

REGENERACIÓN *IN VITRO* Y EVALUACIÓN AGRONÓMICA DE SOMACLONES DE ARROZ BAJO ESTRÉS SALINO Y TÉRMICO

IN VITRO REGENERATION AND AGRONOMIC EVALUATION OF SOMACLONES OF RICE UNDER SALINE AND THERMIC STRESS

Guillermo E. Delgado-Paredes^{1*}, Carmen R. Gastelo-Terrones¹, Jorge Chanamé-Céspedes¹ y Consuelo Rojas-Idrogo¹

¹ Departamento Académico de Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Ciudad Universitaria, Juan XXIII N° 391, Lambayeque, Perú.

* Autor para correspondencia E-mail: guidelg2001@yahoo.es

RESUMEN

La salinidad y el estrés térmico afectan negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas de arroz, por otra parte existe la necesidad de desarrollar métodos alternativos de fitomejoramiento, como la variación somaclonal, que es una novedosa e importante fuente de variabilidad inducida en cultivos celulares. El objetivo de este estudio fue obtener somaclones de arroz (*Oryza sativa* L.), de los cv. Tallán y Viflor, a partir de callos inducidos del escutelo de las semillas y evaluar su comportamiento agronómico bajo condiciones de estrés salino y térmico. El medio de cultivo MS, suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 5-8 mg L⁻¹, indujo el mayor porcentaje de callos (mayores de 10 mm de diámetro). La regeneración de brotes se observó en medio de cultivo MS suplementado con ácido naftalenacético (ANA) 2 mg L⁻¹, benzilaminopurina (BAP) 1,5 mg L⁻¹ y kinetina (KIN) 2 mg L⁻¹. Cada brote regenerado se consideró un somaclón. Se evaluaron 17 somaclones por cultivar y como testigos se utilizaron plantas provenientes de propagación convencional. Los resultados indicaron que numerosos somaclones superaron al testigo. Tallán superó a Viflor en rendimiento con 3,1 t ha⁻¹ de grano en cáscara respecto a 2,2 t ha⁻¹. En el cultivo tradicional, bajo condiciones óptimas, el rendimiento de los cv. Tallán y Viflor es 9,1 y 8,9 t ha⁻¹, respectivamente. Los bajos rendimientos de los somaclones se atribuyeron a los estreses salino y térmico y probablemente a la variabilidad generada en el proceso de inducción de callos y regeneración de plantas.

Palabras clave: inducción de callos, organogénesis, *Oryza sativa*, salinidad, temperatura baja.

ABSTRACT

Salinity and thermal stress adversely affect growth and development of rice plants. Therefore, there is a need to develop alternative methods to conventional breeding; in this context, somaclonal variation is a novel and important source of variability from cell cultures for plant improvement. The aim of this study was to obtain rice somaclones (*Oryza sativa* L.) of Tallán and Viflor cultivars, from callus induced in the scutellum of seeds and evaluate their agronomic performance, under saline and thermal stress conditions. The MS culture medium, supplemented with 5-8 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), induced the highest percentages of callus (greater than 10 mm in diameter). Shoot regeneration was observed in MS medium supplemented with naphthaleneacetic acid (NAA) 2 mg L⁻¹, benzilaminopurine (BAP) 1.5 mg L⁻¹ and kinetin (KIN) 2 mg L⁻¹. Each shoot regenerated was considered a somaclon. Seventeen somaclones of both cultivars were evaluated and conventionally propagated plants were used as control. The results show that many somaclones of Tallán and Viflor cultivars were better than the control. The yield of Tallán cv. was higher than Viflor cv., with 3.1 t ha⁻¹ shell grain versus 2.2 t ha⁻¹, respectively. Under optimal conditions, the traditional crop of Tallán

and Viflor reached yields of 9.1 and 8.9 t ha⁻¹, respectively. Low yields are attributed to salt stress and thermal conditions, and probably to the variability induced in the process of callus induction and plant regeneration.

Key words: callus induction; organogenesis; low temperature; *Oryza sativa*; salinity.

INTRODUCCIÓN

El arroz, *Oryza sativa* L., es la más importante especie entre las 24 que conforman el género. Su cultivo probablemente se inició hace 10.000 años en muchas regiones lluviosas de Asia tropical y subtropical, desde donde se extendió a otras regiones tropicales del mundo (Acevedo et al., 2006). A nivel mundial, si se considera la superficie cosechada, su cultivo ocupa el segundo lugar después del trigo; sin embargo, su importancia como cultivo alimenticio es mayor puesto que proporciona más calorías (80%) por hectárea en relación con cualquier otro cultivo de cereales, resultando una buena alternativa en la solución de problemas socio-económicos de vastos sectores de la población mundial (AIA, 2004).

A comienzos de la década pasada, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2001) estimó que para el año 2005 se requerirían aproximadamente 190 millones adicionales de toneladas de arroz, cifra que debería incrementarse en los años subsiguientes; sin embargo, esta situación en la actualidad ha cambiado positivamente puesto que si bien la producción mundial de arroz en 2011 alcanzó 720,0 millones, en 2012 se incrementó a 732,3 millones, 1,7% más que la estimación revisada de 2011 (FAO, 2012).

No obstante estos resultados, los programas de mejoramiento genético en arroz, de diversos países productores mundiales, continúan desarrollando la estrategia de incrementar el cultivo del arroz híbrido, debido al mayor rendimiento obtenido como consecuencia de la heterosis (Álvarez et al., 2008); sin embargo, otras alternativas merecen ser consideradas para incrementar el área de cultivo y obtener mayor tolerancia a diversos estreses biológicos y físico-químicos. Una de ellas es el uso de la biotecnología, específicamente el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

En la década pasada los trabajos sobre organogénesis (Khatoon et al., 2003; Tariq et al., 2008; Kamal et al., 2009) y embriogénesis somática (Khalida y Al-Forhan, 2006; Biswas y Mandal, 2007), principalmente en semillas maduras de arroz, alcanzaron mayor relevancia; estos procesos morfogénicos que se iniciaron con la inducción del callo organogénico o embriogénico en células epidermales del escutelo (Khatoon et al., 2003), sirvieron para inducir una nueva forma de

variabilidad genética en cultivo de tejidos cual es la variación somaclonal.

En efecto, la variación somaclonal es una forma rápida de generar variación genética y fenotípica en plantas de propagación sexual y vegetativa. En los últimos años se han publicado numerosas revisiones de literatura sobre el tema (Kaeppler et al., 2000; Rai et al., 2011) y sobre arroz los trabajos generales de Sun y Zheng (1990) y Adkins et al. (1990), y recientemente el trabajo de Miyao et al. (2012), indicando que una de las causas es la transposición de retrotransposones, aun cuando muchos aspectos de los mecanismos que conllevan a la variación somaclonal permanecen desconocidos. En cultivo de tejidos la variación somaclonal puede manifestarse como eventos somáticos o meióticos estables que en todo caso resultan importantes cuando el producto final es propagado y vendido como semilla (Kaeppler et al., 2000).

En el arroz, condiciones estresantes como la salinidad y las bajas temperaturas resultan de mucha importancia puesto que limitan significativamente los niveles de producción y productividad. La salinidad es un problema grave en muchas zonas áridas donde el riego ha ido aumentando paulatinamente la concentración de sales solubles en el suelo, reduciendo el potencial productivo de muchos cultivos (Leidi y Pardo, 2002). En el caso de la temperatura, baja o alta, se conoce que afecta de manera diferente las diversas fases del crecimiento y desarrollo de la planta (Lee, 2001; Oh-e et al., 2007; Julia y Dingkuhn, 2013).

Adicionalmente, las técnicas del cultivo de tejidos, utilizando ápices caulinares y segmentos nodales, callos y suspensiones celulares, se consideran excelentes herramientas para el estudio del efecto de la salinidad y de otros estreses químicos y físicos, como la temperatura. Trabajos sobre inducción de callos y organogénesis en arroz han conllevado a la obtención de variantes somaclonales con tolerancia al frío (Bertin y Bouharmont, 1997), sequía (Biswas et al., 2002), NaCl (Lee et al., 2003) y aluminio (Roy y Mandal, 2005).

Por las razones expuestas, el objetivo del presente trabajo fue regenerar plantas a partir de callos, de los cultivares tradicionales de arroz Tallán y Viflor, cultivados en el norte y nororiente del Perú, y realizar su evaluación agronómica bajo condiciones de estrés salino y térmico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal lo conformó semillas de arroz de los cultivares Tallán y Viflor. El cv. Tallán (PNA 237-F₄-33-1) alcanza una altura de planta de 100-105 cm, tiene un periodo vegetativo semitardío (165-168 días), con un peso de 33,4 g en 1.000 granos, rendimiento total 72,5% (53,8% de grano entero y 18,7% de grano quebrado) y rendimiento de grano con cáscara de 9,13 t ha⁻¹, en tanto que el cv. Viflor (PNA 237-F₄-223-1) alcanza una altura de 100-115 cm, tiene un periodo vegetativo semitardío (160-165 días), con un peso de 35,4 g en 1.000 granos, rendimiento total 72,6% (64,5% de grano entero y 8,1% de grano quebrado) y rendimiento de grano con cáscara de 8,9 t ha⁻¹.

Los cultivares Tallán y Viflor fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Lambayeque, Perú, y en la actualidad solamente sirven como soporte genético en trabajos de mejoramiento, como es el caso del cv. Viflor, progenitor masculino del cv. Pítipo, ampliamente cultivado en la región.

Cultivo de tejidos *in vitro* de arroz

Germinación de semillas. Las semillas, que presentaron óptimas características morfológicas y fitosanitarias, se desinfectaron con alcohol etílico 70% durante un minuto y Clorox® (hipoclorito de sodio 4,9% equivalente a 50 g L⁻¹ de cloro activo) con Tween 20 durante 10 min y se enjuagaron con agua destilada esterilizada. El medio de cultivo se conformó con las sales minerales (macro y micronutrientes) MS (Murashige y Skoog, 1962), las vitaminas tiamina.HCl 1 mg L⁻¹ y m-inositol 100 mg L⁻¹, sacarosa 20 g L⁻¹ y agar 8 g L⁻¹. Antes de incorporar el agar, el pH se ajustó en 5,7 ± 0,1 con HCl y NaOH 0,1N, luego se dispensó en tubos de ensayo y esterilizó en autoclave a 121°C de temperatura durante 20 minutos. Las condiciones ambientales de incubación se ajustaron en 24-26°C, 80-85% de humedad relativa y 5 W m⁻² de irradiancia, con un fotoperiodo de 16:8 h, con luz blanca proveniente de lámparas fluorescentes de 40 W.

Inducción de callos. Se utilizó semillas descascaradas así como vainas de hojas y raíces, ambas de un cm de longitud, obtenidas de plántulas procedentes de semillas germinadas *in vitro*. El medio de cultivo de inducción de callos en vainas de hojas se conformó con las sales minerales MS más 2,4-D (4 mg L⁻¹) y la interacción 2,4-D (4-8 mg L⁻¹) - 2iP (2 isopentenil adenina) (0,5-4 mg L⁻¹), en raíces 2,4-D (2-6 mg L⁻¹) y la interacción 2,4-D (2-8 mg L⁻¹) - 2iP (2-4 mg L⁻¹) y en semillas 2,4-D (2-8 mg L⁻¹) y la interacción 2,4-D (5 mg L⁻¹) - KIN (0,5-

5 mg L⁻¹), suplementado con los aditivos orgánicos CH (1 mg L⁻¹) y EL (1 mg L⁻¹). Las condiciones ambientales de incubación fueron similares a las ajustadas para la germinación de semillas excepto que se realizó en oscuridad total.

Organogénesis indirecta. La regeneración de plántulas se realizó en callos inducidos de semillas, vainas de hojas y raíces, en medio de cultivo MS suplementado con las combinaciones ANA - KIN, ANA - BAP - 2iP, ANA - BAP - AG₃ (ácido giberélico) y ANA - BAP - KIN, en concentraciones de 0,02-2 mg L⁻¹. Después de 30 días de aclimatación las plántulas regeneradas fueron transferidas a maceteros conteniendo 10 kg de suelo de cultivo de textura media con mayor contenido de arcilla y materia orgánica, en condiciones de invernadero (28-32°C de temperatura), y llevadas hasta producción de semilla (F1). Las condiciones ambientales de incubación fueron similares a las ajustadas para la germinación de semillas excepto que la irradiancia fue de 8-10 W m⁻² en un fotoperiodo de 16:8 h. Cada plántula se consideró un probable somaclón.

Evaluación agronómica

Campo experimental. El experimento de evaluación agronómica de los somaclones de arroz cv. Tallán y Viflor se realizó en el 2007, en el Fundo Montesecco (07°08'01" S y 79°31'01" O), distrito de Pacanga, provincia de Chepén, departamento de La Libertad, Perú. El terreno, de topografía plana, presentó un suelo franco-arcilloso, P 8,6 mg kg⁻¹, K 373,5 mg kg⁻¹, MO 1,37%, pH 7,65 y CE 1,46 dS m⁻¹. Los riegos se realizaron con agua de filtración acumulada en un pequeño embalse con CE 1,75 dS m⁻¹ y agua de canal desalinizador con CE 2,050 dS m⁻¹. La información climatológica de temperatura y precipitación fue proporcionada por la Estación Talla (07°15'59"S; 79°25'30"O y 150 msnm), encontrándose en el ámbito geográfico del distrito de Pacanga. La temperatura media entre febrero a agosto fue 21,6°C y de precipitación 2,9 mm. La variación mensual de la temperatura fue ± 3°C en promedio.

Manejo del cultivo. El almácigo se realizó en enero del 2007 en terreno preparado con rastra semipesada y dividido en parcelas inundadas de 50 x 50 cm. El control de malezas fue manual a los 15 y 30 días de instalado. La fertilización se realizó cuando las plantas alcanzaron 15 días de edad con urea 46% N y dosis de 120 kg N ha⁻¹. El trasplante se hizo a mediados de febrero en terreno inundado con agua de filtración y de canal desalinizador. Después del fanguero se delimitaron 108 parcelas de 4 m² (2 x 2 m) con separación de 0,5 m entre parcelas. Se establecieron 36 tra-

tamientos y 3 repeticiones, incluidos los testigos, procedentes de semilla sexual. El distanciamiento entre plantas fue 25 x 25 cm, con la siembra de una planta por golpe y un total de 16 plantas m⁻². El trasplante se realizó con una lámina delgada de agua; luego, cada 2-3 días se realizó el repase de agua para evitar la muerte de los macollos.

La fertilización se realizó a los 15, 30 y 45 días después del trasplante, con nitrato de amonio (33% N) en dosis de 240 kg N ha⁻¹. El control de malezas se realizó con 10 L ha⁻¹ de Propanil: N-(3,4-diclorofenil) propanamida 35,6%. El "gusano de tierra" (*Spodoptera frugiperda*) se controló con 50 L ha⁻¹ de 0,0-dimetil-0,4-nitrofenil fosforotioato 63,0%. Durante el cultivo se detectó la presencia de la "mancha marrón" o "mancha carmelita" (asociación de *Bipolaris* sp. y *Dreschlera* sp.) y la "mancha del grano" (asociado a un complejo de hongos y bacterias), lo que se atribuyó a las condiciones climáticas, puesto que entre los meses de junio a agosto se presentaron días nublados. La cosecha se realizó a mediados de agosto, abarcando un periodo de 145-170 días, para ambas variedades.

En el registro de datos de campo se utilizó el metro cuadrado, el cual se ubicó en el centro de cada parcela de 2 x 2 m, registrándose los siguientes caracteres: altura de planta (tomada de 5 plantas escogidas al azar), número de plantas m², número de macollas/planta, número de panojas/planta, longitud de panojas (tomada de 10 panojas escogidas al azar), porcentaje de granos llenos y vanos (tomados de 10 panojas escogidas al azar fuera del m² de cada parcela) y rendimiento (tomado del total de granos llenos de todas las panojas colectadas en el m²). Para la evaluación de estas variables se utilizó las escalas del sistema de evaluación estándar en arroz.

Análisis estadístico. Los resultados de los experimentos *in vitro* se expresaron en porcentajes en tanto que el diseño estadístico utilizado en la evaluación agronómica fue el Diseño Completamente al Azar DCA (Zar, 2009). Los datos se procesaron a través de un ANAVA de un solo factor, teniendo como tratamientos a cada uno de los 17 somaclones por cultivar más los testigos y tres repeticiones, para cada una de las variables. Luego se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (alfa = 0,05), para determinar las diferencias entre somaclones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de tejidos

La germinación de semillas fue 90-95%, la que se inició a las 24-48 h de sembradas. La inducción de callos en semillas alcanzó niveles superiores a

80% y en algunos casos 100%, en medio de cultivo suplementado con 2,4-D 2 y 5 mg L⁻¹ (Tabla 1). En vainas de hojas, con crecimiento regular fue 10-30% en medio de cultivo con 2,4-D 4 mg L⁻¹, en tanto que en raíces, con crecimiento pobre a regular, fue alrededor de 50% con 2,4-D 4-8 mg L⁻¹ (datos no mostrados en tabla).

Un amplio estudio realizado en más de un centenar de genotipos de arroz determinó el potencial de diversos explantes en la inducción de callos en medio de cultivo suplementado con 2,4-D 2 mg L⁻¹ (Mikami y Kinoshita, 1988), así como la inducción de callos y regeneración de plantas en segmentos radiculares de cultivares *indica* de arroz, considerados recalcitrantes en cultivo de tejidos (Hoque y Mansfield, 2004); sin embargo, en hojas los trabajos son escasos, muy antiguos y los resultados pobres y erráticos. En el trabajo que se presenta, la inducción de callos en hojas y raíces fue muy pobre, no obstante utilizarse concentraciones altas de 2,4-D (2-8 mg L⁻¹) y la combinación 2,4-D - 2iP (datos no mostrados en tabla), de allí que es posible asumir que el proceso estaría fuertemente modulado por la clase de explante, la acción hormonal y el genotipo. Todo lo contrario sucedió con los callos formados en semillas, donde la literatura informó porcentajes superiores a 80% y en concentración de 2,4-D (2-3 mg L⁻¹), considerada relativamente baja (Khatoon et al., 2003; Tariq et al., 2008; Kamal et al., 2009).

En este trabajo ocurrió una situación similar, es decir, se alcanzó altos porcentajes de callos en bajas concentraciones de 2,4-D; asimismo, el suplemento de aditivos orgánicos como CH 1 mg L⁻¹ y EL 1 mg L⁻¹ si bien incrementaron el tamaño de los callos estos no resultaron organogénicos; sacarosa 50 g L⁻¹ solamente indujo la formación de callos con crecimiento regular (Tabla 1). Estudios histológicos determinaron que el 2,4-D estimuló la formación del callo a partir de divisiones celulares que ocurren en el epitelio del escutelo y el mesocotilo, sin embargo, inhibió el crecimiento de la plúmula y la radícula (Khatoon et al., 2003).

Referente a la regeneración de plantas, las tasas alcanzadas fueron muy variables y relativamente bajas, dependiendo del genotipo. Así para Tallán fue 45% y para Viflor 26%, en medio de cultivo suplementado con ANA 2 mg L⁻¹, BAP 1,5 mg L⁻¹ y KIN 2 mg L⁻¹ (datos no mostrados en tabla). Estos resultados se aproximan a los observados por Tariq et al. (2008) y Kamal et al. (2009) quienes informaron una frecuencia de regeneración de plantas ligeramente superior a 50%. Los somaclones de Tallán y Viflor obtenidos *in vitro* se catalogaron con los códigos TL y VF, respectivamente, y el número correspondiente, pero solamente los que sobrevivieron en invernadero se evaluaron en campo.

Tabla 1. Inducción de callos en semillas de arroz de los cultivares Tallán y Viflor con distintas dosis de regulador de crecimiento, aditivos orgánicos y sacarosa.**Table 1. Callus induction in rice seeds of Tallan and Viflor cultivars, with different dosages of growth promoter, organic additive and saccharose.**

Cultivar	Regulador crecimiento		Aditivos orgánicos		Sacarosa	Inducción de callos*			
	2,4-D	KIN	CH	EL		-	+	++	+++
			(mg L ⁻¹)		(g L ⁻¹)	(%)			
Tallán	5,0				20	0	0	0	100
	8,0				20	12	0	13	75
Viflor	5,0				20	0	8	0	82
	8,0				20	15	13	15	57
Tallán	2,0		1,0		30	14	0	14	72
	2,0			1,0	30	0	11	0	89
Viflor	2,0		1,0		30	12	25	13	50
	2,0			1,0	30	0	0	22	78
Tallán	2,0				50	0	56	44	0
Viflor	2,0				50	0	30	70	0
Tallán	5,0	0,5			20	13	0	25	62
		2,0			20	0	25	13	62
		5,0			20	0	25	75	0
Viflor	5,0	0,5			20	0	0	0	100
		2,0			20	0	29	42	29
		5,0			20	56	0	44	0

* -: crecimiento nulo, sin formación de callos; +: crecimiento pobre, callo menor de 5 mm; ++: crecimiento regular, callo entre 6-10 mm; +++: crecimiento óptimo, callo mayor de 10 mm de diámetro.

Reguladores de crecimiento: 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, KIN (kinetina)

Aditivos orgánicos: CH (caseína hidrolizada); EL (extracto de levadura)

Evaluación agronómica

El análisis del suelo del sitio donde se realizaron los ensayos indicó valores de P 8,6 mg kg⁻¹, K 373,5 mg kg⁻¹, MO 1,37% y pH 7,65, lo que indica que el suelo tenía deficiencia en P y MO aunque sin problemas de K; sin embargo, el pH resultó alto lo que arrojó una CE 1,46 dS m⁻¹. Al respecto, en un informe sobre el análisis químico del suelo para el cultivo del arroz se indicó que los niveles de P por debajo de 10 mg kg⁻¹, K entre 0,2-0,4 cmol kg⁻¹ y MO inferior a 1,5%, resultaban bajos, en tanto que el pH igual a 6,5, tenía un nivel alto (Medina y Castilla, 2001). En lo referente al agua utilizada en los riegos, la de filtración con CE 1,75 dS m⁻¹ y la de canal desalinizador con CE 2,050 dS m⁻¹, se consideraron con riesgo de salinidad alto e índice de salinidad 3 (1,5-3,0 dS m⁻¹ a 25°C) (Pizarro, 1996), por lo tanto, el suelo donde se evaluaron los somaclones y el agua utilizada en el riego resultaron perjudiciales.

En la evaluación agronómica realizada en 17

somaclones de arroz (F1) para cada uno de los cultivares ensayados (Tallán y Viflor) y el testigo proveniente de semilla convencional, en lo referente a altura de planta, en el cv. Tallán, TL-43 alcanzó la mayor altura (69,0 cm), resultado estadísticamente significativo (Tabla 2). En el caso del cv. Viflor, VF-17, con 71,6 cm también resultó estadísticamente superior a la mayoría de somaclones (Tabla 3). En la escala de clasificación Standard Evaluation System for Rice (SES) del International Rice Research Institute (IRRI, 2002), por tener una altura de planta menor de 110 cm, se consideran en la escala 1 (plantas semienanas). El reporte del PNA (Programa Nacional de Investigaciones en Arroz) del Perú, sobre un promedio de tres campañas (1979-1982) realizadas en tres localidades de la costa norte del Perú (Valles de Jequetepeque, Chancay y Chira), indicó al cv. Tallán con 105 cm (INIPA, 1983) y en un ensayo realizado con época de siembra noviembre 2001 a julio 2002, en la parte media del valle Chancay

Tabla 2. Caracteres evaluados de 17 somaclones de arroz, en comparación con el testigo: cultivar Tallán.
Table 2. Characteristics evaluated of 17 rice somaclonal variants compared with the control: Tallán cultivar.

Altura de planta cm	Macollaje	Panochas/Planta	Longitud de panoja cm	Plantas m ² No	Granos vanos %	Granos llenos	Rendimiento t ha ⁻¹
TL-43 (69,0) a	TL-43 (10,9) a	TL-43 (9,9) a	TL-38 (21,0) a	TL-46 (16,7) a	TL-32 (60,2) a	TL-43 (80,8) a	TL-43 (3,1) a
TL-38 (64,8) ab	TL-48 (10,6) ab	TL-48 (9,6) a	TL-39 (21,0) ab	TL-31 (16,7) a	TL-31 (55,9) a	TL-44 (74,7) ab	TL-46 (1,9) b
TL-34 (64,5) ab	TL-38 (9,2) ab	TL-38 (8,9) a	TL-34 (20,9) abc	TL-49 (16,7) a	TL-48 (48,5) ab	TL-51 (72,3) ab	TL-49 (1,7) bc
TL-44 (63,8) ab	TL-34 (9,0) ab	TL-46 (8,7) a	TL-48 (20,9) abc	TL-51 (16,3) a	TL-33 (45,2) ab	TL-49 (72,1) ab	TL-44 (1,6) bc
TL-41 (63,0) ab	TL-39 (8,9) ab	TL-39 (8,5) a	TL-46 (20,8) abcd	TL-45 (16,3) a	TL-39 (44,2) ab	TL-To (70,9) ab	TL-45 (1,5) bc
TL-51 (63,0) ab	TL-46 (8,6) ab	TL-34 (8,4) a	TL-44 (20,7) abcde	TL-53 (15,3) a	TL-41 (41,3) ab	TL-38 (70,2) ab	TL-38 (1,5) bc
TL-46 (62,0) ab	TL-32 (8,6) ab	TL-32 (8,1) a	TL-43 (20,5) abcde	TL-43 (15,0) a	TL-53 (39,2) ab	TL-46 (69,5) ab	TL-33 (1,5) bc
TL-31 (61,9) ab	TL-33 (8,5) ab	TL-41 (7,9) a	TL-31 (20,3) abcde	TL-To (15,0) a	TL-42 (37,0) ab	TL-34 (67,4) ab	TL-To (1,4) bc
TL-52 (61,6) ab	TL-To (8,1) ab	TL-33 (7,7) a	TL-51 (20,0) abcde	TL-52 (14,7) a	TL-52 (33,8) ab	TL-45 (65,6) ab	TL-51 (1,3) bc
TL-32 (60,9) ab	TL-41 (8,1) ab	TL-42 (7,6) a	TL-45 (19,9) abcde	TL-32 (14,5) a	TL-45 (34,4) ab	TL-52 (63,2) ab	TL-41 (1,2) bc
TL-49 (60,9) ab	TL-42 (8,0) ab	TL-45 (7,5) a	TL-53 (19,8) abcde	TL-33 (14,3) a	TL-34 (32,6) ab	TL-42 (62,9) ab	TL-42 (1,2) bc
TL-To (60,7) ab	TL-45 (7,9) ab	TL-31 (7,4) a	TL-49 (19,7) abcde	TL-44 (13,5) a	TL-46 (30,5) ab	TL-53 (60,8) ab	TL-53 (1,1) bc
TL-39 (60,7) ab	TL-31 (7,8) ab	TL-To (7,3) a	TL-To (19,6) abcde	TL-34 (13,3) a	TL-38 (29,8) ab	TL-41 (58,8) ab	TL-52 (1,1) bc
TL-45 (60,4) b	TL-44 (7,4) ab	TL-44 (7,2) a	TL-33 (19,5) abcde	TL-41 (13,0) a	TL-To (29,1) ab	TL-39 (55,8) ab	TL-34 (1,1) bc
TL-33 (59,9) b	TL-51 (7,3) ab	TL-51 (6,4) a	TL-42 (19,4) abcde	TL-42 (12,7) a	TL-49 (27,9) ab	TL-33 (54,8) ab	TL-39 (0,8) bc
TL-42 (59,5) b	TL-53 (6,9) ab	TL-49 (6,2) a	TL-32 (19,4) cde	TL-38 (12,0) a	TL-51 (27,7) ab	TL-48 (51,6) ab	TL-31 (0,7) bc
TL-53 (57,5) b	TL-49 (6,9) ab	TL-52 (6,0) a	TL-52 (19,1) de	TL-39 (11,0) a	TL-44 (25,3) ab	TL-31 (44,0) b	TL-32 (0,6) bc
TL-48 (56,6) b	TL-52 (6,1) b	TL-53 (5,9) a	TL-41 (18,9) e	TL-48 (8,0) a	TL-43 (19,2) b	TL-32 (39,8) b	TL-42 (0,3) c
ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16

*Las cifras en las columnas con las mismas letras son significativamente iguales entre sí.

Tabla 3. Caracteres evaluados de 17 somaclones de arroz, en comparación con el testigo: cultivar Viflor.
Table 3. Characteristics evaluated of 17 rice somaclonal variants compared with the control: Viflor cultivar.

Altura de planta cm	Macollaje N°	Panojas/Planta cm	Long. de panoja cm	Plantas m ² N°	Granos vanos %	Granos llenos	Rendimiento t ha ⁻¹
VF-17 (71,6) a	VF-15 (12,8) a	VF-15 (9,6) a	VF-15 (21,1) a	VF-18 (18,0) a	VF-15 (91,9) a	VF-19 (85,4) a	VF-18 (2,2) a
VF-18 (65,9) ab	VF-23 (12,2) a	VF-12 (9,4) a	VF-08 (20,2) ab	VF-To (17,8) ab	VF-17 (61,1) ab	VF-05 (74,7) ab	VF-19 (2,1) ab
VF-19 (63,8) ab	VF-12 (10,2) a	VF-16 (8,9) a	VF-09 (20,1) ab	VF-04 (17,3) ab	VF-23 (60,9) ab	VF-20 (74,0) ab	VF-12 (1,9) abc
VF-09 (63,0) ab	VF-16 (9,9) a	VF-24 (8,5) a	VF-16 (19,9) ab	VF-05 (16,0) ab	VF-08 (54,4) abc	VF-12 (72,4) ab	VF-20 (1,6) abcd
VF-To (62,3) ab	VF-24 (9,9) a	VF-04 (7,9) a	VF-05 (19,4) ab	VF-10 (16,0) ab	VF-10 (54,2) abc	VF-18 (72,0) ab	VF-05 (1,6) abcd
VF-04 (61,7) ab	VF-04 (9,4) a	VF-06 (7,9) a	VF-To (19,3) ab	VF-08 (15,8) ab	VF-09 (50,9) bc	VF-24 (70,2) ab	VF-To (1,5) abcd
VF-20 (61,0) ab	VF-17 (9,3) a	VF-05 (7,8) a	VF-24 (19,2) ab	VF-13 (15,5) ab	VF-04 (44,4) bc	VF-To (66,3) ab	VF-16 (1,2) abcd
VF-24 (60,0) ab	VF-06 (8,8) a	VF-10 (7,8) a	VF-03 (19,2) ab	VF-09 (15,3) ab	VF-13 (42,7) bc	VF-16 (63,7) ab	VF-09 (0,9) abcd
VF-06 (59,9) ab	VF-10 (8,5) a	VF-17 (7,8) a	VF-06 (19,2) ab	VF-12 (15,3) ab	VF-06 (40,9) bc	VF-03 (60,9) ab	VF-10 (0,9) abcd
VF-16 (59,7) ab	VF-05 (8,3) a	VF-09 (7,6) a	VF-19 (19,1) ab	VF-24 (15,3) ab	VF-03 (39,1) bc	VF-06 (59,1) ab	VF-21 (0,9) abcd
VF-12 (59,9) ab	VF-09 (7,9) a	VF-20 (7,5) a	VF-18 (18,9) ab	VF-03 (15,0) ab	VF-16 (36,4) bc	VF-13 (57,3) ab	VF-06 (0,9) abcd
VF-10 (59,3) ab	VF-13 (7,9) a	VF-08 (7,1) a	VF-10 (18,9) ab	VF-20 (15,0) ab	VF-To (33,7) bc	VF-04 (55,6) ab	VF-13 (0,8) abcd
VF-05 (59,1) ab	VF-20 (7,8) a	VF-13 (6,9) a	VF-20 (18,8) ab	VF-06 (15,0) ab	VF-24 (29,8) bc	VF-09 (49,1) ab	VF-03 (0,7) abcd
VF-08 (58,9) ab	VF-08 (7,8) a	VF-To (6,9) a	VF-13 (18,4) ab	VF-16 (15,0) ab	VF-18 (27,9) bc	VF-10 (45,8) abc	VF-08 (0,6) abcd
VF-23 (58,9) ab	VF-03 (7,2) a	VF-19 (6,8) a	VF-12 (18,3) ab	VF-23 (15,0) ab	VF-12 (27,6) bc	VF-08 (45,6) abc	VF-04 (0,5) bcd
VF-13 (57,7) b	VF-19 (7,1) a	VF-23 (6,8) a	VF-17 (18,2) ab	VF-19 (14,7) ab	VF-20 (25,9) bc	VF-23 (39,0) bc	VF-17 (0,5) bcd
VF-03 (56,9) b	VF-To (7,1) a	VF-18 (6,4) a	VF-23 (18,1) ab	VF-17 (12,5) ab	VF-05 (25,3) bc	VF-17 (38,9) bc	VF-23 (0,3) cd
VF-15 (56,8) b	VF-18 (6,7) a	VF-03 (6,1) a	VF-04 (18,1) b	VF-15 (11,0) b	VF-09 (14,3) c	VF-15 (38,1) c	VF-15 (0,1) d
ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16	ALS = 5,16

*Las cifras en las columnas con las mismas letras son significativamente iguales entre sí.

(Lambayeque), el cv. Viflor alcanzó 98,8 cm (Cieza, 2003), ligeramente inferior a lo reportado por INIPA (1983) que indicó 110 cm.

Las diferencias con los resultados del presente trabajo obedecerían a la salinidad y a las temperaturas bajas (alrededor de 16°C en los meses de junio-agosto) presentadas durante la etapa de panojamiento lo que pudo haber impedido la ejecución completa de la panícula y consecuentemente la disminución de su altura (Lee, 2001; Julia y Dingkuhn, 2013).

Respecto al macollamiento, en el cv. Tallán, TL-43 obtuvo 10,9 macollas, estadísticamente igual a casi todos los somaclones evaluados (Tabla 2); en el cv. Viflor no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). En la escala de clasificación del IRRI (2002), por tener una habilidad de formar 10 a 19 macollas/planta, la mayoría se consideró en la escala 5 (media). En el ensayo realizado por Cieza (2003) el cv. Viflor alcanzó 358 macollas m²; sin embargo, habría que considerar que en el trasplante utilizó 4-6 plántulas por golpe con un total de 16 golpes m² lo que arrojó un aproximado de 4,5 macollas/planta, por lo que podemos afirmar que en el trabajo que se presenta la mayoría mostró un macollamiento superior.

Las macollas son ramificaciones del tallo que se originan en las yemas localizadas en la base de los entrenudos no alargados (Nemoto et al., 1995). En condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento muchas yemas no se desarrollan y cuando los nudos no reciben una radiación solar adecuada, consistente en un balance óptimo de radiación roja lejana y radiación roja, se inhibe la formación de yemas (Sasaki et al., 2004), jugando el fitocromo un rol significativo (Smith y Whitelam, 1997); sin embargo, la formación de un número bajo de macollas puede tener efectos benéficos porque entonces se desarrolla un manto foliar abierto que permite la iluminación de los estratos inferiores del follaje (Riveros y Rodríguez, 2010).

En relación al número de panojas por planta (Tablas 2 y 3), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre somaclones de ambos cultivares; se debe mencionar que en el cv. Tallán, TL-43 destacó sobre el resto con 9,9; en el caso del cv. Viflor, destacó VF-15. En cuanto a la longitud de panoja, en el cv. Tallán, TL-38 destacó con 21,0 cm (Tabla 2); en el cv. Viflor, la mayor longitud de panoja se observó en VF-15 (Tabla 3). No se cuenta con información bibliográfica sobre estos parámetros, en ambos cultivares.

Los resultados de número de plantas m² indicaron que el cv. Tallán, y el cv. Viflor no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los somaclones (Tablas 2 y 3). Sobre el parámetro

porcentaje de granos vanos, en el cv. Tallán, TL-32 y TL-31, con 60,2 y 55,9% de granos vanos, superaron significativamente al resto (Tabla 2); en el cv. Viflor, VF-15 presentó el mayor porcentaje de granos vanos (91,9%) (Tabla 3). No se cuenta con información bibliográfica sobre número de plantas m², en ambos cultivares, en tanto en el ensayo realizado por Cieza (2003) el cv. Viflor mostró 9,9% de granos vanos por panícula, no contándose con información bibliográfica sobre este parámetro en el cv. Tallán.

En lo referente al porcentaje de granos llenos, se observó en el cv. Tallán que TL-43 alcanzó 80,8%, estadísticamente similar a los otros (Tabla 2), en tanto que en el caso del cv. Viflor el mayor valor correspondió a VF-19 con 85,3% (Tabla 3). En el ensayo realizado por Cieza (2003), el cv. Viflor alcanzó 90,0% de granos llenos por panícula, resultado muy similar a lo obtenido en el presente trabajo. Las diferencias encontradas obedecerían, a la salinidad y las temperaturas bajas, menores de 20°C (Gunawardena et al., 2003; Shimono et al., 2007), que producen esterilidad de espiguillas y consecuentemente disminución del porcentaje de granos llenos, tal como también ocurre cuando las temperaturas altas son mayores de 35°C (Endo et al., 2009; Chakrabarti et al., 2010).

En rendimiento de grano en cáscara, en el cv. Tallán el mayor valor se observó en TL-43 con 3,1 t ha⁻¹ (Tabla 2); en el caso del cv. Viflor el mayor valor correspondió a VF-18 con 2,2 t ha⁻¹ (Tabla 3). En el cv. Tallán se reportó un rendimiento de 9,3 t ha⁻¹ (INIPA, 1983), en tanto que en el ensayo realizado por Cieza (2003), el cv. Viflor registró un rendimiento de 8,1 y 8,9 t ha⁻¹, similar a lo informado por IDAL (2000) e INIPA (1983), respectivamente.

En general, en el cv. Tallán, TL-43 alcanzó el mayor rendimiento y destacó en las características altura de planta, número de plantas por unidad de superficie, número de panojas por planta y porcentaje de granos llenos, en tanto que en el cv. Viflor, VF-18 registró el mayor rendimiento, no obstante que apenas destacó en las características altura de planta y número de plantas por m². En ambos cultivares la mayoría de los somaclones superaron ampliamente al testigo.

El incremento paulatino de la salinidad del suelo o la necesidad de emplear aguas de riego con una concentración de sales superior a la recomendada, limita el crecimiento y desarrollo de las plantas y consecuentemente el potencial de producción de los cultivos (Läuchli and Grattan, 2007), al afectar las propiedades estructurales y físico-químicas del suelo, lo que puede imponer un estrés adicional al crecimiento de los cultivos (Evangelou y McDonald, 1999).

La sustitución de cultivos sensibles a la salinidad por otros más tolerantes o el disponer de variedades tolerantes de los principales cultivos es la alternativa más viable frente a los altos costos que devienen de la aplicación de técnicas de lavado de suelos; sin embargo, la tolerancia de un cultivo a la reducción de la producción por salinidad es un carácter complejo que involucra respuestas al estrés iónico y osmótico a nivel celular, la coordinación de estas respuestas a nivel de organismo y su interacción con el medio circundante (Yeo, 1998). En tal sentido, la reducción en la capacidad de absorción de agua se manifiesta por la reducción de expansión foliar y la pérdida de turgencia, que conlleva a un aumento del Ca^{2+} libre intracelular, síntesis del ácido abscísico (ABA), entre otras señales químicas (Hasegawa et al., 2000).

Asimismo, el estrés salino conlleva a la obtención de plantas de arroz con severas limitaciones en el crecimiento y rendimiento, puesto que en un suelo salino, la elevada concentración de iones Na^+ y Cl^- (o SO_4^{2-}), produce una interferencia en la absorción de nutrientes (K^+ , Ca^{2+} , NO_3^-) e impide la captación de los mismos, al tiempo que pueden alcanzar niveles citosólicos tóxicos para el metabolismo celular (Leidi y Pardo, 2002). Esto afecta a ambos cultivares, Tallán y Viflor, siendo mayor en el cv. Viflor respecto al cv. Tallán. Sin embargo, el ajuste osmótico inducido por diversos compuestos orgánicos como polioles, trehalosa, fructanos, betaína, prolina, entre otros, ejercerían una función más protectora y/o estabilizante de membranas y enzimas que propiamente osmótica (Hasegawa et al., 2000), lo que permitiría una respuesta más eficiente de determinados somaclones frente al estrés por salinidad.

Por otro lado, la temperatura baja también afecta significativamente el desarrollo del cultivo del arroz, causando daños que varían según la edad de la planta, su estado fisiológico y la duración e intensidad del frío. En el periodo vegetativo se afecta la germinación, hay decoloración de las hojas, se reduce el crecimiento y disminuye la producción de macollas y en el periodo reproductivo ocurre esterilidad en los granos, considerándose como el daño más grave (Cruz, 2010). Se ha mencionado que las temperaturas críticas (por exceso o por defecto) para el desarrollo del cultivo están fuera del rango comprendido entre 20 y 30°C y varían según la variedad del arroz, el tiempo de duración de dicha temperatura, la fluctuación diurna y nocturna de la temperatura, y el estado fisiológico de las plantas (Lee, 2001; Julia y Dingkuhn, 2013).

La esterilidad de las espiguillas de arroz es el resultado de las bajas temperaturas durante el desarrollo de la panícula, lo que compromete la for-

mación del polen, por ejemplo, cuando las plantas fueron sumergidas en agua fría a la temperatura crítica de 19,5°C (Shimono et al., 2007), aunque las bajas temperaturas en las raíces también afectan la esterilidad de las espiguillas (Gunawardena et al., 2003); asimismo, compromete la fertilización de los óvulos (Okuno, 2003), lo que conlleva a una reducción drástica del rendimiento, tal como fue reportado en Australia donde las bajas temperaturas redujeron la producción a 0,68 t ha⁻¹ al año (Farrell et al., 2001). En el presente trabajo, las temperaturas bajas registradas entre mayo a agosto del 2007 afectaron los rendimientos, tanto del testigo como de los somaclones, en ambos cultivares, siendo mayor en el cv. Viflor respecto al cv. Tallán.

CONCLUSIONES

Plantas de arroz de los cultivares Tallán y Viflor, tradicionalmente sembrados en el Perú, fueron regeneradas *in vitro* en medio de cultivo MS con ANA 2 mg L⁻¹, BAP 1,5 mg L⁻¹ y KIN 2 mg L⁻¹, a partir de callos inducidos en el escutelo de la semilla en medio de cultivo MS con 2,4-D 2 y 5 mg L⁻¹.

Las evaluaciones agronómicas de las plantas regeneradas *in vitro* o somaclones, en condiciones de estrés salino y térmico, indicaron que varios de los somaclones superaron al testigo, así, en el cv. Tallán el mayor valor correspondió a TL-43 con 3,1 t ha⁻¹, estadísticamente superior al resto de los somaclones evaluados y al testigo que alcanzó 1,3 t ha⁻¹ y en el cv. Viflor el mayor valor correspondió a VF-18 con 2,2 t ha⁻¹, estadísticamente similar al resto de evaluados y al testigo que alcanzó 1,4 t ha⁻¹.

Se comprobó que si bien el rendimiento de los somaclones de ambos cultivares es bajo, comparado con los resultados en condiciones agronómicas óptimas, las plantas regeneradas a partir de callos pueden utilizarse en el aprovechamiento de suelos marginales y bajo condiciones estresantes.

LITERATURA CITADA

- Acevedo, M., W. Castillo, y U. Belmonte. 2006. Origen, diversidad y evolución del arroz. *Agronomía Trop.* 56:151-170.
- Adkins, S.W., T. Shiraiishi, J.A. McComb, S. Ratanapol, T. Kupkanchanakul T., L.J. Armstrong, and A.L. Schultz. 1990. Somaclonal variation in rice – Submergence tolerance and other agronomic characters. *Physiol. Plant.* 80:647-654.
- Álvarez, R.M., M. Pérez, E. Reyes, O.J. Moreno, N. Delgado, G.T. Torrealba, M.A. Acevedo,

- W.A. Castrillo, M.I. Navas, M. Salazar, O.J. Torres, E.A. Torres, P.J. García, y A. Pérez. 2008. Evaluación comparativa de híbridos y variedades de arroz en los Llanos Centrooccidentales de Venezuela. *Agronomía Trop.* 58:101-110.
- AIA. 2004. El arroz es vida. Año Internacional del Arroz (AIA). Disponible en <http://www.cinu.org.mx/prensa/especiales/2004> (Consulta 5 marzo 2013).
- Bertin, P., and J. Bouharmont. 1997. Use of somaclonal variation and *in vitro* selection for chilling tolerance improvement in rice. *Euphytica* 96:135-142.
- Biswas, J., Chowdhury, B., Bhattacharya, A., and A.B. Mandal. 2002. *In vitro* screening for increased drought tolerance in rice. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 38:525-530.
- Biswas, A., and A.B. Mandal. 2007. Plant regeneration in different genotypes of *indica* rice. *Indian J. Biotechnol.* 6:532-540.
- Cieza, I. 2003. Determinación de época de siembra y edad de cosecha óptima en cinco cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) en la parte media del valle Chancay – Lambayeque. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú. 169 p.
- Chakrabarti, B., P.K. Aggarwal, S.D. Singh, S. Nagarajan, and H. Pathak. 2010. Impact of high temperature on pollen germination and spikelet sterility in rice: comparison between basmati and non-basmati varieties. *Crop & Pasture Science* 61:363-368.
- Cruz, M. 2010. Tolerancia del arroz a la temperatura baja. p. 180-190. En V. Degiovanni, C.P. Martínez, y F. Motta (eds.). *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina*. Tomo I. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD). Cali, Colombia.
- Endo, M., Tsuchiya, T., Hamada, K., Kawamura, S., Yano, K., Ohshima, M., Higashitani, A., Watanabe, M., and Kawagishi-Kobayashi, M. 2009. High temperatures cause male sterility in rice plants with transcriptional alterations during pollen development. *Plant Cell Physiol* 50:1911-1922.
- Evangelou, V.P., and L.M. McDonald. 1999. Influence of sodium on soils of humid regions. p. 17-50. In M. Pessarakli (ed.). *Handbook of Plant and Crop Strees*, Second Edition. CRC Press, New York, USA.
- FAO. 2001. The state of food insecurity in the world. Food Agricultural Organization/Naciones Unidas (FAO), Rome, Italy.
- FAO. 2012. Seguimiento del Mercado de Arroz – Abril de 2012. Food Agricultural Organization/Naciones Unidas (FAO), Roma, Italia.
- Farrell, T.C., K. Fox, R. Williams, and S. Fukai. 2001. The cost of low temperature to the NSW rice industry. *Memorias de la 10th Australian Society of Agronomy Conference*, Hobart, Australia. Available at www.regional.org.au/au/asa/2001 (Accessed 16 Feb 2013).
- Gunawardena, T.A., S. Fukai, and F.P.C Blamey. 2003. Low temperature induced spikelet in rice. II. Effects of panicle and root temperatures. *Aust. J. Agric. Res.* 54:947-956.
- Hasegawa, P.M., R.A. Bressan, J.K. Zhu, and A.K. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:463-499.
- Hoque, Md.E., and J.W. Mansfield. 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of *Indica* rice genotypes. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 78:217-223.
- IDAL. 2000. Informe Final del Programa de Investigación en Arroz. 45 p. Instituto de Desarrollo Agrario de Lambayeque (IDAL), Lambayeque, Perú.
- INIPA. 1983. Nuevas variedades de arroz para costa y selva. 26 p. Manual Técnico N° 16. Instituto Nacional de Investigación y Promoción Agropecuaria (INIPA), Chiclayo, Perú.
- IRRI. 2002. Standard Evaluation System for Rice. 56 p. International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Philippines.
- Julia, C. and M. Dingkuhn. 2013. Predicting temperature induced sterility of rice spikelets requires simulation of crop-generated microclimate. *Eur. J. Agron.* 49:50-60.
- Kaeppeler, S.M., H.F. Kaeppeler, and Y. Rhee. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. In M.A. Matzke, and A.J.M. Matzke (eds.). *Plant Gene Silencing*. *Plant Mol. Biol.* 43:179-188.
- Kamal, M.A.H.M., M.A.Z. Al Munsur, M.S. Hosain, and S. Begum. 2009. Comparative studies of callus induction and plant regeneration from mature embryos in rice mutants. *J. Bangladesh Agril. Univ.* 7:39-45.
- Khaleda, L., and M. Al-Forkan. 2006. Genotypic variability in callus induction and plant regeneration through somatic embryogenesis of five deepwater rice (*Oryza sativa* L.) cultivars of Bangladesh. *Afr. J. Biotechnol* 5:1435-1440.
- Khatoun, M.M., M.H. Ali, and N.V. Desamero. 2003. Effects of genotype and culture media on callus formation and plant regeneration from mature seed scutella culture in rice. *Plant Tiss. Cult.* 13:99-107.

- Läuchli, A., and S.R. Grattan. 2007. Plant growth and development under salinity stresses. p. 1-32. In M.A. Jenks, P.M. Hasegawa and S. Mohan Jain (eds.). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer, Netherlands.
- Lee, M-H. 2001. Low temperature tolerance in rice: The Korean experience. p. 109-117. In S. Fukai and J. Basnayake (eds.). *Increased Lowland Rice Production in the Mekong Region*. ACIAR Proceedings 101. Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, Australia.
- Lee, S.Y., J.H. Lee, and T.O. Kwon. 2003. Selection of salt-tolerant doubled haploids in rice anther culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74:143-149.
- Leidi, E.O., and J.M. Pardo. 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino: Qué hay de nuevo. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. *Revista de Investigación de la Facultad de Ciencias Agrarias*. Disponible en <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev2/5.htm> (Consulta 12 enero 2013).
- Medina, J.H., and L.A. Castilla. 2001. Análisis de suelos como aporte a la nutrición del arroz. *Rev. Arroz (Colombia)* 50:12-14.
- Mikami, T., and T. Kinoshita. 1988. Genotypic effects on the callus formation from different explants of rice, *Oryza sativa* L. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 12:311-314.
- Miyao, A., M. Nakagome, T. Ohnuma, H. Yamagata, H. Kanamori, Y. Katayose, A. Takahashi, T. Matsumoto, and H. Hirochika. 2012. Molecular spectrum of somaclonal variation in regenerated rice revealed by whole-genome sequencing. *Plant Cell Physiol.* 53:256-264.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:437-497.
- Nemoto, K., S. Morita, and T. Baba 1995. Shoot and root development in rice related to the phyllochron. *Crop Sci.* 35:24-29.
- Oh-e, I., Saitoh, K. & Kuroda, T. 2007. Effects of high temperature on growth, yield and dry-matter production of rice grown in the paddy field. *Plant Prod. Sci.* 10:412-422.
- Okuno, K. 2003. Genetics and genomics of cold tolerance in rice. Informe del National Agricultural Research Center for Hokkaido region. In *Memorias de la Tercera Conferencia Internacional de Arroz de Clima Templado reunido en Uruguay*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Montevideo, Uruguay.
- Pizarro, F. 1996. Riegos localizados de alta frecuencia. 513 p. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Rai, M.J., R.K. Kalia, R. Singha, M.P. Gangola, and A.K. Dhawan. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection-An overview of the recent progress. *Environ. Exper. Bot.* 71:89-98.
- Riveros, G., and N.S. Rodríguez, 2010. La fisiología de la planta y la productividad del cultivo. p. 100-116. En V. Degiovanni, C.P. Martínez, y F. Motta (eds.). *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina*. Tomo I. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), Cali, Colombia.
- Roy, B., and A.B. Mandal. 2005. Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploring somaclonal variation. *Euphytica* 145:221-227.
- Sasaki, R., K. Toriyama, Y. Shibata, and M. Sugimoto. 2004. Effect of suppression of tiller emergence on the relationship between seedling density and nodal position of the last visible primary tiller in direct seedling cultivation of rice. *Jpn. J. Crop Sci.* 73:309-314.
- Shimono, H., M. Okada, E. Kanda, and I. Arakawa. 2007. Low temperature-induced sterility in rice: Evidence for the effects of temperature before panicle initiation. *Field Crop. Res.* 101:221-231.
- Smith, H., and G.C. Whitelam. 1997. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ.* 20:840-844.
- Sun, Z.X., and K.L. Zheng. 1990. Somaclonal variation in rice. p. 288-325. In Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 3. Springer-Verlag, Berlín, Germany.
- Tariq, M., Ali, G., Hadi, F., Ahmad, S., Ali, N., and Ali Shah, A. 2008. Callus induction and *in vitro* plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) under various conditions. *Pak. J. Biol. Sci.* 11:255-259.
- Yeo, A.R. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49:915-929.
- Zar, J.H. 2009. *Biostatistical Analysis*. 960 p. 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.