en campos agrícolas para ayudar a eliminar los caracoles manzana en estadio temprano, no siendo efectivos en caracoles adultos (Musman et al., 2013). El cangrejo de río (*Austropotamobius italicus*) y el pez luna (*Mola mola*) consumen los caracoles pequeños (más pequeños que el tamaño de la boca de los peces), aunque los adultos completamente desarrollados son demasiado grandes para cualquiera de las dos especies. También se han utilizado molusquicidas, como las saponinas (triterpenoides pentacíclicos) derivados de semillas de té (*Camellia sinensis*) que interrumpen la respiración del caracol o un monohidrato de niclosamida (denominado Pestanal, 20,5-dicloro-40-nitrosalicilanilida), pero probablemente causarían efectos ambientales negativos en las especies nativas y no erradica al caracol manzana, solo reduce las pérdidas en la cosecha (Olivier et al., 2016). Dentro de este orden de acciones y estrategias, la identificación correcta de las especies invasoras contribuirá a tener el

conocimiento básico para desarrollar estrategias efectivas del control de plagas, limitar su propagación y actuar con la correcta erradicación (Yang et al., 2018).

1.2.4 Proyecto NEURICE H2020

Como hemos visto en la anterior sección 1.2.3., los daños ocasionados por la plaga del caracol manzana (*P. maculata*), acarrea muchas pérdidas a los agricultores, esto conllevó la necesidad de buscar una solución en la Unión Europea para el financiamiento de un proyecto para afrontar la plaga y, a su vez, evitar su expansión en toda Europa. Al mismo tiempo, contrarrestar el incremento de la salinidad en el suelo, ocasionado por la subida del nivel de mar, en consecuencia, implica un nuevo reto para la obtención de nuevas líneas de arroz tolerantes a la salinidad. Debido a esto y teniendo el conocimiento que la región mediterránea se caracteriza básicamente, por tener una temperatura que influye de forma positiva en la agricultura, pero en la actualidad se está viendo seriamente afectada por el cambio climático y especies invasoras como el caracol manzana (*P. maculata*).

Por lo descrito anteriormente en el párrafo 1.2.2.1, nace el Proyecto H2020 NEURICE (*New commercial European RICE*), para conseguir arroz tolerante a la salinidad mediante la introgresión de alelos tolerantes a la sal para proteger al sector arrocero contra el cambio climático y el caracol manzana (*P. maculata*). El objetivo principal de este proyecto fue desarrollar estrategias para la productividad, estabilidad y calidad del arroz mediante el desarrollo de un nuevo arroz europeo comercial altamente tolerante a la salinidad.

Las actuales líneas europeas de arroz no son capaces de resistir concentraciones elevadas de salinidad, un grave problema en las regiones productoras de arroz debido al cambio climático. La preocupación de los agricultores es el aumento de la temperatura global en el último siglo, especialmente durante los últimos 50 años (aprox. 0,13°C/ década; IPCC, 2019). Este calentamiento ha sido más intenso en la región mediterránea, especialmente en las estaciones de primavera y verano.

Así, en el proyecto NEURICE, se propuso introducir el QTL *Saltol* de tolerancia a la salinidad en variedades mediterráneas comerciales élites cultivadas en el Delta del Ebro. De esta manera, se puede conseguir luchar fácilmente contra la plaga del caracol manzana inundando los campos con el agua del mar sin perder el rendimiento del arroz, ya que estas nuevas variedades tolerarían las condiciones de salinidad residual gracias a la introgresión de la región *Saltol*.

1.2.5 *Malas hierbas*

Las malas hierbas son otro estrés biológico significativo que dificulta a gran escala la productividad del arroz en los principales países productores. En consecuencia, son elementos decisivos para la erradicación de las malas hierbas del banco de semillas, las prácticas de labranza, el tipo de siembra utilizado, la temporada de siembra, el fertilizante o el manejo del agua (Rao et al, 2017).

El control de las malas hierbas es de vital importancia en el cultivo de arroz, sobre todo en aquellas regiones donde se practica siembra directa y no hay rotación de cultivos, como es el caso del Delta del Ebro (Català, 1995).

La diversidad y flexibilidad de las variedades de malas hierbas posibilita que los agricultores utilicen diferentes métodos para su control y erradicación, las cuales varían dependiendo del lugar y la cantidad de siembra, por consiguiente, se puede utilizar los siguientes métodos: a) el control manual, aunque cada vez es más difícil, laborioso y costoso; b) la mecanización que permite trabajos agrícolas en tiempo más rápido y menos trabajo pesado; c) el método tradicional de trasplante de cultivo, que implica una inmersión continua e inundación del suelo; d) el método de acolchado consiste en utilizar residuos orgánicos como un manto que suprime el crecimiento de malas hierbas y ayuda a mantener la humedad óptima del suelo; e) el método de diversificación de cultivos suprime las malas hierbas porque proporciona un suministro de nutrientes equilibrados y mejora la materia orgánica del suelo; f) el método de rotación de cultivos (en detalle su importancia en el siguiente párrafo); g) el método de los herbicidas, que es efectivo en el control previo y posterior al nacimiento brote del cultivo del arroz (Rao et al., 2017).

Por otro lado, la rotación de cultivos es otra forma de disminuir las malas hierbas, porque las plantaciones de arroz se benefician alternándose con otras cosechas. Así mismo el cultivo alternativo dependerá del sistema de la zona productora tales como la soja, el trigo o la quínoa. De este modo gracias a la rotación se reduce las malas hierbas en un promedio entre 50-70%, obteniendo mejores rendimientos en la producción del arroz, por el contrario las malas hierbas no controladas pueden causar hasta un 80% en pérdidas (Smith, 1981). En la gran mayoría de malas hierbas, sus semillas permanecen latentes en el suelo durante periodos desfavorables y rompen esta latencia germinando cuando las condiciones vuelven hacer favorables (Merritt et al., 2007; Vázquez & Orozco, 1993). La técnica de la siembra falsa se aplica comúnmente en el cultivo continuo de arroz estimulando la germinación de las malas hierbas, con inundaciones de campo y rociando con herbicidas sistémicos antes de la siembra (Labrada, 2002). El éxito dependerá del

número de plantas sobrevivientes en contraste a las eliminadas con herbicidas tanto en cultivos de rotación como en monocultivos (como el caso del arroz) (Vidotto & Ferrero, 2000).

Las principales malas hierbas durante el cultivo y su posterior cosecha son: chufa (*Scirpus maritimus*), la boba (*Typha* sp.), el mijo (*Echinochloa* sp.), arroz salvaje (*Oryza sativa* f. *spontanea*), la punta de espada (*Cyperus difformis*), la *Alisma plantago-aquatica* o la *Heteranthera* sp. Además, los bancos de semillas pueden ser contaminados por estas mismas malas hierbas. Para evitar contaminaciones con estas malas hierbas, los agricultores deben utilizar preferentemente semillas de arroz certificadas libres de toda maleza. Por otro lado, las estrategias de control de malas hierbas basadas en herbicidas pueden agravar el problema de ciertas especies en lugar de aliviarlo, por lo tanto los agricultores tienen que estar adecuadamente asesorados para tomar decisiones que no afecten al rendimiento del cultivo (Labrada, 2002).

En la actualidad el principal objetivo para la investigación agrícola es la mejora de los cultivos, mediante el uso de técnicas como el retrocruzamiento asistido por marcadores moleculares método muy usado por su eficiencia reproductiva y para el desarrollo de nuevas generaciones con características deseadas para los investigadores/productores del cultivo de arroz (Palanog et al., 2020) y el uso de biotecnología aplicada. Si bien es cierto que cada vez las poblaciones de malas hierbas están desarrollando resistencia a los herbicidas, la adopción de nuevas variedades de arroz resistente a los herbicidas, es una herramienta muy útil, brindando una oportunidad de controlar eficientemente el arroz rojo de malas hierbas y otras especies difíciles de eliminar, especialmente las gramíneas resistentes a otros herbicidas (Olofsdotter et al., 2000).

Las zonas productoras de arroz desarrollan otro papel importante, albergar la vida silvestre, pero una intensa práctica agrícola del suelo y además un excesivo uso agroquímico para combatir las malas hierbas, son una potente amenaza a la supervivencia de la biodiversidad y una disminución en cuanto a la producción del arroz (Hosoya & Sugiyama, 2017). La agricultura ecológica es la forma más adecuada para mantener los campos de arroz sin alterar su biodiversidad porque en su práctica no utiliza fertilizantes químicos ni agroquímicos sintéticos, aunque cada vez sea más difícil esta práctica por el aumento de formas crecientes de plagas, patógenos y malas hierbas, acarreado consigo pérdidas considerables para los agricultores (Hosoya & Sugiyama, 2017).

1.3. Resistencia a herbicidas

La resistencia a los herbicidas no es la misma para todas las plantas. Al contrario de lo esperado, las malas hierbas resistentes pueden soportar la aplicación de tasas altas de herbicidas llegando a sobrevivir. Aquí, se presentan dos conceptos diferentes de la resistencia y tolerancia a los herbicidas. La resistencia a los herbicidas es la capacidad genética que tiene una planta individual para sobrevivir a una aplicación de herbicida que mataría a una población normal de la misma especie. En cambio, la tolerancia a los herbicidas es la ventaja genética de una especie para sobrevivir y reproducirse después del tratamiento con un índice de uso normal. Debido a que la especie es naturalmente tolerante, la selección no está involucrada (Reade & Cobb, 1991).

Para disminuir el daño a los cultivos, se han desarrollado cultivos resistentes a los herbicidas HRC (*herbicide-resistant crops*) con el objetivo de mejorar la selectividad de los herbicidas, expandiendo el espectro de control de malas hierbas. Los HRC pueden clasificarse como transgénicos si se desarrollan utilizando la tecnología OGM (*genetically modified organism*) a través de la ingeniería genética, o como no transgénicos, que se desarrollan mediante el mejoramiento por mutación o técnicas de mejoramiento convencionales (Reddy & Nandula, 2012). Los HRC no transgénicos, se desarrollaron utilizando técnicas de mejoramiento convencionales. El rendimiento agronómico de los HRC no transgénicos, a menudo, no cumplía con las expectativas de los productores. Por lo tanto, los científicos comenzaron a buscar formas alternativas de desarrollar HRC, principalmente mutagénesis y selección de mutaciones funcionales en el gen diana que impida la acción de los herbicidas (Reddy & Nandula, 2012).

1.3.1 Tipos de Herbicidas

Los herbicidas son productos y estructuras químicas, agrupados en familias con características similares, cada uno de ellos tiene propiedades únicas. La figura 10 muestra las dianas celulares de acción de los herbicidas y su clasificación por su modo de acción (Délye et al., 2013). Entre los herbicidas actuales (Tabla 4) encontramos varios mecanismos de acción, los cuales suelen basarse en la obstaculización de procesos vitales de las plantas como la fotosíntesis, la división celular o la síntesis de aminoácidos, pigmentos, y lípidos (Duke, 1990).

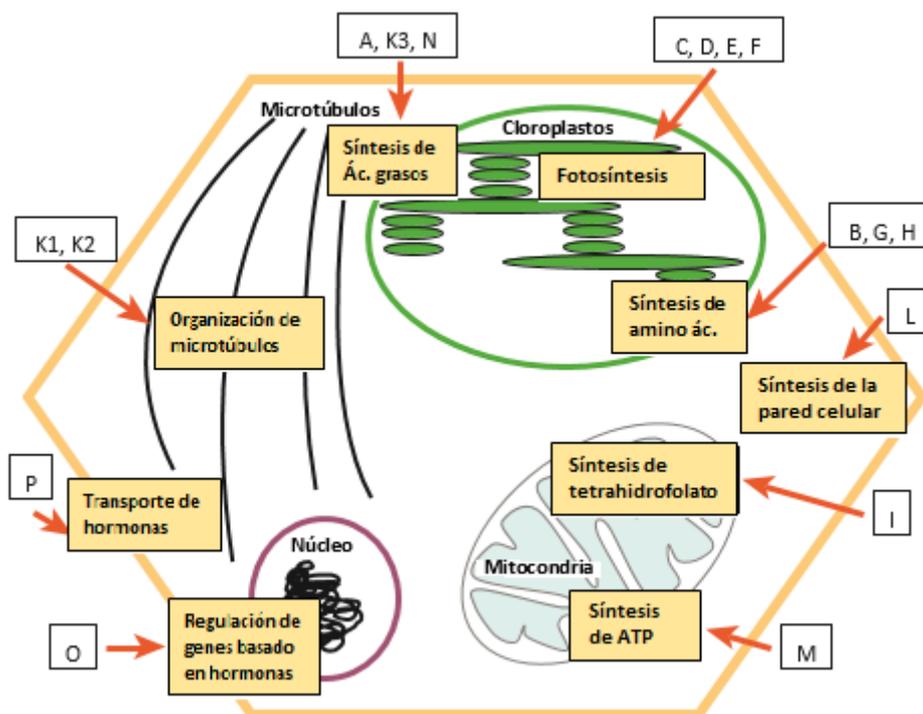


Figura 10.- Dianas celulares de acción de los herbicidas y su clasificación por su modo de acción según el Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas (HRAC). Los herbicidas se dirigen solo a unas pocas proteínas o procesos entre la enorme variedad presente en las plantas. Modificado de Délye et al., (2013).

Tabla 4.- Modo de acción de los herbicidas. Datos modificados de Délye et al., (2013)

Grupo HRAC	Herbicida modo de acción	Proteína objetivo codificación de genes	Vías o procesos dirigido	Familias de herbicidas
A	Inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa)	Nuclear	Biosíntesis de ácidos grasos	Aryloxyphenoxypropionate (FOPs) y cyclohexanedione (DIMs).
B	Inhibición de la acetohidroxiácido sintasa (AHAS, ALS)	Nuclear	Biosíntesis de aminoácidos nucleares (Leu, Ile, Val)	Imidazolinonas, pirimidiniltiobenzoatos, sulfonilaminocarboniltriazolinonas, sulfonilureas y triazolopirimidinas.
C	Inhibición de la proteína D1 del fotosistema II (psbA)	Cloroplástica	Fotosíntesis (transferencia de electrones)	Fenilcarbamatos, piridazinonas, triazinas, triazinonas, uracilos, ureas y amidas
D	Desviación de los electrones transferidos por el fotosistema y la ferredoxina (Fd)	Cloroplástica	Fotosíntesis (transferencia de electrones)	Bipiridilios

E	Inhibición de protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Nuclear	Fotosíntesis (biosíntesis del hemo para la clorofila)	Difeniléteres, N-fenilftalimidas, oxadiazoles, oxazolidinedionas, fenilpirazoles, pirimidindionas, tiadiazoles y triazolinonas.
F	Inhibición del fitoeno desaturasa (PDS) o 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (4-HPPD) de una proteína	Nuclear	Fotosíntesis (biosíntesis de carotenoides)	Amidas, anilidex, furanonas, fenoxibutanamidas, piridiazinonas, piridinas, calistemonas, isoxazoles, pirazoles y tricetonas.
G	Inhibición de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSP sintasa)	Nuclear	Biosíntesis de aminoácidos (Phe, Trp, Tyr)	Glicinas (glifosato)
H	Inhibición de la glutamina sintasa	Nuclear	Biosíntesis de aminoácidos (Gln)	Ácidos fosfínicos (glufosinato y bialofos).
I	Inhibición de la dihidropteroato sintasa	Nuclear	Biosíntesis del tetrahidrofolato	Carbamato y asulam
K1, K2	Mejora de la despolimerización de tubulina	Nuclear	Polimerización de microtúbulos	Benzamida, ácido benzoico (DCPA), dinitroanilina, fosforamidato, piridina, carbamato, carbetamida, clorprofam y profam.
K3	Inhibición de la sintasa de ácidos	Nuclear	Biosíntesis de ácidos grasos	Acetamida, cloroacetamida, oxiacetamida y tetrazolinona.
L	Inhibición de la celulosa-sintasa	Nuclear	Biosíntesis de la pared celular	Benzamidas (WSSA Grupo 21) y nitrilos (Grupo 20).
M	Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa	Nuclear	Biosíntesis del ATP	Desacopladores de fosforilación oxidativa Dinitrofenoles (dinoterb).
N	Inhibición de la elongasa de los ácidos grasos	Nuclear	Biosíntesis de los ácidos grasos	Benzofuranos (WSSA Grupo 16), ácidos clorocarbónicos (Grupo 26), fosforoditioatos (Grupo 8) y tiocarbamatos.
O	Estimulación de la proteína de respuesta al inhibidor del transporte 1 (TIR1)	Nuclear	Regulación de genes sensibles a auxinas	Ácidos benzoicos, ácidos fenoxicarboxílicos, ácidos piridincarboxílicos y ácidos quinolincarboxílicos (O (4) y L (27)).
P	Inhibición del transporte de auxinas	Desconocido	Señalización hormonal de largo alcance	Ftalamatos (naptalam) y semicarbazonas (diflufenzopyr).

Z	Inhibidores de la elongación celular (Desconocido)	Varios herbicidas no clasificados.
---	--	------------------------------------

1.3.2 El sistema Clearfield®

Los campos del cultivo de arroz son infestados por malas hierbas en especial por su homónimo (*Oryza sativa* ssp. *spontanea*), compitiendo con el arroz cultivado (*O. sativa* ssp. *japonica e indica*). Como consecuencia existen pérdidas que van del 5% al 100% en áreas severamente invadidas. Para resolver este problema, el Centro Agrícola de la Universidad Estatal de Louisiana (LSU AgCenter) introdujo nuevas variedades de arroz resistentes a la imidazolinona (IMI) conocidas como arroz Clearfield® ofreciendo la oportunidad de controlar selectivamente el arroz de las malas hierbas (Sudianto et al., 2013). La IMI actúa como inhibidora natural en la planta de arroz, albergando una mutación en la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS) o acetolactato sintasa (ALS) la cual detiene la producción de 3 aminoácidos, es decir sin ellos las malas hierbas mueren lentamente debido a su incapacidad para sintetizar proteínas (Croughan, 2003). El arroz Clearfield® se considera un producto seguro porque no contiene ningún transgén microbiano.

Las empresas BASF (Ludwigshafen, Alemania) y Horizon Ag (Lakewood, EEUU) han diseñado protocolos específicos, con rotación de cultivos para la introducción de arroz Clearfield® en diferentes países para poder acabar con las malas hierbas y tener cosechas 100% productivas (Salassi & Deliberto, 2010).

1.3.3 El sistema Provisia®

Los herbicidas inhibidores de la síntesis de lípidos se agrupan en seis familias según su composición química: Tiocarbamatos, Cloroacetamidas, Fenilpirazolinás, Alaninopropionatos, Ariloxifenoxipropionatos (AOPPs) y Ciclohexanodionas (CHDs). Estas dos últimos, son los que han demostrado mayor eficacia, y su uso ha sido muy extendido desde su desarrollo a mediados de los años 70s (Reade & Cobb, 1991). Su funcionamiento se basa en inhibir la acción de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) en la síntesis de los ácidos grasos, de tal manera que se impide su formación de novo (Rendina & Felts, 2016).

Los herbicidas que tienen este modo de acción consisten en dos grupos: los inhibidores de acetil CoA carboxilasa (ACCase) y los inhibidores de acil CoA elongasa (inhibidores no ACCase). Estos herbicidas bloquean la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA al inhibir la actividad de la enzima acetil-CoA Carboxilasa (ACCase), bloqueando la

producción de fosfolípidos utilizados en la construcción de nuevas membranas celulares requeridas para el crecimiento celular. Las malas hierbas de hoja ancha son naturalmente resistentes a los herbicidas con este modo de acción debido a una ACCasa insensible (Grongrald & Freeman, 1995).

En esta Tesis nos centraremos en las ciclohexanodionas (Figura 11), cuya estructura base es un ciclohexano con un Oxígeno (O) doblemente unido al anillo en la posición 1, un grupo hidroxilo unido en la posición 3 con otras sustituciones en las posiciones 2 y 5 del anillo hexano. Los herbicidas en este grupo son denominados como graminicidas o "dims".

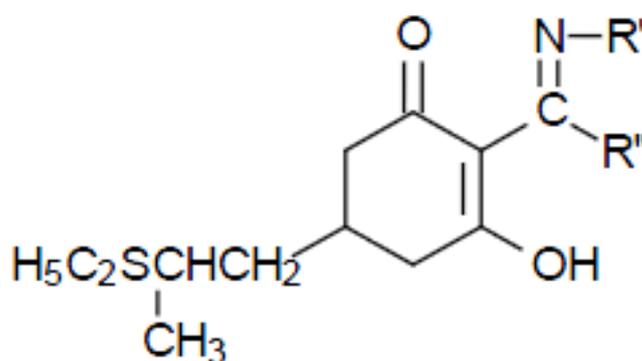


Figura 11. Estructura básica de las ciclohexanodionas. Esquema adaptado de Grongrald & Freeman (1995).

Las ciclohexanodionas, a nivel de planta se caracterizan por un metabolismo de forma inactiva, fácil absorción por el follaje y las raíces, se desplazan tanto en floema como en xilema (aunque principalmente en floema), acumulándose en regiones meristemáticas de raíces y brotes. Son selectivas para eliminar las plantas denominadas malas hierbas de hoja estrecha, la enzima ACCasa tolerante a graminicidas en las hojas anchas y ausente en los pastos (Grongrald & Freeman, 1995).

Teniendo en cuenta lo descrito en el párrafo anterior se realizó una selección por mutagénesis, donde se ha aislado una mutación de OsACC2 que confiere resistencia a las ciclohexanodionas en una variedad de arroz indica (*O. sativa* ssp. *indica*) llamada comercialmente Provisia®. Las mutaciones se producen en rutas metabólicas importantes para las plantas, por ejemplo la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) es la principal enzima para las vías de biosíntesis de los ácidos grasos y su forma plastídica en las malas hierbas son inhibidas por las familias químicas de los herbicidas (Figura 12) (Gaines et al., 2020).

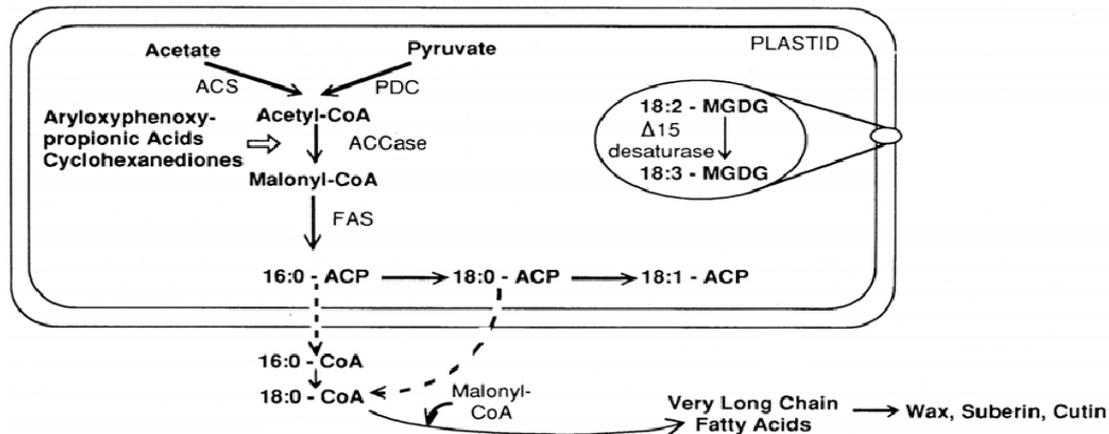


Figura 12. - Acción de la ACCasa en la síntesis de los ácidos grasos. Esquema adaptado de Harwood (1988).

La empresa BASF (Ludwigshafen, Alemania) comercializa en Estados Unidos esta nueva variedad indica resistente Provisia®, y propone un sistema de rotación con la variedad Clearfield® (resistente de Imazamox) y con soja (arroz-arroz-soja y un cuarto año opcional de arroz convencional). De este modo, se alterna el uso de herbicidas con diferente modo de acción y cultivos con malas hierbas asociadas a diferentes métodos de cultivo: arroz (inundación, condiciones anaeróbicas) y soja (aeróbicas). Este sistema dual o de alternancia entre herbicidas y ambientes provoca la interrupción de los ciclos vitales de las malas hierbas, al tiempo que impide la aparición de variedades resistentes evitando utilizar un solo herbicida (BASF., 2020).

Este sistema empleado en los Estados Unidos se quiere introducir en Europa introgressando el alelo mutado OsACC2 que le confiere resistencia al Cicloxidim en líneas comerciales de arroz europeos mediante un sistema de retro-cruces (*backcross*). Con este método, las variedades que se obtienen no se consideran transgénicas sino cisgénicas, ya que se obtiene la introgressión a partir de individuos de grupos muy próximos (de la misma especie en este caso) que también hubieran podido cruzar de forma natural. Además del mejoramiento tradicional por introgressión de plantas de fertilización cruzada nos permite la introducción de genes del germoplasma silvestre sin mezclar la combinación de alelos en el genotipo receptor heterocigoto de élite existente (Schouten et al., 2006).

Por otro lado, la resistencia a los herbicidas es un carácter cada vez más habitual en el mercado de semillas del arroz, debido a la facilidad de selección de mutantes de nueva creación mediante la adición del herbicida en los medios de selección, el hecho de que dichos mutantes no sean considerados organismos modificados genéticamente (OGM) y la creciente infestación de malas hierbas en los arrozales, conllevan a pérdidas

económicas en la agricultura. Las mutaciones son fácilmente predecibles porque se conocen perfectamente los genes que codifican para las enzimas de todos los herbicidas (Nadir et al., 2017).

Existe evidencia de que los herbicidas ACCasa se unen dentro de un dominio cercano y que se superponen parcialmente al sitio catalítico (Figura 13). Actualmente se han descrito ocho sustituciones de aminoácidos para la ACCasa que pueden evitar la unión de herbicidas sin tener un efecto sobre la unión de acetil-CoA del sustrato en el sitio catalítico, mientras que otras mutaciones que se superponen al sitio catalítico pueden afectar negativamente la unión de acetil-CoA carboxilasa y, por lo tanto, la funcionalidad de la misma (Gaines et al., 2020).

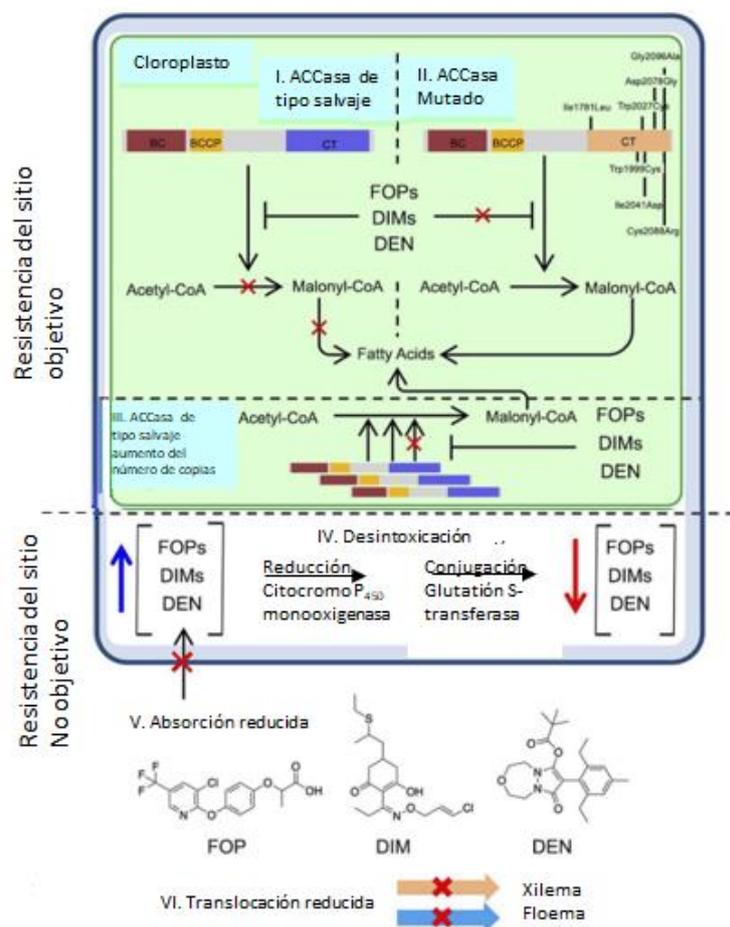


Figura 13. - Aspectos principales de la resistencia a herbicidas que inhiben la acetilcoenzima A carboxilasa (ACCasa) en los pastos y las diferentes formas que la resistencia puede evolucionar. 1 (I) Interacción de inhibidores de la ACCasa y una enzima salvaje, 2 (II) Resistencia por mutaciones de la ACCasa, 3 (III) Mayor número de copias de la ACCasa salvaje, 4 (IV) Resistencia metabólica por desintoxicación de los herbicidas, 5 (V) Absorción reducida y 6 (VI) Translocación reducida. Modificado de Takano et al., (2020).

Además de las diferentes mutaciones que confieren un amplio espectro de resistencia a todas las clases de herbicidas inhibidores de ACCasa los niveles de resistencia no dependen únicamente de las sustituciones de aminoácidos, sino también del número de alelos y la frecuencia inicial, las interacciones alelos recesivos y dominantes, las especies de malas hierbas, la etapa de crecimiento de las plantas, la dosis recomendada de herbicidas (Kaundun, 2014). Así mismo, los niveles de homocigosis/heterocigosis de las plantas es muy importante para la dosis recomendada y la familia de herbicidas a utilizar para la evaluación (Takano et al., 2020).

1.4. Importancia de los Lípidos en las Plantas.

Los lípidos cumplen numerosas funciones en las plantas y son componentes clave de las membranas celulares, como la cutícula y la suberina que rodean las células endodérmicas de la banda de Caspary. Los lípidos cumplen funciones vitales como la estructural, la de reserva energética o de compuestos de señalización y es, por eso, que la inhibición de la biosíntesis de estos compuestos resultará letal. Entre los efectos que provocan, se encuentran la inhibición de la germinación, necrosis de los meristemos, reducción de la elongación foliar e inhibición del crecimiento, ya que la planta es incapaz de formar nuevas membranas plasmáticas (Carr et al., 1986). Los lípidos también sirven como reserva de energía y moléculas de señalización dentro de la célula. En la división celular, el desarrollo de una membrana celular es crítico. Así pues es de esperar que cualquier herbicida que inhiba la formación de lípidos debería afectar con éxito la planta (Grongrald & Freeman, 1995).

1.4.1 Síntesis de los ácidos grasos: La AcetilCoA carboxilasa

La biosíntesis de los ácidos grasos en plantas es catalizada por dos enzimas importantes; acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) y el ácido graso sintasa. Los ácidos grasos se sintetizan en dos lugares: en el estroma del cloroplasto y el citoplasma, respectivamente (Reade & Cobb, 1991). En el arroz existen dos isoformas del gen de la Acetil-CoA carboxilasa: una citosólica (OsACC1) y una plastídica (OsACC2) (Figura 14) (Sasaki & Nagano, 2014).

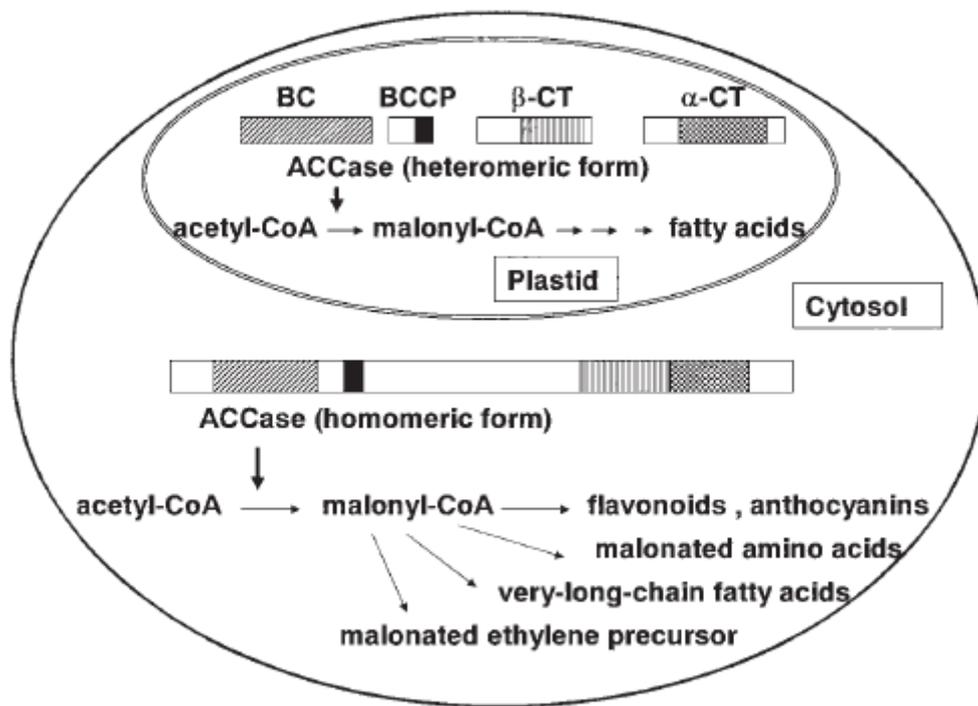


Figura 14.- Repartición de dos formas de ACCasa en plantas. Modificada de Sasaki & Nagano (2014).

La biosíntesis de los ácidos grasos se inicia por la carboxilación dependiente de ATP de acetil-CoA para formar malonil-CoA. A continuación, el grupo malonilo se transfiere a ACP (proteína portadora de acilo). El ensamblaje del ácido graso comienza cuando se forma un enlace carbono-carbono entre C-1 de un "cebador" de acetato y C-2 del grupo de malonilo en ACP, que libera CO₂. Esta extensión de dos cadenas de carbono da como resultado inicialmente la formación de acetoacetil-ACP. Posteriormente, una secuencia de tres reacciones: reducción, deshidratación y reducción nuevamente, conduce a la formación del acil-ACP completamente reducido. Esta secuencia, que progresa en tres pasos desde un grupo 3-cetoacil a un grupo acilo saturado, es una serie de reacciones comunes que se encuentran en las vías bioquímicas. Por ejemplo, tanto la β-oxidación como el ciclo del ácido cítrico usan la misma serie de reacciones, pero en orden inverso (Figura 15) (Buchanan et al., 2015).

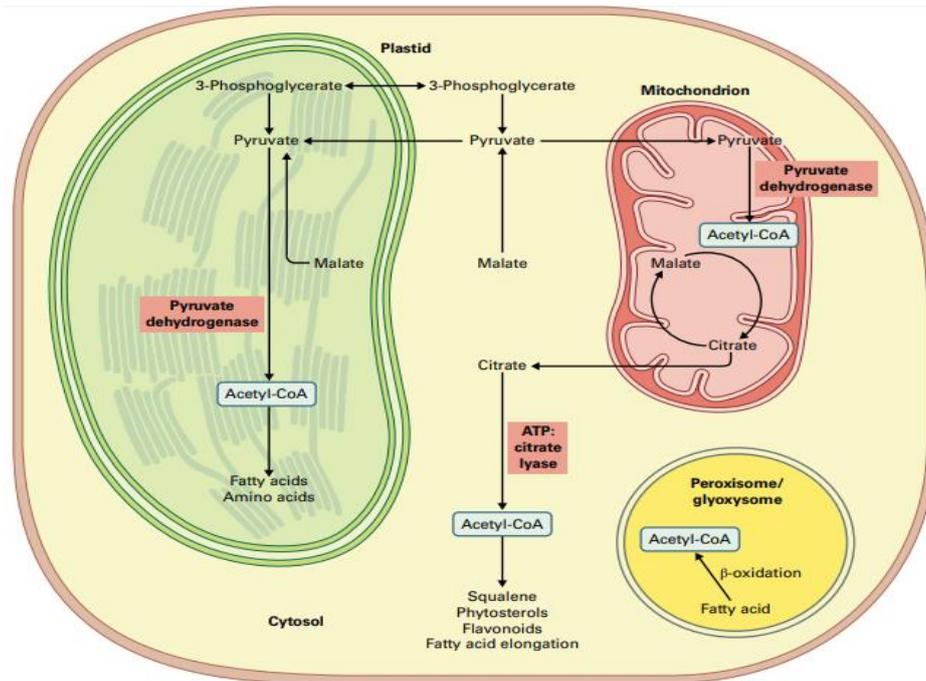


Figura 15.- La síntesis y el metabolismo de los lípidos tienen lugar en varios orgánulos. Acetyl-CoA es el material de partida para la biosíntesis de ácidos grasos, también durante la respiración, la acetil-CoA es la fuente de entrada de carbono en el ciclo del ácido cítrico en las mitocondrias. Modificado de Buchanan et al. (2015).

1.4.2 Estructuras cuaternarias de la ACCasa

Las acetil-CoA carboxilasas (ACC o ACCasas) son enzimas dependientes de biotina necesarias para el metabolismo de los ácidos grasos.

Las ACC catalizan la carboxilación de acetil-CoA a malonil-CoA en dos pasos, a través de la acción de tres componentes proteicos distintos. En el primer paso, un residuo de biotina unido covalentemente al componente de proteína transportadora de carboxilo de biotina (BCCP) se sitúa en el sitio activo de biotina carboxilasa (BC) para la carboxilación de la biotina. En el segundo paso, la biotina carboxilada se transloca al sitio activo de carboxilo transferasa (CT) para transferir el grupo carboxilo al sustrato acetil-CoA, produciendo malonil-CoA (Figura 16) (Inclendon & Hall, 1997; Buchanan et al., 2015).

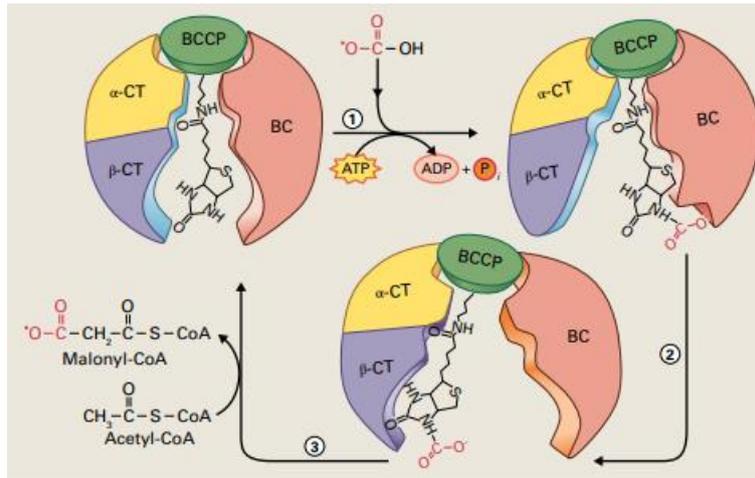


Figura 16. - Reacciones de acetil-CoA carboxilasa (ACCasa). Modificado de Buchanan et al. (2015).

1.4.3 Inhibidores de la Acetil CoA Carboxilasa

Los inhibidores de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) para el control de las malas hierbas se agrupan en dos familias químicas importantes, las ariloxifenoxipropionatos (AOPP), también conocidos como "Fops", y ciclohexanodionas (CHD), también conocidos como "Dims" (Delye et al., 2005). En las ACCasa plásticas (homoméricas) de las plantas, los CHD se unen dentro de la cavidad del sitio activo del dímero carboxilo transferasa (CT) como las AOPP para ejercer su efecto inhibitor de ACCasa. Ambas sustituciones están ubicadas dentro del dominio CT de ACCasa cloroplástica homoméricas. Por lo tanto, si el modo de unión general de los inhibidores de ACCasa dentro de la cavidad del sitio activo de CT es muy similar para las isoformas plásticas y citosólicas dada la conservación entre las proteínas ACCasa homoméricas, muestra claramente diferencias en el detalle de las interacciones involucradas (Figura17) (Délye, 2005).

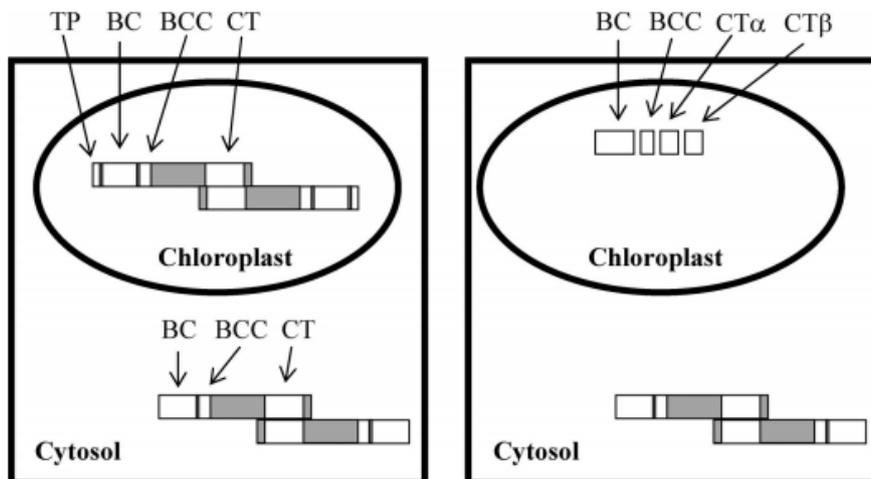


Figura 17. Detalle de las Isoformas de Acetil coenzima A carboxilasa (ACC) presentes en las plantas. TP, péptido de tránsito; Dominios funcionales ACC: BCC, biotina carboxilo-portador; BC, biotina carboxilasa; CT, carboxilo transferasa. Hay que tener en cuenta que el TP podría cortarse después de que la isoforma ACC plastídica se haya importado al cloroplasto. Modificada de (Délye, 2005).

Por otro lado, el uso frecuente de Fops y Dims ha ocasionado el desarrollo de resistencia a los inhibidores de ACCasa en algunas especies de monocotiledóneas. Debido a esta consecuencia se conoce 49 especies de malas hierbas que desarrollaron resistencia a estos herbicidas en las últimas décadas (Figura 18) (Vrbničanin et al., 2017).

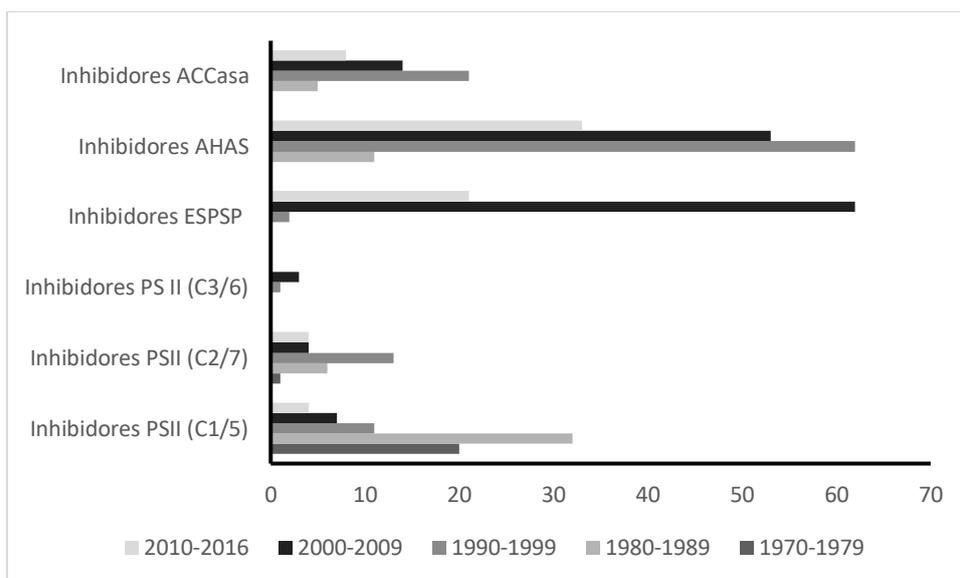


Figura 18. - Evolución del número de especies de malezas resistentes a varios tipos de herbicidas (1970-2016) Datos modificados de Vrbničanin et al. (2017).

La sensibilidad de ACCasa a los inhibidores se ha establecido como el principal determinante molecular de la respuesta de la planta a la aplicación de herbicidas en el campo, el manejo exitoso de la resistencia a los herbicidas depende en gran medida de: a) la concentración y formulación efectivas de herbicidas; b) la absorción y penetración foliar; c) tipos de malas hierbas; d) etapas de crecimiento de la planta y e) la estabilidad, modificación y desintoxicación química de las plantas (Jang et al., 2013; Murphy & Tranel, 2019).

1.5. Mejora del Arroz por Hibridación

1.5.1 Cultivo de embriones

El cultivo de embriones es una técnica utilizada para disminuir el tiempo entre cruces y superar la esterilidad que a menudo se da en la producción de híbridos interespecíficos (Vasil, 2007). Los primeros registros que se tienen de la utilización de esta técnica son

del siglo XVIII, de la mano de Charles Bonnet, quien extraía embriones de *Phaseolus* y *Fagopyrum* plantandolos directamente en el suelo (Sharma et al., 1996). Más tarde, a principios del siglo XX, Hanniger introdujo la siembra de los embriones extraídos en medios de cultivo que contenían sales, minerales y azúcares bajo condiciones de asepsia. En la actualidad se ha optimizado mucho la técnica para cada especie vegetal, haciendo que se utilice en muchos cultivos, como cereales, frutas, leguminosas, entre otros (Sharma et al., 1996).

En el arroz, esta técnica se usa actualmente para acelerar la obtención de plántulas híbridas F1 tras un cruce y, posteriormente, en programas de retro-cruzamientos (BC1F1, BC2F1, etc.) disminuyendo el tiempo necesario entre generaciones, pues aplicando la técnica en semillas inmaduras, se evita el tiempo requerido para la maduración y la brecha del proceso de dormición (Ohnishi et al., 2011).

1.5.2 Programa de retro-cruzamientos asistidos por marcadores moleculares

Los programas de retro-cruzamiento fueron propuestos, por primera vez, por Harlan y Poppe en 1922 (Harry & Poppe, 1922). Son necesarios para el mejoramiento de los cultivos, con el objetivo principal de aumentar el potencial de rendimiento, y permite introducir rasgos de una variedad, parental donante a variedades élite, parental receptor. En la mayoría de los casos, la variedad de élite utilizada para el retro-cruzamiento tiene una gran cantidad de cualidades deseables, pero es deficiente en otras características que también son de interés. El parental donante (PD) generalmente posee rasgos genéticos que carece la variedad elite. El objetivo principal de estos programas de retro-cruzamiento es mantener la calidad del genoma de las variedades élite e ir introduciendo solo los rasgos deseados del PD para aumentar el carácter y productividad de la variedad elite. Por lo tanto, una hibridación forzada entre PD y el parental recurrente (PR) genera un híbrido F1, que a su vez se tiene que volver a retrocruzar con el PR, acto seguido se analiza si la presencia del rasgo está presente, para seleccionar las plantas de la nueva generación y proseguir con los posteriores retro-cruzamientos, hasta conseguir el objetivo final. El número de retro-cruzamientos necesarios dependerán del grado de retorno al parental recurrente que se desee y del uso o no de marcadores específicos para la selección de individuos con el mayor grado de retorno al parental recurrente (Figura 19).

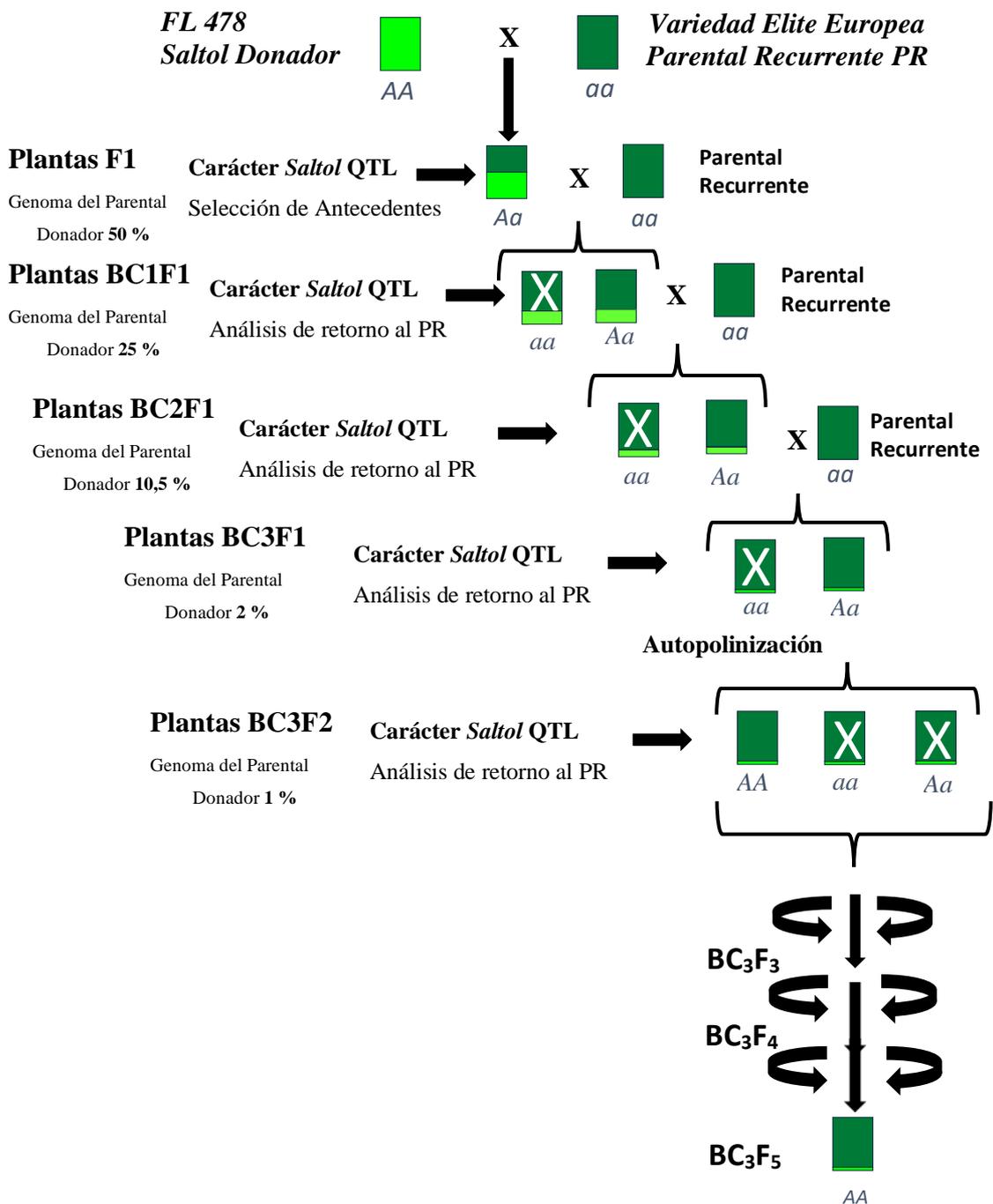


Figura 19. - Esquema de retro-cruzamiento asistido donde PL12 y PM37 se utilizaron como padres recurrentes femeninos (PR), mientras que FL478 e IR64-Saltol como donantes masculinos (PD), llevado a cabo en este trabajo. Representación en colores del genoma de la planta (verde oscuro para el genoma japónica y verde claro para el genoma indica). En el locus QTL, **AA** se refiere al alelo tolerante mientras que **aa** al alelo susceptible. La primera selección (screening) se realizó mediante el uso de una PCR simple enfocada al centro del QTL Saltol. La cuantificación del retorno al parental recurrente y comprobación de la presencia total de la región Saltol se realizó con el análisis KASP.

1.6. Marcadores Genéticos

Un marcador es una entidad genética que manifiesta polimorfismo y se hereda de manera mendeliana, o lo que es lo mismo, un locus con una variación detectable demostrada experimentalmente. Los marcadores genéticos se pueden utilizar para estudiar patrones de herencia, variación genómica, fenómenos evolutivos y de selección, enlaces alelo-alelo y asociaciones alelo-fenotipo. La aplicación depende de sus propiedades físicas y ubicación genómica, el costo involucrado, la facilidad de uso y el grado de rendimiento requerido. Se han aplicado con éxito en fisiología vegetal el mapeo genético y físico de los genomas, la identificación de genes que controlan diversos procesos y fenotipos (asociación de rasgos), la diversidad genética y los análisis evolutivos, y en el mejoramiento asistido por marcadores para la mejora de los cultivos (Blatey, 2015).

1.6.1 Tipos de marcadores genéticos

Los marcadores genéticos se pueden clasificar en dos grupos: Marcadores morfológicos y Marcadores moleculares.

1.6.1.1 Marcadores morfológicos

Son características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño o altura. Muchos de ellos se convierten en importantes «descriptores», a la hora de inscribir nuevas variedades. Por ejemplo, una planta de arroz tiene caracteres como el tallo en forma de caña hueca por dentro (excepto en los nudos); hojas lanceoladas acabadas en punta y con nerviación paralela; o espigas formadas por una panícula caediza, donde se encuentra el grano de arroz. Este tipo de marcadores contribuyó significativamente al desarrollo teórico del ligamiento genético y a la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Levitus et al., 2010).

Las principales limitaciones de los marcadores morfológicos se encuentran en: a) número reducido de marcadores disponibles en cada población, b) bajo nivel de polimorfismo, c) pueden producir alteraciones fenotípicas que dificultan el desarrollo de la planta, d) varios se hallan bajo control poligénico, e) pueden presentar dominancia, f) muchos de ellos se expresan en estadio de planta adulta, lo cual prolonga los tiempos de evaluación en los programas de mejoramiento. No obstante, los marcadores morfológicos permanecen como caracteres útiles en la identificación de materiales dado que representan un conjunto de genes que pueden ser evaluados con métodos sencillos y a bajo costo (Levitus et al., 2010).

1.6.1.2 Marcadores moleculares

Un marcador molecular es simplemente un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia) cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin función conocida (Levitus et al., 2010).

Diversas técnicas de biología molecular se encuentran disponibles para detectar variabilidad en la secuencia de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN, las sondas marcadas y las hibridaciones son algunas de las técnicas que permiten obtener un número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares y cubrir la totalidad del genoma de un organismo (Salmeron, 2013).

1.6.2 Cartografiado de loci para caracteres cuantitativos (QTL)

Los caracteres cuantitativos (QTL) son marcadores habituales de ADN, de elección para estudios de diversidad y para análisis de parentesco. Son la identificación de una región cromosómica, que puede ocupar medio cromosoma, en la que se detecta un efecto significativo para el carácter diana. Las familias poseen un alto grado de desequilibrio de ligamiento entre un gen o genes que afectan a una variable cuantitativa y un marcador molecular, dicho de otra manera, grandes segmentos cromosómicos se transmiten de los padres a la progenie sin recombinación alguna. La frecuencia de recombinación entre dos genes situados en el mismo cromosoma depende de la distancia que los separa. La tasa de recombinación entre marcadores es, por tanto, indicativa de su grado de ligamiento: cuanto más baja es la tasa de recombinación, más cerca estarán los marcadores (Agriculture & Nations, 2007).

La identificación de un QTL es un progreso para determinar los genes asociados con la variación en un rasgo poligénico como la tolerancia a la salinidad. Además, la selección directa de genotipos predominantes basada en el fenotipo de tolerancia a la salinidad no es tan efectiva como la selección de los componentes fisiológicos y agronómicos subyacentes basados en QTL (Rahman et al., 2019).

1.6.3 Polimorfismo de nucleótido simple

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son variantes comunes que se encuentran en todo el genoma y que son altamente modificables para el desarrollo de ensayos robustos. Los SNP se han utilizado eficazmente en una amplia gama de aplicaciones de mejoramiento, incluyendo el mapeo cuantitativo de rasgos loci, la construcción de mapas genéticos, el análisis de asociación de todo el genoma, la selección asistida por

marcadores (MAS) y el análisis de pedigrí y estructura de la población. La variación genética en forma de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inserciones/delecciones, variantes de presencia/ausencia y variaciones en el número de copias contribuyen en gran medida a la diversidad fenotípica observada dentro de una especie. Si bien históricamente las prácticas de mejoramiento se basaron en observaciones fenotípicas para inferir la herencia genética, las estrategias actuales de mejoramiento molecular utilizan ensayos de variación genética, o marcadores genéticos, para predecir fenotipos. Tales prácticas han revolucionado el mejoramiento de los cultivos y han acelerado la ganancia genética. No obstante, se pueden introducir mutaciones en secuencias expresadas o en regiones que influyen en la expresión génica (promotores, potenciadores), y pueden inducir alteración en la estructura o regulación de las proteínas. Dichos SNP tienen la capacidad de detectar la variación genética funcional (Woodward, et al., 2014).

1.6.4 Digestión de secuencias amplificadas polimórficas (CAPS)

Los marcadores CAPS (*Cleavage Amplified Polymorphic Sequence*) detectan polimorfismos mediante la amplificación de fragmentos de ADN con sus respectivos cebadores específicos para cada fragmento, el cual es amplificado por PCR, luego digerido con enzimas de restricción, que actúan como endonucleasas, separación por electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida donde se observa la muestra con diferentes bandas que permiten determinar si un genotipo específico en este fragmento está presente. Este método aprovecha la capacidad que posee la técnica de PCR de amplificar segmentos específicos de ADN con la capacidad que poseen las enzimas de restricción de cortar el ADN en secuencias blanco de la enzima de restricción. La base genética del polimorfismo detectado por el marcador CAPS es la presencia/ausencia de sitios de restricción en la secuencia amplificada por PCR. Este marcador permite identificar individuos heterocigotos, por lo que se comporta como marcador codominante (Levitus et al., 2010).

1.6.5 Sistema de Genotipificación KASP

El ensayo de genotipado KASP (Figura 20) utiliza un novedoso sistema homogéneo fluorescente de un alelo específico de PCR competitiva, para la identificación y medición de la variación genética, que tiene lugar a nivel de nucleótidos para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) o insertos y eliminaciones (*InDels*) (He et al., 2014).

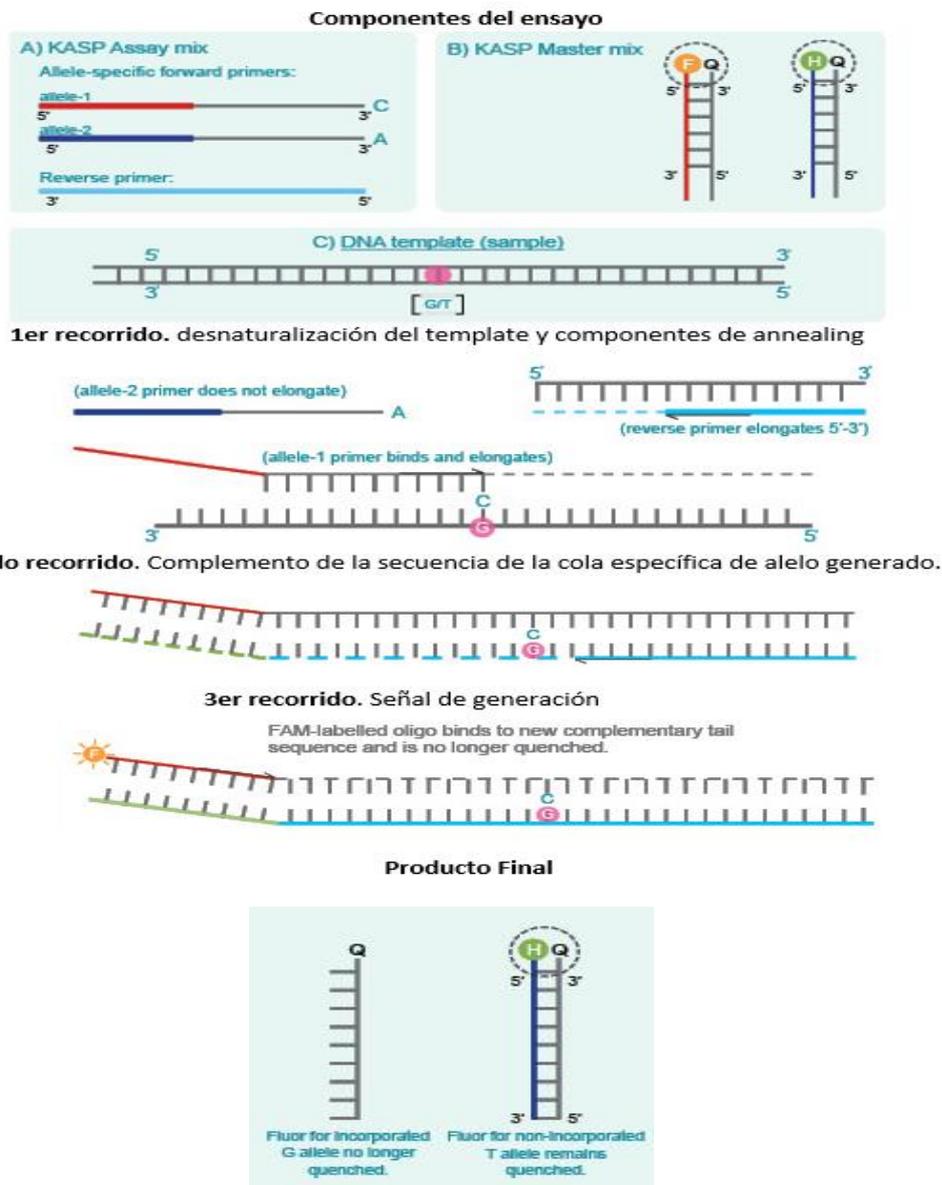


Figura 20. - Diagrama que detalla el ensayo KASP. Los componentes consisten en: Dos cebadores específicos de alelos (uno para cada alelo SNP), cada cebador contiene una secuencia de cola única sin marcar en el extremo 5', un cebador común (inverso), dos oligonucleótidos marcados con flúor en el extremo 5', uno etiquetado con FAM, y el otro HEX. Estas secuencias de oligonucleótidos están diseñadas para interactuar con las secuencias de las colas de los cebadores específicos de los alelos, dos oligonucleótidos, apagadores unidos en los extremos 3'. Estas secuencias de oligonucleótidos son complementarias a las de los oligonucleótidos marcados con flúor (y, por lo tanto, también son complementarias a las colas de los cebadores específicos de alelo). Estos oligonucleótidos apagados, por lo tanto, unen sus complementos marcados con flúor y todas las señales fluorescentes se apagan hasta que se requieren. Modificado de LGC (2017).

Así mismo la reacción funciona de igual manera en placas con formatos de 48, 96 o 1.536 pocillos. Para su reacción utiliza los siguiente tres componentes: a) el análisis de ADN con el SNP de interés; b) el Mix de ensayo *KASP* que contiene dos cebadores diferentes, alelos específicos, competitivos y avanzados con secuencias de cola únicas y un cebador inverso; c) la Master Mix *KASP* que contiene casete FRET más *Taq* polimerasa en una solución tampón optimizada (LGC, 2017). La reacción *KASP* se realiza en un termociclador y después la fluorescencia es leída y digitalizada. El análisis de estos grupos permite clasificar cada marcador como homocigotos o heterocigotos de acuerdo con su fluorescencia.

2. Objetivos

I. Objetivo principal:

El objetivo principal de esta Tesis es producir estrategias para la productividad, perdurabilidad y calidad mediante el desarrollo de nuevas variedades comerciales de arroz mediterráneo (*O. sativa*) e introducir alelos de tolerancia a la salinidad y resistencia a herbicidas mediante *speed breeding*, para proteger el sector del arroz contra el cambio climático, la invasión de malas hierbas y penetración del caracol manzana (*P. maculata*).

II. Objetivos específicos:

1. Cruzar líneas de arroz tolerantes a salinidad y resistente a herbicida por hibridación forzada siguiendo un esquema de retro-cruzamiento.
2. Poner a punto una técnica de rescate de embriones (*embryo rescue*) para optimizar el *speed breeding* (mejora acelerada de variedades) en el programa de retrocruces.
3. Establecer una selección *in vitro* de los embriones que presenten tolerancia al herbicida Cicloxidim.
4. Selección por PCR de los descendientes que presenten marcador SSR *Saltol*.
5. Selección por CAPS de los descendientes que presenten el alelo mutante de resistencia a Cicloxidim.
6. Aplicación de selección de mayor retorno al parental recurrente mediante marcadores *KASPar*.
7. Evaluación de las líneas *Saltol* en ensayos de campo en el Delta del Ebro.

3. Materiales y Métodos

3.1 Experimento 1: Validación de la región *Saltol*, retorno al parental recurrente y ensayos de campo de las nuevas líneas de arroz

3.1.1 *Material vegetal*

Para la introgresión de tolerancia a la salinidad (QTL *Saltol*) se utilizaron dos variedades élite de arroz mediterráneo (*O. sativa* ssp. *japonica* templada) sensibles a salinidad denominadas PM37 (grano medio-corto) y PL12 (grano largo), suministradas por la *Càmara Arrossera del Montsià SCCL* (Amposta, Tarragona, España). Se usaron como variedades donadoras del alelo *Saltol* dos variedades de arroz tropicales (*O. sativa* ssp. *indica*) tolerantes a la salinidad denominada IR64*Saltol* y FL478 ambas líneas de grano largo, obtenidas del Instituto Internacional de Investigación del Arroz IRRI (Los Baños, Laguna, Filipinas). FL478 es una línea *indica* endogámica recombinante (RIL) derivada del cruce, IR29xPokkali (donde IR29 es una variedad sensible a la salinidad y Pokkali es un cultivar tradicional tolerante a altas concentraciones de sal), obteniendo de este cruce una línea estable altamente tolerante a la salinidad (Thomson, et al., 2010). Por otro lado, IR64*Saltol* es una línea que deriva del cruce de IR64xFL478 (su QTL *Saltol* procedente de FL478), disfrutando así de una moderada tolerancia a la salinidad, pero un alto rendimiento agronómico.

Todas las líneas estudiadas, se han cultivado en los invernaderos del *Servei de Camps Experimentals* de la Universitat de Barcelona, en macetas de 4 L con sustrato de turba-vermiculita según la mezcla (*Floratorf peat moss*, Floragard Vertriebs, Oldenburg) -vermiculita (2:1 v/v), suplementada con 1 g CaCO₃·L⁻¹ de turba para ajustar el pH del sustrato (al alrededor de 6) y fertilizante de liberación lenta (Osmocote Exact [15-9-12 + 2MgO + micronutrientes], The Scotts Company LLC, USA) a razón de 1 g·L⁻¹ de sustrato. El riego se automatiza y se fertiliza manualmente una vez por semana con un fertilizante líquido de crecimiento o de floración, según la etapa en la que se encuentren las plantas correspondientes (Tabla 5). El fertilizante de floración está enriquecido con potasio y empobrecido en nitrógeno, para mejorar el llenado del grano.

Tabla 5. Solución de fertilización según la etapa de crecimiento y concentración estándar

	Crecimiento (g·L ⁻¹)	Floración (g·L ⁻¹)	Estándar (g·L ⁻¹)
NH ₄ H ₂ PO ₄	3,1	3,7	15,5
K ₂ SO ₄	2,5	7,2	12,5
NO ₃ NH ₄	2,56	8,04	12,8
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	21,68	10,9	108,4
Urea	0,84	0,88	4,2
EDDHA-Fe 6%	0,62	0,62	3,1
Microelementos	0,6	0,6	3,0
Agua Destilada	5L	5L	5L

La temperatura en el invernadero se mantuvo en un rango controlado entre 18-35°C durante todo el año gracias a calefacción radiante por circuito de agua (Figura 21).

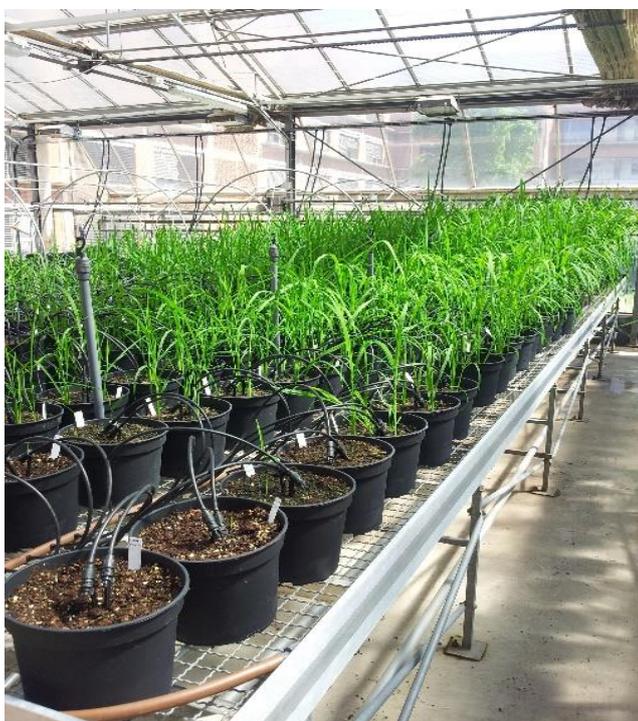


Figura 21. Plantas de arroz (*O. sativa*) aclimatadas a las condiciones de invernadero, en sus correspondientes macetas con sustrato.

3.1.2 *Introgresión del Saltol*

En el proyecto NEURICE se introgresó el QTL denominado *Saltol* para la tolerancia a la salinidad, en líneas sensibles comerciales europeas.

Para realizar la introgresión del QTL *Saltol*, se siguió un esquema de breeding acelerado que involucró el cruce inicial F1, tres retro-cruces (*backcrosses*) y dos generaciones de autofecundación. Este proceso se aceleró gracias a: (a) la técnica *in vitro* del rescate de embriones, reduciendo el tiempo entre cada generación, (b) la selección de líneas con el QTL *Saltol* introgresado, y (c) la selección de individuos con la mayor cantidad de genoma de parental recurrente a través de marcadores genéticos utilizando las técnicas de mapeado genómico y KASP (alelo competitivo PCR específica) para la selección de primer plano y (d) el uso del invernadero calefactado que permitió tener temperaturas controladas en las diferentes estaciones del año.

En cada generación (retro-cruces), se seleccionó aquellas plantas que presentaban un marcador interno de la región *Saltol* (primera selección), y de ellas, también se seleccionaron aquellas que tenían el mayor retorno al progenitor recurrente y no sufrían introgresiones dentro de la región *Saltol* (selección por marcadores moleculares polimórficos *indica/japonica* marcados con fluorescencia). Cuando se llega a las generaciones de autopolinización se fija en homocigosis el segmento cromosómico *Saltol* y se pasa a la posterior multiplicación de semillas para realizar los experimentos en campo. En cada generación, la primera selección de individuos con presencia del alelo *Saltol* se realizó con un marcador SSR simple y luego, para las generaciones siguientes BC₂F₁, BC₃F₁, BC₃F₂ se realizó una selección con más marcadores internos y flanqueantes de la región *Saltol*. Para optimizar el uso de nuestros recursos, se eligió un proceso dual para mejorar la segunda selección: un cribado previo de todas las plantas usando dos marcadores en la zona diana y genotipado de mayor densidad de las plantas seleccionadas usando chips (48 marcadores x 48 individuos o 96 marcadores x 96 individuos-chips).

3.1.3 *Hibridación forzada*

Para forzar la hibridación entre variedades de arroz, se escoge una panícula en desarrollo de la variedad receptora de polen, con las flores aún sin abrir y la zona apical de las anteras por la mitad de la altura de la flor. Se eliminan las flores más maduras (aquellas situadas en el ápice de la panícula) y las más inmaduras (situadas en la base de la panícula). Se realiza un corte con tijeras en las glumas, justo por encima de las anteras, por lo que las flores están abiertas (Figura 22). Se succionan las anteras mediante el uso de una bomba

de vacío acoplada a una punta de micro-pipeta, procurando no dañar el ovario plumoso, estilo y estigma que conforman el pistilo (Figura 22).



Figura 22. – (A) Imagen de la panícula inmadura elegida para la emasculación, (B) Proceso de emasculación en la panícula cortada usando una bomba de vacío (C) Polinización manual de la panícula emasculada (D) Embriones inmaduros obtenidos debido al proceso de fecundación forzada.

Estas panículas emasculadas se cubren con un sobre para evitar fecundaciones espontáneas y se escribe la fecha de emasculación y la variedad emasculada. Hacia el mediodía, cuando la variedad donadora de polen entra en anthesis (las glumas se abren de manera que las anteras maduras, cargadas de polen, salen al exterior) se introduce la espiga donadora dentro del sobre de la espiga emasculada y se agita. Una vez polinizada, se vuelve a cerrar el sobre que cubre la espiga receptora de polen con ayuda de un clip. Este proceso de polinización se realiza el mismo día de la emasculación, pero en casos de mal tiempo puede polinizarse los dos días siguientes con espigas de la misma variedad donadora. En el sobre de papel se escribe cuál ha sido la variedad donadora de polen y las fechas de polinización.

Una vez realizada la polinización, se deja reposar la panícula hasta la formación de los embriones durante 10 a 12 días (Figura 22). Transcurrido este tiempo, se retira el sobre de papel y se deja madurar las semillas obtenidas o se procede a realizar un rescate de embriones con semillas inmaduras de al menos 10 días después de la primera polinización.

3.1.4 Rescate de embriones

Normalmente, habría que esperar más de un mes después de la polinización para que los granos de arroz maduraran, recolectar las semillas, sembrar y esperar a que germinan para obtener los descendientes híbridos. Este largo proceso se puede acortar recolectando las semillas inmaduras en estadio de grano lechoso a pastoso, tan solo 10 días después de la polinización, y rescatar a los embriones inmaduros para forzar su germinación *in vitro*.

Se eliminan manualmente los restos de glumas de las semillas inmaduras obtenidas, se esterilizan durante un minuto con etanol al 70% se descarta la solución y se introducen en un recipiente con una solución 30% de hipoclorito de sodio enriquecida con 8 gotas de Tween 20 (Duchefa Biochemies Ltd, Haarlem, Holanda) por litro durante 30 minutos en agitación. Una vez transcurrido los 30 minutos, se trabaja en una cámara de flujo laminar, donde se procede a hacer cinco lavados (5 min cada lavado) con agua destilada estéril. Las semillas se disponen en un papel de filtro esterilizado situado dentro de una placa de Petri en la cámara de flujo laminar. Con la ayuda de un bisturí, unas pinzas, y una lupa binocular, se extrae el embrión del resto de estructuras de la semilla (Figura 18), sembrando directamente en tubos especiales de vidrio de 17 cm de altura, a razón de 9 mL por tubo de medio de rescate de embriones, con sales y vitaminas MS a mitad de concentración (*Murashige and Skoog Plant Salt Mixture*; Duchefa Biochemie, Ltd.), 20 g·L⁻¹ sacarosa (Duchefa Biochemie, Ltd.), 250 mg·L⁻¹ de ácido 2-(N-morfolina) etanosulfónico (MES) (Duchefa Biochemie, Ltd.) y 2,5 g·L⁻¹ de Gelrite (Duchefa Biochemie, Ltd.) a un pH ajustado a 5,8 (Figura 23). Los tubos con los correspondientes embriones son cultivados a 22-24°C bajo luces fluorescentes a 50-70 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ en un fotoperiodo luz/oscuridad de 16/8 h en combinación de luces LED de espectro blanco, azul y rojo a una intensidad de 23 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$.

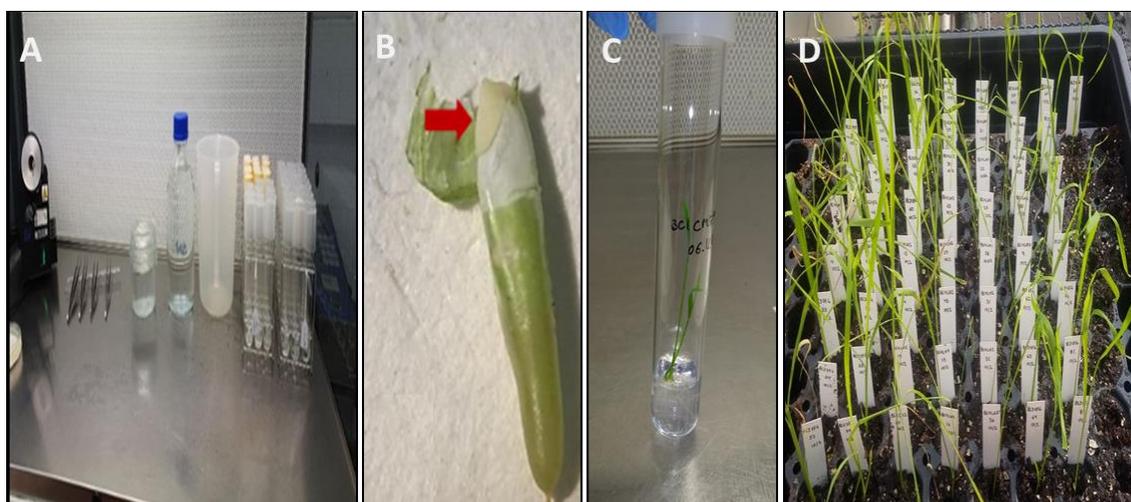


Figura 23. -(A) Preparación del material en la cabina de flujo laminar para proceder con el proceso de rescate embrionario *in vitro*. (B) imagen del embrión inmaduro a rescatar (C) Imagen de plántulas en desarrollo en tubos *in vitro*. (D) Plántulas aclimatadas en invernadero.

Cuando las plántulas miden unos 10 centímetros, o aparece la tercera hoja, al cabo de 1 a 2 semanas, son trasplantadas a bandeja multi-pocillo en el invernadero, donde se aclimatan (Figura 23).

3.1.5 Extracción y amplificación de ADN

El protocolo de extracción de ADN para los diferentes experimentos realizados en esta tesis, se basa en una modificación del protocolo de Doyle y Doyle (Doyle, 1991) utilizando MATAB en vez de CTAB. La extracción se lleva a cabo en cajas de 96 pocillos, donde se introduce una bola de cristal, para luego depositar aproximadamente 100mg de muestra de hoja de diferentes individuos. A continuación, se sumerge la caja en nitrógeno líquido y se trituran las muestras con molino de bolas TissueLyser® II (Qiagen) durante 30 segundos a 25 Hz. Una vez trituradas, se añaden 300 µL de MATAB a cada pocillo con su respectiva muestra y se llevan a una estufa a 72°C durante 30 min con tres agitaciones manuales cada 8 min.

Transcurrido los 30 min, se añade a cada pocillo 300 µL de una mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1. A continuación, se hace un vórtice de un minuto, y se procede a centrifugar durante 10 min a 10°C y 3500 RPM (1.152 G). Se transfiere el sobrenadante (aprox. 200 µL) a una nueva caja y seguidamente se inicia la precipitación del DNA añadiendo a cada muestra 160 µL de isopropanol puro, seguido de una inversión y un reposo de 1h en la nevera (4°C).

Pasado este tiempo, se vuelve a centrifugar durante 30 min a 4°C y 3500 RPM (1.152 G), y se descarta todo el isopropanol restante invirtiendo los tubos (con cuidado y sin golpes), formándose el pellet de ADN en el fondo del tubo. Al pellet de ADN se le añaden 200 µL de etanol al 70%, se centrifuga durante 15 min a 4°C y 4000 RPM (1505 G) y, pasado este tiempo, se descarta el etanol, invirtiendo los tubos nuevamente. Finalmente, se dejan los tubos invertidos una noche, y al día siguiente se resuspenden con 50 µL de agua Milli-Q.

La selección de plantas de arroz con marcador interno SSR *Saltol* se realiza usando una amplificación por PCR seguido de un análisis por electroforesis. La amplificación por PCR se realiza en placas de reacción ópticas transparentes de 96 pocillos con código de barras (Applied Biosystems™ MicroAmp™ EnduraPlate™) en un termociclador de 96 pocillos (Applied Biosystems). Las reacciones se llevaban a cabo en un volumen de mezcla de 20 µL utilizando una adaptación del programa de PCR (M. J. Thomson, de Ocampo, et al., 2010), que contiene 12,2µL de agua milli-Q, 2 µL de 10x *Paq5000* Reaction buffer, 0,4 µL de Mg²⁺ 2,5mM, 0,4 µL de dNTPs (25 mM cada uno), 0,4 µL de primer forward (ATAGGGGATATTGGCTGCAC), 0,4 µL de primer reverse (CAACCAAGCGTGAATAAAAAGA), 0,2 µL de *Paq5000* DNA Polymerase y finalmente 2 µL de ADN genómico (5-30ng). El procedimiento de reacción se programa

de la siguiente manera: un período de desnaturalización de 5 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, y luego 7 minutos a 72°C para la extensión final y enfriado a 4°C.

Una vez amplificado el ADN se prepara un gel de agarosa al 3% agregando 7,5 g de agarosa a 250 ml de 1xTAE buffer (40 mM tris (hydroxymethyl)aminomethano, 20 mM ácido acético glacial y 1 mM ácido ethylenediaminetetraacético y agua Milli-Q), que se calientan en el microondas para fundirlos. Luego, se agregan 5 µL de Redsafe (agente intercalante del DNA) al gel, que se vierte en una cubeta de electroforesis. Una vez que el gel está sólido, se mezclan los 20 µL del producto de PCR con 4 µL de tampón de carga [azul de bromofenol (0.25%) y xilen cianol (0.25%) en 3 ml de glicerol (30%)] y toda esta solución se carga en un pozo en el gel de agarosa. Además, en un pozo de cada fila, se agregaron 4 µL de un marcador de peso molecular conocido para poder determinar el tamaño de las bandas de ADN. Finalmente, se le aplicaba un voltaje de 120 v y 300 mA durante 60 minutos, y al terminar se visualizaba la imagen ultravioleta con el Bio-Rad® Gel Doc XR # 1708170.

3.1.6 Genotipado Final KASP

La tecnología de genotipado que se usó para la detección de la integridad de la región *Saltol* y retorno al parental recurrente fue KAPS (*Kompetitive Allele Specific PCR*). Con esta técnica, una lista de alelos SNP polimórficos entre japónica y índica fueron inicialmente testados con los cuatro parentales, seleccionándose aquellos que resultaban polimórficos y amplificables. Los cebadores específicos para cada alelo fueron marcados con diferentes tintes fluorescentes. Para dos flaqueos individuales se realizó con ensayos de fluidez en máquinas BioMark HD. Alrededor de 240 marcadores KASP tomados de la lista de 2000 marcadores de arroz validados y establecidos por la plataforma integrada *Breeding* (<https://www.integratedbreeding.net>) fueron probados en Montpellier por CIRAD (*Centre de cooperation internationale en recherche agronomique pour le developpement*) en las 2 líneas parentales utilizadas y se determinaron conjuntos de 48 marcadores polimórficos para cada cruce.

Todos los análisis KAPS fueron realizados en colaboración con el CRAG (*Center for Research in Agricultural Genomics*, Bellaterra, Barcelona), por la Dra. Mireia Bundó, bajo la supervisión de la Dra. Blanca San Segundo. Desarrollaron nuevos marcadores SNP para estos cruces específicos hasta un número final de 68 marcadores, distribuidos a lo largo de los 12 cromosomas de arroz con una densidad de 3 a 7 marcadores/cromosomas con la excepción del cromosoma I portador del QTL *Saltol*, que

estaba más saturado de marcadores, llegando a tener hasta 11 marcadores, cuatro de ellos dentro de la región donde se encuentra el QTL *Saltol*.

3.1.7 Evaluación de tolerancia a salinidad en cultivo hidropónico

Finalizado la selección molecular, se eligió las plantas BC3F3 que en su genoma presentaban un mayor retorno del parental recurrente (PR) y que albergaban la región *Saltol* íntegra, estas fueron sometidas a un estudio de tolerancia a la salinidad utilizando cultivos hidropónicos, bajo condiciones de salinidad controladas. Al mismo tiempo, se pretende descifrar los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que contribuyen la tolerancia a la salinidad en las líneas seleccionadas, llegando a tener la identificación de biomarcadores para la tolerancia a la salinidad en el arroz. Todas las plantas que respondieron adecuadamente a la exposición del estrés salino en un cultivo hidropónico realizado en los invernaderos del *Servei de Camps Experimentals* de la UB fueron multiplicadas para tener suficiente material (semillas) para los ensayos de campo.

3.1.8 Ensayos de campo

Se realizaron ensayos de campo en dos años consecutivos (2018 y 2019) en campos experimentales no salinizados de la cooperativa *Càmara Arrossera del Montsià* (40°42'15,0"N, 0°38'17,8"E, Amposta, Tarragona) en la finca de Pont de Canes, y en un campo salinizado de la finca Los Vascos (40°45'38,9"N, 0°47'39,1"E Deltebre, Tarragona), supervisada por el equipo de investigadores de la Estación Experimental del Ebro (EEE) del IRTA (*Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries*, Amposta, Tarragona) (Figura 24).



Figura 24.- Ubicación de los ensayos de campo. El campo no salino se halla localizado hacia el centro del delta del Ebro, en cambio el campo salinizado se sitúa muy cerca de la costa norte del delta muy próximo al mar.

Se monitorizó la salinidad mediante el uso de las redes de sensores inalámbricas (WSN) instaladas en los campos de ensayo, durante las dos temporadas de producción de arroz (2018-2019). Como ejemplo, se instalaron 6 sensores en el campo experimental Los Vascos: cuatro de los sensores se ubicaron dentro del campo, los cuales registraron la conductividad eléctrica del suelo, del agua y de su profundidad, mientras los dos restantes se ubicaron, uno en la entrada y el otro en la salida del agua de riego (Figura 25).

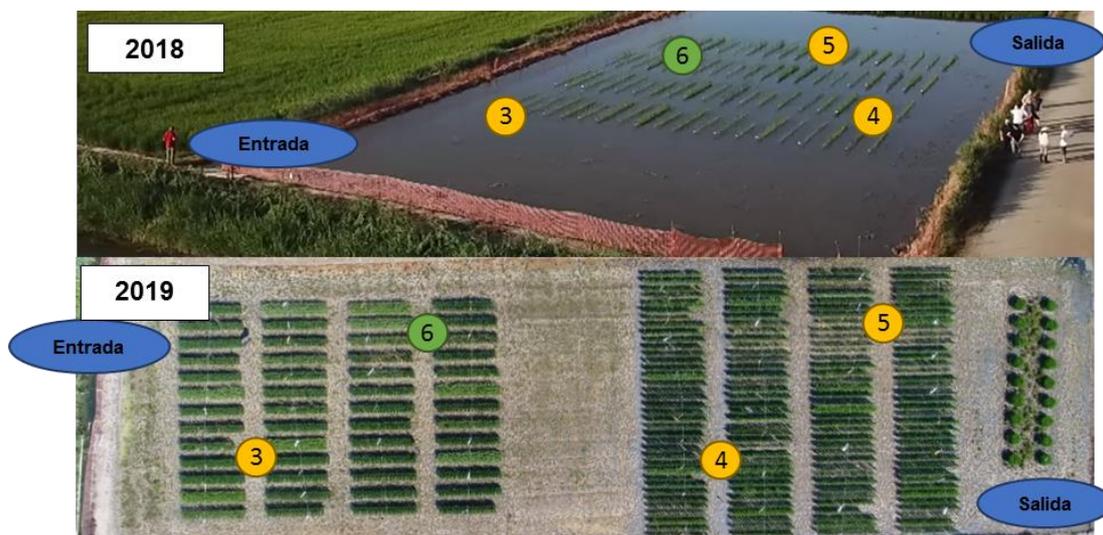


Figura 25.- Ubicación de los diferentes sensores en el campo salino. Los sensores que se encuentran en la entrada y salida miden la conductividad eléctrica del agua. Los sensores 3, 4 y 5 son sensores de conductividad eléctrica del suelo. El sensor número 6 hace la lectura de conductividad eléctrica del agua y la medición de profundidad del agua.

3.1.9 Diseño y ensayos de campo de las líneas seleccionadas

Se codifican como LP las líneas resultantes del cruce entre las variedades PL12 y FL478, mientras que MS son las líneas resultantes del cruce entre PM37 y IR64-Saltol, respectivamente. Las plantas de todos los genotipos más los cuatro parentales se germinaron en bandejas de multi-pocillo y luego se trasplantaron al campo en estadio de cuatro hojas.

En cuanto al diseño se realizaron cuatro réplicas del ensayo, de las cuales se disponen en el año 2018 de 12 líneas de la familia LP (LP5, LP8, LP13, LP22, LP24, LP26, LP28, LP29, LP30, LP31) de la siguiente manera: 20 filas de plantas trasplantadas manualmente dos por cada línea o híbridos, con una separación de 25cm entre planta-planta y 50cm de separación entre cada fila (Figura 26).



Figura 26.- Imagen aérea de los ensayos de campo no salino (izquierda) y salino (derecha) 2018.

En el año 2019, se disponen de ambas familias LP y MS (LP1, LP2, LP3, LP4, LP5, LP6, LP7, LP8, LP11, LP12, LP13, LP14, LP16, LP17, LP20, LP21, LP22, LP24, LP25, LP26, LP27, LP28, LP29, LP30, LP31, MS3, MS12, MS14, MS17, MS21, MS23, MS25, MS28) y se dispuso de dos ensayos de cuatro replicas cada uno, uno de ellos con 13 filas de líneas individuales, en el otro con 39 filas, de las cuales contenían 3 repeticiones de cada línea o híbrido siguiendo el mismo procedimiento del año anterior (Figura 27).



Figura 27.- Imagen aérea de los ensayos de campo no salino (izquierda) y salino (derecha) 2019. Se observan las 4 réplicas y la proximidad del mar en el tratamiento salino.

La fertilización para el diseño de los campos experimentales en ambos años fue la misma que usan los agricultores locales, con $66,67 \text{ UNF} \cdot \text{ha}^{-1}$ de nitrógeno en el formato de urea directa sobre el suelo, $33,34 \text{ UNF} \cdot \text{ha}^{-1}$ de nitrógeno en el formato de sulfato amónico en el estado de iniciación de la panícula, con un aproximado de 100 unidades de fertilizante nitrogenado (UNF) y 50 UNF respectivamente. Por otro lado, la ADV (*Agrupació de Defensa Vegetal de l'arròs i altres cultius al Delta de l'Ebre*) realiza dos tratamientos anuales para combatir al minador-taladro del arroz (*Chilo suppressalis*) usando avionetas durante el periodo de cultivo. Por lo tanto, solo se aplicó un tratamiento de herbicida antes de la siembra manual de las líneas o híbridos de arroz y otro tratamiento para las malas hierbas en la fase de floración del arroz, porque se comprobó que al no arrancar la raíz completamente estas malas hierbas volvían a crecer con mayor intensidad.

Los meses de evaluación fueron en la época de verano de cada año (julio, agosto y septiembre), tomando en cuenta la homogeneidad, el número de tallos (brotes) que presentaba cada planta, altura de la planta y su ciclo (siguiendo el protocolo de Lancashire Lancashire et al., 1991), el minador-taladro del arroz y la afectación del estallido del arroz (Tabla 6).

Tabla 6. Protocolo de análisis para la homogeneidad, los números de tallos, el minador del tallo y el añublo de arroz, Datos adaptados de Lancashire et al. (1991).

Código	Homogeneidad	N.º de tallos	Minador-taladro del tallo	Añublo del arroz
+++	>90% homogéneo	>40 tallos	0-1 plantas afectadas	0-0,5% afectación de la hoja
++	50-75% homogéneo	20-40 tallos	2-5 plantas afectadas	0,5-1% afectación de la hoja
+	25-50% homogéneo	10-20 tallos	5-10 plantas afectadas	1-2% afectación de la hoja

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis ANOVA de dos factores siempre que se cumplieron la normalidad de los residuos y la homocedasticidad de varianzas, analizados mediante el test de Shapiro-Wilk, Levene y Bartlett respectivamente. Posteriormente, en caso de observarse diferencias significativas en las comparaciones se realizó un test post-hoc de Tukey. En los casos en los que los residuos de la normalidad no fueron iguales, se llevó a cabo un test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de un test post-hoc de Dunn. Cuando ni la normalidad de residuos ni la homocedasticidad se cumplieron, se utilizó un test ANOVA's Welch seguido por un test de Games-Howell post-hoc. El programa de análisis estadístico utilizado fue el Stata V.15 (StataCorp LLC).

3.2 Experimento 2: Optimización *in vitro* de la resistencia al herbicida

3.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para este experimento se han utilizado seis líneas comerciales europeas (*O. sativa* ssp. *japonica*), variedades sensibles al herbicida Cicloxidim, denominadas para este estudio L01, L02, L03 (las tres de grano largo), C997, XF5 (las dos de grano medio-corto) y RP01 (de grano redondo) y una línea *O. sativa* ssp. *indica* tropical mutante LIH03283 donadora de la resistencia al herbicida Cicloxidim (desde ahora denominada LIH). Estas líneas fueron suministrados por la compañía privada BASF (Ludwigshafen, Alemania). Las 6 líneas sensibles más la línea resistente fueron cultivadas en invernadero del *Servei de Camps Experimentals* de la UB, siguiendo las mismas condiciones descritas en el experimento 1 punto 3.1.1.

3.3.2 Hibridación forzada y rescate de embriones

El ensayo consiste en cruzar las seis líneas de arroz comercial con una línea donadora de la tolerancia al Cicloxidim, con pasos ya descritos en experimento 1 (apartados 3.1.3 y 3.1.4) y una vez cruzadas, cultivar la F1 resultante en medios con 0 μM , 2,50 μM 3,00 μM , 3,25 μM y 3,50 μM de Cicloxidim. Transcurridos 10 días se valoraban los resultados de las diferentes concentraciones de herbicida donde se observó plantas que lograban sobrevivir y plantas que habían muerto por el efecto del Cicloxidim (Tabla 7).

$$\frac{100\text{ml } M}{0} * \frac{2,5\mu\text{M } C}{1000\text{ml } M} * \frac{1\text{mol } C}{10^6} * \frac{325,467 \text{ gr } C}{1\text{mol } C} * \frac{100\text{ml } H}{10\text{gr } C} * \frac{1000\mu\text{L } H}{1\text{mL } H} = 0,813\mu\text{L}$$

- 0,813 μL de herbicida Cicloxidim al 10% para 100 ml de medio
- 8,1 μL de herbicida Cicloxidim al 1% para 100 ml de medio
- 89,1 μL de herbicida Cicloxidim al 1% para 1000 ml de medio

Tabla 7. Componentes del medio con herbicida (para un volumen final 1.000 ml) empleado para el cultivo *in vitro* de embriones de arroz. Las cantidades de Cicloxidim usadas en este experimento fueron 2,50 μM (202,5 μL) 3,00 μM (243 μL) 3,25 μM (263,25 μL) 3,50 μM (283,5 μL).

Componentes	Cantidad
MS sales y vitaminas	2,2 g
Sacarosa	20 g
MES	250 g
<i>Gelrite</i>	2,5 g
pH	5,8
Cicloxiidim	Variable

3.3.3 Extracción del ADN

Todos los embriones sembrados *in vitro* que superaban el tratamiento con el herbicida eran analizados molecularmente mediante CAPs para confirmar la presencia de la mutación la cual confiere resistencia al Cicloxiidim. Por ello, se realizaron extracciones de ADN (descrito en experimento 1, apartado 3.1.5), a todas las plantas candidatas a ser identificadas como homocigotos sensibles (s/s) o individuos heterocigotos (R/s).

3.2.4 Amplificación PCR del Exón 1 de *OsACC2*

Posteriormente de la extracción de ADN, proseguimos con la amplificación del exón 1 del gen *OsACC2* seguido de una digestión con una enzima de restricción que digiere específicamente el alelo mutante R, y una electroforesis para discriminar entre individuos homocigotos sensibles (s/s) e individuos heterocigotos (R/s). La amplificación se realizó en placas de reacción ópticas transparentes de 96 pocillos con código de barras (Applied Biosystems™ MicroAmp™ EnduraPlate™) en un termociclador de 96 pocillos (Applied Biosystems, California, EEUU). Las reacciones se llevan a cabo en un volumen de mezcla de 25 µL utilizando el protocolo de ensayo SNP, método de detección del arroz Provisia® mediante (CAPS). Para la amplificación del exón 1 de *OsACC2* se usó en cada reacción 17,5 µL de agua milli-Q, 2,5 µL de 10x *Dream Taq* Reaction buffer, 1 µL de dNTPs (0,2 mM cada uno), 0,5 µL de primer forward, 0,5 µL de primer reverse (Tabla 8), 0,125 µL de *Dream Tap* DNA Polymerase y finalmente 2 µL de DNA genómico (30-40ng). El procedimiento de reacción se programa de la siguiente manera: un período de desnaturalización de 2 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 59°C y 1 segundos a 72°C, y luego 10 minutos a 72°C para la extensión final y enfriado a 4°C.

Tabla 8. Primers utilizados en este experimento

Cebadores (primers):	Región del gen OsACC2 amplificada
Sentido:	Alelo sensible (s):
5'CCTGAACGTGGGTTTCAGTA3'	5'.CTTGGTGTGGAGAATATACATGGAAGTGCTGCT..3'
Antisentido:	Alelo resistente (r):
3'AACGCCTTCAAGGTCATCTG5'	5'.CTTGGTGTGGAGAATTACATGGAAGTGCTGCT..3'

Se prepara un gel de agarosa al 2% agregando 5 g de agarosa a 250 ml de 1xTAE buffer (40 mM tris (hydroxymethyl) aminomethano, 20 mM ácido acético glacial y 1 mM ácido ethylenediaminetetraacético y agua Milli-Q), que se calientan en el microondas para fundirlos. Luego, se agregan 5 µL de Redsafe (agente intercalante del DNA) al gel, que se vierte en una cubeta de electroforesis. Una vez que el gel está sólido, se mezclan los 10 µL del producto de PCR con 2 µL de tampón de carga [azul de bromofenol (0,25%) y xilen cianol (0,25%) en 3 ml de glicerol (30%)] y toda esta solución se carga en un pozo en el gel de agarosa. Además, en un pozo de cada fila, se agregaron 4 µL de un marcador de peso molecular para poder determinar el tamaño de las bandas de ADN. Finalmente, se le aplicaba un voltaje de 100 V y 300 mA durante 50 minutos, y al terminar se visualizaba la imagen ultravioleta con el Bio-Rad® Gel Doc XR # 1708170.

3.2.5 Digestión del producto de PCR

Confirmado la presencia de amplificación, se procedía a una digestión enzimática de los productos de la amplificación mediante la enzima de restricción ApoI (Figura 19). La digestión se realizó en placas de reacción ópticas transparentes de 96 pocillos con código de barras (Applied Biosystems™ MicroAmp™ EnduraPlate™) en un termociclador de 96 pocillos (Applied Biosystems). Las reacciones se llevan a cabo en un volumen de mezcla de 20 µL, utilizando 12,75 µL de H₂O Milli-Q, 1,875 µL tampón NEBuffer™ 3.1 de New England BioLabs®, el cual se basa en Tris-HCl, 0,375 µL de enzima New England BioLabs® (Figura 28) y finalmente, 5 µL de producto de PCR. El procedimiento de reacción se programa de la siguiente manera: un período de incubación de 60 minutos a 50°C, seguido de 20 minutos a 80°C (degradación de la enzima) y enfriado a 4°C.



Figura 28. Enzima de restricción ApoI utilizado en este experimento

Una vez que acaba la digestión del producto de PCR, se lleva a cabo una electroforesis para verificar la amplificación. Para esto, se prepara un gel de agarosa al 2% agregando 5 g de agarosa a 250 ml de 1xTAE buffer (40 mM tris (hydroxymethyl) aminomethano,

20 mM ácido acético glacial y 1 mM ácido ethylenediaminetetraacético y agua Milli-Q), que se calientan en el microondas para fundirlos. Luego, se agregan 5 μ L de Redsafe (agente intercalante del DNA) al gel, que se vierte en una cubeta de electroforesis. Una vez que el gel está sólido, se mezclan los 20 μ L del producto digerido con 4 μ L de tampón de carga [azul de bromofenol (0,25%) y xilen cianol (0,25%) en 3 ml de glicerol (30%)] y toda esta solución se carga en un pocillo en el gel de agarosa. Además, en un pocillo de cada fila, se agregaron 4 μ L de un marcador de peso molecular para poder determinar el tamaño de las bandas de ADN. Finalmente, se le aplicaba un voltaje de 100 v y 300 mA durante 70 minutos, y al terminar se visualizaba la imagen ultravioleta con el Bio-Rad® Gel Doc XR # 1708170.

3.2.6 Análisis estadístico

Las variables estudiadas han sido número de embriones, plantas heterocigotas y plantas homocigotas. Se aplicó un análisis ANOVA de dos factores siempre que se cumplieron la normalidad de los residuos y la homocedasticidad de varianzas, analizados mediante el test de Shapiro-Wilk, Levene y Bartlett respectivamente. Posteriormente, en caso de observarse diferencias significativas en las comparaciones se realizó un test post-hoc de Tukey. Para determinar diferencias entre líneas y concentraciones, plantas heterocigotas y homocigotas, se han hecho test de χ^2 con un intervalo de confianza del 95%. El programa de análisis estadístico utilizado fue el Stata V.15 (StataCorp LLC).

3.3 Experimento 3: Estudio de la resistencia al herbicida en líneas europeas de arroz

3.3.1 *Material vegetal*

Para la introgresión de tolerancia a los herbicidas se han utilizado seis líneas comerciales europeas (*O. sativa* ssp. *japonica*), suministrados por la compañía privada *BASF SE* (Ludwigshafen, Alemania). Estas seis variedades sensibles fueron denominadas para este estudio L01, L02, L03 (las tres de grano largo), C997, XF5 (las dos de grano medio-corto) y RP01 (de grano redondo) y una línea *O. sativa* ssp. *indica* tropical mutante donadora de la resistencia al herbicida Cicloxidim LIH03283 (desde ahora LIH). Las 6 líneas sensibles más la línea resistente fueron cultivadas en invernadero, siguiendo las mismas condiciones ya descritas en el experimento 1 en el *Servei de Camps Experimentals* de la UB, apartado 3.1.1.

3.3.2 *Introgresión del alelo mutante OsACC2*

Para la introgresión del alelo mutante OsACC2, se realizó un método de retrocruzamiento acelerado mediante rescate de embriones y cribado *in vitro* de en medio de cultivo con herbicida Cicloxidim, seguido de una confirmación molecular mediante amplificación de la región génica del gen ACCase2 que contiene la mutación específica y posterior digestión enzimática (*ApoI*) para la distinción alélica, siguiendo un esquema típico que involucró el cruce inicial F1, seis retro-cruces y dos generaciones de autofecundación en diferentes etapas, una cuando obtuvimos la BC4F1 y la siguiente para finalizar el proyecto BC6F1. Las seis líneas L01, L02, L03, C997, XF y RP01 se utilizaron como parentales recurrentes femeninos (PR), mientras que LIH como donante masculino (PD). Cada cruce se realizó de la misma manera para simplificar el trabajo según la (Figura 29).

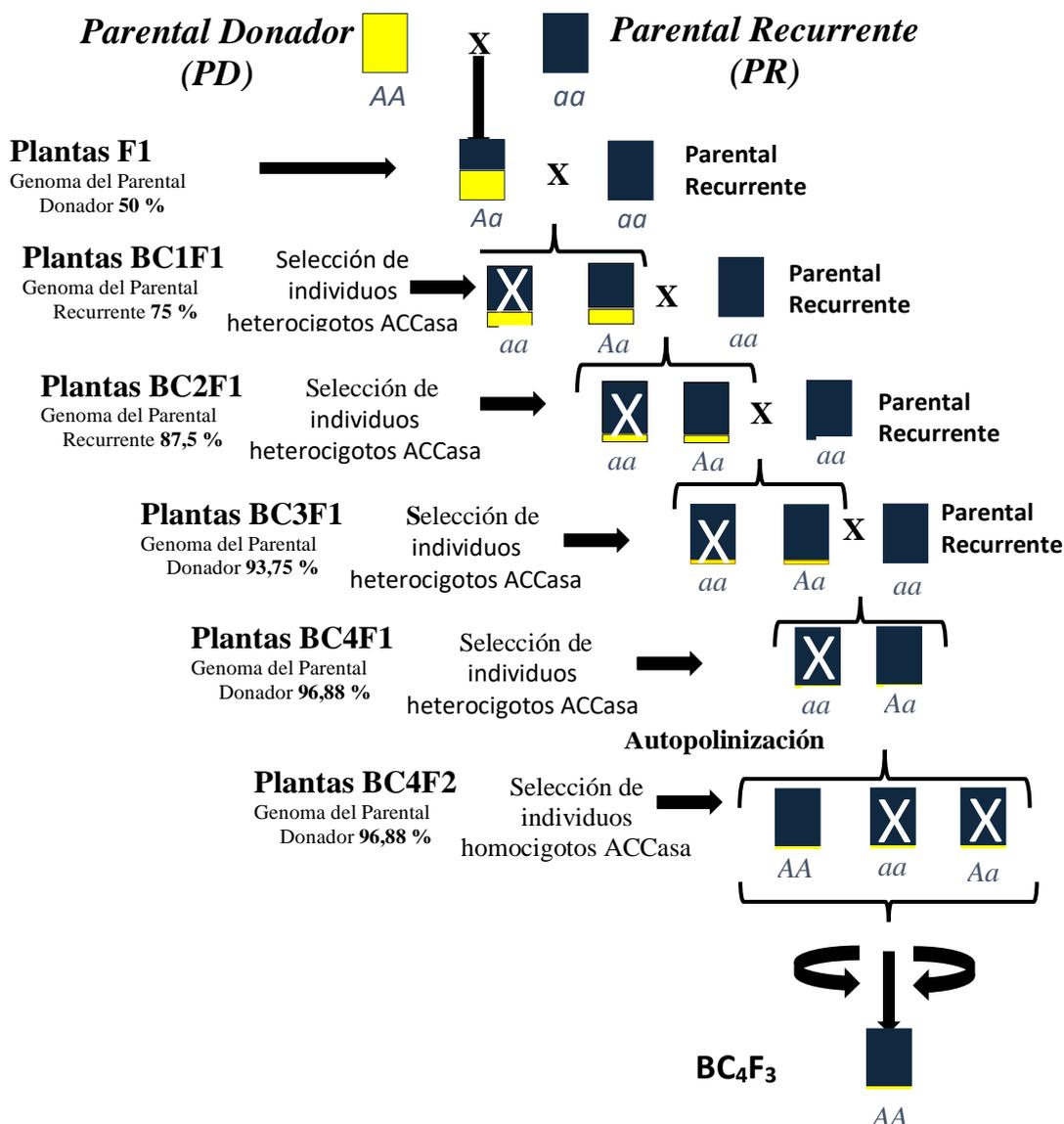


Figura 29. Esquema de retro-cruzamiento asistido mediante el protocolo de secuencia polimórfica amplificada escindida (CAPS) llevado a cabo en este trabajo. Representación en colores del genoma de la planta (azul oscuro para el genoma japónica y amarillo para el genoma indica). La primera selección (screening) mediante el uso de medios con Cicloxidim *in vitro*, posterior PCR y digestión para confirmar la presencia de la mutación OsACC2 en las líneas tolerantes ya seleccionadas *in vitro*. En el locus, **AA** se refiere al alelo tolerante mientras que **aa** al alelo susceptible.

El trabajo que se realizó en cada una de las generaciones fue: a) una hibridación forzada, b) un rescate de embriones de semillas inmaduras, c) una primera selección *in vitro* de medios de cultivos con herbicida y d) la confirmación de todas las plantas heterocigotas con una enzima de restricción (todo esto descrito en el experimento 2).

3.3.3 *Análisis estadísticos*

Las variables estudiadas han sido número de embriones, plantas supervivientes, plantas heterocigotas y homocigotas. Se aplicó un análisis ANOVA de dos factores siempre que se cumplieron la normalidad de los residuos y la homocedasticidad de varianzas, analizados mediante el test de Shapiro-Wilk, Levene y Bartlett respectivamente. Para determinar diferencias entre líneas y cruces, plantas heterocigotas y homocigotas, se han hecho test de χ^2 con un intervalo de confianza del 95%. El programa de análisis estadístico utilizado fue el Stata V.15 (StataCorp LLC).

4. Resultados

4.1 Experimento 1: Validación de la región *Saltol*, retorno al parental recurrente y ensayos de campo de las nuevas líneas de arroz

4.1.1 Validación de KASP para el genotipado de las nuevas líneas de arroz

Cientos de marcadores polimórficos *indica/japonica* fueron testados para determinar el retorno al parental recurrente hasta llegar a los marcadores que resultaron polimórficos entre la línea *indica* donante y las líneas *japonica* receptoras, XX para PL12 y YY para PM37.

El genotipado KASP se realizó en la generación BC1F1, BC2F1, BC3F1, BC3F2 y BC3F3 de las líneas LP (PL12 x FL478) y MS (PM37 x IR64-*Saltol*) respectivamente. Por ello la validación de marcadores polimórficos de las líneas genotipadas en las diferentes generaciones se agrupó de acuerdo a la heredabilidad íntegra de la región *Saltol* y mayor retorno al genoma de los parentales recurrentes. Por esta razón todos los cruces se realizaron entre los parentales recurrentes y las nuevas líneas seleccionadas genotípicamente *PCR-KASP* (parentales donadores), (Tabla 9) el detalle de selección de las nuevas líneas en las tablas SM1 y SM2.

Tabla 9. - Ejemplo de la selección de retorno al parental recurrente por marcadores polimórficos *indica/japonica* en líneas MS. %PR representa el porcentaje de marcadores japonica detectados en cada línea sin tener en cuenta la región *Saltol*, %H representa el porcentaje de marcadores en heterocigosis *indica/japonica*. %IR64-*Saltol* representa el porcentaje de marcadores *indica* en homocigosis presentes en cada línea:

Código	Línea BC3MS	Planta F3	%PR	%H	%IR64- <i>Saltol</i>
MS1	21.11H.100.58	1	100	0	0.00
MS2	21.11H.100.58	2	98.36	0	1.64
MS3	21.11H.100.43	1	95.08	0	4.92
MS4	21.11H.222.59	5	93.44	0	6.56
MS5	21.11H.22.66	3	93.44	0	6.56
MS6	21.8E.27.67	11	93.44	0	6.56
MS7	21.11H.22.66	6	91.80	0	8.20
MS8	21.11H.22.66	8	91.80	0	8.20
MS9	21.8E.27.79	3	91.80	0	8.20
MS10	21.6A.164.63	1	91.80	0	8.20
MS11	21.6A.164.63	10	91.80	0	8.20
MS12	21.4E.47.67	4	90.16	0	9.84
MS13	21.8E.27.34	2	90.16	0	9.84
MS14	21.8E.85.30	4	88.52	0	11.48
MS15	2984.33.69	5	88.52	0	11.48

MS16	21.4E.47.3	7	88.52	0	11.48
MS17	21.3B.22.5	9	88.52	0	11.48

4.1.2 Resultados de campo de las líneas seleccionadas

4.1.2.1 Efectos de la salinidad en el número de Brotes (Ahijado)

El estudio de parámetros en los ensayos de campo fue realizado en los veranos del 2018 y 2019. En 2018 se realizaron estudios de los parentales PL12 y FL478 con sus respectivas líneas *Saltol* LP, mientras en 2019 se trabajaron las cuatro líneas parentales PL12, PM37, FL478, IR64*Saltol* y sus líneas *Saltol* LP y MS.

En los ensayos de campo se realizaron dos tratamientos uno denominado control (no salino) en la *Càmara Arrossera del Montsià*, y el otro denominado salino en el campo experimental Los Vascos (IRTA) los cuales han proporcionado diferencias significativas al comparar resultados entre cada línea y a su vez entre sus parentales en ambos tratamientos con un p-valor < 0,05.

En el tratamiento salino 2018, de todas las líneas estudiadas, la línea tolerante FL478 sufrió la disminución estadísticamente inferior en el número de brotes (ahijado), ocurriendo de igual manera en las líneas *Saltol* LP8, LP26, LP23, LP28, LP29, LP30 y la línea parental PL12 respecto a las obtenidas en el tratamiento control. Al contrario, las líneas LP10, LP13, LP20, LP24, LP31 y LP9 no sufrieron disminuciones estadísticamente significativas en sus brotes. Por otro lado, el parental FL478 del tratamiento control presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes con todas las líneas *Saltol* LP, incluidas el parental PL12 del tratamiento control. El parental PL12 del tratamiento control no presentó disminuciones estadísticamente significativas en el número de brotes con las líneas *Saltol* LP8, LP9, LP10, LP13, LP20 y LP31, ocurriendo lo contrario con las líneas *Saltol* LP23, LP24, LP26, LP28, LP29 y LP30 donde si se observaron disminuciones estadísticamente significativas en el número de brotes del tratamiento control. También, se observaron diferencias estadísticamente inferiores en el número de brotes entre las líneas *Saltol* del tratamiento control agrupándose en 3 grupos el primer grupo LP23, LP24, LP26, LP28 LP29 y LP30, el segundo grupo LP8, LP20, LP31 y el tercer grupo LP9, LP10 y LP13.

En cambio, el parental FL478 del tratamiento salino no presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes con la línea *Saltol* LP24. Ocurriendo lo contrario con las líneas *Saltol* LP10, LP13, LP20, LP31, LP8, LP9, LP23, LP26, LP28, LP29, LP30 y el parental PL12 donde sí se observaron diferencias

estadísticamente significativas en cuanto al número de brotes. Por otro lado, el parental PL12 del tratamiento salino no presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes con las líneas *Saltol* LP8, LP9, LP10, LP13, LP20 y LP23, ocurriendo todo lo contrario con las líneas *Saltol* LP24 LP26, LP28, LP29, LP30 y LP31 del tratamiento salino. Finalmente, entre las líneas *Saltol* se observaron diferencias estadísticamente diferentes en el número de brotes agrupándose en primer lugar la línea *Saltol* LP24, en el segundo grupo LP26, LP28, LP29 LP30, LP31, en el tercer grupo LP8, LP13, LP20, LP23, y el cuarto grupo LP9 y LP10 del tratamiento salino (Figura 30).

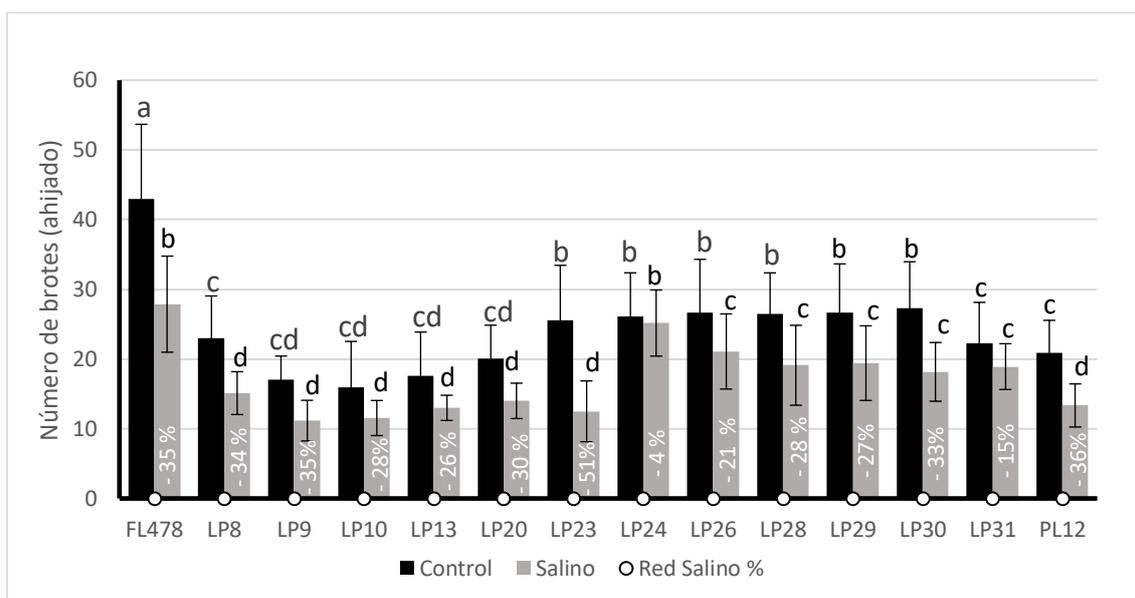


Figura 30. Número brotes (ahijado) obtenido en el experimento 1. Las líneas parentales y sus híbridas LP del tratamiento control (no salino) están representadas en color negro y las líneas parentales y sus híbridas LP del tratamiento salino están representadas en color gris. Los datos aparecen como la media ($n = 24$ control), ($n = 17$ salino) \pm el error estándar (2018). Las diferencias significativas con un p -valor $< 0,05$ se han representado con letras distintas dentro de los tratamientos. Además, se ha añadieron los datos de la reducción porcentual del tratamiento salino.

En el 2019, el grupo de plantas en estudio se ampliaron a 37 líneas a diferencia del verano anterior (14 líneas). Por consiguiente, empezaremos con las parentales FL478 y PL12 con sus respectivas líneas *Saltol* LP. La línea tolerante FL478 del tratamiento control sufrió una reducción estadísticamente de brotes (ahijado) en el tratamiento salino, ocurriendo de igual manera en las líneas *Saltol* LP7, LP25, LP27. Al contrario, las líneas LP1, LP2, LP3, LP4, LP5, LP6, LP8, LP11, LP12, LP13, LP14, LP16, LP17, LP20, LP21, LP22, LP24, LP26, LP28, LP29, LP30, LP31 y la parental PL12 no sufrieron diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes. Por otro lado, el parental FL478 del tratamiento control presentó diferencias estadísticamente significativas con todas las

líneas *Saltol* LP, incluidas la parental PL12 del tratamiento control. El parental PL12 del tratamiento control no presentó diferencias estadísticamente significativas con las líneas *Saltol* LP1, LP2, LP3, LP4, LP5, LP6, LP7, LP8, LP11, LP12, LP13, LP14, LP20, LP21, LP22, LP24, LP30 y LP31 del tratamiento control, ocurriendo todo lo contrario con las líneas *Saltol* LP16, LP17, LP25, LP26, LP27, LP28 y LP29. También se observan diferencias estadísticamente significativas inferiores en el número de brotes entre las líneas *Saltol* del tratamiento control en el primer grupo las líneas LP16, LP17, LP25, LP26, LP27, LP28, LP29, en el segundo grupo LP1, LP2, LP3, LP4, LP5, LP6, LP8, LP11, LP20, LP21, LP22, LP24, LP30, LP31 y el tercer grupo LP7, LP12, LP13 y LP14. En cambio, el parental FL478 del tratamiento salino no presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes con las líneas *Saltol* LP16 y LP17 y a su vez estas dos líneas *Saltol* presentaron similitudes estadísticas con LP1, LP7, LP28, LP30. Ocurriendo lo contrario con las líneas *Saltol* LP2, LP4, LP5, LP6, LP8, LP11, LP12, LP13, LP14, LP20, LP21, LP22, LP24, LP30, LP31 LP25, LP26, LP27, LP29 y el parental PL12 del tratamiento salino donde sí que se observaron diferencias estadísticamente diferentes en el número de brotes. Por otro lado, el parental PL12 del tratamiento salino no presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes con las líneas *Saltol* LP1, LP3, LP5, LP6, LP7, LP8, LP11, LP20, LP22, LP24, LP25, LP26, LP27, LP28, LP29, LP30 y LP31 del tratamiento salino, ocurriendo todo lo contrario con las líneas *Saltol* LP2, LP4, LP12, LP13, LP14, LP16 y LP17 del mismo tratamiento salino. Finalmente, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas *Saltol* en primer lugar LP1, LP7, LP16, LP17, LP28, LP29, LP30 en el segundo grupo, LP3, LP5, LP6, LP21, LP22, LP24, LP26, LP27, en el tercer grupo LP8, LP11, LP20, LP25 y el cuarto grupo LP2, LP4, LP12, LP13, LP14 (Figura 31).

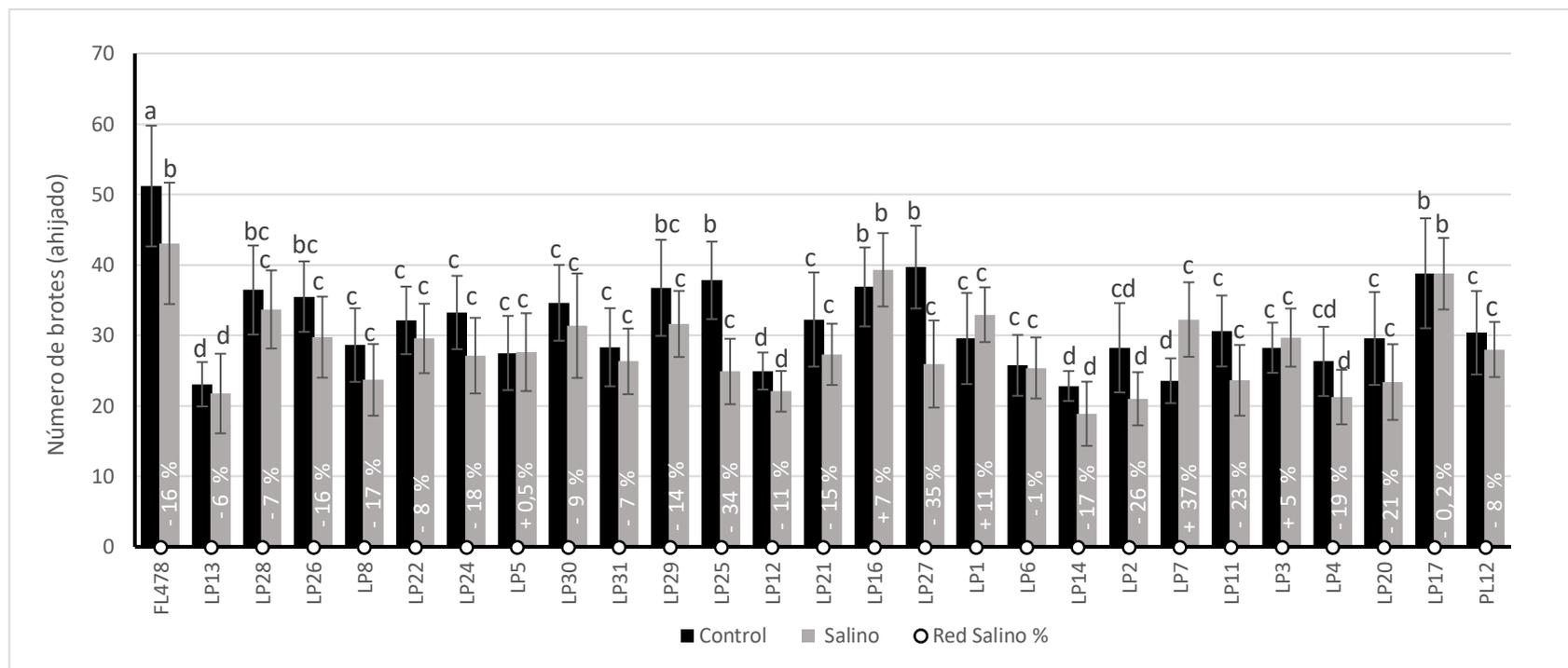


Figura 31. Número de brotes (ahijado) obtenido en el experimento 1. Las líneas parentales y sus híbridas LP del tratamiento control están representadas en color negro y las líneas parentales y sus híbridas LP del tratamiento salino están representadas en color gris. Los datos aparecen como la media ($n = 32$ control), ($n = 28$ salino) \pm el error estándar (2019). Las diferencias significativas con un p -valor $< 0,05$ se han representado con letras distintas dentro de los tratamientos. Además, se ha añadieron los datos de la reducción porcentual del tratamiento salino.

Por otro parte, se estudió los parentales IR64*Saltol* y PM37 y sus respectivas líneas *Saltol* MS. Con relación a la línea tolerante IR64*Saltol* del tratamiento control no sufrió disminuciones estadísticamente significativas de brotes (ahijado) en el tratamiento salino, ocurriendo de igual manera con todas las líneas *Saltol* MS, incluidas su parental PM37. Por otro lado, el parental tolerante IR64*Saltol* control, presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes con todas las líneas *Saltol* MS y el parental PM37 del tratamiento control. El parental PM37 del tratamiento control no presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes con las líneas *Saltol* MS12, MS21, MS23, MS25 y MS28, ocurriendo todo lo contrario con las líneas *Saltol* MS3, MS14, MS17, del tratamiento control. También se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas *Saltol* dentro del tratamiento control, agrupándose en dos grupos el primero con MS3, MS14, MS17, MS21, el segundo grupo MS12, MS23, MS25 y MS28.

En cambio, el parental tolerante IR64-*Saltol* del tratamiento salino presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de brotes con todas las líneas híbridas incluido el parental PM37 del tratamiento salino. Mientras que el parental PM37 del tratamiento salino no presentó diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las líneas híbridas MS y tampoco se observaron reducciones en el número de brotes entre líneas híbridas dentro del tratamiento salino (Figura 32).

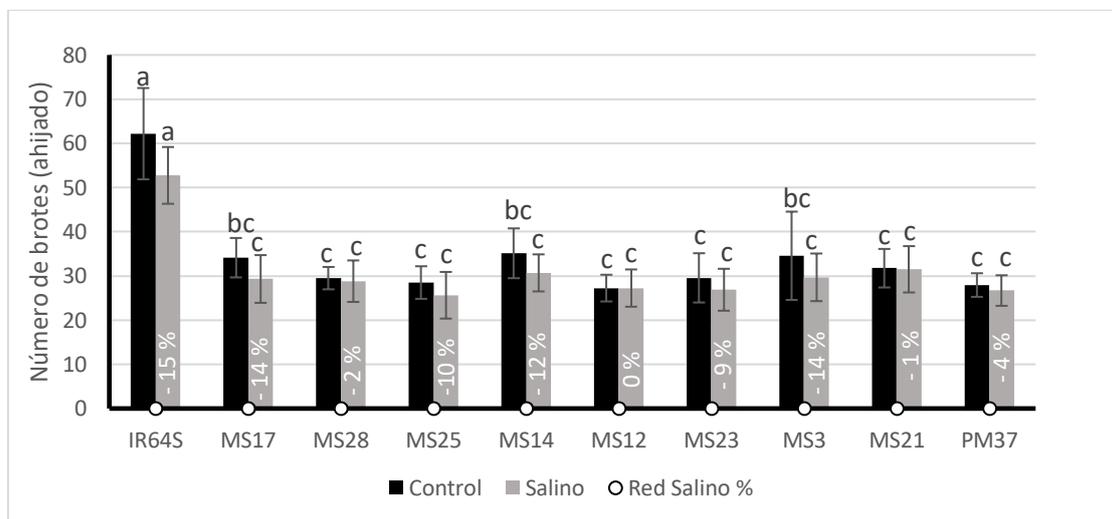


Figura 32. Número de brotes (ahijado) obtenido en el experimento 1. Las líneas parentales y sus híbridas MS del tratamiento control están representadas en color negro y las líneas parentales y sus híbridas MS del tratamiento salino están representadas en color gris. Los datos aparecen como la media ($n = 34$ control), ($n = 31$ salino) \pm el error estándar (2019). Las diferencias significativas con un p -valor $< 0,05$ se han representado con letras distintas dentro de los tratamientos. Además, se ha añadieron los datos de la reducción porcentual del tratamiento salino.

4.1.2.2 Efectos de la salinidad en la longitud

Durante el periodo de cultivo, la altura de las plantas alcanzó para 2018 un promedio máximo de 77,5 cm de longitud en el caso del parental tolerante FL478 y de 79,5 cm en el parental sensible PL12. Por consiguiente, la línea tolerante FL478 del tratamiento control mostró reducción estadísticamente de su longitud en el tratamiento salino, ocurriendo de igual manera en las líneas híbridas LP20, LP23, LP26, LP28, LP29, LP30, LP31 y el parental PL12 con sus homologas del tratamiento salino. Al contrario, las líneas híbridas LP8, LP9, LP10, LP13 y LP24 no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a su longitud. Por otro lado, los parentales FL478 y el PL12 del tratamiento control no presentaron diferencias estadísticamente significativas en su longitud con las líneas híbridas LP del tratamiento control y tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las líneas híbridas dentro del tratamiento control.

Por su parte, el parental FL478 del tratamiento salino no presentó diferencias estadísticamente significativas en su longitud con respecto a las líneas híbridas dentro del mismo tratamiento salino. Asimismo, el parental PL12 del tratamiento salino no mostró diferencias estadísticamente significativas en su longitud con respecto a las líneas híbridas LP dentro del mismo tratamiento salino (Figura 33).

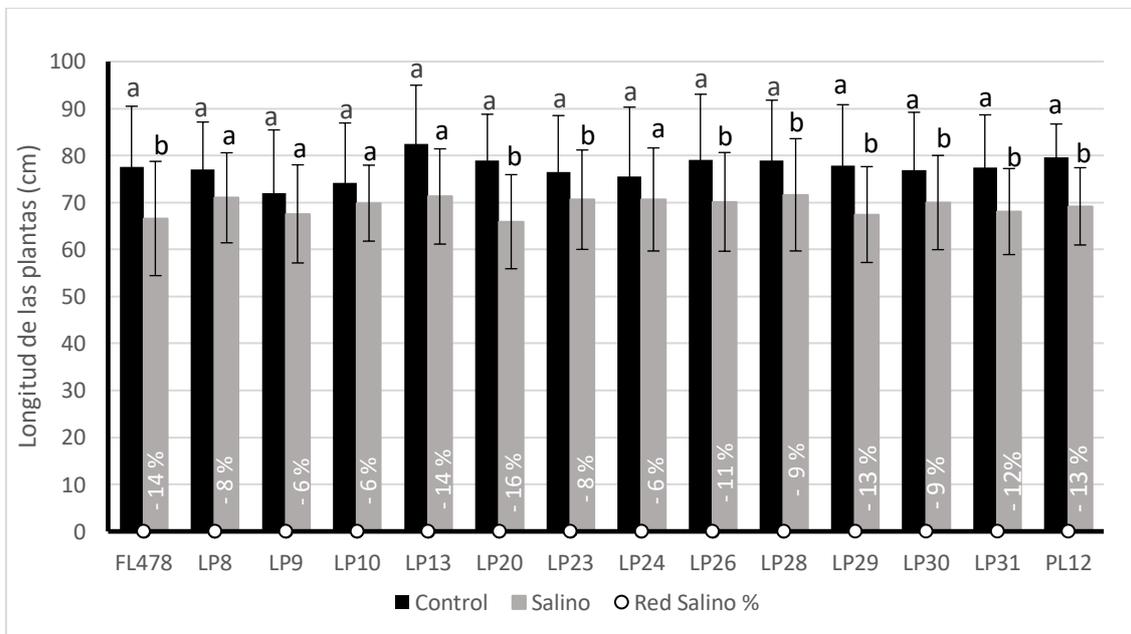


Figura 33. Longitud en cm de las plantas obtenido en el experimento 1. Las líneas parentales y sus híbridas LP del tratamiento control están representadas en color negro y las líneas parentales

y sus híbridas LP del tratamiento salino están representadas en color gris. Los datos aparecen como la media ($n = 77$ control), ($n = 69$ salino) \pm el error estándar (2018). Las diferencias significativas con un p -valor $< 0,05$ se han representado con letras distintas dentro de los tratamientos. Además, se ha añadieron los datos de la reducción porcentual del tratamiento salino.

Durante el periodo de cultivo, la altura alcanzó para 2019 un promedio máximo de 96,5 cm de longitud en el caso del parental tolerante FL478 y de 93 cm en el parental PL12. En primer lugar, la línea tolerante FL478 control mostró disminuciones estadísticamente significativas de su longitud en el tratamiento salino, ocurriendo de igual manera con todas las líneas *Saltol* LP y la línea parental PL12 en su comparación a su equivalente. En segundo lugar, el parental FL478 del tratamiento control no presentó diferencias estadísticamente significativas en su longitud con las líneas *Saltol* LP1, LP5, LP8, LP22, LP24, LP26, LP28, LP29, LP30, LP31 y el parental PL12 del tratamiento control. Todo lo contrario, sucedió con las líneas *Saltol* LP2, LP3, LP4, LP6, LP7, LP11, LP12, LP13, LP14, LP16, LP17, LP20, LP21, LP25 y LP27 las cuales presentaron diferencias estadísticamente inferiores de su longitud dentro del tratamiento control. El parental PL12 control no presentó diferencias estadísticamente significativas en su longitud con las líneas *Saltol* LP1, LP2, LP3, LP5, LP8, LP11, LP12, LP17, LP20, LP21, LP22, LP24, LP25, LP26, LP28, LP29, LP30 y LP31 del mismo tratamiento. Contrariamente, sucedió con las líneas *Saltol* donde se observaron diferencia estadísticamente significativa en su longitud LP4, LP6, LP7, LP13, LP14, LP16 y LP27 dentro mismo tratamiento. Finalmente, se observaron diferencias estadísticamente significativas en su longitud entre las líneas *Saltol* en primer lugar LP22, LP26, LP28, en el segundo grupo LP1, LP2, LP3, LP5, LP7, LP8, LP11, LP12, LP17, LP20, LP21, LP24, LP29, LP30, LP31, en el tercer grupo LP6, LP4, LP13, LP16, LP27, y el cuarto grupo LP14 y LP25 dentro del tratamiento control.

En cambio, la FL478 del tratamiento salino no presento diferencias estadísticamente significativas en su longitud con las *Saltol* LP2, LP5, LP8, LP13, LP20, LP22, LP24, LP26, LP28, LP29, LP30, LP31 y el parental PL12 del tratamiento salino. Contrariamente sucedió con las líneas *Saltol* LP1, LP3, LP4, LP6, LP7, LP11, LP12, LP14, LP16, LP17, LP21, LP25 y LP27 del tratamiento salino donde se observaron diferencias estadísticamente significativas en la reducción de su longitud. El parental PL12 del tratamiento salino no presentó diferencias estadísticamente significativas en su longitud con las líneas *Saltol* LP1, LP2, LP3, LP5, LP6, LP7, LP8, LP13, LP20, LP22, LP24, LP25, LP26, LP28, LP29, LP30, LP31. Además, de forma contraría paso con las líneas

Saltol LP4, LP11, LP14, LP16, LP17, LP21, LP25 y LP27 del tratamiento salino donde se observaron diferencias estadísticamente inferiores en su longitud.

Finalmente, se observaron diferencias estadísticamente significativas en su longitud entre las líneas *Saltol* en el primer grupo LP2, LP5, LP8, LP13, LP20, LP22, LP24, LP26, LP28, LP29, LP30 y LP31 en el segundo grupo LP1, LP3, LP6, LP7, LP12, en el tercer grupo LP4, LP11, LP16, LP17, LP21, LP27 el cuarto grupo LP14 y LP25 dentro del tratamiento control (Figura 34).

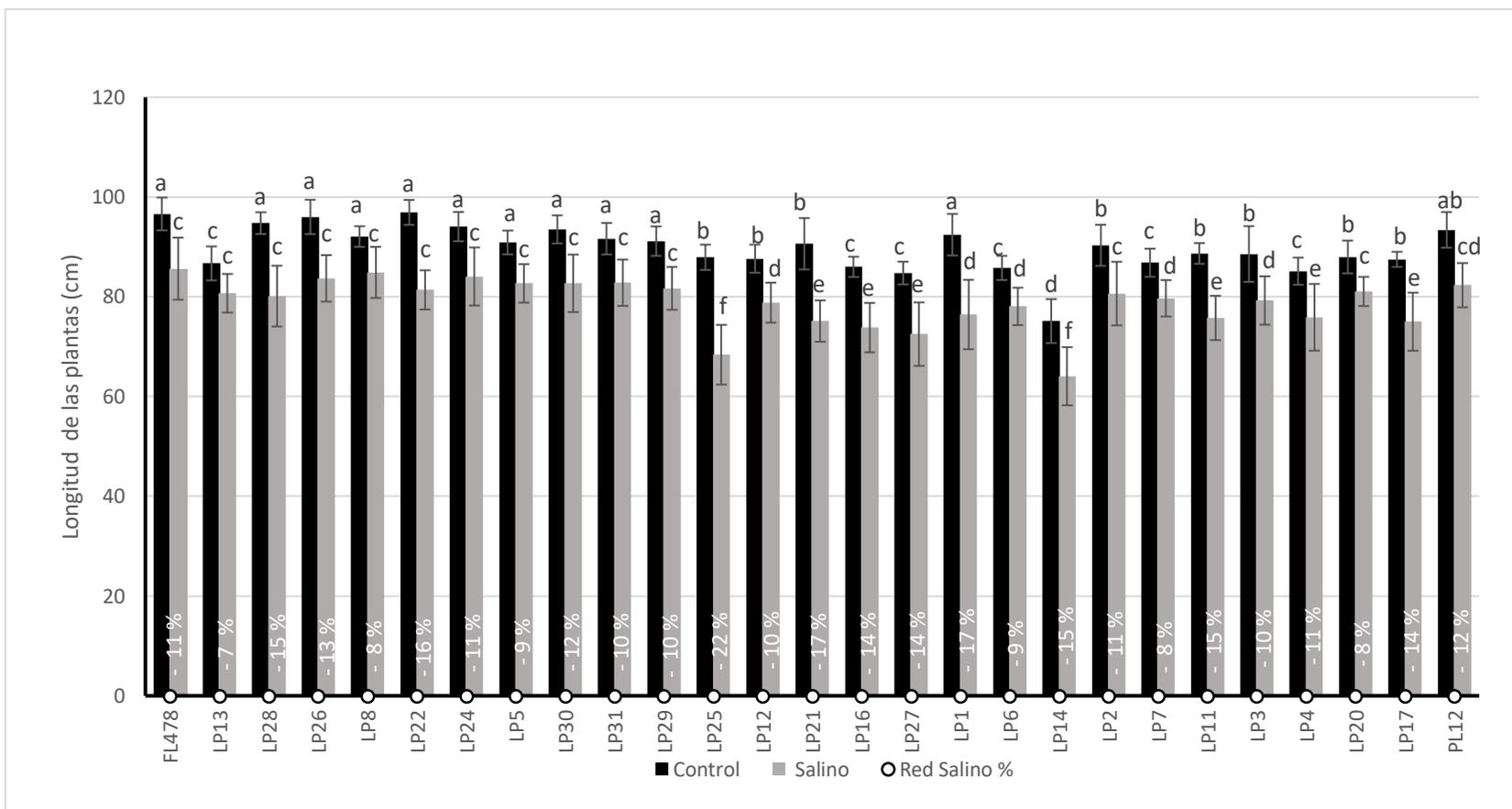


Figura 34: Longitud en cm de las plantas obtenido en el experimento 1. Las líneas parentales y sus híbridas LP del tratamiento control están representadas en color negro y las líneas parentales y sus híbridas LP del tratamiento salino están representadas en color gris. Los datos aparecen como la media ($n = 90$ control), ($n = 79$ salino) \pm el error estándar (2019). Las diferencias significativas con un p -valor $< 0,05$ se han representado con letras distintas dentro de los tratamientos. Además, se ha añadieron los datos de la reducción porcentual del tratamiento salino.

Por otra parte, tenemos los parentales IR64*Saltol* y PM37 y sus respectivas líneas híbridas MS. Con relación a la línea tolerante IR64*Saltol* control no sufrió reducción estadísticamente en su longitud en el tratamiento salino, ocurriendo de igual manera con las líneas *Saltol* MS3, MS14, MS21 e incluido el parental PM37, en cambio presentaron diferencias estadísticamente significativas de su longitud las líneas *Saltol* MS12, MS17, MS23, MS25 y MS28 entre sus réplicas homólogas del tratamiento salino. Por otro lado, el parental IR64*Saltol* del tratamiento control no presentó diferencias estadísticamente inferiores en su longitud con las líneas *Saltol* MS3, MS14, MS23, MS25, MS28 y el parental PM37 del tratamiento control, ocurriendo todo lo contrario con las líneas *Saltol* MS12, MS17 y MS21 del tratamiento control. En cambio, el parental PM37 del tratamiento control no mostró diferencias estadísticamente significativas de su longitud con las líneas *Saltol* MS3, MS14, MS25 y MS28 del mismo tratamiento control, ocurriendo todo lo contrario con las líneas *Saltol* MS12, MS17, MS21 y MS23. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas de su longitud entre las líneas *Saltol* MS, en el primer grupo MS12, el segundo grupo MS14, MS23, MS25, MS28, el tercer grupo MS3, MS17 y el cuarto grupo MS21 dentro del tratamiento control.

Por su parte, el parental IR64*Saltol* salino no mostró diferencias estadísticamente significativas en su longitud con las líneas *Saltol* MS3, MS12, MS14, MS23, MS28 y PM37 del mismo tratamiento salino, ocurriendo todo lo contrario con las líneas *Saltol* MS17, MS21 y MS25 dentro del tratamiento salino. En cambio, el parental PM37 del tratamiento salino no presentó diferencia estadísticamente significativa en su longitud con las líneas *Saltol* MS3, MS12, MS14, MS23 y MS28 del mismo tratamiento salino, ocurriendo todo lo contrario con las líneas *Saltol* MS17, MS21 y MS25 dentro del mismo tratamiento salino. Finalmente, se observaron diferencias estadísticamente significativas de su longitud entre las líneas *Saltol* MS en el primer grupo MS3, MS12, MS14, MS23, MS28, el segundo grupo MS17, MS25 y el tercer grupo MS21 dentro del mismo tratamiento salino (Figura 35).

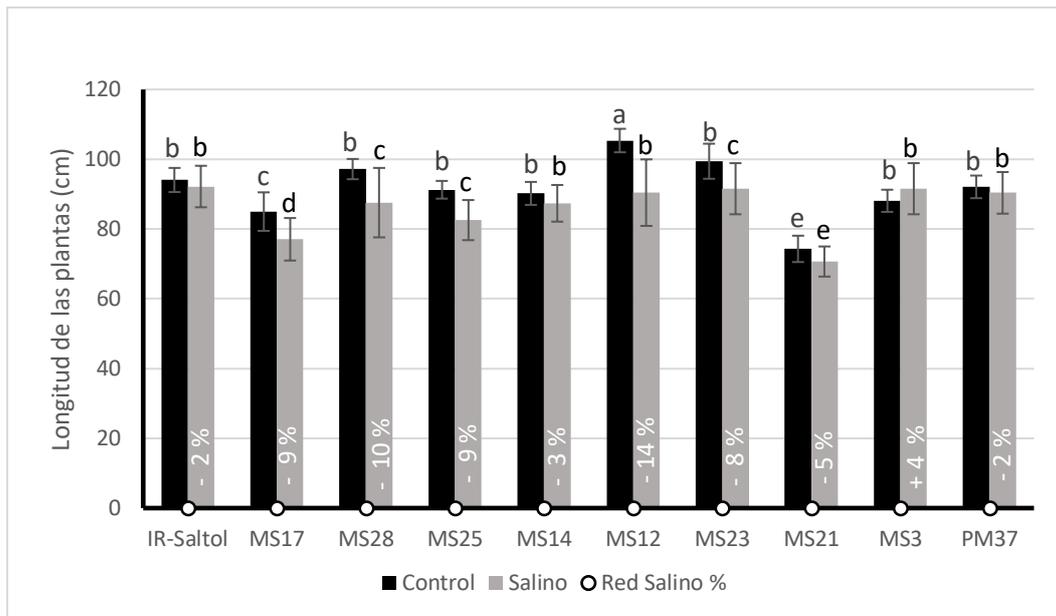


Figura 35. Longitud en cm de las plantas obtenida en el experimento 1. Las líneas parentales y sus híbridas MS del tratamiento control están representadas en color negro y las líneas parentales y sus híbridas MS del tratamiento salino están representadas en color gris. Los datos aparecen como la media ($n = 92$ control), ($n = 86$ salino) \pm el error estándar (2019). Las diferencias significativas con un p -valor $< 0,05$ se han representado con letras distintas dentro de los tratamientos. Además, se ha añadieron los datos de la reducción porcentual del tratamiento salino.

4.1.2.3 Efectos salinos en panícula y maduración del arroz

En los ensayos de campo 2018 se trabajó y se evaluó solo las líneas LP con respecto al estudio del número de panículas y maduración. Sin embargo, el siguiente año no se lograron analizar las pruebas debido al gran número de líneas híbridas. En cuanto al parental FL478 del tratamiento control no llegó a completar su ciclo, por lo tanto, el análisis estadístico utilizó los parentales FL478 del tratamiento salino y PL12 de ambos tratamientos.

El parental PL12 control no presenta diferencias estadísticamente significativas en números de panículas con respecto al tratamiento salino, de igual manera se comportaron las líneas *Saltol* LP8, LP10, LP20, LP26, LP28, LP29, LP30, LP31. Sin embargo, las líneas *Saltol* LP9, LP13, LP23 y LP24 si mostraron diferencias en su número de panículas entre ellas. Por otro lado, El parental PL12 del tratamiento control mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de panículas con las líneas *Saltol* LP9, LP10, LP13, LP23, LP24, LP26, LP29 dentro del mismo tratamiento control. También se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de panículas entre las líneas *Saltol* LP el primer grupo LP23, LP24, LP26, LP29, LP31 en el segundo grupo LP8,

LP28, LP30 en el tercer grupo LP20 y el cuarto grupo LP9, LP10, LP13 dentro del mismo tratamiento control (Figura 36).

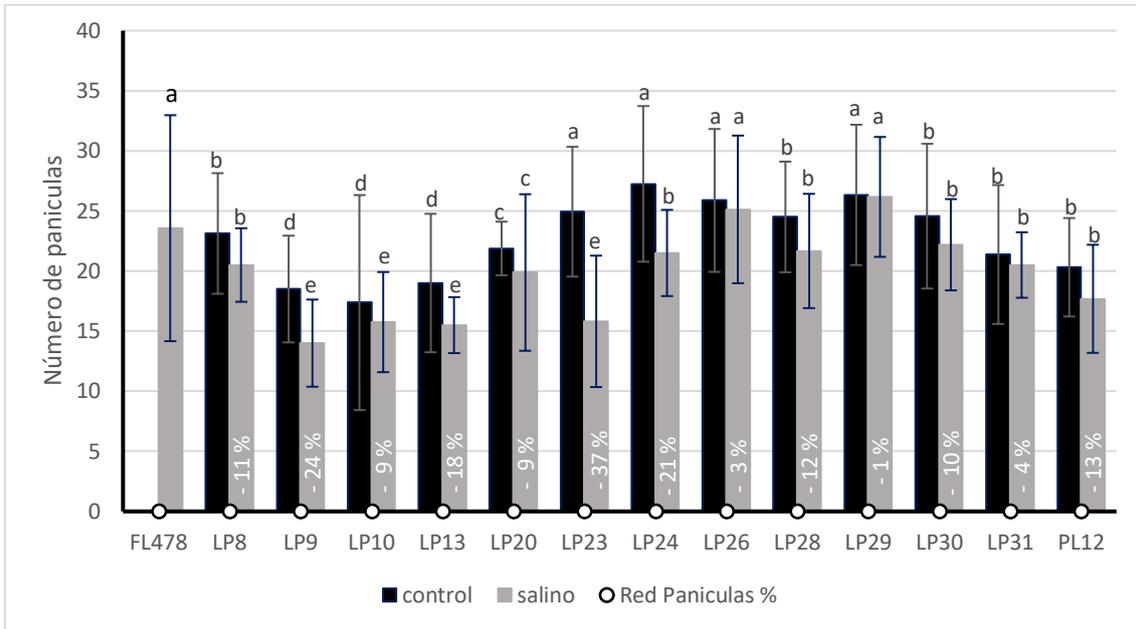


Figura 36. Número de panículas obtenido en el experimento 1. La parental PL12 y sus híbridas LP del tratamiento control están representadas en color negro y las líneas parentales y sus híbridas LP del tratamiento salino están representadas en color gris. Los datos aparecen como la media ($n = 21$ control), ($n = 20$ salino) \pm el error estándar (2018). Las diferencias significativas con un p -valor $< 0,05$ se han representado con letras distintas dentro de los tratamientos. Además, se ha añadieron los datos de la reducción porcentual del tratamiento salino.

Por su parte, en el ensayo salino el parental FL478 mostro diferencias estadísticamente significativas en el número de panículas con las líneas *Saltol* LP9, LP10, LP13, LP23 y el parental PL12 dentro del mismo tratamiento. Además, el parental PL12 salino mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de panículas con las líneas *Saltol* LP26, LP29 y el parental FL478 dentro del mismo tratamiento. Finalmente se observaron diferencias estadísticamente diferentes en el número de panículas entre las líneas *Saltol* LP el primer grupo LP26, LP29, en el segundo grupo LP24, LP28, LP30, en el tercer grupo LP8, LP20, LP31 y el cuarto grupo LP9, LP10, LP13, LP23 dentro del mismo tratamiento salino.

La maduración viene asociada al número de panículas, debido a esta dependencia no se obtuvo resultados del parental resistente FL478 en el tratamiento control. Por otro lado, el parental PL12 y algunas líneas *Saltol* no consiguieron completar su ciclo de maduración. Por consiguiente, los datos no fueron suficientes para el análisis estadístico. En el tratamiento salino, la maduración completó el ciclo fisiológico en los parentales

FL478, PL12 y sus líneas *Saltol* LP. Sin embargo, no se obtuvo suficientes replicas para cada línea y, por tanto, no fue viable el análisis estadístico.

4.1.2.4 Medición de la afectación de las plagas en el cultivo del arroz

En el ensayo de campo, también se evaluó otros parámetros cualitativos no estadísticos como: la homogeneidad, el encamado, la afectación por *Pyricularia oryzae*, infestación por *Lissoroptus sp.* y afectación por *Chilo suppressalis* (minador-taladro del arroz), los cuales fueron significativos para la investigación. Por otro lado, la recogida de datos para la evaluación de las 4 líneas parentales FL478, IR64*Saltol*, PL12 y PM37 y sus líneas *Saltol* LP y MS se realizó cada quince días durante todo el periodo de cultivo (Julio-Agosto-Septiembre), a continuación se muestra (Tabla 10) los criterios que se utilizaron para los aspectos cualitativos a evaluar en el cultivo del arroz 2018 y 2019 (Tabla 11-12).

Tabla 10. Criterios cualitativos para el estudio de las variedades del arroz.

Código	Homogeneidad	Encamado	<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Lissoroptus sp.</i>	<i>Chilo suppressalis</i>
+++	>90% homogéneo	<10 plantas acostadas	0-0.5% afectación de la hoja	0-1 plantas afectadas	0-1 plantas afectadas
++	50-75% homogéneo	>10-20 plantas acostadas	0.5-1% afectación de la hoja	2-5 plantas afectadas	2-5 plantas afectadas
+	25-50% homogéneo	>20-40 plantas acostadas	1-2% afectación de la hoja	5-7 plantas afectadas	5-7 plantas afectadas
-	<25% homogéneo	>40 tallos	>2% afectación de la hoja	7-10 plantas afectadas	7-10 plantas afectadas

Tabla 11. Evaluación de campo de las Líneas FL478, PL12 y sus híbridas LP, en ambos campos de cultivos (No Salino y Salino).

Líneas	Salinidad	Homogeneidad	Encamado	<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Lissoroptus sp.</i>	<i>Chilo suppressalis</i>
FL478	No salino	+++	++	+++	+++	+
	Salino	+++	+++	+++	+++	++
LP8	No salino	+++	++	+++	++	++
	Salino	+++	+++	+++	+++	+++
LP9	No salino	+	++	+++	+++	+
	Salino	++	+++	+++	+++	+++

LP10	No salino	+	++	+++	++	++
	Salino	++	+	+++	++	++
LP13	No salino	+++	++	+++	++	++
	Salino	+++	+++	+++	++	++
LP20	No salino	+++	++	++	++	+++
	Salino	++	+++	+++	+++	++
LP23	No salino	+++	++	+++	+++	++
	Salino	++	+++	+++	++	++
LP24	No salino	+++	++	+++	+++	++
	Salino	+++	+++	+++	+++	+++
LP26	No salino	++	++	+++	++	++
	Salino	++	+++	+++	++	++
LP28	No salino	+++	++	+++	+++	++
	Salino	+++	+++	+++	+++	++
LP29	No salino	+++	++	+++	++	++
	Salino	++	+++	+++	+++	++
LP30	No salino	+++	++	+++	++	++
	Salino	+++	+++	+++	+++	++
LP31	No salino	++	++	+++	++	++
	Salino	++	+++	+++	+++	++
PL12	No salino	+++	++	+++	+++	++
	Salino	+++	+++	+++	++	++

Tabla 12. Evaluación de campo de las 4 parentales FL478, IR64Saltol, PL12, PM37 y sus híbridas LP y MS, en ambos campos de cultivos (No Salino y Salino) 2019.

Líneas	Salinidad	Plantas fuera de tipo	Encamado de las plantas	<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Chilo suppressalis</i>
LP8	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP13	No salino	++	+++	+++	+++
	Salino	+++	++	+++	+++
LP20	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP24	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP26	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP28	No salino	+++	++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP29	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP30	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++

LP31	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP16	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP2	No salino	++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	++	++
LP17	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP7	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP1	No salino	+++	++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+
LP12	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP14	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP11	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP6	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP4	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	++
LP3	No salino	+++	+++	+++	++
	Salino	+++	+++	+++	++
MS12	No salino	++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
IR64S	No salino	++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
MS28	No salino	+++	++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
MS23	No salino	+++	+++	+++	++
	Salino	+	+++	+++	+++
MS3	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
FL478	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	++
PM37	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	++
LP22	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
PL12	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP5	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	++	+++	+++

LP21	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
LP25	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	++	+++	+++	+++
LP27	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
MS14	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++
MS17	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	-	+++	+++	+++
MS21	No salino	+++	+++	+++	++
	Salino	+++	+++	+++	+++
MS25	No salino	+++	+++	+++	+++
	Salino	+++	+++	+++	+++

4.2 Experimento 2: Optimización *in vitro* de la resistencia al herbicida

4.2.1 Cruzamiento de las seis líneas elite

En el segundo experimento referente a la resistencia al herbicida, se emascularon 316 espigas las cuales fueron fecundadas mediante una polinización asistida, la cual dio como resultado la obtención de 1.640 embriones, es decir que por cada espiga emasculada se desarrollaba una media de 5,18 embriones. En relación a las líneas (Figura 37), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas (P valor = 0,8490). Durante el proceso del ensayo, las líneas C997, XF6 y RP01 presentaron una esterilidad considerable, lo cual nos llevó a realizar un mayor número de emasculaciones.

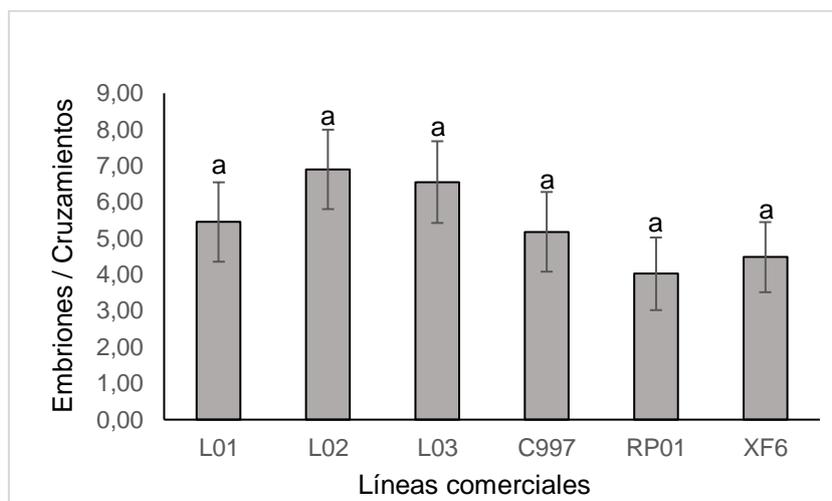


Figura 37. Media de embriones obtenidos por cruzamiento asistido de cada línea. El análisis estadístico mostró que no había diferencias significativas entre las líneas ($p = 0,8490$) y todas pertenecen a un mismo grupo.

4.2.2 Supervivencia de los embriones en el cultivo *in vitro* con herbicida

Una vez obtenidos los 1.640 embriones mediante cruzamientos asistidos se realizó el cultivo *in vitro* para observar la supervivencia a diferentes concentraciones de herbicida, de los cuales se obtuvieron por un lado 420 embriones del tratamiento con herbicida y 321 embriones del tratamiento sin herbicida (Tabla 13). Además, en la comparación de las líneas no se observaron diferencias significativas, con un (P valor < 0,05).

Tabla 13. Porcentajes de supervivencia de las plantas de cada línea cultivadas a diferentes concentraciones de herbicida. Las concentraciones con asterisco presentan tasas de supervivencia significativamente diferentes al resto ($P < 0,05$).

Líneas	Plantas Cultivadas	Plantas Supervivientes	% Supervivientes según la concentración de herbicida (μM)					Total
			0*	2,50*	3,00	3,25	3,50*	
L01	269	110	95.92%	47.17%	31.58%	26.79%	8.93%	42.08%
L02	325	146	97.18%	43.64%	23.61%	29.51%	25.71%	43.93%
L03	309	151	95.52%	49.02%	25.00%	38.46%	32.35%	48.07%
C997	241	98	92.00%	40.00%	23.40%	24.00%	20.75%	40.03%
XF6	231	103	100.00%	44.00%	29.55%	23.91%	23.91%	44.27%
RP01	265	133	87.50%	58.33%	44.44%	45.28%	14.04%	49.92%
Total	1640	741	94.69%	47.03%	29.60%	31.33%	20.95%	44.72%

En cuanto a todos los embriones cultivados con herbicida presentaron porcentajes de supervivencia significativamente inferiores al tratamiento sin herbicida (94,69%), la concentración 2,50 μM con 47,03% a su vez presentó diferencias con el resto de las concentraciones con herbicidas, pero entre las concentraciones 3,00 μM y 3,25 μM (con porcentajes de supervivencia de 29,60% y 31,33%, respectivamente) las diferencias no son significativas, mientras que la concentración 3,50 μM con solo 20,95% de supervivientes la más bajo de todas y con diferencias significativas respecto al resto. Asimismo, la concentración 2,50 μM parece ser la mejor y la 3,50 μM la peor en cuanto a supervivencia. Posteriormente estudiamos que concentración es la mejor del ensayo, realizando la confirmación con una PCR-Digestión (Figura 38).

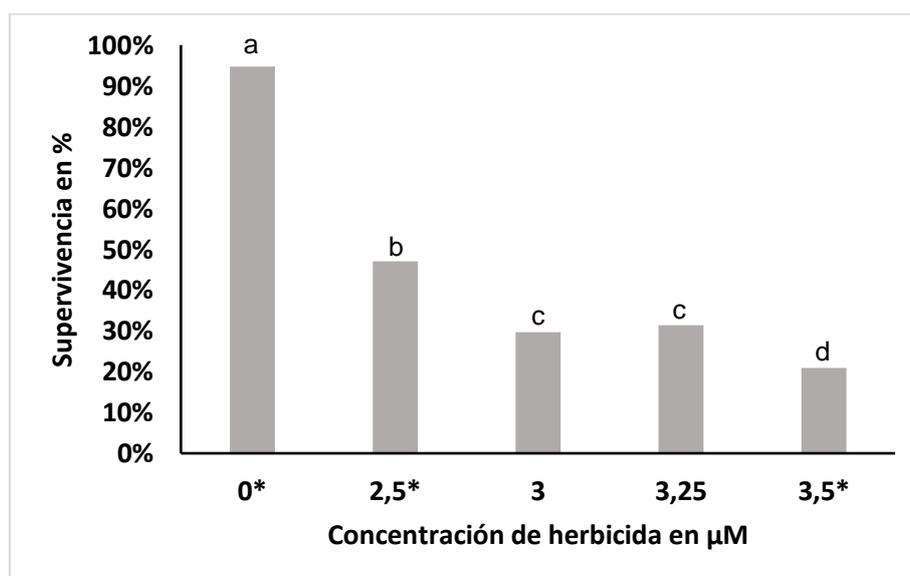


Figura 38. Tasa de supervivencia observada en cada concentración de Cicloxidim. Las letras indican grupos con diferencias significativas por el test χ^2 ($P < 0,05$).

4.2.3 Confirmación molecular de la introgresión del alelo OsACC2

Para continuar con el ensayo, se extrajeron el ADN de las 741 plantas vivas para determinar molecularmente los alelos del gen OsACC2 presentes de las cuales 12 plantas no amplificaron molecularmente quedando un total de 729 plantas estudiadas. Se detectaron 584 heterocigotas Resistente/sensible (R/s) y 145 homocigotas sensible/sensible (s/s) (Figura 39).

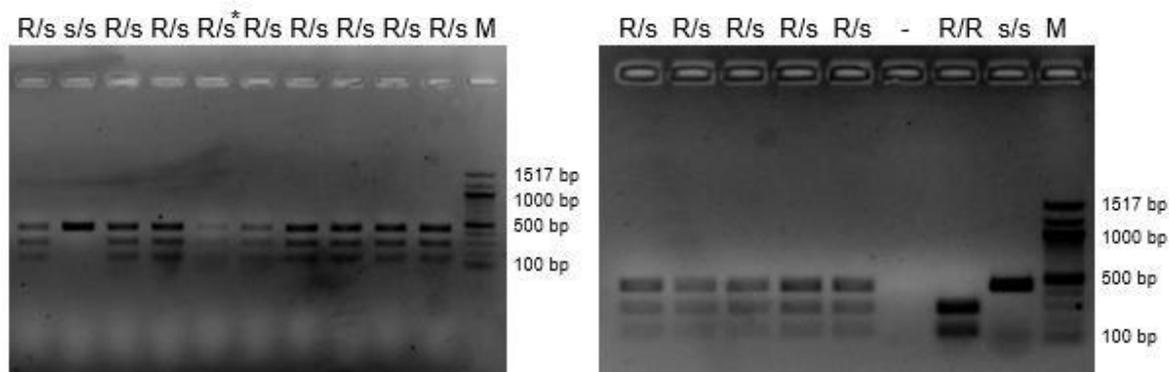


Figura 39. Electroforesis en gel del ADN amplificado y digerido. Encima de cada carril mostramos el genotipo resultante de cada individuo analizado. R/s: individuo heterocigoto resistente; s/s: individuo homocigoto sensible; (-): control negativo (H₂O MilliQ); R/R: control homocigoto resistente; s/s: control de homocigoto sensible; M: marcador molecular. El asterisco corresponde a un individuo heterocigoto que se confirmó repitiendo la ampliación. A la derecha, se indican los pesos de las principales bandas del marcador molecular.

Por consiguiente, en el tratamiento control obtuvimos como resultado un 64% y a su vez las concentraciones 2,50 μ M un 75%, la 3,00 μ M un 97%, la 3,25 μ M un 100% y la 3,50 μ M un 99% de plantas heterocigotas respectivamente. Por otra parte, tenemos las plantas homocigotas con un 34% para el tratamiento control, un 24% para la concentración de 2,50 μ M, un 2% para 3,00 μ M, un 0% para 3,25 μ M y finalmente un 1% para 3,50 μ M. Con respecto al análisis estadístico se observaron diferencias significativas en las concentraciones (P valor = 0,0001), mientras que entre las líneas no presentaron diferencias (P valor = 0,8377) ambos análisis realizados por un test chi².

4.3 Experimento 3: Estudio de la resistencia al herbicida en líneas europeas de arroz

4.3.1 Retrocruzamiento asistido de seis líneas europeas de arroz

Inicialmente en el tercer experimento se trabajaron con cuatro cruces de líneas *japonicas* (parentales recurrentes) y una línea *indica* (parental donador). Posteriormente, cuando obtuvimos resultados favorables de la generación F1, la empresa BASF decidió agregar dos líneas adicionales al estudio durante dos años. Por lo tanto, se obtuvieron diferentes números de embriones, los cuales dependían de sus variedades y sus tipos de granos (Tabla 14).

El factor más importante del experimento 3 es el número de embriones, los cuales dependieron directamente de la cantidad de polen que se produjo en cada estación del año. Esta es la principal razón que explicaría que mientras se realizaron los cruces de cada generación, se obtuvieron diferentes resultados en cada una de ellas. Iniciamos el programa de mejoramiento (retrocruces) con las cuatro primeras líneas (L01, L02, CM7 y CM8) más la donadora (LIH). Así, en el verano del 2018 los embriones obtenidos en este primer cruce (F1) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre el número de embriones y entre las cuatro líneas. Para la siguiente generación los cruces se realizaron en otoño del 2018. Por un lado, la obtención del (BC1F1) de tres líneas (L01, L02, CM7 este último cambio de siglas a C997) y por el otro lado la obtención de la F1 de tres líneas (L03, RP01 y CM8 que cambio de siglas a XF), en las cuales se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de embriones y las seis líneas comerciales. A continuación, para la siguiente generación los cruces se realizaron en la primavera del 2019 para la obtención del BC2F1 de las líneas (L01, L02 y C997) y, por el otro lado, para la obtención del BC1F1 de las líneas (L03, RP01 y XF), en las cuales se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de embriones y las seis líneas comerciales. Seguidamente, para la siguiente generación los cruces se realizaron el verano del 2019 con la obtención del BC3F1 de las líneas (L01, L02 y C997) y el BC2F1 de las líneas (L03, RP01 y XF) donde se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de embriones y las líneas comerciales. Finalmente, la siguiente generación se cruzó en el invierno 2019/20 para la obtención del BC4F1 de las líneas (L01, L02 y C997) y el BC3F1 de las líneas (L03, RP01 y XF) donde se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de embriones obtenidos y las líneas comerciales en estudio, (Figuras 40 y 41). Se realizó un test χ^2 para observar las diferencias significativas, sin embargo, en el primer cruce no se

observaron diferencias con un P valor = 0,721. Mientras que para las siguientes cuatro generaciones se observaron diferencias significativas con un P valor = 0,0001 (Tabla SM 10). Por otra parte, las seis líneas en estudio no presentaron diferencias significativas entre ellas (test ANOVA) con un P valor = 0,8429, pero durante la obtención de la F1 y el BC1F1 de la línea RP01 se observaron características de infertilidad en los embriones, ya que la donadora de polen (LIH) es subespecie *indica* tropical de grano largo y la receptora (RP01) es subespecie *japonica* pura presentando alelos de incompatibilidad mayor en el locus de esterilidad S5 del arroz.

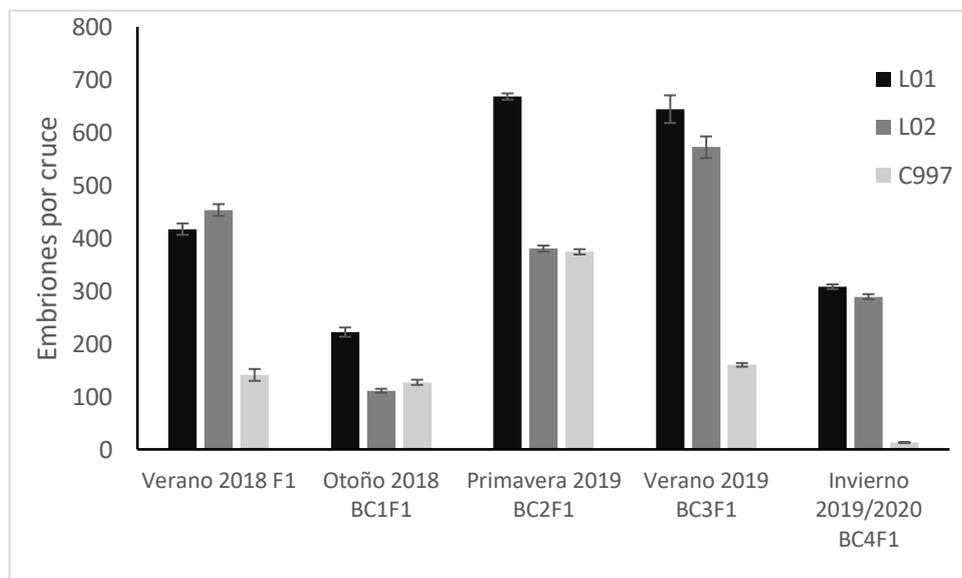


Figura 40. Ratio media de embriones por cruzamiento/generación obtenido por dos líneas de grano largo (L01, L02) y una línea de grano medio (C997) a lo largo de los cinco periodos. Las barras indican el error estándar.

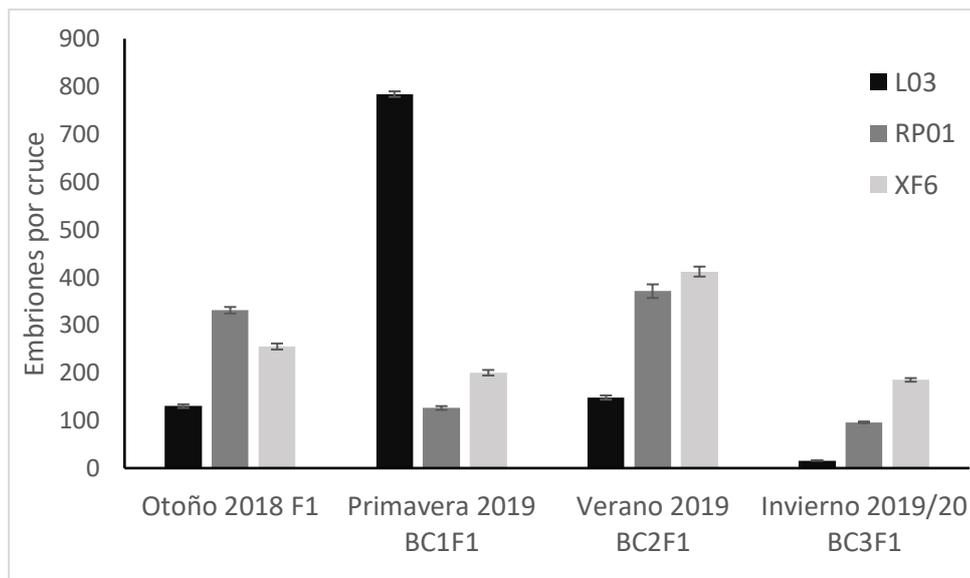


Figura 41. Ratio media de embriones por cruzamiento/generación obtenido por una línea de grano largo (L03), una línea de grano medio (XF) y una línea de grano redondo (RP01) a lo largo de los cuatro periodos. Las barras indican el error estándar.

4.3.2 Eficiencia del retrocruzamiento

Los embriones obtenidos de cada variedad se cultivaron en medios de cultivo *in vitro* para rescate de embriones (ER) con la concentración de 3,25 μM (263,25 μL de herbicida para 1000mL de medio ER, concentración puesta a punto en el experimento 2) para cada generación. Se valoraron los efectos del medio y al cabo de 10 días se observaron la regeneración de las plántulas para cada variedad (Tabla 14).

Tabla 14. Parámetros utilizados en este experimento. Número de panículas emasculadas y polinizadas, número de embriones obtenidos, plantas mutantes en cada generación y la eficiencia de los embriones según la época estacional.

Generación	Líneas	Panículas emasculadas /polinizadas	Embriones obtenidos	Embriones/ panículas polinizada	Mutante/ generación	Eficiencia Mutantes/ embriones	Estación
F1	L01	78	263	3,37	182	69,20	Verano
F1	L02	74	280	3,78	160	57,14	Verano
F1	CM7	17	71	4,18	48	67,61	Verano
F1	CM8	23	70	3,04	40	57,14	Verano
BC1F1	L01	38	228	6,00	53	23,25	Otoño
BC1F1	L02	59	113	1,92	19	16,81	Otoño
BC1F1	C997	24	134	5,58	31	23,13	Otoño
F1	L03	49	134	2,73	101	75,37	Otoño
F1	RP01	56	329	5,88	30	9,12	Otoño
F1	XF	20	151	7,55	39	25,83	Otoño

BC2F1	L01	135	683	5,06	49	7,17	Primavera
BC2F1	L02	123	345	2,80	59	17,10	Primavera
BC2F1	C997	98	370	3,78	35	9,46	Primavera
BC1F1	XF	118	522	4,42	69	13,22	Primavera
BC1F1	L03	218	788	3,61	222	28,17	Primavera
BC1F1	RP01	103	178	1,73	26	14,61	Primavera
BC3F1	L01	25	590	23,60	228	38,64	Verano
BC3F1	L02	33	543	16,45	204	37,57	Verano
BC3F1	C997	43	61	1,42	39	63,93	Verano
BC2F1	XF	29	378	13,03	168	44,44	Verano
BC2F1	L03	56	153	2,73	62	40,52	Verano
BC2F1	RP01	27	347	12,85	130	37,46	Verano
BC4F1	L01	41	132	3,22	44	33,33	Invierno
BC4F1	L02	51	142	2,78	39	27,46	Invierno
BC4F1	C997	31	9	0,29	3	33,33	Invierno
BC3F1	XF	48	123	2,56	55	44,72	Invierno
BC3F1	L03	23	7	0,30	1	14,29	Invierno
BC3F1	RP01	45	48	1,07	5	10,42	Invierno

El análisis estadístico demostró diferencias significativas ($P = 0,0001$) (Tabla SM8) en la regeneración de plántulas mediante el retrocruzamiento asistido llevado a cabo durante dos años de investigación. En general las seis líneas se comportaron de manera diferente y destacaremos las más estudiadas del experimento. Las líneas de grano largo L01 y L02 son las que mostraron mejor comportamiento en la obtención de los cruces teniendo en cuenta que tienen una espiga más grande, pero las glumas son más delgadas lo que dificulta la entrada del grano de polen en la polinización asistida. Por su parte la línea L03 también de grano largo y espiga más pequeña que las dos anteriores, su principal problema fue estar siempre descoordinada con su donadora de polen, es decir cuando había plantas donadoras de polen no había receptoras y viceversa. Las líneas de grano medio por un lado C997 presento muchas contaminaciones *in vitro* (medios con herbicida Cicloxidim) por lo que todas las plantas contaminadas se contaban como plantas muertas para evitar falsos positivos. Por otro lado, la planta XF sufrió una excesiva infección de pulgones (*Schizaphis graminum*) una de las principales plagas fitosanitarias del arroz, los cuales originaron problemas en la etapa de la polinización debido a la interferencia del pulgón dentro de las glumas, que las invadían completamente lo cual disminuía significativamente el número de embriones obtenidos. Finalmente, la línea de grano redondo RP01 subespecie *japonica* pura presentó esterilidad en la obtención de las híbridas F1 y su enraizado frágil que provocaba un efecto de acostado, el cual debía tener

un soporte rígido en paralelo a la espiga para evitar que se doblara y perdiesen los embriones fecundados. Estas observaciones realizadas *in vitro* e invernadero son las posibles causas para que existan diferencias estadísticamente significativas en la obtención de los nuevos cruces.

4.3.3 Confirmación molecular de las plántulas supervivientes

Se extrajo el ADN de todas las plantas supervivientes a la selección *in vitro* en medio con herbicida de todos los cruces/generaciones y para confirmar la heredabilidad del gen OsACC2 presente en cada plántula se realizaron un protocolo CAPs mediante PCR-Digestión enzimática. Los resultados de las amplificaciones por PCR y su posterior digestión identificaron con éxito la presencia de homocigosis/heterocigosis de las plántulas seleccionadas. La observación mostrada por los geles de electroforesis fueron plantas heterocigotas resistentes/sensibles (R/s) y homocigotas sensibles (s/s) tal y como se observa en la Figura 41. En cuanto al número de plantas mutantes conforme se va avanzando en el programa de retrocruces, la cantidad de mutantes es mayor, hemos superado la esterilidad que observamos en la línea RP01 en los primeros cruces (esterilidad mayor debida a incompatibilidad en el locus S5).

Por otro lado, realizamos el análisis estadístico χ^2 para cada generación, en la obtención de la F1 de las cuatro primeras líneas estudiadas no se observaron diferencias significativas (P valor = 0,2770), mientras que para las siguientes tres líneas del BC1F1 (L01, L02 y C997) y las líneas F1 (L03, RP01 y XF6) sí que se observaron diferencias (P valor = 0,0001), en relación al BC2F1 de las líneas (L01, L02 y C997) y las BC1F1 de las líneas (L03, RP01 y XF6) no se evidenciaron diferencias (P valor = 0,2501), siguiendo con la BC3F1 de las líneas (L01, L02 y C997) y la BC2F1 de las líneas (L03, RP01 y XF6) donde se volvieron a ver diferencias (P valor = 0,0001) y finalmente la generación BC4F1 para las líneas (L01, L02 y C997) y el BC3F1 de las líneas (L03, RP01 y XF6) no se volvieron a evidenciar diferencias (P valor = 0,2808 ver tabla anexo).

El alelo mutante OsACC2 genera en una diana de restricción *ApoI*, de modo que la banda amplificada de ACC2 de 444pb es digerida en dos fragmentos de 291 pb y 153 pb. De este modo, cuando la muestra analizada es homocigota mutante aparecerán sólo las bandas de digestión de 291 y 153 pb, cuando se trate de una muestra homocigota salvaje aparecerá una única banda no digerible de 444bp y cuando se trate de un heterocigoto aparecerán las tres bandas la primera de 444pb (heredado del parental recurrente), y dos bandas (heredadas del parental donador LIH) de 291 pb y 153 pb (Figura 42).

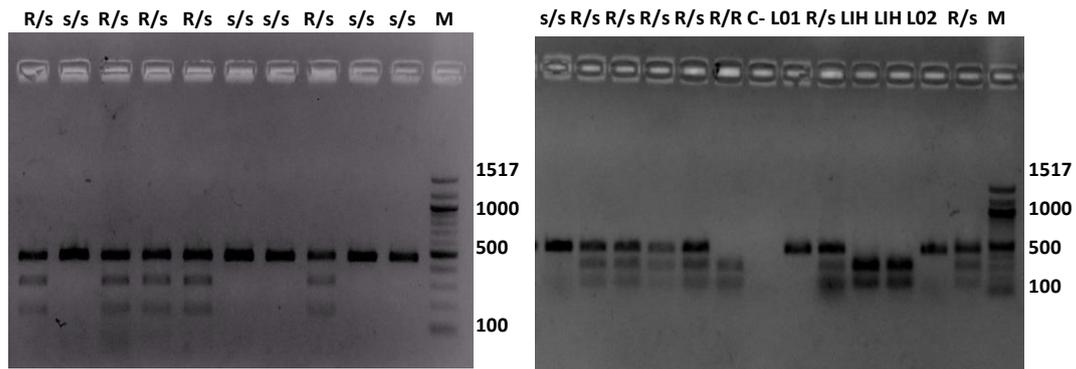


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa de las plántulas mutantes. El control positivo mutante homocigoto LIH muestra dos bandas de ADN (153 pares de bases y 291 pares de bases). Los controles positivos homocigotos de tipo salvaje L01 y L02 muestran una única banda de 444 pb no digerida. Las mutantes heterocigotas muestran tres bandas correspondientes a la banda de 444 pb no digerida y las bandas de 153 y 291 pb digeridas. El control negativo es la mix de PCR y mezcla de digestión con agua MilliQ como muestra (C-).

5. Discusión

5.1 Experimento 1: Validación de la región *Saltol*, retorno al parental recurrente y ensayos de campo de las nuevas líneas de arroz

El primer experimento permitió determinar la integridad de la región *Saltol* y el porcentaje de retorno al parental recurrente en todas las líneas seleccionadas.

La introgresión del QTL *Saltol* para variedades de alto rendimiento (PL12 y PM37) fue exitosa, obteniéndose un alto porcentaje de retorno al parental recurrente del 90-100% en tan sólo tres retrocruces. Las introgresiones accidentales de los parentales donantes representaron entre 0 a 9,84%, los cuales han sido similares a los obtenidos por Krishnamurthy y colaboradores al desarrollar tres retrocruces y seleccionar los individuos con mayor retorno al parental recurrente mediante chips de DNA de 50.000 SNPs (Krishnamurthy et al. 2020). De modo similar, a nuestros resultados, Ho et al. (2016) también recalca la importancia del uso de marcadores MABC para acelerar la obtención del BC3F2 con un 99,7% del genoma para el parental recurrente y homocigosis en la región del QTL *Saltol* (Ho et al. 2016). Por su parte, Huyen y colaboradores (2012) identificaron 63 marcadores polimórficos de entre 500 marcadores SSR flanqueados en los 12 cromosomas del arroz para el genotipado de sus nuevas líneas, obteniendo en el BC3F1 un individuo que tenía todos los alelos del parental recurrente y cuatro individuos que diferían por tener un rasgo heterocigoto (Huyen et al. 2012). De la misma forma, Vu y colaboradores seleccionaron 89 marcadores polimórficos de entre 368 marcadores SSR para el genotipado de las nuevas generaciones por retrocruzamiento y obtuvieron como resultado una generación BC3F1 de 96,8 a 100% del genoma al parental recurrente (Vu et al. 2012).

Cabe destacar que una vez alcanzado la homocigosis en la región *Saltol*, las plantas manifestaron diferentes comportamientos y tolerancia a la salinidad con respecto al parental tolerante FL478. No obstante, estas diferencias observadas en respuesta a la salinidad podrían atribuirse al entorno complejo del suelo y de los caracteres de tolerancia a la salinidad (Wu et al., 2020).

Las nuevas líneas de arroz LP-*Saltol* y MS-*Saltol* tolerantes a la salinidad fueron estudiadas, en primer lugar, en soluciones hidropónicas para garantizar concentraciones homogéneas en el tratamiento salino. Sin embargo, presentaron resultados contradictorios entre el comportamiento de las nuevas líneas y sus parentales (resultados no mostrados

en esta Tesis). Finalmente, las nuevas líneas *Saltol* y sus parentales fueron analizadas en condiciones reales de campo donde también observamos variabilidad entre las plantas, que explicamos por la elevada variabilidad espacio/temporal de la salinidad en los campos salinos.

Los ensayos de campo con las nuevas líneas introgresadas con la región *Saltol* suponen un gran avance para el sector arrocero europeo. Por un lado, se reducirá la pérdida de la cosecha por salinidad. Por otro, ayudará a combatir la invasión del caracol manzana en los campos de arroz, ya que se minimizarán las mermas de producción debido a la salinidad residual derivada de las distintas estrategias de erradicación basadas en el manejo del agua como son las siguientes: (a) la inundación de los campos con agua de mar, (b) el barbecho que también provoca salinización del campo, (c) el cultivo del arroz mediante riegos intermitentes, y (d) realizando rotación de cultivo con especies de cultivo aeróbico tolerantes a la salinidad como la quinoa.

Los resultados de biomasa (concretamente número de brotes, Figuras 26, 27 y 28) mostraron la alta tolerancia de las nuevas líneas *Saltol* a los efectos de la salinidad expresada en la reducción en la merma del número de brotes (ahijamiento) debido a la salinidad que si sufrían los parentales europeos. Cabe destacar que el número de brotes está correlacionado con el número de panículas y la tasa de supervivencia de la planta, en comparación con el tratamiento control, como describen Zeng & Shannon, (2000) y similares afirmaciones hace Zeng et al. (2001). Nuestros resultados también estuvieron en esta dirección.

Los resultados indicaron el efecto de la salinidad en la altura de las plantas de las nuevas líneas *Saltol* y sus parentales, y demostrando que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en las longitudes entre los tratamientos salino y control en ambos años (que podría deberse a la complejidad genética de las variedades). Aunque cabe destacar que las plantas afectadas por salinidad a bajas concentraciones pueden tolerar el estrés salino durante períodos más largos antes de que ocurra una reducción significativa del crecimiento de las plantas. Nuestros resultados han coincidido con Puvanitha y Mahendran (2017) que observaron los efectos del estrés salino en las alturas de las plantas de arroz causa una reducción significativa en las etapas vegetativa, reproductiva y de maduración en comparación con su tratamiento control. Además, Sajid y colaboradores observaron que las altas concentraciones de sal en el suelo afectaron la homeostasis de los caracteres bioquímicos y la fisiología del crecimiento en las plantas durante dos temporadas de cultivo (Sajid et al., 2019). Otros autores como Shankar (2016) estudiaron

tres variedades de arroz, tales como Pokkali, IR64*Saltol* y N22, bajo condiciones de salinidad y sequía, afirmando que la etapa de plántula es la más susceptible a la salinidad y que cada variedad tiene respuestas específicas al estrés por sequía y salinidad (Shankar et al. 2016).

Por su parte, Parihar y colaboradores mencionan que la reducción del crecimiento en las plantas se debe, en primer lugar, al efecto osmótico debido a la baja absorción de agua mediante las raíces y en segundo lugar por el efecto iónico producido por un desequilibrio en las rutas metabólicas de las plantas (Parihar et al. 2015). También, Linh y colaboradores realizaron ensayos de campos para analizar diferencias entre líneas introgresadas con el alelo *Saltol* y sus parentales, pero no encontraron diferencias entre los rasgos morfológicos y agronómicos de las nuevas líneas *Saltol* con respecto a su parental sensible, no obstante, la longitud de las nuevas líneas fue superior en 4 a 5 cm en comparación con el parental sensible (Linh et al. 2012).

De la misma manera, Takehisa y colaboradores (2004) estudiaron rasgos como la longitud de las plantas y el número de brotes en condiciones salinas (50-100 mM) y no salinas (>10 mM) durante cuatro temporadas de cultivo (1999-2002) y revelaron que las líneas en condiciones salinas eran más estables que sus homologas del tratamiento no salino. Además, indicaron que existen diferentes mecanismos genéticos que controlan la longitud y el número de brotes (Takehisa et al. 2004).

La reducción en el número y la longitud de panículas también fue significativa en condiciones salinas y por la disminución de brotes (ahijado). La etapa más sensible fue el inicio de la panícula y la floración, acarreado como consecuencia la esterilidad de algunas líneas *Saltol* y los parentales sensibles. En cambio, el parental tolerante FL478 no llegó a finalizar su ciclo de maduración debido a su deficiente adaptación a las condiciones climáticas del Delta del Ebro (sensibilidad al fotoperiodo; Jia, 2009). Las panículas fueron más cortas como resultado del estrés salino, con una gran variación entre las nuevas líneas *Saltol*, el parental tolerante FL478 y parental sensible PL12. Del mismo modo, se observaron un menor porcentaje de granos llenos o incluso esterilidad y no llegaron a finalizar la maduración, resultados que coinciden con Gerona et al. (2019), quienes observaron que el estrés salino afectó negativamente varios aspectos especialmente el porcentaje de granos llenos, la viabilidad del polen y bajo rendimiento de grano con un 45%, 37% y 52% y genotipos sensibles a la salinidad de un 68%.

Asimismo, Ali y colaboradores (2013) estudiaron la correlación de varios rasgos morfológicos entre los que podemos mencionar están la longitud de las plantas, el número

de brotes, la productividad de los brotes, la longitud de las panículas entre otros. Para medir estos rasgos morfológicos ellos utilizaron dos índices de estrés: el índice de susceptibilidad al estrés (ISS) y el índice de tolerancia al estrés (ITS), observando que para el ISS no hubo ninguna correlación en suelos sódicos normales y moderados, mientras que para suelos con alta salinidad mostró correlaciones negativas en la altura de la planta, la longitud de la panícula, la fertilidad de la espiguilla, el rendimiento del grano y el índice de la cosecha. En cambio, para el índice ITS se correlacionaron positivamente la altura de la planta, el número de brotes, la productividad de los brotes, el rendimiento del grano y el índice de la cosecha (Ali et al. 2013).

El control de las plagas y enfermedades de insectos se monitoreó a lo largo del experimento en todas las etapas del cultivo de arroz. El minador del arroz *Chilo suppressalis* es una plaga muy severa y, para contrarrestarla, se realizan estudios con diferentes pesticidas y así controlar daños en los cultivos como afirma He et al. (2008) que sucede en China. En el verano 2018, las líneas se trasplantaron dos semanas más tarde que el resto de los campos de arroz de la zona. Como consecuencia, la mayoría de las plantas tuvieron afectaciones severas causadas por diversas plagas del arroz, como comúnmente ocurre en los campos no sincronizados ya que, tras la cosecha de los campos, las plagas tardías como el minador se concentran en los últimos campos todavía no cosechados. Sin embargo en el verano del 2019, el experimento fue en paralelo al de los agricultores de la zona y las afectaciones se redujeron considerablemente en la mayoría de las líneas, como también afirma Zhu et al. (2007) que una siembra coordinada de los agricultores ha mitigado las afectaciones por *Chilo suppressalis*.

Por otro lado, la presencia de *P. oryzae* y *Fusarium* causaron enfermedades en las nuevas líneas *Saltol* LP y MS, ocasionando que algunas réplicas sean afectadas con pérdidas parciales o totales de la planta como por ejemplo la línea LP2 en el ensayo de campo del tratamiento salino. Al contrario, el tratamiento control no tuvo tantas infestaciones que ocasionaran pérdidas irreversibles. También, se pudo observar la presencia de *Lissorhoptus sp.* con infestaciones puntuales y sin ocasionar daños severos en ambos tratamientos. Al mismo tiempo, la *Gallinula chloropus* más conocida como Gallineta común también causo problemas porque anidaba en medio de las nuevas líneas *Saltol* LP y MS lo cual ocasionaba la pérdida de las réplicas, por lo tanto, se tuvo que construir un enmallado para detener la entrada de esta ave de agua al campo de ensayo del tratamiento salino.

El estudio de las nuevas líneas *Saltol* LP y MS mostro resultados significativos, donde un grupo determinado de plantas de las nuevas líneas *Saltol* LP y MS toleran la resistencia a la salinidad de los campos de cultivos salinos. Sin embargo, también hemos podido observar la sensibilidad a la salinidad de otras líneas *Saltol* LP y MS debido a la heterogeneidad genética que presenta cada una de las plantas. Finalmente, las mejores líneas *Saltol* fueron la LP24 y LP28 elegidas para el proceso de registro en el catálogo oficial del Ministerio sobre nuevas variedades 2020.

5.2 Experimento 2: Optimización *in vitro* de la resistencia al herbicida

En el presente experimento, las condiciones meteorológicas fueron un factor importante durante la antesis, proceso que se ve estimulado por la alta irradiación solar, la alta temperatura y la baja humedad relativa del aire que suele ocurrir al mediodía. Nuestras observaciones están en línea con las de Islam y Morison (1992), porque afirman que hay una relación lineal entre el rendimiento de grano y la irradiación solar (mayor producción de polen). Contrariamente, las altas temperatura ($> 35\text{ C}$) produce estrés y reduce el porcentaje de dehiscencia de las anteras en el momento de la floración. La polinización es sensible a las altas temperaturas en el momento de la floración ya que inhibe el llenado de los granos de polen, resultando una polinización deficiente y pérdida de rendimiento Krishnan et al. (2011), pudiéndose llegar a la degeneración de las espigas (panículas), más aún si se cruza una variedad *japonica* con una *indica* según advierte Wang et al. (2019).

En cuanto a la tasa de fecundación forzada, los embriones obtenidos, se encuentran muy por debajo de las flores totales que suelen contener las espigas, que son 80-90 para L01 y L02 (21-26 embriones aproximadamente por espiga), 50-70 para L03 (15-19 embriones aproximadamente por espiga) y 30-50 para C997, XF6 y RP01 (9-11 embriones aproximadamente por espiga). Aun así, nuestra tasa de hibridación forzada es similar a García et al. (2008) con un porcentaje de plantas híbridas F1 del 8,4% y autores como Rather et al. (2017) afirman que el mejor método para obtener híbridas F1 es la emasculación por succión. Una forma en la que podrían incluso aumentar estos valores sería utilizar más espigas donadoras para cada receptora, maximizando así la cantidad de polen que ésta recibe.

La baja productividad de C997, XF6 y RP01 ha sido identificada desde el inicio del programa de retrocruces. Ante esta perspectiva, se optó por reajustar el programa de cruzamientos centrando los esfuerzos en estas tres líneas, polinizando mayoritariamente plantas de C997, XF6 y RP01 y, de esta manera, obtener la misma cantidad de embriones que se planteó para el experimento (aproximadamente 50 embriones para cada concentración de herbicida más el control).

El estudio de la supervivencia en la selección *in vitro* de resistencia a los herbicidas hace años que se practica. Así se conocen, diferentes líneas de arroz resistente a numerosos herbicidas, que son utilizados a concentraciones muy variadas según la naturaleza química de estos. Se puede señalar ejemplos como el arroz resistente al bensulfurón metilo (BSM), para el que se trabajaba con concentraciones de hasta $30\ \mu\text{M}$ Terakawa &

Wakasa, (1992) o el arroz resistente al quizalofop-p-etilo (QPE), donde se utilizaron valores tan bajos como 0,007 μM (Camacho et al., 2019). Así como, Ye y colaboradores ensayaron las actividades de la ACCasa *in vitro* para comprobar la acción de seis compuestos sintetizados de herbicida y observaron que existen diferentes grados de inhibición de la actividad ACCasa según el sitio objetivo, la concentración puede variar de 0,061 a 0,385 $\text{nmolh}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Ye et al., 2018). El Cicloxidim, por su parte, ha demostrado ser menos efectivo que este último, y por lo tanto se necesitan concentraciones más elevadas, de alrededor de 3 μM (BASF Corp. 2017a).

En este experimento, las diferencias significativas en la supervivencia de las plantas entre el tratamiento control y los tratamientos con herbicida eran evidentes. Sin embargo, la significancia entre 3,00 μM y 3,25 μM fue casi nula, seguramente debido a que las concentraciones son demasiado próximas. Por el contrario, en las concentraciones más distantes tales como 2,50 μM , 3,00 μM y 3,50 μM se encontraron diferencias significativas en el número de plantas supervivientes. Pese a que en un principio teníamos la hipótesis que la concentración 3,50 μM de herbicida sería la ideal para seleccionar todas las plantas que hubieran heredado la mutación en heterocigosis, lo cierto es que hubo una tasa de supervivencia muy baja (20,95%), significativamente menor que en el resto de medios, por lo que podemos considerar que es una concentración demasiado alta (cribado muy severo), y empezaría a ser una concentración letal para la selección, coinciden con Toldi et al. (2000). Además, con la concentración 3,25 μM ya se seleccionan bien las plantas resistentes sin que sobrevivan plantas no heterocigotas (escapes). Este hecho probablemente se deba a que las concentraciones subletales para el Cicloxidim sean hasta 3,25 μM superior a esta concentración como lo es 3,50 μM , que es letal para las plantas homocigotas y heterocigotas. Para conseguirlo, se hubieran tenido que analizar el genotipo de las plantas control para establecer una ratio de heterocigotos R/s en la F1, y si la proporción de supervivientes en herbicida hubiera sido similar a esta ratio, hubiéramos podido considerar que las que no sobrevivieron eran homocigotas s/s. Las líneas estudiadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la supervivencia al herbicida de sus híbridos, de tal manera que el alelo resistente (R) ha tenido un efecto muy similar en todas las líneas independientemente de cuál fuera su progenitor femenino (comercial). El cálculo de los porcentajes totales de supervivencia para cada línea se realizó con las cuatro concentraciones 2,50, 3,00, 3,25 y 3,50 μM de herbicida y el control 0 μM , aunque la supervivencia en este grupo no fue sometido al impacto del herbicida, trabajamos de igual manera que con las demás concentraciones.

La cantidad de plantas homocigotas sensibles supervivientes fue variando dependiendo de la concentración de Cicloxidim en el medio de cultivo, el control presentó un 34%, de escapes, 2,50 μM presentó un 24%, 3,00 μM un 2%, 3,25 μM un 0% y 3,50 μM un 1%. Cabe destacar que entre la concentración 0 μM y 2,50 μM suman un 58% del 61% de escapes totales detectados, y que las concentraciones 3,00 μM , 3,25 μM y 3,50 μM (concentración con un retardo en el crecimiento de las plantas *in vitro*) suman el 3% restante de escapes. Es decir, la concentración 2,50 μM no es una concentración que permita seleccionar eficientemente los individuos R/s heterocigotos, tendríamos que elegir una concentración más elevada, pero sin comprometer la supervivencia de las plantas. En la concentración 3,00 μM la supervivencia del 2% de plantas homocigotas sensibles implica una selección más segura. Sin embargo, la concentración 3,25 μM el valor 0% implica que no ha sobrevivido ninguna planta sensible y que, por lo tanto, todos los individuos supervivientes a esta concentración serían seleccionados para seguir con los retro-cruces. Es interesante destacar el tercer valor, ya que tratándose de la mayor concentración de herbicida (3,50 μM), en la que se supone debería haber una menor probabilidad de que los homocigotos sobrevivan, un 1% de las plantas supervivientes resultaron ser sensibles. No obstante, si tuviéramos que elegir entre las concentraciones más adecuada para trabajar sería 3,25 μM , aunque sigue siendo necesaria una segunda confirmación vía PCR para seleccionar las plantas heterocigotas para continuar con los cruces de la siguiente generación.

La optimización del método de selección fenotípica *in vitro* permite analizar un gran número de individuos en un espacio reducido, por lo que representa una alternativa mucho más rápida que la selección en condiciones de campo, y a la vez se ahorra en espacio e inversión en infraestructura Bright & Jones (1985). Es por ello que este método resulta muy económico y efectivo, por lo que ha sido ampliamente utilizado para seleccionar plantas tolerantes a los herbicidas (Rai et al. 2011). Sin embargo, el hecho de que homocigotas sensibles superen un cultivo *in vitro* con herbicida indica que no se están seleccionando correctamente los genotipos, y supone un retraso en el proceso de obtención de líneas resistentes. Si encontramos un alto porcentaje de homocigotas entre los supervivientes, hay que aumentar la concentración de Cicloxidim empleada, pero también se debe considerar cual es la dosis letal para la selección aumentando la probabilidad de perder plántulas heterocigotas (falsos negativos) y por tanto obtenemos menos individuos aptos. Es por lo que resulta imprescindible un reajuste constante de la

concentración utilizada, procurando obtener siempre el máximo número de supervivientes y el mínimo número de homocigotos entre estos.

Actualmente, estamos empleando una concentración de 3,00 μM para este proceso, que da aproximadamente un 30% de supervivencia y cerca del 2% de homocigosis de los supervivientes. El objetivo de este trabajo ha sido valorar un incremento de la concentración a 3,25 μM o 3,50 μM y, por ello, se han comparado los resultados de utilizar estas concentraciones con los 2,50 μM , 3,00 μM y un control 0 μM . Aquí, la concentración de 3,25 μM de Cicloxidim no ha presentado diferencias significativas con la concentración 3,00 μM , sin embargo, ha presentado valores muy buenos en la supervivencia de las plantas y ninguna homocigosis. En cuanto a 3,50 μM , tampoco ha presentado diferencias significativas en cuanto al porcentaje de homocigotos que sobreviven, pero si ha presentado una supervivencia significativamente menor a las demás concentraciones. Es por ello una concentración de 3,25 μM de Cicloxidim daría mejor resultados en el proceso de selección, con la posterior confirmación PCR-Digestión.

5.3 Experimento 3: Estudio de la resistencia al herbicida en líneas europeas de arroz

Este experimento muestra, por primera vez, como la programación de retrocruces se puede extender a las cuatro estaciones del año debido a condiciones controladas en los invernaderos de la UB. Por esta razón, es importante destacar el periodo de crecimiento del arroz para el rendimiento de las espigas (polen) en el caso de los parentales donadores, y las espiguillas (panículas) en los parentales receptores. Esta duración, así como la cantidad de brotes (ahijamiento), se redujo significativamente en los cruces con un fotoperiodo corto y la cantidad/calidad del polen, como también sostienen Wang et al. (2019) donde observaron la sensibilidad del fotoperiodo en la duración del crecimiento de la planta de arroz, sembrado en distintas fechas, y Zhou et al. (2011) analizaron el crecimiento vegetativo básico, la sensibilidad al fotoperiodo y la temperatura óptima para la productividad de las plantas. Este componente estacional resultó muy evidente en la polinización, y fácilmente se podía observar cómo durante las estaciones de otoño, invierno y primavera las espigas producían menos cantidad de polen que en el verano (época idónea para el cultivo de arroz mediterráneo). Al mismo tiempo, el desarrollo floral es muy sensible a las altas temperaturas (Jagadish et al. 2007), en consecuencia, el sistema de abertura de las anteras será deficiente, habrá una disminución en el número de granos de polen y la germinación del polen sería incompleta, provocando la esterilidad, aunque las temperaturas a las que se produce la esterilidad varían en las líneas. Por otro lado, las bajas temperaturas también producen esterilidad en la etapa de inicio del espigado impiden la salida del polen. Las temperaturas altas ($> 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) y bajas ($<20\text{ }^{\circ}\text{C}$) pueden ser perjudiciales para el desarrollo floral del arroz produciendo esterilidad en ambos casos Krishnan et al. (2011).

La segunda característica importante a destacar fueron los cruces, que se realizaron con la variedad donadora *indica* tropical pura y las variedades receptoras *japonica* de clima templado con tres diferentes granos (largo, medio y redondo) para desarrollar variedades de arroz con tolerancia a los herbicidas. La tercera característica importante fue el uso de medios de selección adecuados para la obtención de líneas resistentes que habían heredado el gen OsACC2. Los medios elegidos fueron los de concentraciones de 3,00 μM y 3,25 μM de Cicloxidim, seleccionados gracias a los resultados obtenidos en el capítulo anterior (Experimento 2), reduciendo a más de la mitad el número de individuos a confirmar molecularmente mediante el protocolo CAPs.

Como ya mencionamos a lo largo del experimento, el número de embriones fue variando según la época del año, así como, la calidad/cantidad del polen y las líneas estudiadas. Sin embargo, el número de embriones obtenidos se encuentra por debajo de las flores totales que suelen contener las espigas, que son 80-90 para L01 y L02, 50-70 para L03 y 30-50 para C997, XF y RP01 excepto en el verano 2019 que obtuvimos un récord de embriones (65-86 embriones en espigas) en las líneas de grano largo L01 y L02. Debe señalarse que el método de emasculación elegido para realizar el retrocruzamiento asistido fue por aspiración (succión) de anteras debido a que es un proceso eficaz, aunque dependía de la variedad del grano (largo, medio o redondo) para conseguir un mayor número de embriones, eficiencia que también observaron García-Yzaguirre & Carreres (2008).

No obstante, observamos esterilidad híbrida interespecífica en el cruce RP01 x LIH cuando los embriones rescatados mostraron una alta mortalidad en los medios de cultivos estándar (ER). Algunos autores describen un desarrollo embrionario anormal en híbridos interespecíficos que causan la incapacidad de germinar en condiciones normales debido a la degeneración o retraso en el proceso de formación del saco embrionario (Rodrangboon et al. 2002). Se han descubierto varios genes de esterilidad en híbridos F1 en el arroz, especialmente tres genes S5 (S-a, S-b y S-c) que están relacionados con la esterilidad femenina en los híbridos interespecíficos F1, causando el aborto en el embrión (Zhang & Lu 2008). Otros autores como Yang et al. (2012), en un trabajo de investigación utilizaron la misma variedad RP01, revelan el papel del locus S5 en la esterilidad entre los híbridos *indica-japonica*, mostraron que el locus S5 consiste en 3 genes ORF que regulan la formación del saco embrionario. Una incompatibilidad alélica en uno de estos genes, específicamente en el gen ORF3, durante la esporogénesis femenina, conduce a un aumento en los niveles de estrés celular que resulta en un desarrollo anormal del saco embrionario que puede causar el aborto del embrión (Yang et al., 2012). Un problema en el proceso de embriogénesis causado por la interacción alélica entre las dos variedades de subespecies diferentes podría explicar la baja tasa de germinación embrionaria que se muestra en los resultados RP01 x LIH. Sin embargo, otros autores defienden la incompatibilidad del alelo S5 en los cruces *indica x japonica*. Según este modelo, hay tres alelos en el locus S5; a) un alelo neutro (alelo de compatibilidad amplia), S5n; b) un alelo *indica*, S5i; y c) un alelo *japonica*, S5j. Los genotipos de S5n/S5i y S5n/S5j serán fértiles, mientras que S5i/S5j serán semi-estériles debido a un aborto parcial del gameto que lleva el alelo S5j, (Sundaram et al., 2010). A pesar de todas estas dificultades, hemos

podido avanzar con los cruces donde observamos una mejora de las líneas receptoras en cuanto al número de brotes, el tamaño de la planta y la esterilidad en la obtención de la F1 y el BC1F1 de la línea RP01 (datos no presentados en esta tesis), conforme se va avanzando en los cruces el número de mutantes es mayor, se superó la esterilidad y se mejoró las líneas. Además, nuestros resultados indican que una vez superado la esterilidad que presentaron las subespecies *O. sativa ssp indica* y *O. sativa ssp japonica* no parece tener implicaciones con respecto a la heredabilidad del gen OsACC2, gen de interés en este experimento, tal y como describen Ali et al. (2006).

Por otro lado, la técnica de rescate de embriones nos permitió reducir el tiempo normal de 30 días (maduración de las semillas en su ciclo natural) a solo 10 días, el cual posibilitó cultivar embriones inmaduros en condiciones controladas ayudando a reducir el ciclo para la obtención del nuevo cruce. Sin duda esta técnica fue muy útil porque durante los dos periodos de cultivos (2018-2019) obtuvimos hasta la generación BC4F1, como también planteó (Ohnishi et al. 2011).

En lo que respecta a la resistencia de los herbicidas, la obtención de nuevas líneas resistentes al Cicloxidim, fue realizado siguiendo mutaciones en el dominio carboxil transferasas de las ACCasa mediante el conocimiento de los sitios objetivos, a través del procedimiento de retrocruzamiento asistido para la obtención del BC4F3. En cambio, autores como Rangel y colaboradores desarrollaron nuevas líneas de arroz tolerantes de Imidazolina (IMI) siguiendo el programa de retrocruzamiento asistido, con la diferencia que la introgresión de Imidazolina fue mediante el uso de marcadores moleculares para acelerar la obtención del BC3F3 (Rangel et al. 2010). Asimismo, Grover y colaboradores han utilizado el retrocruzamiento asistido con marcadores (MABB) para la introducción de un alelo mutante del gen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), el cual confiere tolerancia al grupo de herbicidas imidazolinona, desarrollando exitosamente sus cruces hasta la obtención de las plantas BC4F4 homocigotas para el alelo mutante AHAS, las cuales poseen características agronómicas superiores y una resistencia a los herbicidas inhibidores de AHAS (Grover et al., 2020).

Nuestros resultados del protocolo CAPs (PCR ACC2-Digestión *ApoI*) demostraron ser efectivos para confirmar la presencia de la mutación ACCasa en plantas de arroz y además permitieron la verificación de las plantas homocigotas y heterocigotas. Mientras que Pereira demostró de manera similar la presencia de la mutación ACCasa, pero mediante el uso de cuatro cebadores (tetraprimer) ARMS-PCR y asimismo comprobó la verificación de sus líneas homocigotas y heterocigotas (Pereira et al. 2019). Por tanto, es

necesario el desarrollo de una planta de arroz resistente a los herbicidas para mitigar las afectaciones producidas por las malas hierbas, las cuales han adquirido resistencia a los herbicidas actuales. Finalmente, resaltar que el experimento de resistencia a los herbicidas sigue actualmente en desarrollo hasta obtener el BC6F3, un arroz de calidad, de alto rendimiento y así poder proteger la producción arroceras de las malas hierbas mediante la incorporación de la mutación para la resistencia a los herbicidas y subsanar la dificultad ocasionada por las malas hierbas que anualmente tienen los productores/agricultores y tener calidad como productividad de las nuevas variedades de arroz.

6. Conclusiones

- La introgresión del QTL *Saltol* para variedades de alto rendimiento (PL12 y PM37) *japonica* mediterráneas con líneas de arroz *indica* asiáticas fue exitosa. El uso de marcadores SSR, junto al método del rescate de embriones nos ha permitido realizar la transferencia del genotipo en 3 años y alcanzar un BC3F4 con un 90-100% de retorno al parental recurrente.
- El protocolo de rescate de embriones optimizado permitió obtener embriones inmaduros a los 10 días después de la polinización, acelerando el proceso entre las generaciones siguientes, actuando como una herramienta eficiente y rápida.
- La tolerancia a la salinidad de las nuevas líneas *Saltol* BC3F5 del cruce (PL12 x FL478) y, las MS BC3F4 (PM37 x IR64*Saltol*) ensayadas en campo fue elevada. Dos líneas fueron seleccionadas (LP24 y LP28) para su registro y posterior comercialización por presentar una tolerancia a la salinidad semejante a FL478.
- Sin embargo, debido a la heterogeneidad genética que presenta cada una de las nuevas líneas se observó diferencias en la selectividad iónica y la tolerancia tisular, una gran variabilidad entre las nuevas líneas *Saltol* en el tratamiento salino e incluso diferencias en el tratamiento control y dentro de los tratamientos.
- También, en los ensayos de campo de 2018 se pudo observar las afectaciones en el cultivo de arroz por *Pyricularia oryzae* y el minador del arroz (*Chilo suppressalis*) si el cultivo no se siembra en paralelo con el resto de las líneas.
- La época del año tiene una fuerte influencia en la cantidad/calidad del polen y como consecuencia el número de embriones en cada generación, viéndose más favorecidos en la época de verano.
- La línea RP01 *japonica* pura, presentó alelos de incompatibilidad con la donadora LIH *indica tropical*, en el locus de esterilidad S5 del arroz, en la obtención de híbrido F1 y el BC1F1 superando la esterilidad mediante la aplicación de un mayor esfuerzo de reproducción para continuar con los cruces siguientes.
- La selección *in vitro* en medios con herbicida Cicloxidim resultó ser un buen método de selección de plantas heterocigotas y reducir el número total de plantas para ser analizadas molecularmente PCR-Digestión.
- La introgresión del alelo resistente R tiene un efecto similar en todos los híbridos, independientemente de cuál sea su progenitor comercial.

- El número de plantas heterocigotas en las concentraciones 3,00 μM y 3,25 μM de Cicloxidim tienen efectos similares y la concentración 3,50 μM está al límite de la letalidad. Por otro lado, hubo escape de plantas homocigotas en todas las concentraciones de herbicidas excepto en la concentración 3,25 μM .
- La concentración de 3,25 μM de Cicloxidim fue la usada para seleccionar heterocigotos resistentes a este herbicida.
- El protocolo CAPs (la PCR ACC2-Digestión ApoI) demostró ser efectiva para confirmar la presencia de la mutación OsACCasa en plantas de arroz y además permitieron la verificación de los homocigotos y heterocigotos eficientemente.

7. Bibliografía

- Agriculture, C. O. G. R. F. F. A., & Nations, F. A. A. O. O. T. U. (2007). Molecular markers – a tool for exploring genetic diversity. *The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture* (p. section C; ISBN 978-92-5-105762-9).
- Ali, A. J., Xu, J. L., Ismail, A. M., Fu, B. Y., Vijaykumar, C. H. M., Gao, Y. M., Domingo, J., Maghirang, R., Yu, S. B., Gregorio, G., Yanagihara, S., Cohen, M., Carmen, B., Mackill, D., & Li, Z. K. (2006). Hidden diversity for abiotic and biotic stress tolerances in the primary gene pool of rice revealed by a large backcross breeding program. *Field Crops Research*, 97(1 SPEC. ISS.), 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.08.016>
- Bae, M.-J., Kwon, Y.-S., & 박용석. (2012). Effects of Global Warming on the Distribution of Overwintering *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in Korea. *Korean Journal of Ecology and Environment*, 45(4), 453-458.
- BASF., C. (2020). The Provisia® Rice System. In Retrieved on February 19, 2020.
- BASF. (s. f.). *Provisia® herbicide label*. BASF we create Chimestry. <https://agriculture.basf.us/crop-protection/products/provisia-herbicide.html>
- Bedford, D., Claro, J., Giusti, A. M., Karumathy, G., Lucarelli, L., Mancini, D., Marocco, E., Milo, M., & Yang, D. (2020). *Food Outlook* (Número June).
- Bedford, D., Collier, E., Claro, J., Dekermendjian, H., Fortuna, A., Lucarelli, L., Marocco, E., Milo, M., & Yang, D. (2019). *Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets* (Número May).
- Bernis, J. M. F., & Pàmies, C. B. (2008). Variedades y mejoras del arroz (*Oryza sativa* L.). 2008. <http://www.eumed.net/libros-gratis/2006a/fbbp/index.htm>
- Blatey, J. (2015). Molecular Marker Applications in Plants. In *Plant Genotyping* (pp. 13-28; 313).
- Bonilla, P., Dvorak, J., Mackill, D., Deal, K., & Gregorio, G. (2002). RFLP and SSLP mapping of salinity tolerance genes in chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) using recombinant inbred lines. *The Philippine Agricultural Scientist*, 85(1), 68-76.
- Borghini, M., Bryden, H., Schroeder, K., Sparnocchia, S., & A. Vetrano. (2014). The Mediterranean is becoming saltier. *Ocean Science*, 10(4), 693-700. <https://doi.org/10.5194/os-10-693-2014>
- Bright S. W. J. & Jones M. G. K. (1985). Selection *In Vitro*. Cereal Tissue and Cell Culture. *Springer* (pp. 231-260) https://doi.org/10.1007/978-94-009-5133-4_8.
- Brito, F., & Joshi, R. C. (2016). The golden apple snail. The golden apple snail *Pomacea canaliculata* : *Outlooks on Pest Management*. 157-163. <https://doi.org/10.1564/v27>
- Buchanan, B. B., Grisse, W., & Jones, R. L. (2015). Lipids; Fatty acid biosynthesis. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd Edition (pp. 337-373, 1280).
- Camacho, J. R., Linscombe, S. D., Sanabria, Y., Mosquera, P. A., & Oard, J. H. (2019). Inheritance of Provisia® rice resistance to quizalofop-p-ethyl under laboratory and greenhouse environments. *Springer Nature*, 215(4), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2407-4>
- Campbell, M. T., Bandillo, N., Al Shiblawi, F. R. A., Sharma, S., Liu, K., Du, Q., Schmitz, A. J., Zhang, C., Véry, A. A., Lorenz, A. J., & Walia, H. (2017). Allelic variants of OsHKT1;1 underlie the divergence between *indica* and *japonica* subspecies of rice (*Oryza sativa*) for root sodium content. In *PLOS Genetics* (Vol. 13, Número 6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006823>
- Carr, J. E., Davies, L. G., Cobb, A. H., & Pallet, K. E. (1986). Uptake, translocation and

- metabolism of fluazifop-butyl in *Setaria viridis*. *Annals of Applied Biology*, 108(1), 115-123. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1986.tb01972.x>
- Castillo, E. G., Tuong, T. P., Ismail, A. M., & Inubushi, K. (2007). Response to Salinity in Rice: Comparative Effects of Osmotic and Ionic Stresses. *Plant Production Science*, 10(2), 159-170. <https://doi.org/10.1626/pps.10.159>
- Català, M. M. (1995). Chemical and cultural practices for red rice control in rice fields in Ebro Delta (Spain). *Crop Protection*, 14(5), 405-408. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(94\)00001-o](https://doi.org/10.1016/0261-2194(94)00001-o)
- Chang, T.-T., Bardenas, E. A., & del Rosario, A. C. (1965). The morphology and varietal characteristics of the rice plant. In *IRRI Technical Bulletin*. <https://doi.org/10.1364/BOE.6.001828>
- Chattopadhyay, K., Nath, D., Mohanta, R. L., Bhattacharyya, S., Marndi, B. C., Nayak, A. K., Singh, D. P., Sarkar, R. K., & Singh, O. N. (2014). Diversity and validation of microsatellite markers in Saltol QTL region in contrasting rice genotypes for salt tolerance at the early vegetative stage. *Australian Journal of Crop Science*, 8(3), 356-362.
- Chauhan, B. S., Jabran, K., & Mahajan, G. (2017). Rice Production Worldwide. *Springer*, 1-549. <https://doi.org/10.1007/97-3-319-47516-5>
- Cheeseman, J. (2016). Food Security in the Face of Salinity, Drought, Climate Change, and Population Growth. *Halophytes for Food Security in Dry Lands*, 111-123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801854-5.00007-8>
- Chen, X., Wang, L., Niu, Z., Zhang, M., Li, C., & Li, J. (2020). The effects of projected climate change and extreme climate on maize and rice in the Yangtze River Basin, China. *Agricultural and Forest Meteorology*, 282-283(July 2019), 107867. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2019.107867>
- Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., Van Den Bulcke, M., Bauw, G., Van Montagu, M., & Caplan, A. (1990). Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. *Plant Cell*, 2(1), 19-27. <https://doi.org/10.2307/3869047>
- Cobb, A. H., Reade, J. P. H. (2010). *Herbicides and Plant Physiology*, 2^{ed} (Wiley-Blackwell, Ed.). pgs. 574-585, DOI: 10.1017/S0014479711000287.
- Croughan, T. P. (2003). Clearfield rice: it's not a GMO. *Louisiana Agriculture Magazine*, 46, 24e26.
- Daliakopoulos, N. I., Tsanis, K. I., Koutroulis, A., Kourgialas, N. N., Varouchakis, A. E., Karatzas, G. P., & C. J. Ritsema. (2016). The threat of soil salinity: A European scale review. *Science of the Total Environment*, 573, pgs. 727-739. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.177>
- Dawe, D., Pandey, S., & Nelson, A. (2010). Emerging trends and spatial patterns of rice production. *ResearchGate*, Chapter, 1(1), 1-22.
- Délye, C. (2005). Weed Resistance to Acetyl Coenzyme A Carboxylase Inhibitors: An Update Author(s): Christophe Délye Source: Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Science Weed Science*, 53(53), pgs. 728-746.
- Délye, C., Zhang, X.-Q., Michel, S., Matejicek, A., & Powles, S. B. (2005). Molecular Bases for Sensitivity to Acetyl-Coenzyme. *Plant Physiology*, 137 (March), 794-806. <https://doi.org/10.1104/pp.104.046144.as>
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. *Molecular Techniques in Taxonomy*. pgs. 283-293. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Duke, S. O. (1990). Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives*, v. 87, pgs. 263-271. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087263>

- EFSA. (2012). Scientific Opinion on the evaluation of the pest risk analysis on Pomacea insularum, the island apple snail, prepared by the Spanish Ministry of Environment and Rural and Marine Affairs.
- EFSA. (2016). Scientific Opinion on the environmental risk assessment of the apple snail for the EU. *EFSA Journal*, 12(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3641>
- EPPO Reporting Service, E. (2018). *Europa and Mediterranean Plant Protection Organization*, 8, 1-20.
- Fageria, N., Baligar, V., & RB, C. (2006). Physiology of crop production. *The Haworth Press, New York*, 25, 345. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.09.001>
- FAO. (2001). Developing farming systems and best practices for drought-prone areas. Annex XIV, APDC/01/10. <http://www.fao.org/3/ac120e/AC120e15.htm>
- FAO. (2018). *Food Outlook-Biannual report on global food markets/July 2018* (Número July). <https://doi.org/ISSN 1560-8182>
- FAOSTAT. (2019). *Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. FAOSTAT*. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>
- Ferrero, A. (2007). Rice scenario in the European Union. *Cahiers Agricultures*, 16(4), 272-277. <https://doi.org/10.1684/agr.2007.0108>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2018). *FAOSTAT*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Frouin, J., Languillaume, A., Mas, J., Mieulet, D., Boissard, A., Labeyrie, A., Bettembourg, M., Bureau, C., Lorenzini, E., Portefaix, M., Turquay, P., Vernet, A., Périn, C., Ahmadi, N., & Courtois, B. (2018). Tolerance to mild salinity stress in japonica rice: A genome-wide association mapping study highlights calcium signaling and metabolism genes. *PLoS ONE*, 13(1), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190964>
- Futhazar G, A., L., & D, S. (2018). Risks associated to climate and environmental changes in the Mediterranean region. *MedECC*.
- Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A. G., Tranel, P. J., Küpper, A., & Dayan, F. E. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 1, jbc.REV120.013572. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev120.013572>
- García-Yzaguirre, A., & Carreres, R. (2008). Efficiency of different hybridization methods in single crosses of rice for pure line breeding. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(3), 395-400. <https://doi.org/10.5424/sjar/2008063-332>
- Garris, A. J., Tai, T. H., Coburn, J., Kresovich, S., & McCouch, S. (2005). Genetic structure and diversity in (*Oryza sativa* L.). *Genetics*, 169, 1631-1638. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035642>
- 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>
- Grongrald, J. W., W.H. Freeman, S. (1995). Inhibition of Lipid Synthesis. En *Biochemistry* 4^{ed} edition (pp. 1-7).
- Grover, N., Kumar, A., Yadav, A. K., Krishnan, S. G., Ellur, R. K., Bhowmick, P. K., Vinod, K. K., Bollinedi, H., Nagarajan, M., Viswanathan, C., Sevanthi, A.M.V., Sing, N. K., Mohapatra, T., Singh A. K. (2020) Marker Assisted Development and Characterization of Herbicide Tolerant Near Isogenic Lines of a Mega Basmati Rice Variety, “Pusa Basmati 1121”. *Rice*, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12284-020-00423-2>
- Guerrero, M. (2017). Declining Rice Area and New Eating Habits Create Opportunities

- in Spain's Rice Market. *Global Agricultural Information Network*. (1-14), SP1702.
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado*, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science* 368 (April), 266-269.
- Haque, S. A. (2006). Salinity problems and crop production in coastal regions of bangladesh. *Pakistan Journal of Botany* 38(5), 1359-1365.
- Hartke, J., Goforth, L., & Barber, T. (2018). Rice Production (Vol. 192).
- Harry, H., & Poppe, M. (1922). The use and value of back-crosses in small-grain breeding *The Journal of Heredity*, 319-322.
- Harwood, J. L. (1988). Fatty Acid Metabolism. *In Plant Physiology, molecular and Biochemistry* (39: pgs.101-38).
- Hauser, F., & Horie, T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: A mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K^+/Na^+ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 552-565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02056.x>
- He, C., Holme, J., & Anthony, J. (2014). SNP genotyping: the KASP assay. *Methods Mol Biol*, 1145, 75-86. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0446-4_7
- He, Y. P., Gao, C. F., Chen, W. M., Huang, L. Q., Zhou, W. J., Liu, X. G., Shen, J. L., & Zhu, Y. C. (2008). Comparison of dose responses and resistance ratios in four populations of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae), to 20 insecticides. *Pest management science*, 64(11), 308-315. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Henry N, & Hou´erou, L. (1996). Climate change, drought and desertification. *In Journal of Arid Environments* (34; pgs 133-185). <https://doi.org/0140-1963/96/020133>
- Ho, V. T., Thomson, M. J., & Ismail, A. M. (2016). Development of salt tolerant IR64 near isogenic lines through marker-assisted breeding. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 19(5), 373-381. <https://doi.org/10.1007/s12892-016-0049-9>
- Horie, T., Hauser, F., & Schroeder, J. I. (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends in Plant Science*, 14(12), 660-668. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.009>
- Hosoya, K., & Sugiyama, S. (2017). Weed communities and their negative impact on rice yield in no-input paddy fields in the northern part of Japan. *Biological Agriculture & Horticulture*, 8765(March). <https://doi.org/10.1080/01448765.2017.1299641>
- Hussain M, Park H-W, Farooq M, Jabran K, Dong-Jin L (2013) Morphological and Physiological Basis of Salt Resistance in Different Rice Genotypes. *International journal of agriculture & biology* 113-118
- Imran, Horie, T., & Katsuhara, M. (2019). Expression and ion transport activity of rice OsHKT1;1 variants. *Plants*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.3390/plants9010016>
- Inclendon, B. J., & Hall, J. C. (1997). Acetyl-coenzyme A carboxylase: Quaternary structure and inhibition by graminicidal herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 57(3), 255-271. <https://doi.org/10.1006/pest.1997.2279>
- IPCC. (2014). Climate Change 2014. *In Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324>
- IPCC. (2019). Comunicado de prensa de IPCC. *The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) is the United Nations body for assessing the science related to climate change* 1-7.
- Islam, M. S., & Morison, J. I. L. (1992). Influence of solar radiation and temperature on irrigated rice grain yield in Bangladesh. *Field Crops Research*, 30(1-2), 13-28. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(92\)90053-C](https://doi.org/10.1016/0378-4290(92)90053-C)

- Ismail, A. M., & Horie, T. (2017). Genomics, Physiology, and Molecular Breeding Approaches for Improving Salt Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), 405-434. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040936>
- Jagdish, S. V. K., Murty, M. V. R., & Quick, W. P. (2015). Rice responses to rising temperatures – challenges, perspectives and the future directions. *Plant Cell Environ*, 38(9), 1686-1698. <https://doi.org/10.1111/pce.12430>
- Jang, S., Marjanovic, J., & Gornicki, P. (2013). Resistance to herbicides caused by single amino acid mutations in acetyl-CoA carboxylase in resistant populations of grassy weeds. *New Phytologist*, 197(4), 1-7. <https://doi.org/10.1111/nph.12117>
- Jia, Y. (2009). Artificial introgression of a large chromosome fragment around the rice blast resistance gene Pi-ta in backcross progeny and several elite rice cultivars. *Heredity*, 103(4), 333-339. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.95>
- Joshi Ravindra, Cowie Robert & Leocadio Sebastian. (2017). Biology and Management of Invasive Apple Snails. *Philippine Rice Research Institute*, 1-424.
- Kakar, N., Jumaa, S. H., Redoña, E. D., Warburton, M. L., & Reddy, K. R. (2019). Evaluating rice for salinity using pot-culture provides a systematic tolerance assessment at the seedling stage. *Springer Open*, 57, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0317-7>
- Kaundun, S. S. (2014). Resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides. *Pest Management Science*, 70(9), 1-13. <https://doi.org/10.1002/ps.3790>
- Kraehmer, H., Thomas, C., & Vidotto, F. (2017). Rice production in Europe. In *Rice Production Worldwide* (pp. 93-116; 549).
- Krishnamurthy, S. L., Pundir, P., Warraich, A. S., Rathor, S., Lokeshkumar, B. M., Singh, N. K., & Sharma, P. C. (2020). Introgressed Saltol QTL Lines Improves the Salinity Tolerance in Rice at Seedling Stage. *Frontiers in Plant Science*, 11(June), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00833>
- Krishnan, P., Ramakrishnan, B., Reddy, K. R., & Reddy, V. R. (2011). High-Temperature Effects on Rice Growth, Yield, and Grain Quality. In *Advances in Agronomy* (1^{aed}., Vol. 111, Número November). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387689-8.00004-7>
- Kumar, V., Singh, A., Mithra, S. V. A., Krishnamurthy, S. L., Parida, S. K., Jain, S., Tiwari, K. K., Kumar, P., Rao, A. R., Sharma, S. K., Khurana, J. P., Singh, N. K., & Mohapatra, T. (2015). Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). *DNA Research*, 22(2), 133–145. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsu046>
- Labrada, R. (2002). Major weed problems in rice – red/weedy rice and the Echinochloa complex. *Weed Officer, Plant Protection Service, FAO, Rome*, ChapterII 1-17.
- Lal, R. (2014). Desertification and Soil Erosion. In *B. Freedmans (Ed.), Global environmental Change* (pp. 369-378). https://doi.org/10.1007/978-94-007-5784-4_7
- Lancashire, P. D., Bleiholder, H., Van den Boom, T., Langelüdekke, P., Stauss, R., Weber, E., & Witzzenberger, A. (1991). A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of Applied Biology*, 119(3), 41.
- Lavanguardia. (2020). El mar inunda arrozales y mejilloneras y llega a 3 kilómetros tierra adentro en el Delta del Ebro. *La Vanguardia*, 1-2.
- Levitus, G., Echenique, V., & Rubinstein, C. (2010). Marcadores moleculares. In *Bioteología y Mejoramiento Vegetal II: Vol. II* (pp. 70-85; 643).
- LGC. KASP genotyping chemistry (internet). 2017. Available: <https://doi.org/www.lgcgroup.com/products/kasp-genotyping-chemistry/#.Wv1HGKSFPIU>
- Lin, H. X., Zhu, M. Z., Yano, M., Gao, J. P., Liang, Z. W., Su, W. A., Hu, X. H., Ren, Z.

- H., & Chao, D. Y. (2003). QTLs for Na⁺ and K⁺ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(2), 253-260. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1421-y>
- Liu, L., Xia, W., Li, H., Zeng, H., Wei, B., Han, S., & Yin, C. (2018). Salinity Inhibits Rice Seed Germination by Reducing α -Amylase Activity via Decreased Bioactive Gibberellin Content. *Frontiers in Plant Science*, 9 (March), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00275>
- López-van Oosterom M.V., Casa-Ruiz J.P., Gampe D., López-Robles M.A., Ludwig R., Nuñez-Marcé & Muños I. (2019). Responses of a native and a recent invader snail to warming and dry conditions : the case of the lower Ebro River. *Springer Link* 53, 497-508. <https://doi.org/10.1007/s10452-019-09704-5>
- López, J., Quiñonero, S., & Tarruella, A. (2009). Presencia masiva de *Pomacea* cf . *canaliculata* (Lamarck , 1822) (Gastropoda : Ampullariidae) en el Delta del Ebro (Cataluña , España). *Spira*, 3(1-2), 117-121.
- MAAMA. (2015). Programa nacional para la aplicación de la normativa fitosanitaria. *Plan nacional de contingencia de Pomacea sp. Ministerio de Agricultura alimentación y Medio Ambiente* 1-43.
- Maceda-Veiga A, Escribano-Alacid J, de Sostoa A, García-Berthou E (2013) The aquarium trade as a potential source of fish introductions in southwestern Europe. *Biol Invasions* 15: 2707–2716
- Macias, D., Garcia-Gorriz, E., & Stips, A. (2013). Understanding the Causes of Recent Warming of Mediterranean Waters . How Much Could Be Attributed to Climate Change ?. *PLOS ONE* 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081591>
- Marocco, E., & Milo, M. (2019). FAO. *Food Outlook Biannual Report On Global Food Markets* 108 (30-34) (Número November).
- McLean, J., Hardy, B., & Hettel, G. (2013). Rice Almanac, 4th edition. *International Rice Research Institute IRRI, Los Baños, Philippines*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg189>
- Merritt, D. J., Turner, S. R., Clarke, S., & Dixon, K. W. (2007). Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. *Australian Journal of Botany*, 55(3), 336-344. <https://doi.org/10.1071/BT06106>
- MINECO. (2018). Caracol Manzana (*Pomacea maculata*) Memoria de actuaciones. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/caracol-manzana/>.
- MINECO. (2019). *Cuentas Económicas de la Agricultura*.
- Molina, J., Sikora, M., Garud, N., Flowers, J. M., Rubinstein, S., & Reynolds, A. (2011). Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(20), 8351-8356. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104686108>
- Murphy, B. P., & Tranel, P. J. (2019). Target-site mutations conferring herbicide resistance. *Plants*, 8(10), 1-16. <https://doi.org/10.3390/plants8100382>
- Musman, M., Kamaruzzaman, S., Karina, S., Rizqi, R., & Arisca, F. (2013). A preliminary study on the anti hatching of freshwater golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) eggs from *Barringtonia racemosa* (Magnoliopsida: Lecythidaceae) seeds extract. *AACL Bioflux*, 6, 4, 394-398.
- Muthayya, S., Sugimoto, J. D., Montgomery, S., & Maberly, G. F. (2014). An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1324(1), 7-14. <https://doi.org/10.1111/nyas.12540>
- Nadir, S., Xiong, H. B., Zhu, Q., Zhang, X. L., Xu, H. Y., Li, J., Dongchen, W., Henry, D., Guo, X. Q., Khan, S., Suh, H. S., Lee, D. S., & Chen, L. J. (2017). Weedy rice in sustainable rice production. A review. *Agronomy for Sustainable Development*,

- 37(5), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0456-4>
- Negrão, S., Courtois, B., Ahmadi, N., Abreu, I., Saibo, N., & Oliveira, M. M. (2011). Recent updates on salinity stress in rice: From physiological to molecular responses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(4), 329–377. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.587725>
- Nguyen, N. V. (2004). Global climate changes and rice food security. *Executive Secretary, International Rice Commission, FAO, Rome, Italy. Part 1*, 24-30.
- Ohnishi, T., Yoshino, M., Yamakawa, H., & Kinoshita, T. (2011). The biotron breeding system: a rapid and reliable procedure for genetic studies and breeding in rice. *Plant Cell Physiol*, 52(7), 1249-1257. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr066>
- Olivier, H. M., Jenkins, J. A., Berhow, M., & Carter, J. (2016). A Pilot Study Testing a Natural and a Synthetic Molluscicide for Controlling Invasive Apple Snails (*Pomacea maculata*). *Springer. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(3), 289-294. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1709-z>
- Olofsson, M., Valverde, B. E., & Madsen, K. H. (2000). Herbicide resistant rice (*Oryza sativa* L.): Global implications for weedy rice and weed management. *Annals of Applied Biology*, 137(3), 279-295. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2000.tb00069.x>
- Olsen, K. M., Caicedo, A. L., Polato, N., McClung, A., McCouch, S., & Purugganan, M. D. (2006). Selection under domestication: Evidence for a sweep in the rice waxy genomic region. *Genetics*, 173(2), 975-983. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.056473>
- Palanog, A. D., Mondejar, C. L. C., Bello, G. E., Calayugan, M. I. C., Palanog, M. O., Caguiat, X. G. I., Ferrer, M. C., & Sta. Ines, L. T. (2020). Rice Breeding Strategies in the Philippines. *Journal of Scientific Agriculture*, 4, 21-27. <https://doi.org/10.25081/jsa.2020.v4.6164>
- Paper, W. (2014). River Salinity and Climate Change Evidence from Coastal Bangladesh. March. *Policy Research Working Paper*. 1-44.
- Parray, J. A., Mir, M. Y., & Shameem, N. (2019). Rhizosphere Engineering and Agricultural Productivity. *Sustainable Agriculture: Biotechniques in Plant Biology*. 547 (71-155). <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8840-8>
- Platten, J. D., Cotsaftis O., Berthomieu P., Bohnert H., Davenport R. J., Fairbairn D. J., Horie T., Leigh, R. a, Lin, H.-X., Luan, S., Mäser, P., Pantoja, O., Rodríguez-Navarro, A., Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Sentenac, H., Uozumi, N., Véry, A.-A., Zhu, J.-K., Tester, M. (2006). Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science*, 11(8), 372-374. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.06.001>
- Platten, John Damien, Egdane, J. A., & Ismail, A. M. (2013). Salinity tolerance, Na⁺ exclusion and allele mining of HKT1;5 in *Oryza sativa* and *O. glaberrima*: Many sources, many genes, one mechanism? *BMC Plant Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-32>
- Puvanitha, S., & Mahendran, S. (2017). Effect of Salinity on Plant Height, Shoot and Root Dry Weight of Selected Rice Cultivars. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 3(1), 126-131. <https://doi.org/10.21276/sjavs>
- Rahman, M. A., Bimpong, I. K., Bizimana, J. B., Pascual, E. D., Arceta, M., Swamy, B. P. M., Diaw, F., Rahman, M. S., & Singh, R. K. (2017). Mapping QTLs using a novel source of salinity tolerance from Hasawi and their interaction with environments in rice. *Rice*, 10(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12284-017-0186-x>
- Rahman, M. A., Thomson, M. J., Ocampo, M. De, Egdane, J. A., Salam, M. A., & Ismail, A. M. (2019). Assessing trait contribution and mapping novel QTL for salinity

- tolerance using the Bangladeshi rice landrace Capsule. *Rice*, 63, 1-18.
- Rahman, S., Di, L., Yu, E. G., Tang, J., Lin, L., Zhang, C., Yu, Z., & Gaigalas, J. (2018). Impact of Climate Change on Soil Salinity : A remote sensing based investigation in Coastal Bangladesh. *2018 7th International Conference on Agro-geoinformatics (Agro-geoinformatics)*, 1-5. <https://doi.org/10.1109/Agro-Geoinformatics.2018.8476036>
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P., & Dhawan, A. K. (2011). Developing stress tolerant plants through in vitro selection-An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71(1), 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.021>
- Ramakrishnan, V. (2007). Salinity, ph, temperature, desiccation and hypoxia tolerance in the invasive freshwater apple snail *Pomacea insularum*. *The University of texas at Arlington in Partial Fulfillment* 1-262.
- Rao, A.N., Wani, S.P., Ahmed, S., HaiderAli, H., Marambe, B. (2017). Weed management in rice in the Asian-Pacific region. Asian-Pacific Weed Science Society (APWSS). *The Weed Science Society of Japan, Japan and Indian Society of Weed Science, India*. International Standard Book Number: ISBN -13: 978-81-931978-4-4 (septiembre), 1-40.
- Rather, S., Pandey, I. D., Panda, G. S., & Kumar, S. (2017). Relative Efficiency of Different Emasculation Methods in Rice (*Oryza sativa* L.). *Environment and Ecology*, 35(September), 2205-2208.
- Reddy, K. N., & Nandula, V. K. (2012). Herbicide resistant crops: History, development and current technologies. *Indian Journal of Agronomy*, 57(1), 1-7.
- Ren, Z.-H., Gao, J.-P., Li, L.-G., Cai, X.-L., Huang, W., Chao, D.-Y., Zhu, M.-Z., Wang, Z.-Y., Luan, S., & Lin, H.-X. (2005). A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, 37(10), 1141-1146. <https://doi.org/10.1038/ng1643>
- Rendina, A. R., & Felts, J. M. (2016). Cyclohexanedione herbicides are selective and potent Inhibitors of Acetyl-CoA Carboxylase from grasses. *In Plant Physiology and Biochemistry* (p. v. 86(4), pgs. 983– 986.).
- Rodrangboon, P., Pongtongkam, P., Suputtitada, S., & Adachi, T. (2002). Genetics of F1 Pollen Sterility in *Oryza sativa*. *Breeding Science*, 52, 123-129.
- Rubio, F., Gassmann, W., & Schroeder, J. I. (1995). Sodium-Driven Potassium Uptake by the Plant Potassium Transporter HKT1 and Mutations Conferring Salt Tolerance. *Science*, 270(5242), 1660-1663.
- Rubio, F., Nieves-Cordones, M., Horie, T., & Shabala, S. (2019). Doing ‘business as usual’ comes with a cost: evaluating energy cost of maintaining plant intracellular K⁺ homeostasis under saline conditions. *New Phytologist*, 225(3), 1097-1104. <https://doi.org/10.1111/nph.15852>
- Sajid H., Bai, Z., Huang, J., Cao, X., Zhu, L., Zhu, C., Khaskheli, M. A., Zhong, C., Jin, Q., & Zhang, J. (2019). 1-Methylcyclopropene Modulates Physiological, Biochemical, and Antioxidant Responses of Rice To Different Salt Stress Levels. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00124>
- Salassi, M. E., & Deliberto, M. A. (2010). Production Economics Comparison of Rice Varieties. *Research & Extension*, 10, 1-8.
- Salmeron, J. I. C. (2013). Marcadores moleculares. *Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Mundi-Prensa 3^{ed}* (pp. 36-57; 602).
- Sang, T., & Ge, S. (2007). Genetics and phylogenetics of rice domestication. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17(6), 533-538. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.09.005>

- Sasaki, Y., & Nagano, Y. (2014). Plant Acetyl-CoA Carboxylase: Structure , Biosynthesis , Regulation , and Gene Manipulation for Plant Breeding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 68(6), pgs. 1175–1184. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1175>.
- Schubert, D., Willians, D. (2006). “Cisgenic” as a product designation. *Nature Biotechnology*, v. 24(11), pgs. 1327–1329. <https://doi.org/10.1038/nbt1106-1327>
- Shankar, R., Bhattacharjee, A., & Jain, M. (2016). Transcriptome analysis in different rice cultivars provides novel insights into desiccation and salinity stress responses. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep23719>
- Sharma, D. R., Kaur, R., & Kumar, K. (1996). Embryo rescue in plants—a review. *Euphytica*, 89(3), 325-337. <https://doi.org/10.1007/BF00022289>
- Silva, W. De, Cao, T., Wen, Z., Zhang, X., & Ni, L. (2019). Potential spreading risk of an invasive snail species (*Pomacea canaliculata*) in freshwater habitats of Asia. *Research Articles 1-8*.
- SIN, T. E. O. (2003). Damage potential of the golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck) in irrigated rice and its control by cultural approaches. *International Journal of Pest Management*, 49. <https://doi.org/10.1080/713867835>
- Singh, R. K., & Flowers, T. J. (2016). Physiology and molecular biology of the effects of salinity on rice. *Handbook of Plant and Crop Stress*, 3^{ed} (Número April). <https://doi.org/10.1201/b10329-44>
- Smith, R. J. (1981). Weeds of major economic importance in rice and yield losses due to weed competition. In: Proceedings of the Conference on Weed Control in Rice. *Weed Control in Rice* (Número Aug 31–Sept 4, pp. 19–36.).
- Soda, N., Kushwaha, H. R., Soni, P., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2013). A suite of new genes defining salinity stress tolerance in seedlings of contrasting rice genotypes. *Functional and Integrative Genomics*, 13(3), 351-365. <https://doi.org/10.1007/s10142-013-0328-1>
- Sudianto, E., Beng-Kah, S., Ting-Xiang, N., Saldain, N. E., Scott, R. C., & Burgos, N. R. (2013). Clearfield® rice: Its development, success, and key challenges on a global perspective. *Crop Protection*, 49, 40-51. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.013>
- Sundaram, R. M., Sakthivel, K., Hariprasad, A. S., Ramesha, M. S., Viraktamath, B. C., Neeraja, C. N., Balachandran, S. M., Rani, N. S., Revathi, P., Sandhya, P., & Hari, Y. (2010). Development and validation of a PCR-based functional marker system for the major wide-compatible gene locus S5 in rice. *Molecular Breeding*, 26(4), 719-727. <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9482-5>
- Suzuki, K., Costa, A., Nakayama, H., Katsuhara, M., Shinmyo, A., & Horie, T. (2015). OsHKT2;2/1-mediated Na⁺ influx over K⁺ uptake in roots potentially increases toxic Na⁺ accumulation in a salt-tolerant landrace of rice Nona Bokra upon salinity stress. *Journal of Plant Research*, 129(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0764-1>
- Sweeney, M., & McCouch, S. (2007). The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany*, 100(5), 951-957. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm128>
- Takano, H. K., Ovejero, R. F. L., Belchior, G. G., Maymone, G. P. L., & Dayan, F. E. (2020). ACCase-inhibiting herbicides: Mechanism of action, resistance evolution and stewardship. *Scientia Agricola; Plant Physiology and Biochemistry*, 78(1), 1-11. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2019-0102>
- Terakawa, T., & Wakasa, K. (1992). Rice mutant resistant to the herbicide bensulfuron methyl (BSM) by in vitro selection. *NI I-Electronic Library Service*, 42, 267-275.
- Thomson, M. J., de Ocampo, M., Egdane, J., Rahman, M. A., Sajise, A. G., Adorada, D.

- L., Tumimbang-Raiz, E., Blumwald, E., Seraj, Z. I., Singh, R. K., Gregorio, G. B., & Ismail, A. M. (2010). Characterizing the *Saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. *Rice*, 3(2-3), 148-160. <https://doi.org/10.1007/s12284-010-9053-8>
- Thomson, M. J., Ocampo, M., Egdane, J., Rahman, M. A., Sajise, A. G., Adorada, D. L., Tumimbang-Raiz, E., Blumwald, E., Seraj, Z. I., Singh, R. K., Gregorio, G. B., Ismail, A. M., (2010). Characterizing the *Saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. *Rice*, 3(2-3), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s12284-010-9053-8>
- Thomson, M., Ocampo, M., Egdane, J., Akhlasur, R. M., Sajise, A., Adorada, D., Tumimbang-Raiz, E., Blumwald, E., Seraj, Z., Singh, R., Gregorio, G., & Ismail, A. (2010). Characterizing the *Saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. *Rice*, 3(2-3), 148-160. <https://doi.org/10.1007/s12284-010-9053-8>
- Toldi, O., Oreifig, A. S., Kiss, E., & Jenes, B. (2000). Production of phosphinothricin-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) through the application of phosphinothricin as growth regulator. *Plant Cell Reports* 19, 1226-1231.
- Vasil, I. K. (2007). Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant cell report*, 26 1133-1154. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0338-3>
- Vaughan, D. A., Morishima, H., & Kadowaki, K. (2003). Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(2), 139-146. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00009-8)
- Vázquez-Yanes, C., & Orozco-Segovia, A. (1993). Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 69-87. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.000441>
- Vidotto, F., & Ferrero, A. (2000). Germination behaviour of red rice (*Oryza sativa* L.) seeds in field and laboratory conditions. *Agronomie*, 20(4), 375-382. <https://doi.org/10.1051/agro:2000134>
- Vrbničanin, S., Pavlović, D., & Božić, D. (2017). Weed Resistance to Herbicides. *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*, 2, 1-30. <https://doi.org/10.5772/67979>
- Wang, R., Jing, W., Xiao, L., Jin, Y., Shen, L., & Zhang, W. (2015). The rice high-affinity potassium transporter1;1 is involved in salt tolerance and regulated by an MYB-type transcription factor. *Plant Physiology*, 168(3), 1076-1090. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00298>
- Wang, Y., Wang, L., Chen, H., Xiang, J., Zhang, Y., Shi, Q., Zhu, D., & Zhang, Y. (2019). Sowing dates have different effects on spikelet formation among different photoperiod-sensitive rice genotypes. *Agronomy Journal*, 111(5), 2263-2275. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.09.0586>
- Waziri, A., Kumar, & Purty, R. (2016). *Saltol* QTL and Their Role in Salinity Tolerance in Rice. *Austin J Biotechnol Bioeng. Austin J Biotechnol Bioeng*, 3(3), 1067-3.
- Weert, F. Van. (2009). Global Overview of Saline Groundwater Occurrence and Genesis By. July. *International Groundwater resources assessment centre*, 1-107
- Wei, X., & Huang, X. (2019). Origin, taxonomy, and phylogenetics of rice. *In Rice. AACCI. Published by Elsevier Inc. in cooperation with AACC International*, 1-16.
- Weijden, W., Leewis, R. and Bo, P. (2014). 100 of the World's worst invasive alien species. *Biological Globalisation*. 206-208 https://doi.org/10.1163/9789004278110_019
- Woodward, John, Delphine Fleury, R. W. (2014). Bi-Allelic SNP Genotyping Using the TaqMan® Assay. *Croop Breeding Methods and Protocols* (pp. 67-74; 253).
- Wu, F., Yang, J., Yu, D., & Xu, P. (2020). Identification and validation a major QTL from “Sea Rice 86” seedlings conferred salt tolerance. *Agronomy*, 10(3), 1-12. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030410>

- Yang, J., Zhao, X., Cheng, K., Du, H., Ouyang, Y., Chen, J., Qiu, S., Huang, J., Jiang, Y., Jiang, L., Ding, J., Wang, J., Xu, C., Li, X., & Zhang, Q. (2012). A Killer-Protector System Regulates Both Hybrid Sterility and Segregation Distortion in Rice. *Sciences*, 337(September). <https://doi.org/10.1126/science.1223702>
- Yang, Q., Liu, S., He, C., Cowie, R. H., & Hayes, K. A. (2018). Invisible apple snail invasions : importance of continued vigilance and rigorous taxonomic assessments. December. *Wiley Online Library* 1-10. <https://doi.org/10.1002/ps.5241>
- Ye, F., Ma, P., Zhang, Y. Y., Li, P., Yang, F., & Fu, Y. (2018). Herbicidal activity and molecular docking study of novel ACCase inhibitors. *Frontiers in Plant Science*, 871. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01850>
- Yoshida, K., Matsukura, K., Cazzaniga, N. J., & Wada, T. (2014). Tolerance to low temperature and desiccation in two invasive apple snails, *Pomacea canaliculata* and *P. Maculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae), collected in their original distribution area (northern and central Argentina). *Journal of Molluscan Studies*, 80, 62-66. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyt042>
- Zaman, M., Shahid, S. A., & Heng, L. (2018). Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques. *Springer Open*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3>
- Zeng, L., Shannon, M. C., & Lesch, S. M. (2001). Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. *Agricultural Water Management*, 48, 191-206. [https://doi.org/10.1016/S0378-3774\(00\)00146-3](https://doi.org/10.1016/S0378-3774(00)00146-3)
- Zeng, Linghe, & Shannon, M. C. (2000). Salinity Effects on Seedling Growth and Yield Components of Rice. *Crop Science*, 40, 996-1003. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.404996x>
- Zhang, G., & Lu, Y. (2008). Genetics of F1 pollen sterility in *Oryza sativa*. *Rice Genetics III* (Vol. 2, pp. 418-422). https://doi.org/10.1142/9789812814289_0040
- Zhou, Z. ling, Wei, X. jin, Jiang, L., Liu, K., Xu, D. yong, Zhai, H. qu, & Wan, J. min. (2011). Genetic Analysis of Heading Date of Japonica Rice Cultivars in Southwest China. *Rice Science*, 18(4), 287-296. [https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(12\)60007-9](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(12)60007-9)
- Zhu, Z. R., Cheng, J., Zuo, W., Lin, X. W., Guo, Y. R., Jiang, Y. P., Wu, X. W., Teng, K., Zhai, B. P., Luo, J., Jiang, X. H., & Tang, Z. H. (2007). Integrated management of rice stem borers in the Yangtze Delta, China. *M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson and J. Hendrichs (eds.), Area-Wide Control of Insect Pests*, 373-382. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5_35

Tabla SM 3.- Promedios de las medidas de salinidad en la temporada 2018-2019

	Nodo 3/Conductividad del suelo	Nodo 4/Conductividad del suelo	Nodo 5/Conductividad del suelo	Nodo 6/Conductividad del suelo	Nodo 19/Conductividad del suelo	Promedio	Media del extracto de saturación
2018	2,38	4,30	3,62	6,01		4,08	14,90
2019		2,80	2,93	3,28	3,03	3,01	14,90

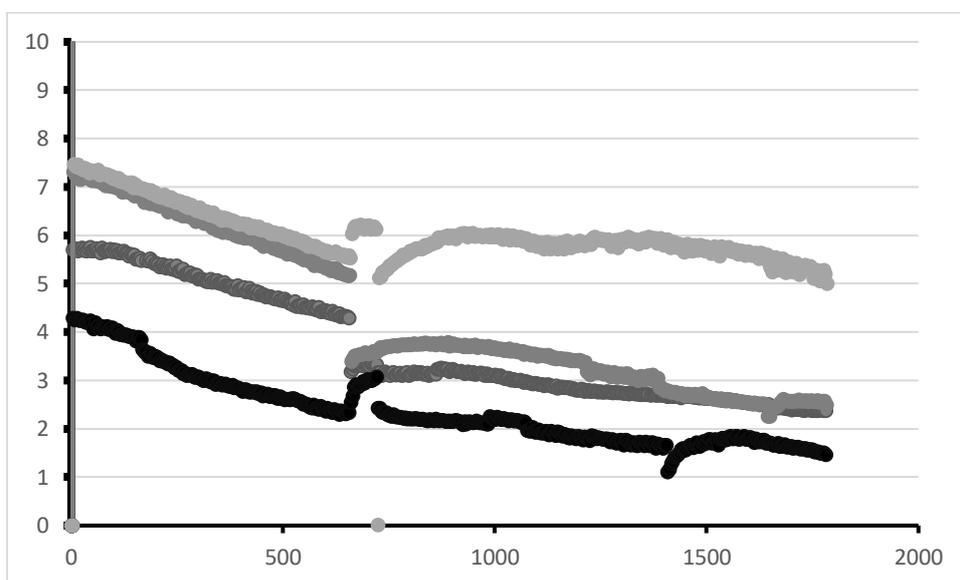


Figura SM 1. -Conductividad en el campo salino los Vascos, las medidas de salinidad es mediante cinco sensores de nodos desarrollados por IRIS Technology Solutions (Castelldefels, Barcelona), los cuales se encontraban dentro del campo de arroz durante el tiempo que duro el ensayo que las plantas estuvieron expuestas a la salinidad en el periodo 2018.

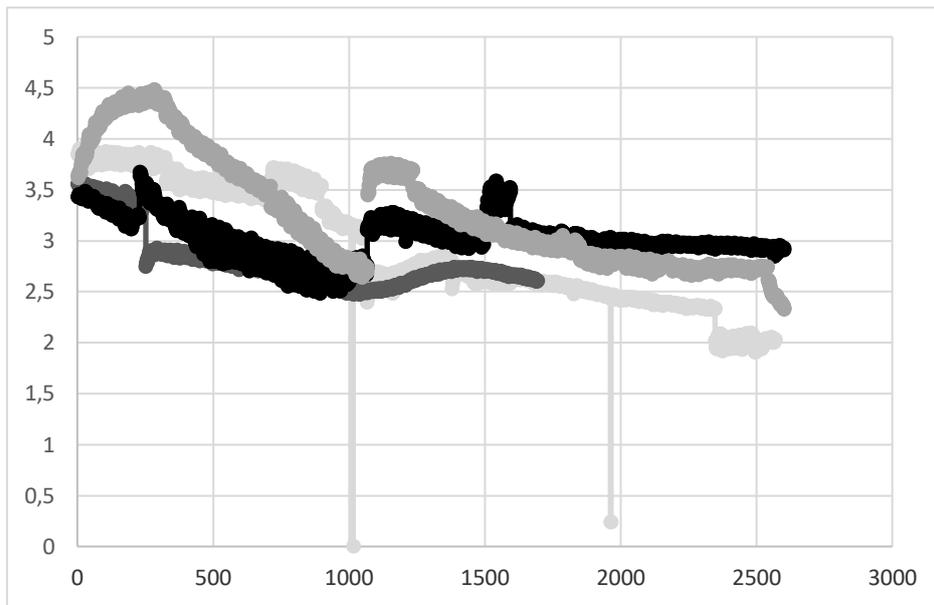


Figura SM 2.- Conductividad en el campo salino los Vascos, las medidas de salinidad es mediante cinco sensores de nodos desarrollados por IRIS Technology Solutions (Castelldefels, Barcelona), los cuales se encontraban dentro del campo de arroz durante el tiempo que duro el ensayo que las plantas estuvieron expuestas a la salinidad en el periodo 2019.

Tabla SM 4.- Valores Estadístico de los brotes 2018, comparación entre tratamientos Salino y no salino

Líneas Tratamiento			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Conf.]	
FL478-S	vs	FL478-C	-1.504.433	1.210.086	-12.43	0.000	-1.955.367	-1.053.498
PL12-S	vs	PL12-C	-7.555.408	1.210.086	-6.24	0.000	-1.206.475	-3.046.061
LP8-S	vs	LP8-C	-7.886.364	1.230.753	-6.41	0.000	-1.247.273	-3.300.001
LP9-S	vs	LP9-C	-5.916.667	24.074	-2.46	0.778	-1.488.777	3.054.435
LP10-S	vs	LP10-C	-4.416.667	1.702.289	-2.59	0.678	-1.076.019	192.686
LP13-S	vs	LP13-C	-4.583.333	24.074	-1.90	0.984	-1.355.444	4.387.768
LP20-S	vs	LP20-C	-6.083.333	1.702.289	-3.57	0.082	-1.242.686	.2601935
LP23-S	vs	LP23-C	-1.308.333	12.037	-10.87	0.000	-1.756.888	-8.597.782
LP24-S	vs	LP24-C	-.9583333	2.084.869	-0.46	1.000	-8.727.535	6.810.869
LP26-S	vs	LP26-C	-5.541.667	12.037	-4.60	0.002	-1.002.722	-1.056.116
LP28-S	vs	LP28-C	-7.388.889	1.389.913	-5.32	0.000	-1.256.836	-2.209.421
LP29-S	vs	LP29-C	-7.25	1.389.913	-5.22	0.000	-1.242.947	-2.070.532
LP30-S	vs	LP30-C	-9.166.667	12.037	-7.62	0.000	-1.365.222	-4.681.116
LP31-S	vs	LP31-C	-3.375	1.702.289	-1.98	0.974	-9.718.527	2.968.527

Tabla SM 5.- Diferencias de los brotes del parental FL478 con las nuevas líneas Saltol LP 2018

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
FL478-C	vs	LP8-C	-1.991.667	12.037	-16.55	0.000	-2.440.222	-1.543.112
FL478-S	vs	LP8-S	-127.587	1.236.999	-10.31	0.000	-1.736.834	-8.149.066
FL478-C	vs	LP9-C	-2.583.333	1.903.216	-13.57	0.000	-3.292.561	-1.874.105
FL478-S	vs	LP9-S	-1.670.567	1.907.262	-8.76	0.000	-2.381.303	-9.598.321
FL478-C	vs	LP10-C	-2.695.833	1.474.225	-18.29	0.000	-3.245.199	-2.146.468
FL478-S	vs	LP10-S	-1.633.067	1.479.444	-11.04	0.000	-2.184.378	-1.081.757
FL478-C	vs	LP13-C	-2.533.333	1.903.216	-13.31	0.000	-3.242.561	-1.824.105
FL478-S	vs	LP13-S	-1.487.234	1.907.262	-7.80	0.000	-2.197.969	-7.764.988
FL478-C	vs	LP20-C	-2.283.333	1.474.225	-15.49	0.000	-2.832.699	-1.733.968
FL478-S	vs	LP20-S	-1.387.234	1.479.444	-9.38	0.000	-1.938.544	-8.359.238
FL478-C	vs	LP23-C	-1.733.333	12.037	-14.40	0.000	-2.181.888	-1.284.778
FL478-S	vs	LP23-S	-1.537.234	1.210.086	-12.70	0.000	-1.988.169	-1.086.299
FL478-C	vs	LP24-C	-1.679.167	1.474.225	-11.39	0.000	-2.228.532	-1.129.801
FL478-S	vs	LP24-S	-2.705.674	1.907.262	-1.42	1.000	-9.813.026	4.401.679
FL478-C	vs	LP26-C	-1.629.167	12.037	-13.53	0.000	-2.077.722	-1.180.612
FL478-S	vs	LP26-S	-6.789.007	1.210.086	-5.61	0.000	-1.129.835	-227.966
FL478-C	vs	LP28-C	-1.641.667	1.300.144	-12.63	0.000	-2.126.162	-1.157.172
FL478-S	vs	LP28-S	-8.761.229	1.306.059	-6.71	0.000	-1.362.822	-3.894.241
FL478-C	vs	LP29-C	-16.25	1.300.144	-12.50	0.000	-2.109.495	-1.140.505
FL478-S	vs	LP29-S	-8.455.674	1.306.059	-6.47	0.000	-1.332.266	-3.588.686
FL478-C	vs	LP30-C	-1.558.333	12.037	-12.95	0.000	-2.006.888	-1.109.778
FL478-S	vs	LP30-S	-9.705.674	1.210.086	-8.02	0.000	-1.421.502	-5.196.327
FL478-C	vs	LP31-C	-20.625	1.474.225	-13.99	0.000	-2.611.866	-1.513.134
FL478-S	vs	LP31-S	-8.955.674	1.479.444	-6.05	0.000	-1.446.878	-3.442.572

Tabla SM 6.- Diferencia en el número de brotes del parental PL12 con las nuevas líneas Saltol LP 2018

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
PL12-C	vs	LP8-C	-2.104.167	12.037	-1.75	0.995	-6.589.718	2.381.384
PL12-S	vs	LP8-S	-1.773.211	1.236.999	-1.43	1.000	-6.382.849	2.836.427
PL12-C	vs	LP9-C	38.125	1.903.216	2.00	0.970	-3.279.779	1.090.478
PL12-S	vs	LP9-S	2.173.759	1.907.262	1.14	1.000	-4.933.594	9.281.111
PL12-C	vs	LP10-C	49.375	1.474.225	3.35	0.156	-.5561554	1.043.116
PL12-S	vs	LP10-S	1.798.759	1.479.444	1.22	1.000	-3.714.343	7.311.861
PL12-C	vs	LP13-C	33.125	1.903.216	1.74	0.995	-3.779.779	1.040.478
PL12-S	vs	LP13-S	.3404255	1.907.262	0.18	1.000	-6.766.927	7.447.778
PL12-C	vs	LP20-C	.8125	1.474.225	0.55	1.000	-4.681.155	6.306.155
PL12-S	vs	LP20-S	-.6595745	1.479.444	-0.45	1.000	-6.172.677	4.853.528
PL12-C	vs	LP23-C	-46.875	12.037	-3.89	0.028	-9.173.051	-.2019491
PL12-S	vs	LP23-S	.8404255	1.210.086	0.69	1.000	-3.668.922	5.349.773
PL12-C	vs	LP24-C	-5.229.167	1.474.225	-3.55	0.049	-1.072.282	.2644888
PL12-S	vs	LP24-S	-1.182.624	1.907.262	-6.20	0.000	-1.893.359	-4.718.889
PL12-C	vs	LP26-C	-5.729.167	12.037	-4.76	0.001	-1.021.472	-1.243.616
PL12-S	vs	LP26-S	-7.742.908	1.210.086	-6.40	0.000	-1.225.225	-3.233.561
PL12-C	vs	LP28-C	-5.604.167	1.300.144	-4.31	0.006	-1.044.912	-.759218
PL12-S	vs	LP28-S	-5.770.686	1.306.059	-4.42	0.004	-1.063.767	-.9036976
PL12-C	vs	LP29-C	-5.770.833	1.300.144	-4.44	0.003	-1.061.578	-.9258847
PL12-S	vs	LP29-S	-6.076.241	1.306.059	-4.65	0.001	-1.094.323	-1.209.253
PL12-C	vs	LP30-C	-64.375	12.037	-5.35	0.000	-1.092.305	-1.951.949
PL12-S	vs	LP30-S	-4.826.241	1.210.086	-3.99	0.020	-9.335.588	-.3168941
PL12-C	vs	LP31-C	-1.395.833	1.474.225	-0.95	1.000	-6.889.489	4.097.822
PL12-S	vs	LP31-S	-5.576.241	1.479.444	-3.77	0.043	-1.108.934	-.0631391
PL12-C	vs	FL478-C	-22.02083	1.2037	-18,29	0.000	-26.50638	-17.53528
PL12-S	vs	FL478-S	-14.53191	1.216438	-11.95	0.000	-19.06493	-9.998897

Tabla SM 7.- Valores estadísticos de los brotes 2019, comparación entre tratamientos salino y no salino

Líneas Tratamiento			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
FL478-C	vs	FL478-S	-8,125	1,944534	-4,18	0,019	-15,72469	-0,5253062
PL12-S	vs	PL12-C	-2,375	1,944534	-1,22	1	-9,974694	5,224694
LP1-S	vs	LP1-C	3,375	1,944534	1,74	1	-4,224694	10,97469
LP12-S	vs	LP12-C	-2,875	1,944534	-1,48	1	-10,47469	4,724694
LP13-S	vs	LP13-C	-1,3125	1,944534	-0,67	1	-8,912194	6,287194
LP14-S	vs	LP14-C	-3,9375	1,944534	-2,02	0,994	-11,53719	3,662194
LP16-S	vs	LP16-C	2,4375	1,944534	1,25	1	-5,162194	10,03719
LP21-S	vs	LP21-C	-4,9375	1,944534	-2,54	0,866	-12,53719	2,662194
LP22-S	vs	LP22-C	-2,5625	1,944534	-1,32	1	-10,16219	5,037194
LP24-S	vs	LP24-C	-6,125	1,944534	-3,15	0,398	-13,72469	1,474694
LP25-S	vs	LP25-C	-12,9375	1,944534	-6,65	0	-20,53719	-5,337806
LP26-S	vs	LP26-C	-5,75	1,944534	-2,96	0,557	-13,34969	1,849694
LP27-S	vs	LP27-C	-13,75	1,944534	-7,07	0	-21,34969	-6,150306
LP28-S	vs	LP28-C	-2,75	1,944534	-1,41	1	-10,34969	4,849694
LP29-S	vs	LP29-C	-5,125	1,944534	-2,64	0,809	-12,72469	2,474694
LP30-S	vs	LP30-C	-3,25	1,944534	-1,67	1	-10,84969	4,349694
LP31-S	vs	LP31-C	-2	1,944534	-1,03	1	-9,599694	5,599694
LP5-S	vs	LP5-C	0,125	1,944534	0,06	1	-7,474694	7,724694
LP6-S	vs	LP6-C	-0,375	1,944534	-0,19	1	-7,974694	7,224694
LP8-S	vs	LP8-C	-4,9375	1,944534	-2,54	0,866	-12,53719	2,662194
LP11-S	vs	LP11-C	-7	1,958452	-3,57	0,143	-14,65409	0,6540898
LP17-S	vs	LP17-C	-0,0625	1,958452	-0,03	1	-7,71659	7,59159
LP2-S	vs	LP2-C	-7,25	1,958452	-3,7	0,098	-14,90409	0,4040898
LP20-S	vs	LP20-C	-6,1875	1,958452	-3,16	0,39	-13,84159	1,46659
LP3-S	vs	LP3-C	1,4375	1,958452	0,73	1	-6,21659	9,09159
LP4-S	vs	LP4-C	-5,0625	1,958452	-2,58	0,841	-12,71659	2,59159
LP7-S	vs	LP7-C	8,6875	1,958452	4,44	0,007	1,03341	16,34159

Tabla SM 8.- Diferencias de los brotes del parental FL478 con las nuevas líneas Saltol LP 2019

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
FL478-C	vs	LP1-C	-21,625	1,944534	-11,12	0	-29,22469	-14,02531
FL478-S	vs	LP1-S	-10,125	1,944534	-5,21	0	-17,72469	-2,525306
FL478-C	vs	LP12-C	-26,25	1,944534	-13,5	0	-33,84969	-18,65031
FL478-S	vs	LP12-S	-21	1,944534	-10,8	0	-28,59969	-13,40031
FL478-C	vs	LP13-C	-28,125	1,944534	-14,46	0	-35,72469	-20,52531
FL478-S	vs	LP13-S	-21,3125	1,944534	-10,96	0	-28,91219	-13,71281
FL478-C	vs	LP14-C	-28,375	1,944534	-14,59	0	-35,97469	-20,77531
FL478-S	vs	LP14-S	-24,1875	1,944534	-12,44	0	-31,78719	-16,58781
FL478-C	vs	LP16-C	-14,3125	1,944534	-7,36	0	-21,91219	-6,712806
FL478-S	vs	LP16-S	-3,75	1,944534	-1,93	0,998	-11,34969	3,849694
FL478-C	vs	LP21-C	-18,9375	1,944534	-9,74	0	-26,53719	-11,33781
FL478-S	vs	LP21-S	-15,75	1,944534	-8,1	0	-23,34969	-8,150306
FL478-C	vs	LP22-C	-19,0625	1,944534	-9,8	0	-26,66219	-11,46281
FL478-S	vs	LP22-S	-13,5	1,944534	-6,94	0	-21,09969	-5,900306
FL478-C	vs	LP24-C	-17,9375	1,944534	-9,22	0	-25,53719	-10,33781
FL478-S	vs	LP24-S	-15,9375	1,944534	-8,2	0	-23,53719	-8,337806
FL478-C	vs	LP25-C	-13,375	1,944534	-6,88	0	-20,97469	-5,775306
FL478-S	vs	LP25-S	-18,1875	1,944534	-9,35	0	-25,78719	-10,58781
FL478-C	vs	LP26-C	-15,6875	1,944534	-8,07	0	-23,28719	-8,087806
FL478-S	vs	LP26-S	-13,3125	1,944534	-6,85	0	-20,91219	-5,712806
FL478-C	vs	LP27-C	-11,5	1,944534	-5,91	0	-19,09969	-3,900306
FL478-S	vs	LP27-S	-17,125	1,944534	-8,81	0	-24,72469	-9,525306
FL478-C	vs	LP28-C	-14,75	1,944534	-7,59	0	-22,34969	-7,150306
FL478-S	vs	LP28-S	-9,375	1,944534	-4,82	0,001	-16,97469	-1,775306
FL478-C	vs	LP29-C	-14,4375	1,944534	-7,42	0	-22,03719	-6,837806
FL478-S	vs	LP29-S	-11,4375	1,944534	-5,88	0	-19,03719	-3,837806

FL478-C	vs	LP30-C	-16,5625	1,944534	-8,52	0	-24,16219	-8,962806
FL478-S	vs	LP30-S	-11,6875	1,944534	-6,01	0	-19,28719	-4,087806
FL478-C	vs	LP31-C	-22,875	1,944534	-11,76	0	-30,47469	-15,27531
FL478-S	vs	LP31-S	-16,75	1,944534	-8,61	0	-24,34969	-9,150306
FL478-C	vs	LP5-C	-23,6875	1,944534	-12,18	0	-31,28719	-16,08781
FL478-S	vs	LP5-S	-15,4375	1,944534	-7,94	0	-23,03719	-7,837806
FL478-C	vs	LP6-C	-25,4375	1,944534	-13,08	0	-33,03719	-17,83781
FL478-S	vs	LP6-S	-17,6875	1,944534	-9,1	0	-25,28719	-10,08781
FL478-C	vs	LP8-C	-22,5625	1,944534	-11,6	0	-30,16219	-14,96281
FL478-S	vs	LP8-S	-19,375	1,944534	-9,96	0	-26,97469	-11,77531
FL478-C	vs	LP11-C	-20,5625	1,958452	-10,5	0	-28,21659	-12,90841
FL478-S	vs	LP11-S	-19,4375	1,958452	-9,92	0	-27,09159	-11,78341
FL478-C	vs	LP17-C	-12,375	1,958452	-6,32	0	-20,02909	-4,72091
FL478-S	vs	LP17-S	-4,3125	1,958452	-2,2	0,977	-11,96659	3,34159
FL478-C	vs	LP20-C	-21,625	1,958452	-11,04	0	-29,27909	-13,97091
FL478-S	vs	LP20-S	-19,6875	1,958452	-10,05	0	-27,34159	-12,03341
FL478-C	vs	LP3-C	-22,9375	1,958452	-11,71	0	-30,59159	-15,28341
FL478-S	vs	LP3-S	-13,375	1,958452	-6,83	0	-21,02909	-5,72091
FL478-C	vs	LP4-C	-24,875	1,958452	-12,7	0	-32,52909	-17,22091
FL478-S	vs	LP4-S	-21,8125	1,958452	-11,14	0	-29,46659	-14,15841
FL478-C	vs	LP2-C	-22,9375	1,958452	-11,71	0	-30,59159	-15,28341
FL478-S	vs	LP2-S	-22,0625	1,900264	-11,61	0	-29,48918	-14,63582
FL478-C	vs	LP7-C	-27,625	1,958452	-14,11	0	-35,27909	-19,97091
FL478-S	vs	LP7-S	-10,8125	1,958452	-5,52	0	-18,46659	-3,15841
FL478-C	vs	PL12-C	-20,8125	1,944534	-10,7	0	-28,41219	-13,21281
FL478-S	vs	PL12-S	-15,0625	1,944534	-7,75	0	-22,66219	-7,462806

Tabla SM 9.- Diferencias de los brotes del parental PL12 con las nuevas líneas Saltol LP 2019

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
PL12-C	vs	LP1-C	0,8125	1,944534	0,42	1	-6,787194	8,412194
PL12-S	vs	LP1-S	-4,9375	1,944534	-2,54	0,866	-12,53719	2,662194
PL12-C	vs	LP12-C	5,4375	1,944534	2,8	0,691	-2,162194	13,03719
PL12-S	vs	LP12-S	5,9375	1,944534	3,05	0,046	-1,662194	13,53719
PL12-C	vs	LP13-C	7,3125	1,944534	3,76	0,081	-0,2871938	14,91219
PL12-S	vs	LP13-S	6,25	1,944534	3,21	0,049	-1,349694	13,84969
PL12-C	vs	LP14-C	7,5625	1,944534	3,89	0,053	-0,0371938	15,16219
PL12-S	vs	LP14-S	9,125	1,944534	4,69	0,002	1,525306	16,72469
PL12-C	vs	LP16-C	-6,5	1,944534	-3,34	0,049	-14,09969	1,099694
PL12-S	vs	LP16-S	-11,3125	1,944534	-5,82	0	-18,91219	-3,712806
PL12-C	vs	LP21-C	-1,875	1,944534	-0,96	1	-9,474694	5,724694
PL12-S	vs	LP21-S	0,6875	1,944534	0,35	1	-6,912194	8,287194
PL12-C	vs	LP22-C	-1,75	1,944534	-0,9	1	-9,349694	5,849694
PL12-S	vs	LP22-S	-1,5625	1,944534	-0,8	1	-9,162194	6,037194
PL12-C	vs	LP24-C	-2,875	1,944534	-1,48	1	-10,47469	4,724694
PL12-S	vs	LP24-S	0,875	1,944534	0,45	1	-6,724694	8,474694
PL12-C	vs	LP25-C	-7,4375	1,944534	-3,82	0,046	-15,03719	0,1621938
PL12-S	vs	LP25-S	3,125	1,944534	1,61	1	-4,474694	10,72469
PL12-C	vs	LP26-C	-5,125	1,944534	-2,64	0,049	-12,72469	2,474694
PL12-S	vs	LP26-S	-1,75	1,944534	-0,9	1	-9,349694	5,849694
PL12-C	vs	LP27-C	-9,3125	1,944534	-4,79	0,001	-16,91219	-1,712806
PL12-S	vs	LP27-S	2,0625	1,944534	1,06	1	-5,537194	9,662194
PL12-C	vs	LP28-C	-6,0625	1,944534	-3,12	0,047	-13,66219	1,537194
PL12-S	vs	LP28-S	-5,6875	1,944534	-2,92	0,584	-13,28719	1,912194
PL12-C	vs	LP29-C	-6,375	1,944534	-3,28	0,043	-13,97469	1,224694
PL12-S	vs	LP29-S	-3,625	1,944534	-1,86	0,999	-11,22469	3,974694

PL12-C	vs	LP30-C	-4,25	1,944534	-2,19	0,98	-11,84969	3,349694
PL12-S	vs	LP30-S	-3,375	1,944534	-1,74	1	-10,97469	4,224694
PL12-C	vs	LP31-C	2,0625	1,944534	1,06	1	-5,537194	9,662194
PL12-S	vs	LP31-S	1,6875	1,944534	0,87	1	-5,912194	9,287194
PL12-C	vs	LP5-C	2,875	1,944534	1,48	1	-4,724694	10,47469
PL12-S	vs	LP5-S	0,375	1,944534	0,19	1	-7,224694	7,974694
PL12-C	vs	LP6-C	4,625	1,944534	2,38	0,936	-2,974694	12,22469
PL12-S	vs	LP6-S	2,625	1,944534	1,35	1	-4,974694	10,22469
PL12-C	vs	LP8-C	1,75	1,944534	0,9	1	-5,849694	9,349694
PL12-S	vs	LP8-S	4,3125	1,944534	2,22	0,975	-3,287194	11,91219
PL12-C	vs	LP11-C	-0,25	1,958452	-0,13	1	-7,90409	7,40409
PL12-S	vs	LP11-S	4,375	1,958452	2,23	0,972	-3,27909	12,02909
PL12-C	vs	LP17-C	-8,4375	1,958452	-4,31	0,011	-16,09159	-0,7834102
PL12-S	vs	LP17-S	-10,75	1,958452	-5,49	0	-18,40409	-3,09591
PL12-C	vs	LP20-C	0,8125	1,958452	0,41	1	-6,84159	8,46659
PL12-S	vs	LP20-S	4,625	1,958452	2,36	0,941	-3,02909	12,27909
PL12-C	vs	LP3-C	2,125	1,958452	1,09	1	-5,52909	9,77909
PL12-S	vs	LP3-S	-1,6875	1,958452	-0,86	1	-9,34159	5,96659
PL12-C	vs	LP4-C	4,0625	1,958452	2,07	0,991	-3,59159	11,71659
PL12-S	vs	LP4-S	6,75	1,958452	3,45	0,049	-0,9040898	14,40409
PL12-C	vs	LP7-C	6,8125	1,958452	3,48	0,186	-0,8415898	14,46659
PL12-S	vs	LP7-S	-4,25	1,958452	-2,17	0,982	-11,90409	3,40409
PL12-C	vs	LP2-C	2,125	1,958452	1,09	1	-5,52909	9,77909
PL12-S	vs	LP2-S	7	1,958452	3,57	0,043	-0,6540898	14,65409

Tabla SM 10.- Valores estadístico de los brotes 2019, comparación entre tratamientos salinos y no salino líneas Saltol MS

Líneas Tratamiento			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
IR64S-S	vs	IR64S-C	-3,375	2,037142	-1,66	0,983	-10,65988	3,909883
MS12-S	vs	MS12-C	-1,42E-14	2,037142	0	1	-7,284883	7,284883
MS14-S	vs	MS14-C	-4,4375	2,037142	-2,18	0,811	-11,72238	2,847383
MS17-S	vs	MS17-C	-4,8125	2,037142	-2,36	0,689	-12,09738	2,472383
MS21-S	vs	MS21-C	-0,25	2,037142	-0,12	1	-7,534883	7,034883
MS23-S	vs	MS23-C	-2,6875	2,037142	-1,32	0,999	-9,972383	4,597383
MS25-S	vs	MS25-C	-2,875	2,037142	-1,41	0,997	-10,15988	4,409883
MS28-S	vs	MS28-C	-0,6875	2,037142	-0,34	1	-7,972383	6,597383
MS3-S	vs	MS3-C	-4,875	2,037142	-2,39	0,666	-12,15988	2,409883
PM37-S	vs	PM37-C	-1,25	2,037142	-0,61	1	-8,534883	6,034883

Tabla SM 11.- Diferencias de los brotes del parental IR64-Saltol con las nuevas líneas Saltol MS 2019

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
MS12-C	vs	IR64S-C	-34,9375	2,037142	-17,15	0	-42,22238	-27,65262
MS12-S	vs	IR64S-S	-31,5625	2,037142	-15,49	0	-38,84738	-24,27762
MS14-C	vs	IR64S-C	-27,0625	2,037142	-13,28	0	-34,34738	-19,77762
MS14-S	vs	IR64S-S	-28,125	2,037142	-13,81	0	-35,40988	-20,84012
MS17-C	vs	IR64S-C	-28,0625	2,037142	-13,78	0	-35,34738	-20,77762
MS17-S	vs	IR64S-S	-29,5	2,037142	-14,48	0	-36,78488	-22,21512
MS21-C	vs	IR64S-C	-30,4375	2,037142	-14,94	0	-37,72238	-23,15262
MS21-S	vs	IR64S-S	-27,3125	2,037142	-13,41	0	-34,59738	-20,02762
MS23-C	vs	IR64S-C	-32,625	2,037142	-16,02	0	-39,90988	-25,34012
MS23-S	vs	IR64S-S	-31,9375	2,037142	-15,68	0	-39,22238	-24,65262

MS25-C	vs	IR64S-C	-33,6875	2,037142	-16,54	0	-40,97238	-26,40262
MS25-S	vs	IR64S-S	-33,1875	2,037142	-16,29	0	-40,47238	-25,90262
MS28-C	vs	IR64S-C	-32,6875	2,037142	-16,05	0	-39,97238	-25,40262
MS28-S	vs	IR64S-S	-30	2,037142	-14,73	0	-37,28488	-22,71512
MS3-C	vs	IR64S-C	-27,625	2,037142	-13,56	0	-34,90988	-20,34012
MS3-S	vs	IR64S-S	-29,125	2,037142	-14,3	0	-36,40988	-21,84012
PM37-C	vs	IR64S-C	-34,25	2,037142	-16,81	0	-41,53488	-26,96512
PM37-S	vs	IR64S-S	-32,125	2,037142	-15,77	0	-39,40988	-24,84012

Tabla SM 12.- Diferencias de los brotes del parental PM7 con las nuevas líneas Saltol MS 2019

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
MS12-C	vs	PM37-C	0,6875	2,037142	0,34	1	-6,597383	7,972383
MS12-S	vs	PM37-S	-0,5625	2,037142	-0,28	1	-7,847383	6,722383
MS14-C	vs	PM37-C	-7,1875	2,037142	-3,53	0,049	-14,47238	0,0973834
MS14-S	vs	PM37-S	-4	2,037142	-1,96	0,914	-11,28488	3,284883
MS17-C	vs	PM37-C	-6,1875	2,037142	-3,04	0,048	-13,47238	1,097383
MS17-S	vs	PM37-S	-2,625	2,037142	-1,29	0,999	-9,909883	4,659883
MS21-C	vs	PM37-C	-3,8125	2,037142	-1,87	0,944	-11,09738	3,472383
MS21-S	vs	PM37-S	-4,8125	2,037142	-2,36	0,689	-12,09738	2,472383
MS23-C	vs	PM37-C	-1,625	2,037142	-0,8	1	-8,909883	5,659883
MS23-S	vs	PM37-S	-0,1875	2,037142	-0,09	1	-7,472383	7,097383
MS25-C	vs	PM37-C	-0,5625	2,037142	-0,28	1	-7,847383	6,722383
MS25-S	vs	PM37-S	1,0625	2,037142	0,52	1	-6,222383	8,347383
MS28-C	vs	PM37-C	-1,5625	2,037142	-0,77	1	-8,847383	5,722383
MS28-S	vs	PM37-S	-2,125	2,037142	-1,04	1	-9,409883	5,159883
MS3-C	vs	PM37-C	-6,625	2,037142	-3,25	0,049	-13,90988	0,6598834
MS3-S	vs	PM37-S	-3	2,037142	-1,47	0,996	-10,28488	4,284883

Tabla SM 13.- Valores estadísticos de la longitud de las plantas 2018, comparación entre tratamientos salino y no salino líneas LP

Líneas Tratamiento			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
FL478-S	vs	FL478-C	-10,9122	1,54692	-7,05	0	-16,66668	-5,157724
LP10-S	vs	LP10-C	-4,247024	2,187676	-1,94	0,98	-12,38508	3,891037
LP13-S	vs	LP13-C	-11,21429	3,093841	-3,62	0,068	-22,72324	0,2946705
LP20-S	vs	LP20-C	-13,04762	2,187676	-5,96	0	-21,18568	-4,909558
LP23-S	vs	LP23-C	-5,933036	1,54692	-3,84	0,034	-11,68751	-0,1785576
LP24-S	vs	LP24-C	-4,89881	2,644771	-1,85	0,989	-14,73725	4,939626
LP26-S	vs	LP26-C	-8,991071	1,54692	-5,81	0	-14,74555	-3,236593
LP28-S	vs	LP28-C	-7,313492	1,78623	-4,09	0,013	-13,95819	-0,6687931
LP29-S	vs	LP29-C	-10,37698	1,78623	-5,81	0	-17,02168	-3,732285
LP30-S	vs	LP30-C	-6,936012	1,54692	-4,48	0,003	-12,69049	-1,181534
LP31-S	vs	LP31-C	-9,428571	2,187676	-4,31	0,005	-17,56663	-1,29051
LP8-S	vs	LP8-C	-6,010417	1,62267	-3,7	0,053	-12,04668	0,0258483
LP9-S	vs	LP9-C	-4,470238	3,093841	-1,44	1	-15,97919	7,038718
PL12-S	vs	PL12-C	-10,38393	1,54692	-6,71	0	-16,13841	-4,62945

Tabla SM 14.- Diferencias en la longitud de las plantas del parental FL748 con las nuevas líneas Saltol LP 2018

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
LP10-C	vs	FL478-C	-3,40625	1,966102	-1,73	0,996	-10,72006	3,907564
LP10-S	vs	FL478-S	3,258929	1,820256	1,79	0,993	-3,512347	10,0302
LP13-C	vs	FL478-C	4,989583	2,538226	1,97	0,977	-4,45251	14,43168
LP13-S	vs	FL478-S	4,6875	2,349941	1,99	0,972	-4,05418	13,42918
LP20-C	vs	FL478-C	1,447917	1,966102	0,74	1	-5,865897	8,761731
LP20-S	vs	FL478-S	-0,6875	1,820256	-0,38	1	-7,458776	6,083776
LP23-C	vs	FL478-C	-0,9791667	1,605315	-0,61	1	-6,950871	4,992537
LP23-S	vs	FL478-S	4	1,486233	2,69	0,601	-1,528724	9,528724

LP24-C	vs	FL478-C	-1,96875	1,966102	-1	1	-9,282564	5,345064
LP24-S	vs	FL478-S	4,044643	2,349941	1,72	0,996	-4,697037	12,78632
LP26-C	vs	FL478-C	1,614583	1,605315	1,01	1	-4,357121	7,586287
LP26-S	vs	FL478-S	3,535714	1,486233	2,38	0,829	-1,993009	9,064438
LP28-C	vs	FL478-C	1,434028	1,733939	0,83	1	-5,01615	7,884205
LP28-S	vs	FL478-S	5,032738	1,605315	3,14	0,266	-0,9389661	11,00444
LP29-C	vs	FL478-C	0,2951389	1,733939	0,17	1	-6,155039	6,745317
LP29-S	vs	FL478-S	0,8303571	1,605315	0,52	1	-5,141347	6,802061
LP30-C	vs	FL478-C	-0,5833333	1,605315	-0,36	1	-6,555037	5,388371
LP30-S	vs	FL478-S	3,392857	1,486233	2,28	0,881	-2,135867	8,921581
LP31-C	vs	FL478-C	-0,0104167	1,966102	-0,01	1	-7,324231	7,303397
LP31-S	vs	FL478-S	1,473214	1,820256	0,81	1	-5,298062	8,24449
LP8-C	vs	FL478-C	-0,5	1,605315	-0,31	1	-6,471704	5,471704
LP8-S	vs	FL478-S	4,401786	1,564923	2,81	0,501	-1,419663	10,22323
LP9-C	vs	FL478-C	-5,46875	2,538226	-2,15	0,933	-14,91084	3,973343
LP9-S	vs	FL478-S	0,9732143	2,349941	0,41	1	-7,768465	9,714894
PL12-S	vs	FL478-C	2,052083	1,605315	1,28	1	-3,919621	8,023787
PL12-S	vs	FL478-S	2,580357	1,486233	1,74	0,996	-2,948367	8,109081

Tabla SM 15.- Diferencias en la longitud de las plantas del parental PL12 con las nuevas líneas Saltol LP 2018

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
LP10-C	vs	PL12-C	5,458333	1,966102	2,78	0,531	-1,855481	12,77215
LP10-S	vs	PL12-S	-0,6785714	1,820256	-0,37	1	-7,449847	6,092705
LP13-C	vs	PL12-C	-2,9375	2,538226	-1,16	1	-12,37959	6,504593
LP13-S	vs	PL12-S	-2,107143	2,349941	-0,9	1	-10,84882	6,634537
LP20-C	vs	PL12-C	0,6041667	1,966102	0,31	1	-6,709647	7,917981
LP20-S	vs	PL12-S	3,267857	1,820256	1,8	0,993	-3,503419	10,03913

LP23-C	vs	PL12-C	3,03125	1,605315	1,89	0,986	-2,940454	9,002954
LP23-S	vs	PL12-S	-1,419643	1,486233	-0,96	1	-6,948367	4,109081
LP24-C	vs	PL12-C	4,020833	1,966102	2,05	0,962	-3,292981	11,33465
LP24-S	vs	PL12-S	-1,464286	2,349941	-0,62	1	-10,20597	7,277394
LP26-C	vs	PL12-C	0,4375	1,605315	0,27	1	-5,534204	6,409204
LP26-S	vs	PL12-S	-0,9553571	1,486233	-0,64	1	-6,484081	4,573367
LP28-C	vs	PL12-C	0,6180556	1,733939	0,36	1	-5,832122	7,068233
LP28-S	vs	PL12-S	-2,452381	1,605315	-1,53	0,999	-8,424085	3,519323
LP29-C	vs	PL12-C	1,756944	1,733939	1,01	1	-4,693233	8,207122
LP29-S	vs	PL12-S	1,75	1,605315	1,09	1	-4,221704	7,721704
LP30-C	vs	PL12-C	2,635417	1,605315	1,64	0,998	-3,336287	8,607121
LP30-S	vs	PL12-S	-0,8125	1,486233	-0,55	1	-6,341224	4,716224
LP31-C	vs	PL12-C	2,0625	1,966102	1,05	1	-5,251314	9,376314
LP31-S	vs	PL12-S	1,107143	1,820256	0,61	1	-5,664133	7,878419
LP8-C	vs	PL12-C	2,552083	1,605315	1,59	0,999	-3,419621	8,523787
LP8-S	vs	PL12-S	-1,821429	1,564923	-1,16	1	-7,642877	4,00002
LP9-C	vs	PL12-C	7,520833	2,538226	2,96	0,383	-1,92126	16,96293
LP9-S	vs	PL12-S	1,607143	2,349941	0,68	1	-7,134537	10,34882

Tabla SM 16.- Valores estadísticos de la longitud de las plantas 2019, comparación entre tratamientos salino y no salino líneas LP

Líneas Tratamiento			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
FL478-S	vs	FL478-C	-10,9375	1,524535	-7,17	0	-16,89574	-4,979261
LP1-S	vs	LP1-C	-16	1,524535	-10,5	0	-21,95824	-10,04176
LP11-S	vs	LP11-C	-12,9375	1,524535	-8,49	0	-18,89574	-6,979261
LP13-S	vs	LP13-C	-6	1,524535	-3,94	0,046	-11,95824	-0,0417609
LP14-S	vs	LP14-C	-11,0625	1,524535	-7,26	0	-17,02074	-5,104261
LP16-S	vs	LP16-C	-12,1875	1,524535	-7,99	0	-18,14574	-6,229261

LP17-S	vs	LP17-C	-12,5	1,524535	-8,2	0	-18,45824	-6,541761
LP21-S	vs	LP21-C	-15,5	1,524535	-10,17	0	-21,45824	-9,541761
LP22-S	vs	LP22-C	-15,5	1,524535	-10,17	0	-21,45824	-9,541761
LP25-S	vs	LP25-C	-19,5	1,524535	-12,79	0	-25,45824	-13,54176
LP26-S	vs	LP26-C	-12,3125	1,524535	-8,08	0	-18,27074	-6,354261
LP27-S	vs	LP27-C	-12,25	1,524535	-8,04	0	-18,20824	-6,291761
LP29-S	vs	LP29-C	-9,4375	1,524535	-6,19	0	-15,39574	-3,479261
LP30-S	vs	LP30-C	-10,8125	1,524535	-7,09	0	-16,77074	-4,854261
LP31-S	vs	LP31-C	-8,8125	1,524535	-5,78	0	-14,77074	-2,854261
LP3-S	vs	LP3-C	-9,3125	1,524535	-6,11	0	-15,27074	-3,354261
LP4-S	vs	LP4-C	-9,25	1,524535	-6,07	0	-15,20824	-3,291761
LP5-S	vs	LP5-C	-8,1875	1,524535	-5,37	0	-14,14574	-2,229261
LP6-S	vs	LP6-C	-7,6875	1,524535	-5,04	0	-13,64574	-1,729261
LP12-S	vs	LP12-C	-8,8125	1,52956	-5,76	0	-14,75236	-2,872645
LP2-S	vs	LP2-C	-9,6875	1,52956	-6,33	0	-15,62736	-3,747645
LP20-S	vs	LP20-C	-6,90625	1,52956	-4,52	0,004	-12,84611	-0,9663946
LP24-S	vs	LP24-C	-10	1,081563	-9,25	0	-14,20011	-5,799888
LP28-S	vs	LP28-C	-14,625	1,52956	-9,56	0	-20,56486	-8,685145
LP7-S	vs	LP7-C	-7,125	1,52956	-4,66	0,002	-13,06486	-1,185145
LP8-S	vs	LP8-C	-7,1875	1,52956	-4,7	0,002	-13,12736	-1,247645
PL12-S	vs	PL12-C	-11	1,524535	-7,22	0	-16,95824	-5,041761

Tabla SM 17.- Diferencias en la longitud de las plantas del parental FL478 con las nuevas líneas Saltol LP 2019

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
LP1-C	vs	FL478-C	-4,15625	1,52956	-2,72	0,729	-10,09611	1,783605
LP1-S	vs	FL478-S	-9,1875	1,524535	-6,03	0	-15,14574	-3,229261
LP11-C	vs	FL478-C	-20,8125	1,524535	-13,65	0	-26,77074	-14,85426

LP11-S	vs	FL478-S	-9,875	1,524535	-6,48	0	-15,83324	-3,916761
LP13-C	vs	FL478-C	-9,875	1,524535	-6,48	0	-15,83324	-3,916761
LP13-S	vs	FL478-S	-4,9375	1,524535	-3,24	0,331	-10,89574	1,020739
LP14-C	vs	FL478-C	-21,4375	1,524535	-14,06	0	-27,39574	-15,47926
LP14-S	vs	FL478-S	-21,5625	1,524535	-14,14	0	-27,52074	-15,60426
LP16-C	vs	FL478-C	-10,59375	1,52956	-6,93	0	-16,53361	-4,653895
LP16-S	vs	FL478-S	-11,8125	1,524535	-7,75	0	-17,77074	-5,854261
LP17-C	vs	FL478-C	-9,09375	1,52956	-5,95	0	-15,03361	-3,153895
LP17-S	vs	FL478-S	-10,625	1,524535	-6,97	0	-16,58324	-4,666761
LP21-C	vs	FL478-C	-5,96875	1,52956	-3,9	0,047	-11,90861	-0,0288946
LP21-S	vs	FL478-S	-10,5	1,524535	-6,89	0	-16,45824	-4,541761
LP22-C	vs	FL478-C	0,3125	1,524535	0,2	1	-5,645739	6,270739
LP22-S	vs	FL478-S	-4,25	1,524535	-2,79	0,698	-10,20824	1,708239
LP25-C	vs	FL478-C	-8,6875	1,52956	-5,68	0	-14,62736	-2,747645
LP25-S	vs	FL478-S	-17,25	1,524535	-11,31	0	-23,20824	-11,29176
LP26-C	vs	FL478-C	-0,5625	1,524535	-0,37	1	-6,520739	5,395739
LP26-S	vs	FL478-S	-1,9375	1,524535	-1,27	1	-7,895739	4,020739
LP27-C	vs	FL478-C	-11,84375	1,52956	-7,74	0	-17,78361	-5,903895
LP27-S	vs	FL478-S	-13,125	1,524535	-8,61	0	-19,08324	-7,166761
LP29-C	vs	FL478-C	-5,4375	1,52956	-3,55	0,14	-11,37736	0,5023554
LP29-S	vs	FL478-S	-3,9375	1,524535	-2,58	0,842	-9,895739	2,020739
LP30-C	vs	FL478-C	-3,09375	1,52956	-2,02	0,992	-9,033605	2,846105
LP30-S	vs	FL478-S	-2,9375	1,524535	-1,93	0,998	-8,895739	3,020739
LP31-C	vs	FL478-C	-4,96875	1,52956	-3,25	0,305	-10,90861	0,9711054
LP31-S	vs	FL478-S	-2,8125	1,524535	-1,84	0,999	-8,770739	3,145739
LP3-C	vs	FL478-C	-8	1,524535	-5,25	0	-13,95824	-2,041761
LP3-S	vs	FL478-S	-6,375	1,524535	-4,18	0,019	-12,33324	-0,4167609
LP4-C	vs	FL478-C	-11,4375	1,524535	-7,5	0	-17,39574	-5,479261

LP4-S	vs	FL478-S	-9,75	1,524535	-6,4	0	-15,70824	-3,791761
LP5-C	vs	FL478-C	-5,71875	1,52956	-3,74	0,08	-11,65861	0,2211054
LP5-S	vs	FL478-S	-2,9375	1,524535	-1,93	0,998	-8,895739	3,020739
LP6-C	vs	FL478-C	-18,5	1,524535	-12,13	0	-24,45824	-12,54176
LP6-S	vs	FL478-S	-7,5625	1,524535	-4,96	0,001	-13,52074	-1,604261
LP12-C	vs	FL478-C	-8,96875	1,52956	-5,86	0	-14,90861	-3,028895
LP12-S	vs	FL478-S	-6,8125	1,52956	-4,45	0,006	-12,75236	-0,8726446
LP2-C	vs	FL478-C	-6,28125	1,52956	-4,11	0,023	-12,22111	-0,3413946
LP2-S	vs	FL478-S	-5	1,52956	-3,27	0,291	-10,93986	0,9398554
LP20-C	vs	FL478-C	-8,625	1,52956	-5,64	0	-14,56486	-2,685145
LP20-S	vs	FL478-S	-4,5625	1,52956	-2,98	0,51	-10,50236	1,377355
LP24-C	vs	FL478-C	-2,53125	1,324638	-1,91	0,997	-7,675316	2,612816
LP24-S	vs	FL478-S	-1,5625	1,324638	-1,18	1	-6,706566	3,581566
LP28-C	vs	FL478-C	-1,84375	1,52956	-1,21	1	-7,783605	4,096105
LP28-S	vs	FL478-S	-5,5	1,52956	-3,6	0,124	-11,43986	0,4398554
LP7-C	vs	FL478-C	-9,78125	1,52956	-6,39	0	-15,72111	-3,841395
LP7-S	vs	FL478-S	-5,9375	1,52956	-3,88	0,05	-11,87736	0,0023554
LP8-C	vs	FL478-C	-4,53125	1,52956	-2,96	0,527	-10,47111	1,408605
LP8-S	vs	FL478-S	-0,75	1,52956	-0,49	1	-6,689855	5,189855
PL12-C	vs	FL478-C	-3,1875	1,52956	-2,08	0,987	-9,127355	2,752355
PL12-S	vs	FL478-S	-3,3125	1,52956	-2,17	0,978	-9,252355	2,627355

Tabla SM 18.- Diferencias en la longitud de las plantas del parental PL12 con las nuevas líneas Saltol LP 2019

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
PL12-C	vs	LP1-C	0,96875	1,52956	0,63	1	-4,971105	6,908605
PL12-S	vs	LP1-S	5,875	1,524535	3,85	0,06	-0,0832391	11,83324
PL12-C	vs	LP11-C	4,625	1,524535	3,03	0,492	-1,333239	10,58324

PL12-S	vs	LP11-S	6,5625	1,524535	4,3	0,011	0,6042609	12,52074
PL12-C	vs	LP13-C	6,625	1,524535	4,35	0,01	0,6667609	12,58324
PL12-S	vs	LP13-S	1,625	1,524535	1,07	1	-4,333239	7,583239
PL12-C	vs	LP14-C	18,1875	1,524535	11,93	0	12,22926	24,14574
PL12-S	vs	LP14-S	18,25	1,524535	11,97	0	12,29176	24,20824
PL12-C	vs	LP16-C	7,40625	1,52956	4,84	0,001	1,466395	13,34611
PL12-S	vs	LP16-S	8,5	1,524535	5,58	0	2,541761	14,45824
PL12-C	vs	LP17-C	5,90625	1,52956	3,86	0,054	-0,0336054	11,84611
PL12-S	vs	LP17-S	7,3125	1,524535	4,8	0,001	1,354261	13,27074
PL12-C	vs	LP21-C	2,78125	1,52956	1,82	0,999	-3,158605	8,721105
PL12-S	vs	LP21-S	7,1875	1,524535	4,71	0,002	1,229261	13,14574
PL12-C	vs	LP22-C	-3,5625	1,524535	-2,34	0,948	-9,520739	2,395739
PL12-S	vs	LP22-S	0,9375	1,524535	0,61	1	-5,020739	6,895739
PL12-C	vs	LP25-C	5,5	1,52956	3,6	0,124	-0,4398554	11,43986
PL12-S	vs	LP25-S	13,9375	1,524535	9,14	0	7,979261	19,89574
PL12-C	vs	LP26-C	-2,6875	1,524535	-1,76	1	-8,645739	3,270739
PL12-S	vs	LP26-S	-1,375	1,524535	-0,9	1	-7,333239	4,583239
PL12-C	vs	LP27-C	8,65625	1,52956	5,66	0	2,716395	14,59611
PL12-S	vs	LP27-S	9,8125	1,524535	6,44	0	3,854261	15,77074
PL12-C	vs	LP29-C	2,25	1,52956	1,47	1	-3,689855	8,189855
PL12-S	vs	LP29-S	0,625	1,524535	0,41	1	-5,333239	6,583239
PL12-C	vs	LP30-C	-0,09375	1,52956	-0,06	1	-6,033605	5,846105
PL12-S	vs	LP30-S	-0,375	1,524535	-0,25	1	-6,333239	5,583239
PL12-C	vs	LP31-C	1,78125	1,52956	1,16	1	-4,158605	7,721105
PL12-S	vs	LP31-S	-0,5	1,524535	-0,33	1	-6,458239	5,458239
PL12-C	vs	LP3-C	4,75	1,524535	3,12	0,425	-1,208239	10,70824
PL12-S	vs	LP3-S	3,0625	1,524535	2,01	0,995	-2,895739	9,020739
PL12-C	vs	LP4-C	8,1875	1,524535	5,37	0	2,229261	14,14574

PL12-S	vs	LP4-S	6,4375	1,524535	4,22	0,016	0,4792609	12,39574
PL12-C	vs	LP5-C	2,53125	1,52956	1,65	1	-3,408605	8,471105
PL12-S	vs	LP5-S	-0,375	1,524535	-0,25	1	-6,333239	5,583239
PL12-C	vs	LP6-C	7,5625	1,524535	4,96	0,001	1,604261	13,52074
PL12-S	vs	LP6-S	4,25	1,524535	2,79	0,698	-1,708239	10,20824
PL12-C	vs	LP12-C	5,78125	1,52956	3,78	0,071	-0,1586054	11,72111
PL12-S	vs	LP12-S	3,5	1,52956	2,29	0,953	-2,439855	9,439855
PL12-C	vs	LP2-C	3,09375	1,52956	2,02	0,992	-2,846105	9,033605
PL12-S	vs	LP2-S	1,6875	1,52956	1,1	1	-4,252355	7,627355
PL12-C	vs	LP20-C	5,4375	1,52956	3,55	0,14	-0,5023554	11,37736
PL12-S	vs	LP20-S	1,25	1,52956	0,82	1	-4,689855	7,189855
PL12-C	vs	LP24-C	-0,65625	1,324638	-0,5	1	-5,800316	4,487816
PL12-S	vs	LP24-S	-1,75	1,324638	-1,32	1	-6,894066	3,394066
PL12-C	vs	LP28-C	-1,34375	1,52956	-0,88	1	-7,283605	4,596105
PL12-S	vs	LP28-S	2,1875	1,52956	1,43	1	-3,752355	8,127355
PL12-C	vs	LP7-C	6,59375	1,52956	4,31	0,01	0,6538946	12,53361
PL12-S	vs	LP7-S	2,625	1,52956	1,72	1	-3,314855	8,564855
PL12-C	vs	LP8-C	1,34375	1,52956	0,88	1	-4,596105	7,283605
PL12-S	vs	LP8-S	-2,5625	1,52956	-1,68	1	-8,502355	3,377355

Tabla SM 19.- Valores estadísticos de la longitud de las plantas 2019, comparación entre tratamientos salino y no salino líneas MS

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
IR64S-S	vs	IR64S-C	-1,875	1,975602	-0,95	1	-8,939812	5,189812
MS12-S	vs	MS12-C	-14,9375	1,975602	-7,56	0	-22,00231	-7,872688
MS14-S	vs	MS14-C	-2,84375	1,975602	-1,44	0,997	-9,908562	4,221062
MS17-S	vs	MS17-C	-7,9375	1,975602	-4,02	0,011	-15,00231	-0,8726877
MS21-S	vs	MS21-C	-3,625	1,975602	-1,83	0,953	-10,68981	3,439812

MS23-S	vs	MS23-C	-7,875	1,975602	-3,99	0,012	-14,93981	-0,8101877
MS25-S	vs	MS25-C	-8,6875	1,975602	-4,4	0,002	-15,75231	-1,622688
MS28-S	vs	MS28-C	-9,625	1,975602	-4,87	0	-16,68981	-2,560188
MS3-S	vs	MS3-C	3,46875	1,975602	1,76	0,969	-3,596062	10,53356
PM37-S	vs	PM37-C	-1,71875	1,975602	-0,87	1	-8,783562	5,346062

Tabla SM 20.- Diferencias en la longitud de las plantas del parental IR64-Saltol con las nuevas líneas Saltol MS 2019

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
MS12-C	vs	IR64S-C	11,3125	1,975602	5,73	0	4,247688	18,37731
MS12-S	vs	IR64S-S	-1,75	1,975602	-0,89	1	-8,814812	5,314812
MS14-C	vs	IR64S-C	-3,84375	1,975602	-1,95	0,921	-10,90856	3,221062
MS14-S	vs	IR64S-S	-4,8125	1,975602	-2,44	0,634	-11,87731	2,252312
MS17-C	vs	IR64S-C	-9,0625	1,975602	-4,59	0,001	-16,12731	-1,997688
MS17-S	vs	IR64S-S	-15,125	1,975602	-7,66	0	-22,18981	-8,060188
MS21-C	vs	IR64S-C	-19,75	1,975602	-10	0	-26,81481	-12,68519
MS21-S	vs	IR64S-S	-21,5	1,975602	-10,88	0	-28,56481	-14,43519
MS23-C	vs	IR64S-C	5,375	1,975602	2,72	0,417	-1,689812	12,43981
MS23-S	vs	IR64S-S	-0,625	1,975602	-0,32	1	-7,689812	6,439812
MS25-C	vs	IR64S-C	-2,8125	1,975602	-1,42	0,997	-9,877312	4,252312
MS25-S	vs	IR64S-S	-9,625	1,975602	-4,87	0	-16,68981	-2,560188
MS28-C	vs	IR64S-C	3,125	1,975602	1,58	0,99	-3,939812	10,18981
MS28-S	vs	IR64S-S	-4,625	1,975602	-2,34	0,704	-11,68981	2,439812
MS3-C	vs	IR64S-C	-5,96875	1,975602	-3,02	0,228	-13,03356	1,096062
MS3-S	vs	IR64S-S	-0,625	1,975602	-0,32	1	-7,689812	6,439812
PM37-C	vs	IR64S-C	-1,96875	1,975602	-1	1	-9,033562	5,096062
PM37-S	vs	IR64S-S	-1,8125	1,975602	-0,92	1	-8,877312	5,252312

Tabla SM 21.- Diferencias en la longitud de las plantas del parental PM37 con las nuevas líneas Saltol MS 2019

Líneas/Tratamientos			Contraste	Error Estándar	t	P> t	[95% Intervalo Confianza]	
MS12-C	vs	PM37-C	-13,28125	1,975602	-6,72	0	-20,34606	-6,216438
MS12-S	vs	PM37-S	-0,0625	1,975602	-0,03	1	-7,127312	7,002312
MS14-C	vs	PM37-C	1,875	1,975602	0,95	1	-5,189812	8,939812
MS14-S	vs	PM37-S	3	1,975602	1,52	0,994	-4,064812	10,06481
MS17-C	vs	PM37-C	7,09375	1,975602	3,59	0,048	0,0289377	14,15856
MS17-S	vs	PM37-S	13,3125	1,975602	6,74	0	6,247688	20,37731
MS21-C	vs	PM37-C	17,78125	1,975602	9	0	10,71644	24,84606
MS21-S	vs	PM37-S	19,6875	1,975602	9,97	0	12,62269	26,75231
MS23-C	vs	PM37-C	-7,34375	1,975602	-3,72	0,032	-14,40856	-0,2789377
MS23-S	vs	PM37-S	-1,1875	1,975602	-0,6	1	-8,252312	5,877312
MS25-C	vs	PM37-C	0,84375	1,975602	0,43	1	-6,221062	7,908562
MS25-S	vs	PM37-S	7,8125	1,975602	3,95	0,014	0,7476877	14,87731
MS28-C	vs	PM37-C	-5,09375	1,975602	-2,58	0,524	-12,15856	1,971062
MS28-S	vs	PM37-S	2,8125	1,975602	1,42	0,997	-4,252312	9,877312
MS3-C	vs	PM37-C	4	1,975602	2,02	0,89	-3,064812	11,06481
MS3-S	vs	PM37-S	-1,1875	1,975602	-0,6	1	-8,252312	5,877312

Experimento 2: Optimización *in vitro* de la resistencia al herbicida

Tabla SM 22. - Prueba de χ^2 para las cuatro concentraciones de herbicida y el tratamiento sin herbicida ($p < 0.05$).

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
0	188.544	155.407
2.5 μM	0.226	0.186
3 μM	15.997	13.186
3.25 μM	12.593	10.380
3.5 μM	43.710	36.028

Chi calculado	476.25
Chi de la tabla	9.49
DF	4
Pvalor	<0,0001

Tabla SM 23. - Prueba de χ^2 para todas las concentraciones de herbicidas ($p < 0.05$).

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
0 μM	24.418	64.604
2.5 μM	27.168	71.878

Chi calculado	188.068
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	<0.0001

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
0 μM	54.369	94.525
3 μM	56.382	98.026

Chi calculado	303.301
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	<0.0001

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
0 μM	51.568	92.302
3.25 μM	52.826	94.553

Chi calculado	291.249
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	<0.0001

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
0 μ M	83.210	113.625
3.5 μ M	79.882	109.080

Chi calculado	385.797
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	<0.001

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
2.5 μ M	5.937	3.691
3 μ M	5.533	3.440

Chi calculado	18.601
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	<0.0001

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
2.5 μ M	4.703	3.033
3 μ M	4.330	2.792

Chi calculado	14.858
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	<0.0001

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
2.5 μ M	17.125	8.543
3 μ M	14.776	7.371

Chi calculado	47.814
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	<0.0001

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
3 μ M	0.082	0.037
3.25 μ M	0.081	0.037

Chi calculado	0.237
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	0.6265

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
3 μ M	2.647	0.914
3.5 μ M	2.450	0.846

Chi calculado	6.857
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	0.0088

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Supervivientes	No supervivientes
3.25 μ M	3.688	1.333
3.5 μ M	3.456	1.249

Chi calculado	9.726
Chi de la tabla	3.841
DF	1
Pvalor	0.0018

Tabla SM 24.- Prueba de χ^2 para todas las plantas supervivencias entre líneas ($p < 0.05$).

Chi-cuadrado		
Líneas	Supervivientes	No supervivientes
L01	1.096	0.903
L02	0.005	0.004
L03	0.928	0.765
C997	1.089	0.898
XF6	0.018	0.015
RP01	1.470	1.211

Chi calculado	8.403
Chi de la tabla	11.070
DF	5
Pvalor	<0.0500

Tabla SM 25.- Prueba de chi-cuadrado para todas las plantas homocigotas y heterocigotas según las concentraciones de herbicidas ($p < 0.05$).

Chi-cuadrado		
Concentraciones	Homocigotas	Heterocigotas
0 μ M	536.413	10.522
2.5 μ M	101.794	14.944
3 μ M	1.736	39.055
3.25 μ M	5.329	46.167
3.5 μ M	2.069	31.165

Chi calculado	789.193
Chi de la tabla	7.815
DF	4
Pvalor	<0,0001

Tabla SM 26.- Prueba de chi-cuadrado para el resultado de la PCR plantas homocigotas y heterocigotas para cada tipo de líneas ($p < 0.05$).

Chi-cuadrado		
Líneas	Supervivientes	No supervivientes
L01	0.001	0.000
L02	0.178	0.044
L03	0.318	0.079
C997	0.556	0.138
XF6	0.531	0.132
RP01	0.084	0.021

Chi calculado	2.082
Chi de la tabla	11.070
DF	5
Pvalor	0,8377

Experimento 3: Estudio de la resistencia al herbicida en líneas europeas de arroz

Tabla SM 27.- Prueba de χ^2 para las líneas comerciales durante las cuatro estaciones del año y la generación de los cruces desde la F1 hasta el BC4F1 ($p < 0.05$).

Chi-cuadrado			
Líneas	Emasculación	Embriones	Mutantes
L01	0.016	0.435	0.558
L02	0.032	0.433	0.504
C997	0.448	0.001	0.232
COP8	0.608	0.002	0.328

Chi calculado	3.597
Chi de la tabla	5.348
DF	6
Pvalor	<0.7210

Chi-cuadrado			
Líneas	Emasculación	Embriones	Mutantes
L01	2.391	0.662	0.025
L02	30.350	2.067	5.560
C997	0.835	0.281	0.037
L03	0.710	17.693	57.783
RP01	0.883	8.179	23.231
XF5	4.578	0.542	0.314

Chi calculado	156.122
Chi de la tabla	9.342
DF	10
Pvalor	<0.0001

Chi-cuadrado			
Líneas	Emasculación	Embriones	Mutantes
L01	5.942	10.266	23.240
L02	4.708	1.352	0.004
C997	0.021	1.078	7.799
XF5	2.411	1.572	1.209
L03	1.337	5.377	53.701
RP01	32.939	6.043	1.925

Chi calculado	160.925
Chi de la tabla	9.342
DF	10
Pvalor	<0.0001

Chi-cuadrado			
Líneas	Emasculación	Embriones	Mutantes
L01	18.471	1.546	0.045
L02	7.743	1.142	0.078
C997	112.930	12.221	0.020
XF6	2.702	0.049	1.400
L03	75.812	4.106	1.460
RP01	1.612	0.420	0.145

Chi calculado	241.902
Chi de la tabla	9.342
DF	10
Pvalor	<0.0001

Chi-cuadrado			
Líneas	Emasculación	Embriones	Mutantes
L01	6.685	1.634	1.067
L02	3.196	1.959	0.040
C997	29.336	8.865	2.669
XF6	3.900	0.000	6.346
L03	23.223	5.777	3.566
RP01	10.882	0.534	8.478

Chi calculado	118.156
Chi de la tabla	9.342
DF	10
Pvalor	<0,0001

Tabla SM 28.- Prueba de χ^2 para la confirmación de plantas heterocigotas mediante una PCR-Digestión.

CHI-CUADRADO		
Cruce F1	Homocigotas	Heterocigotas
L01 X LIH	0.733	0.131
L02 X LIH	1.002	0.179
MP17 X LIH	0.473	0.085
MP18 X LIH	1.068	0.191

Chi calculado	3.862
Chi de la tabla	7.814
DF	3
Pvalor	0,2770

CHI-CUADRADO		
Cruce F1-BC1	Homocigotas	Heterocigotas
BC1LH1	27.195	7.826
BC1LH2	5.952	1.713
BC1CM7	5.481	1.578
C997 X (LIHxMP18)	0.392	0.113
RP01 X LIH	3.711	1.068
L03 X LIH	129.958	9.595

Chi calculado	194.581
Chi de la tabla	11.07
DF	5
Pvalor	0,0001

CHI-CUADRADO		
Cruce F1-BC2	Homocigotas	Heterocigotas
BC2LH1	1.647	0.057
BC2LH2	3.772	0.131
BC2CM7	0.036	0.001
BC1LH3	0.009	0.000
BC1RP01	0.874	0.030
BC1XF5	0.063	0.002

Chi calculado	6.624
Chi de la tabla	11.07
DF	5
Pvalor	0,2501

CHI-CUADRADO		
Cruce F1-BC3	Homocigotas	Heterocigotas
BC3LH1	1.074	0.005
BC3LH2	0.961	0.005
BC3CM7	0.250	0.001
BC2LH3	23.695	0.112
BC2RP01	0.612	0.003
BC2XF6	0.052	0.000

Chi calculado	26.771
Chi de la tabla	11.07
DF	5
Pvalor	0,0001

CHI-CUADRADO		
Cruce F1-BC4	Homocigotas	Heterocigotas
BC4LH1	1.154	0.032
BC4LH2	1.047	0.029
BC4CM7	0.081	0.002
BC3LH3	0.027	0.001
BC3RP01	0.107	0.003
BC3XF6	3.686	0.102

Chi calculado	6.270
Chi de la tabla	11.07
DF	5
Pvalor	0,2808