

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

SELECCIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS T2 Y T3 DE
ARROZ (*Oryza sativa* L) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS
VARIETADES TIPO *indica* CR-5272 Y CR-1821. EVALUACIÓN
MORFOLÓGICA Y FENOLÓGICA

Tesis de grado para optar al título de Licenciada en
Genética y Biotecnología

Graciela Saborío Montero

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2004

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**SELECCIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS T2 Y T3 DE
ARROZ (*Oryza sativa* L) OBTENIDAS A PARTIR DE LAS
VARIEDADES TIPO *indica* CR-5272 Y CR-1821. EVALUACIÓN
MORFOLÓGICA Y FENOLÓGICA**

**Tesis de grado para optar al título de Licenciada en
Genética y Biotecnología**

Graciela Saborío Montero

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2004

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

A DIOS TODOPODEROSO

A Dios todopoderoso por haberme permitido vivir esta vida y por haberme dado a conocer a todos los seres queridos que me rodean. A mi familia por su amor y apoyo incondicional. A mi Dios por darme la oportunidad de ser parte del mundo y de experimentar la vida y por ser un gran regalo.

A mis padres, Alejandro y M. Eugenia por darme la vida y más. A mis hermanos Gabriela, Priscilla, Rebeca y Alejandro por todo lo que hemos compartido, las bizcochadas interminables y maravillosas que me enseñaron a luchar y apreciar las cosas importantes de la vida. A mi sobrino Alejandro que llena de alegría mi casa. A Alex por compartir conmigo y apoyarme durante todo este proceso y a Mariela, por ser parte de nuestra familia. A todos los quiero.

AGRADECIMIENTO

Mi enorme agradecimiento a los miembros del tribunal examinador, en especial a Griselda Arrieta por toda su enseñanza, ayuda y orientación en esta investigación. A la Dra Ana M. Espinoza por darme la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Biotecnología del Arroz y por su amistad, gracias.

A todos los compañeros del laboratorio que en algún momento me acompañaron en las giras, en especial a Elena por su compañía en las asoleadas y empapadas. A mis amigos Carlos y Marlon por compartir conmigo durante toda la carrera.

Agradezco a todas las personas que de alguna forma ayudaron en esta tesis.

INDICE

RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO GENERAL	4
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1 SEGUNDA GENERACIÓN (T2)	5
3.1.1 Cultivares y líneas transgénicas	5
3.1.2 Pruebas de tolerancia al herbicida PPT en el invernadero y selección de líneas puras homocigotas T2 para la resistencia al herbicida	7
3.1.3 Germinación de la semilla T2 en invernadero	7
3.1.4 Transplante de líneas T2 al campo	9
3.1.5 Prueba de tolerancia al herbicida PPT en campo	10
3.1.6 Evaluación morfológica y fenológica	10
3.1.6.1 Prefloración ("panzoneo")	11
3.1.6.2 Estado de floración	13
3.1.6.3 Estado de maduración	16
3.1.7 Análisis Estadístico	23
3.2 TERCERA GENERACIÓN (T3)	24
3.2.1 Cultivares y líneas transgénicas	24
3.2.2 Descripción y preparación del terreno	24
3.2.3 Siembra de semilla	24
3.2.4 Prueba de tolerancia al herbicida PPT en campo	24
3.2.5 Evaluación morfológica y fenológica	25
4. RESULTADOS	28
4.1 SEGUNDA GENERACIÓN (T2)	28
4.1.1 Prueba de tolerancia al herbicida PPT en el invernadero	28
4.1.2 Germinación de semilla T2 en campo e invernadero	28
4.1.3 Infección natural con RHBV	30
4.1.4 Prueba de tolerancia al herbicida PPT en campo	32
4.1.5 Evaluación morfológica y fenológica	32
4.1.5.1 Variables cualitativas	33
4.1.5.1.1 Vellosidad predominante de la lámina de la hoja 1	33
4.1.5.1.2 Color predominante de la lámina foliar	33
4.1.5.1.3 Posición predominante de la hoja bandera	34
4.1.5.1.4 Tamaño y color predominante de las aurículas	34
4.1.5.1.5 Forma predominante de la lígula	35
4.1.5.1.6 Tipo de arizado predominante de la semilla y tamaño de las aristas	35
4.1.5.1.7 Color predominante del ápice que forman la lema y la pálea en la espiguilla	36
4.1.5.1.8 Pubescencia predominante de las glumas	36
4.1.5.1.9 Densidad predominante de la panícula	37
4.1.5.1.10 Número de granos vanos (estériles) en el ápice de la panícula	37
4.1.5.1.11 Fertilidad predominante de la panícula	37
4.1.5.1.12 Desgranado predominante de la panícula	38
4.1.5.1.13 Color de las glumas fértiles (lema y pálea) del grano apical de la panícula	38
4.1.5.1.14 Hábito predominante de crecimiento	38

4.1.5.1.15	Capacidad predominante de macollamiento	38
4.1.5.1.16	Resistencia predominante al acame	39
4.1.5.1.17	Exerción predominante de la panícula	39
4.1.5.2	Variables cuantitativas	41
4.1.5.2.1	Días a prefloración ("panzoneo")	41
4.1.5.2.2	Días a antesis	42
4.1.5.2.3	Duración de la antesis	42
4.1.5.2.4	Días a la madurez	42
4.1.5.2.5	Altura de la planta	42
4.1.5.2.6	Longitud de la lámina de la hoja bandera	45
4.1.5.2.7	Ancho de la lámina de la hoja bandera	47
4.1.5.2.8	Longitud de la panícula	49
4.1.5.2.9	Número de ramificaciones de la panícula	51
4.1.5.2.10	Número de granos vanos y llenos de la panícula	53
4.1.5.2.11	Longitud, ancho y espesor de la semilla	56
4.1.6	Análisis de conglomerados	59
4.2	TERCERA GENERACION (T3)	61
4.2.1	Resistencia al herbicida PPT	61
4.2.2	Resistencia a infección natural de RHBV	62
4.2.3	Evaluación morfológica y fenológica	64
4.2.3.1	Variables cualitativas	64
4.2.3.1.1	Capacidad predominante de macollamiento	64
4.2.3.1.2	Resistencia predominante al acame	65
4.2.3.1.3	Número de granos vanos (estériles) en el ápice de la panícula	65
4.2.3.1.4	Exerción predominante de la panícula	65
4.2.3.2	Variables cuantitativas evaluadas en la tercera generación	67
4.2.3.2.1	Altura promedio de la planta	67
4.2.3.2.2	Longitud promedio de la lámina de la hoja bandera	69
4.2.3.2.3	Ancho promedio de la lámina de la hoja bandera	71
4.2.3.2.4	Longitud y número de ramificaciones promedio de la panícula	73
4.2.3.2.5	Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula	77
4.2.4	Destrucción de remanentes	81
4.2.5	Análisis de Conglomerados	82
4.3	COMPARACIÓN DE LA SEGUNDA Y TERCERA GENERACIÓN (T2 y T3)	84
4.3.1	Altura promedio de la planta	85
4.3.2	Longitud de la hoja bandera	86
4.3.3	Ancho de la hoja bandera	87
4.3.4	Longitud de la panícula	88
4.3.5	Ramificaciones de la panícula	89
4.3.6	Número de granos vanos y llenos	90
5.	DISCUSIÓN	92
6.	CONCLUSIONES	97
7.	RECOMENDACIONES	98
8.	BIBLIOGRAFÍA	99

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plásmidos utilizados en la transformación de variedades de arroz CR-1821 y CR-5272.....	6
Figura 2. Esquema del procedimiento utilizado en la selección y evaluación de las líneas transgénicas T2 en el segundo ensayo de campo.....	8
Figura 3. Lote experimental establecido para el ensayo de arroz transgénico en Agribiotecnología de Costa Rica, S.A.....	9
Figura 4. Estados de desarrollo de la planta de arroz.....	10
Figura 5. Forma predominante de la lígula.....	12
Figura 6. Estructura y posición de las aurículas en la hoja de la planta de arroz.....	12
Figura 7. Hábito predominante de crecimiento.....	14
Figura 8. Posición predominante de la hoja bandera.....	16
Figura 9. Estructura de la semilla de arroz.....	18
Figura 10. Densidad predominante de la panícula.....	19
Figura 11. Ejerción predominante de la panícula.....	20
Figura 12. Panícula de arroz, su longitud y características adyacentes.....	21
Figura 13. Establecimiento del tercer ensayo de campo en la finca San Rafael, Guápiles.....	25
Figura 14. Evaluación en invernadero de la resistencia a PPT de plantas T2 de líneas transgénicas de arroz y planta T2 germinada en campo con daño por herbivoría.....	30
Figura 15. Porcentaje de germinación de líneas transgénicas y variedades control en invernadero, Alajuela.....	31
Figura 16. Porcentaje de infección con RHBV de líneas T2 en campo.....	31
Figura 17. Líneas transgénicas y plantas control cinco días después de ser aplicadas con una dosis de 5ml/L de FINALE.....	32
Figura 18. Color predominante de la lámina foliar en plantas derivadas de la variedad CR-5272 (A) y CR-1821 (B).....	34
Figura 19. Aristado predominante de la semilla.....	35
Figura 20. Pubescencia predominante de las glumas.....	36
Figura 21. Número de plantas con ejerción incluida, coincidente o emergida de las plantas evaluadas en la generación T2.....	40
Figura 22. Número promedio de días a prefloración según grupo de transformación, segunda generación (T2), Alajuela.....	41

Figura 23.	Altura promedio de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.....	44
Figura 24.	Altura promedio de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.	44
Figura 25.	Longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.....	46
Figura 26.	Longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.	46
Figura 27.	Ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.....	48
Figura 28.	Ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.	48
Figura 29.	Longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.....	50
Figura 30.	Longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.....	50
Figura 31.	Número promedio de ramificaciones de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.....	52
Figura 32.	Número promedio de ramificaciones de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.	52
Figura 33.	Número total de granos promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 según grupo de transformación, Alajuela.....	54
Figura 34.	Número total de granos promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.	54
Figura 35.	Número total de granos promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.....	55
Figura 36.	Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.....	55
Figura 37.	Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.....	56
Figura 38.	Longitud, ancho y espesor promedio de la semilla de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.....	57
Figura 39.	Longitud, ancho y espesor promedio de la semilla de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.....	57
Figura 40.	Conformación de los conglomerados de las líneas transgénicas de arroz T2 y los controles no transgénicos en Agrobiotecnología, Alajuela.....	60

Figura 41.	Líneas transgénicas y control una semana después de la aplicación de FINALE..	61
Figura 42.	Porcentaje de infección por RHBV en líneas transgénicas AS10, Guápiles.....	62
Figura 43.	Porcentaje de infección por RHBV en líneas transgénicas C37S-7, Guápiles.....	63
Figura 44.	Porcentaje de infección por RHBV en líneas transgénicas CPM80, Guápiles.....	63
Figura 45.	Porcentaje de infección por RHBV en líneas transgénicas CPM10, Guápiles.....	64
Figura 46.	Número de plantas con excreción incluida, coincidente o emergida de las plantas evaluadas en la generación T3, Guápiles.....	66
Figura 47.	Altura promedio de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.....	68
Figura 48.	Altura promedio de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.	68
Figura 49.	Longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.....	70
Figura 50.	Longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.	70
Figura 51.	Ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.....	72
Figura 52.	Ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles..	72
Figura 53.	Longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.....	74
Figura 54.	Longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.....	74
Figura 55.	Número promedio de ramificaciones de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.....	76
Figura 56.	Número promedio de ramificaciones de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.	76
Figura 57.	Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.....	78
Figura 58.	Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.....	78
Figura 59.	Destrucción de remanentes de líneas transgénicas de arroz transgénico.....	81
Figura 60.	Configuración de los conglomerados de las líneas transgénicas de arroz T3 y los controles no transgénicos en Guápiles.....	83

Figura 61.	Comparación de la altura promedio de la planta de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación.....	85
Figura 62.	Comparación de la longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación.....	86
Figura 63.	Comparación del ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación.....	87
Figura 64.	Comparación de la longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación.....	88
Figura 65.	Comparación del número de ramificaciones promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación.....	89
Figura 66.	Comparación del número promedio de granos vanos y llenos en la panícula, de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación.....	90
Figura 67.	Número total de granos en la panícula, en la tercera y segunda generación.....	91

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nomenclatura de las líneas transgénicas de las variedades CR-5272 CR-1821 transformadas con el gen de la nucleoproteína de cápside del virus de la hoja blanca (RHBV), según el plásmido utilizado.....	5
Cuadro 2. Distribución de semilla de las líneas transgénicas en los sitios de establecimiento del tercer ensayo de campo y banco de germoplasma.....	26
Cuadro 3. Líneas puras de una población T2 de plantas transgénicas que expresan el gen <i>bar</i> obtenidas de la prueba de tolerancia al PPT en invernadero.....	29
Cuadro 4. Porcentaje de plantas en cada variable cualitativa para las líneas transgénicas de arroz y los controles.....	105-108
Cuadro 5. Promedio y desviación estándar de las características cuantitativas evaluadas en las líneas transgénicas de arroz según la estrategia de transformación de la segunda generación (T2). Alajuela. 2002.....	109
Cuadro 6. Promedio y desviación estándar de las variables cuantitativas graficadas para las líneas transformadas y las variedades CR-5272 y CR1821 en la segunda generación (T2). Alajuela. 2002.....	110-111
Cuadro 7. Significancias del análisis de variancia para las siete características de producción, de acuerdo al grupo de transformación, dentro y entre grupos. Alajuela (T2).....	112
Cuadro 8. Líneas transgénicas de arroz T2 seleccionadas para la tercera evaluación de campo.	58
Cuadro 9. Porcentaje de plantas en cada variables cualitativas evaluadas para las líneas transgénicas de arroz y los controles CR-5272 y CR-1821 en la generación T3.....	103
Cuadro 10. Promedio y desviación estándar de las características cuantitativas evaluadas en las líneas transgénicas de arroz, según la estrategia de transformación, tercera generación (T3). Guápiles 2003.....	114
Cuadro 11. Promedio y desviación estándar de las variables cuantitativas graficadas para las líneas transgénicas de arroz y las variedades CR-5272 y CR-182, tercera generación (T3). Guápiles 2003.....	115-117
Cuadro 12. Significancias del análisis de variancia para las siete características de producción, de acuerdo al grupo de transformación, dentro y entre grupos. Guápiles (T3).....	118
Cuadro 13. Líneas transgénicas de arroz T3 seleccionadas para la tercera evaluación de campo.....	79-80

RESUMEN

Se establecieron dos ensayos de campo uno en Alajuela y el otro en Guápiles durante los años 2002 y 2003. La finalidad de los ensayos fue seleccionar líneas de arroz transgénico y evaluar su morfología y fenología. Estas líneas fueron modificadas genéticamente con el gen de la nucleoproteína de cápside del virus de la hoja blanca (RHBV) en sentido y antisentido o flanqueadas por secuencias de anclaje a la matriz nuclear (MAR), así como con los fragmentos 5' y 3' del mismo gen. También contienen el gen *bar* el cual se utilizó como gen marcador y que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (PPT). La semilla de la generación T2 se plantó en el invernadero y cuatro semanas después de la germinación fue evaluada para su resistencia al herbicida PPT. Los resultados de la resistencia al PPT mostraron que el gen *bar* estaba activo en las líneas transgénicas de arroz T2 y que la enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa se expresa en concentraciones suficientemente altas para detoxificar el PPT, del mismo modo que se observó en la generación T1, cuando se aplicó en la dosis del herbicida recomendada para el control de malezas (1L/ha).

Las semillas de las líneas T2 resistentes al herbicida PPT se plantaron en la empresa Agribiotecnología, S.A (Alajuela) y la semilla de las líneas T3 en Guápiles, donde se evaluó la resistencia al PPT, la resistencia al virus de la hoja blanca (RHBV) y características morfológicas cualitativas y cuantitativas utilizadas para describir las variedades de arroz (*Oriza sativa*). Los resultados reflejaron que las líneas transgénicas mostraron una resistencia clara al herbicida PPT. Sin embargo, se observaron síntomas de hoja blanca en las líneas experimentales transformadas con fragmentos truncados del gen de la nucleoproteína de cápside, tanto en la generación T2 como en la T3, quizás como un posible efecto de silenciamiento.

Con respecto a los resultados de las evaluaciones morfológicas, las líneas transgénicas y los controles fueron significativamente diferentes en su morfología a un nivel de 1% ($p < \alpha$), para siete características altura de la planta, largo y ancho de la hoja bandera, longitud y número de ramificaciones y número de granos vanos y llenos, tanto en la segunda como en la tercera generación. Las diferencias fueron evidentes, las plantas transgénicas presentaron mayores longitudes de altura y hoja, así como una mayor producción de ramificaciones y número de granos que las variedades control. Sin embargo las plantas de la T2 estudiadas en Alajuela presentaron gran cantidad de granos vanos y problemas de fertilidad, situación totalmente inversa a la observada en

las plantas de la generación T3 sembradas en Guápiles, por lo que se determinó que los problemas observados en Alajuela se debieron a los cambios drásticos de temperatura y humedad durante el día y la noche, además del estrés hídrico y posibles deficiencias nutricionales en las que crecieron las plantas en Alajuela. Las condiciones ambientales jugaron un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo normal de la planta.

Este estudio, destaca la importancia de estas líneas transgénicas de arroz a mediano o largo plazo en su uso potencial en forma directa o en programas de fitomejoramiento dado el caso en el que se obtengan líneas que no presenten todas las características deseadas en una variedad.

1. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L) es uno de los cultivos más importantes en el mundo. Es el mayor recurso de nutrición humana ya que constituye del 25 al 50% de la dieta diaria de unos 2000 millones de personas en el mundo, principalmente en países subdesarrollados (Rathore *et al.*, 1993; Ronald, 1997).

En 1999 la producción total de arroz en el mundo ascendió a 596.485.338 toneladas (ton), cosechadas en 155.128.138 hectáreas (ha) con un rendimiento promedio de 3.84 ton/ha (FAO, 2000). En Costa Rica, la producción anual de arroz para el período de 1997 a 1998 fue de 284.693 (ton) en un área sembrada de 70.299 ha. En Liberia, se produjeron 36.946 ton y en Parrita 24.050 ton (CNPa, 1999).

La producción de arroz en el país está severamente limitada por la contaminación con arroces maleza, que ocasionan graves pérdidas en el cultivo tanto en América Latina como en Estados Unidos (Diarra *et al.*, 1985; Agüero, 1996). En Costa Rica el 1% del área de arroz producida entre 1997 y 1998 fue descartado por contaminación con arroces maleza (CNPa, 1999). Por otra parte, la enfermedad causada por el virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) es otro de los factores que limitan la producción del arroz en América tropical. El RHBV es un tenuivirus transmitido por el insecto delfácido *Tagosodes orizicolus* y afecta a la mayoría de las variedades comerciales utilizadas en América tropical. Los síntomas de esta enfermedad incluyen formación de estrías cloróticas en las hojas, enanismo, panículas estériles y glumas deformadas con una consecuente disminución en la producción (Jennings, 1963; Vargas, 1985).

El control de la enfermedad se realiza mediante la aplicación de insecticidas sintéticos, para reducir las poblaciones de los delfácidos vectores, sin embargo esta práctica es poco efectiva y produce problemas ambientales dada la alta toxicidad de los insecticidas. Se han probado medidas culturales para reducir infecciones tempranas, tales como la destrucción de rastrojos y la eliminación de hospederos alternos; pero debido al comportamiento de las poblaciones del vector estas prácticas han tenido poco éxito (Peñaranda *et al.*, 1999). También, se han utilizado variedades tolerantes al virus obtenidas a partir de fuentes de resistencia identificadas en arroz japónica (Lamey, 1967; Zeigler *et al.*, 1988). Sin embargo, los cruces entre variedades tipo *indica* y

genética son difíciles por los problemas de incompatibilidad que producen esterilidad de los híbridos (Zeigler *et al.*, 1994, Lentini, 1995a, 1995b). Además, algunos cultivares con resistencia al insecto vector son muy susceptibles al virus (Lentini *et al.*, 1995b).

La ingeniería genética de plantas permite la inserción y expresión de genes virales que interfieren en el ciclo del virus en la planta (Baulcombe, 1996). La resistencia derivada del patógeno incluye estrategias tales como el uso de bloqueadores moleculares, la expresión de moléculas señuelo, el uso de sistemas de defensa generales activados en plantas y la degradación específica del ácido ribonucleico (ARN) viral por silenciamiento postranscripcional de genes (Wilson, 1993; Hull, 1994).

Muñoz (2000) produjo plantas de arroz transgénicas mediante bombardeo de callos embriogénicos de las variedades CR-1821 y CR-5272. Se obtuvieron plantas fértiles de arroz CR-1821 transformadas con el gen de la nucleoproteína de cápside del RiHEV ya sea en sentido o en antisentido (copia complementaria). Además, se utilizaron los fragmentos inicial y terminal del gen (regiones 5' y 3') a las líneas transgénicas obtenidas con estos fragmentos se les denominó líneas N y C respectivamente. Por otra parte, se produjeron líneas derivadas de la variedad CR-5272 transformadas con el gen de la nucleoproteína de cápside subclonado en un casete bordeado de secuencias de anclaje a la matriz nuclear (MAR) de tabaco; las líneas fueron denominadas CPM. En todos los casos, las secuencias virales se colocaron bajo el control del promotor constitutivo de la actina I del arroz.

El gen *bar* se utilizó como agente de selección de las células transformadas durante el cultivo *in vitro*. Este gen fue aislado originalmente de *Streptomyces hygroscopicus* y *S. viridochromogenes* (Thompson *et al.*, 1987); y codifica para una enzima que inactiva el herbicida fosfinotricina (PPT o biolafos) o el análogo sintético glutosinato de amonio (Wehrmann *et al.*, 1996). El PPT inhibe la glutamina sintetasa (GS), enzima clave en el metabolismo del nitrógeno que asimila el amonio producido por la fotorespiración y deaminación. Como un análogo estructural de la GS el sustrato glutamato ó PPT inhibe irreversiblemente la GS. Esta inhibición produce la acumulación de amonio que en plantas resulta en el cese de la fotosíntesis y disrupción de la estructura de los cloroplastos (De Vine *et al.*, 1993; Gaunt *et al.*, 1999).

Los procesos de mejoramiento genético, independientemente de la vía que utilicen ya sea por mejoramiento convencional o por ingeniería genética, requieren de la evaluación y selección de las líneas obtenidas.

La evaluación en campo de las plantas transgénicas puede realizarse mediante análisis secuencial o por análisis múltiple temprano (McElroy, 1999). En el primer caso, se enfoca en la evaluación molecular de los diferentes eventos de transformación con el fin de determinar la integración (Southern blot) y expresión de los transgenes (Northern blot y ELISA). Simultáneamente, se llevan a cabo estudios de segregación y expresión del transgen en la progenie bajo condiciones de invernadero durante varias generaciones, previo al ensayo de campo. Esta estrategia tiene la desventaja de que consume mucho tiempo y trabajo, además se demora varias generaciones, aunque se obtiene una gran cantidad de información sobre los eventos de transformación. Estos últimos no necesariamente tienen características agronómicas favorables.

En el caso de evaluación múltiple temprana, las líneas se seleccionan en el invernadero utilizando una característica de interés, la resistencia a un herbicida por ejemplo y luego se transfieren al campo para el incremento de semilla y la evaluación agronómica. Esta estrategia tiene la ventaja de que aquellas líneas promisorias se seleccionan temprano en el proceso y los análisis moleculares se realizan posteriormente, utilizando un número reducido de líneas (McElroy, 1999).

En el caso de las líneas transgénicas de arroz, se utilizó el análisis temprano de la progenie para la evaluación de las plantas transgénicas T1 de las líneas derivadas de las variedades CR-1821 y CR-5272. Los resultados preliminares indicaron que las plantas transformadas con el gen de la nucleoproteína de cápside y el gen *bar* eran tolerantes al herbicida PPT, 18 % de las líneas evaluadas no presentaron síntomas de hoja blanca incluso después de dos o tres inoculaciones consecutivas con insectos venúferos. La resistencia al herbicida indica que el gen *bar* está activo en las líneas transgénicas, al menos en la generación T1 y que la enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa se expresa en concentraciones suficientemente altas para detoxificar el PPT (Muñoz, 2000).

Sin embargo en el primer ensayo de campo con la generación T1 de las líneas transgénicas CR-5272T y CR-1821T se observaron diferencias en la altura de las plantas de las líneas transgénicas en comparación con los controles y entre ellos. En vista de que la ingeniería genética requiere de un protocolo de cultivo *in vitro*, en el cual se da la rediferenciación de células embriogénicas en los callos o suspensiones celulares, es posible que se produjeran cambios en la morfología de las líneas transgénicas con respecto a la variedad original. La variación puede observarse en características morfológicas como altura de la planta, número y forma de las hojas, morfología de la panícula, características fisiológicas como tolerancia a estrés, resistencia a patógenos, y características fenológicas como días a floración, sensibilidad al fotoperíodo. Por estas razones esta investigación tiene el siguiente objetivo general.

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la morfología y fenología, resistencia al RHBV y al herbicida PPT de las líneas transgénicas de arroz CR-5272T y CR-1821T y determinar su similitud con las variedades tipo sin transformar que les dieron origen, con base en las características agronómicas utilizadas para definir y calificar las variedades de *Oryza sativa*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1.1 Analizar la segregación del gen *bar* en la generación T2 de líneas de arroz transgénico, utilizando la tolerancia al herbicida fosfinotricina (PPT) como criterio de evaluación.
- 2.1.2 Seleccionar en el invernadero las líneas puras homocigotas tolerantes al herbicida glufosinato de amonio.
- 2.1.3 Evaluar la tolerancia de las líneas homocigotas al herbicida fosfinotricina (PPT) establecidas en condiciones de campo.
- 2.1.4 Evaluar las características morfológicas y fenológicas de las líneas transgénicas de arroz y las variedades originales.
- 2.1.5 Seleccionar las mejores líneas de arroz transgénico de acuerdo a las características evaluadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 SEGUNDA GENERACIÓN (T2)

3.1.1 Cultivares y líneas transgénicas

Se utilizó semilla de la generación T2 de plantas de arroz transgénicas producidas mediante bombardeo de callos embriogénicos de las variedades CR-1821 y CR-5272. La semilla se obtuvo a partir de los siguientes materiales:

3.1.1.1 Líneas T1 y T2 de arroz CR-1821T transformadas con el gen de la nucleoproteína de cápside del virus de la hoja blanca (RHBV) en orientación sentido (S) y una copia complementaria en antisentido (AS). Además de las líneas de arroz N y C transformadas con los fragmentos 5' y 3' del mismo gen, respectivamente (Figura 1). Todas estas líneas se derivaron de plantas de la variedad CR-1821.

3.1.1.2 Líneas T1 de arroz de las variedades CR-5272 denominadas CPM, transformadas con el gen de la nucleoproteína de cápside subclonado en un casete bordeado de secuencias de anclaje a la matriz nuclear (MAR) de tabaco (Cuadro 1).

El gen de interés se colocó bajo el control de un promotor constitutivo (actina I del arroz), mientras que el gen *bar* está controlado, por el promotor 35S del CaMV, y se utilizó como marcador de selección (Muñoz, 2000).

Cuadro 1. Nomenclatura de las líneas transgénicas de las variedades CR-5272 CR-1821 transformadas con el gen de la nucleoproteína de cápside del virus de la hoja blanca (RHBV), según el plásmido utilizado.

Genes de interés	Varietal original	Línea
Nucleoproteína de cápside del RHBV en orientación sentido	CR-1821T	CP-A1; CP-A1-2; CP # 2; CP # 2-1; CP A5; CP A13; CP R3
Nucleoproteína de cápside del RHBV en orientación anti-sentido	CR-1821T	AS9; AS10; AS-19
Extremo 5' del gen de la nucleoproteína de cápside del RHBV	CR-1821T	N1; N4 T; N4 S; N5 T; N5 S; N6; N9 T; N9 S; N10; N11 T; N11 S; N15; N16
Extremo 3' del gen de la nucleoproteína de cápside del RHBV	CR-1821T	C31; C32; C33; C34 T; C34 S; C36; C37 T; C37S
Nucleoproteína de cápside del RHBV en orientación sentido, flanqueada por secuencias MAR	CR-5272T	CPM 1; CPM 2; CPM4; CPM6; CPM7; CPM 9; CPM 10 CPM13; CPM78; CPM 80

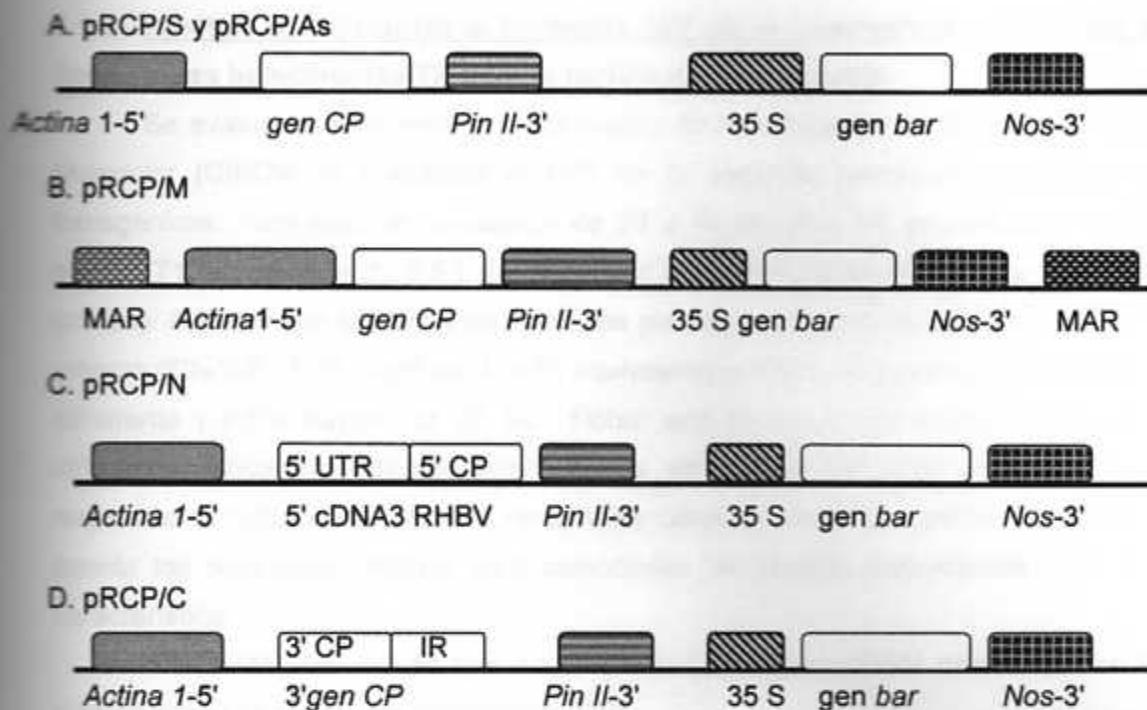


Figura 1. Plásmidos utilizados en la transformación de variedades de arroz CR-1821 y CR-5272, con el gen de la proteína de cápside del RHBV en orientación sentido y antisentido (A) o bordeado por las secuencias MAR (B), además de las regiones 3' y 5' del mismo gen (C y D, respectivamente). CP (gen de la proteína de cápside), PinII 3' (terminador del gen del inhibidor de proteasas de la papa), 35 S (promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor, CaMV), Nos 3' (terminador del gen de la sintetasa de la nopalina), IR (region intergénica) (Muñoz, 2000).

3.1.2 Pruebas de tolerancia al herbicida PPT en el invernadero y selección de líneas puras homocigotas T2 para la resistencia al herbicida

Se evaluó en el invernadero del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) la tolerancia al PPT de la segunda generación de 39 líneas transgénicas. Para esto se sembraron de 20 a 40 semillas T2, procedentes de 580 plantas T1, en macetas de 0,5 L de capacidad con suelo autoclavado (60% suelo, 40% granza). A las cuatro semanas de edad, las plantas se asperjaron con glufosinato de amonio (FINALE 15 SL, AgrEvo 5 ml/lt, equivalente a 200 L de mezcla por ha), con un adherente (0,5% Kaytar Act 26 SL, Rohm and Hass). Como control negativo se utilizaron plantas no transformadas de las variedades CR-5272 y CR-1821. La respuesta al herbicida se evaluó cinco días después de la aplicación, tomando en cuenta los siguientes criterios para seleccionar las plantas homocigotas para esta característica:

3.1.2.1 Macetas en las que no se presentó ninguna planta muerta (todas las plantas vivas) se consideró homocigota (RR).

3.1.2.2 Si en la maceta había tanto plantas vivas como muertas, la línea se considerará heterocigota (Rr).

3.1.2.3 Si todas las plantas de la maceta resultaron muertas se consideró recesiva (rr).

3.1.2.4 Se contó el número de plantas resistentes (vivas) y el número de plantas susceptibles (muertas) por maceta por línea.

El proceso de producción y evaluación de semilla T2 de las líneas transgénicas se presenta en la figura 2.

3.1.3 Germinación de la semilla T2 en invernadero

Se sembró semilla de las líneas T2 homocigotas seleccionadas según la prueba de tolerancia al PPT descrita anteriormente, en el invernadero de Agribiotecnología S.A., en San Antonio del Tejar, Alajuela. Las semillas de cada línea, previamente tratadas con Vitavax, se colocaron en bandejas de 98 hoyos con sustrato compuesto por fibra de coco, suelo, granza y urea. Se sembró un total de 20 a 40 semillas de cada línea a una densidad de una semilla por hoyo. Además, se sembró semilla de las variedades CR-5272 y CR-1821 como controles. Las bandejas se colocaron en un sector del invernadero con alta luminosidad, temperatura de 28 - 30°C durante el día y con riego constante mediante microaspersores.

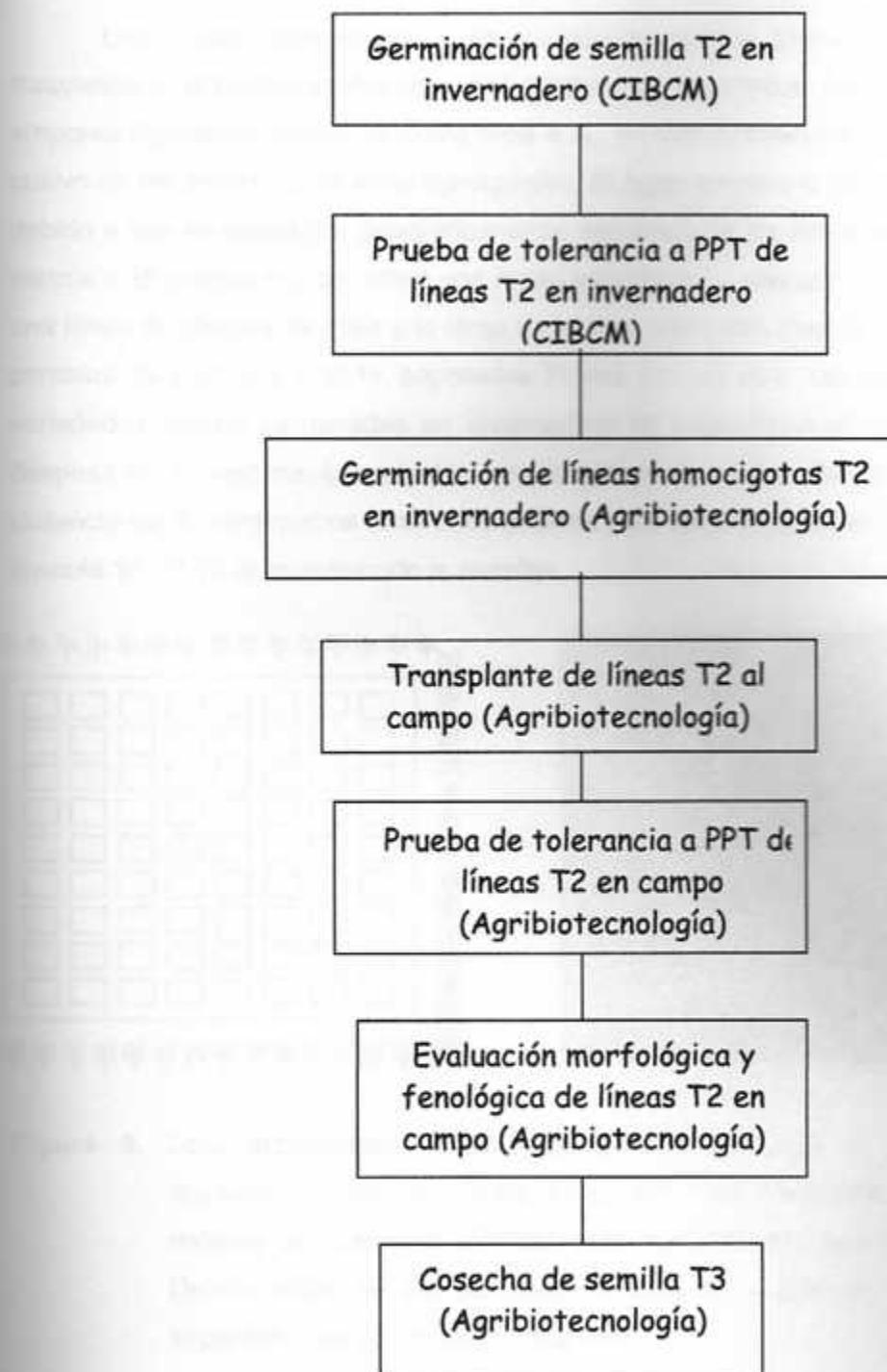


Figura 2. Esquema del procedimiento utilizado en la selección y evaluación de las líneas transgénicas T2 en el segundo ensayo de campo.

3.1.4 Transplante de líneas T2 al campo

Las líneas transgénicas y las variedades control germinadas en invernadero se trasplantaron al campo cuatro semanas después de la siembra. Se acondicionó un lote en la empresa Agribiotecnología de Costa Rica S.A., en San Antonio del Tejar de Alajuela, para el cultivo de las líneas T2 de arroz transgénico. El lugar permite la contención de este material debido a que se encuentra geográficamente separado de las áreas arroceras. El lote de 28 metros x 25 metros (m) se cubrió con malla antipájaros a una altura de 3 m y se bordeó con una hilera de plantas de maíz a lo largo de todo el perímetro (Figura 3). El lote se dividió en parcelas de 2,30 m x 2,30 m, separadas 70 cm, una de otra. Las líneas transgénicas y las variedades control germinadas en invernadero se trasladaron al campo, cuatro semanas después de la siembra. Las plantas se sembraron en hileras dentro de las parcelas a una distancia de 40 centímetros (cm) entre plantas y 35 cm entre hileras. El suelo se fertilizó con fórmula 10-30-10 al momento de la siembra.

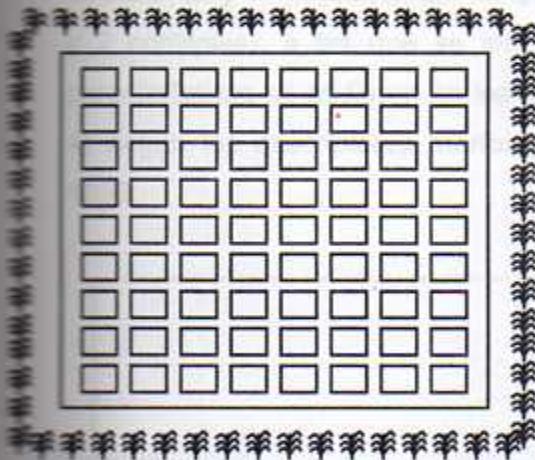


Figura 3. Lote experimental establecido para el ensayo de arroz transgénico en Agribiotecnología de Costa Rica, S.A. **(A)** Esquema del área de siembra dividida en parcelas. El lote está rodeado por una barrera de maíz. **(B)** Demarcación de las parcelas de 2,30 m x 2,30 m con una distancia de separación de 70 cm entre cada una.

3.1.5 Prueba de tolerancia al herbicida PPT en campo.

Para evaluar la tolerancia de las líneas transgénicas al PPT en campo, se aplicó a las plantas una solución de 5 ml/L de FINALE® 15 SL (AgrEvo), (200 L de mezcla por ha) con 0.5% Kaytar Act 26 SL®, Rohm and Hass). La solución se aplicó también a las plantas control de las variedades CR-1821 y CR-5272. La aplicación se realizó con una boquilla cónica 8002, cuatro semanas después del transplante y la tolerancia de las líneas transgénicas al herbicida, se evaluó cinco días después de la aplicación, para lo cual se contó el número de plantas susceptibles por línea.

También se evaluó la resistencia al RHBV mediante infección natural.

3.1.6 Evaluación morfológica y fenológica

Se realizaron mediciones semanales de 34 características, 20 características cualitativas y 14 cuantitativas. Se evaluó 15 plantas por parcela (39 líneas transgénicas y 2 controles), a las que se les colocó una placa metálica para identificarlas. Las características se midieron en los diferentes estados del desarrollo de la planta (Figura 4) según los descriptores morfológicos y fenológicos basados en CIAT, 1993; IRRI, 1996.

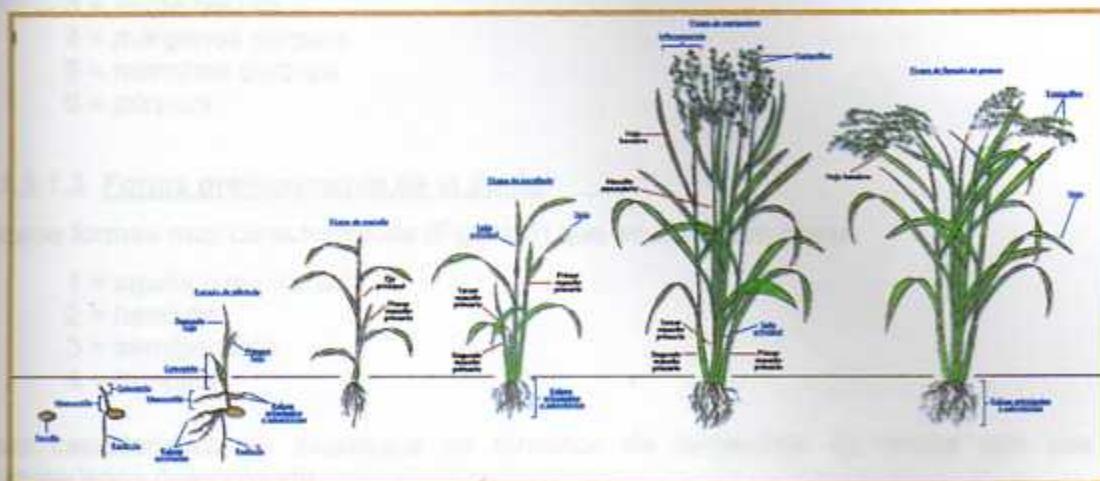


Figura 4. Estados de desarrollo de la planta de arroz.

3.1.6.1 Prefloración ("panzoneo")

3.1.6.1.1. Vellosidad predominante de la lámina de la hoja 1

Indica la presencia o ausencia de vellos sobre la lámina foliar. La descripción se realiza sobre el haz de la hoja 1 que se encuentra por debajo de la hoja bandera, en el tallo más alto de la planta. Se pasan los dedos índice y pulgar a lo largo de toda la lámina de la hoja, de la parte distal hacia la basal. Se clasifica como:

- 1 = glabra o lisa
- 3 = pubescente de la mitad de la lámina hacia el ápice
- 5 = ligeramente pubescente
- 7 = escabrosa, áspera al tacto
- 9 = aterciopelada

3.1.6.1.2 Color predominante de la lámina foliar

Se observa en el tercio medio de la primera hoja, por debajo de la hoja bandera del tallo más alto de la planta. Debe prestarse atención a las deficiencias nutricionales y a los efectos ambientales, que se manifiestan por un color característico en la parte superior o haz de la lámina.

- 1 = verde pálido
- 2 = verde
- 3 = verde oscuro
- 4 = márgenes púrpura
- 5 = manchas púrpura
- 6 = púrpura

3.1.6.1.3 Forma predominante de la lígula

Asume formas muy características (Figura 5) que se clasifican como:

- 1 = aguda o acuminada
- 2 = hendida
- 3 = semihendida
- 4 = truncada

Esta característica se expresará en términos de porcentaje de líneas con una característica determinada.

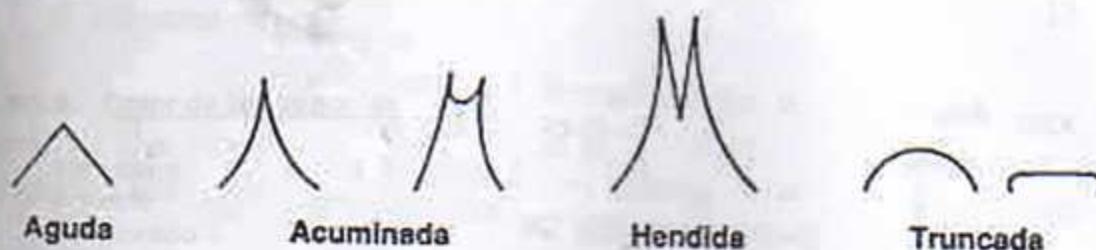


Figura 5. Forma predominante de la lígula.

3.1.6.1.4 Longitud de la lígula

Se mide en milímetros, desde la base del cuello hasta la punta de la lígula. Se observa en la lígula situada en la base del cuello de la primera hoja, por debajo de la hoja bandera del tallo más alto de la planta.

3.1.6.1.5 Tamaño predominante de las aurículas

Las aurículas son dos apéndices que se encuentran en el cuello de la hoja. Tienen forma de hoz con pequeños dientes en su parte convexa (Figura 6). La observación se hace sobre una aurícula representativa tomada del tercio medio de la planta, la cual se colectó en el campo con una pinza. Se colocó en un eppendorf para trasladarla al laboratorio y se midió de extremo a extremo con un vernier y con lupa. Se clasifican como:

- 1 = muy pequeñas
tamaño menor de 2.1 mm
- 3 = pequeñas
entre 2.1 y 3 mm
- 5 = medianas
entre 3.1 y 3.5 mm
- 7 = grandes
entre 3.6 y 5 mm
- 9 = muy grandes
mayores de 5 mm

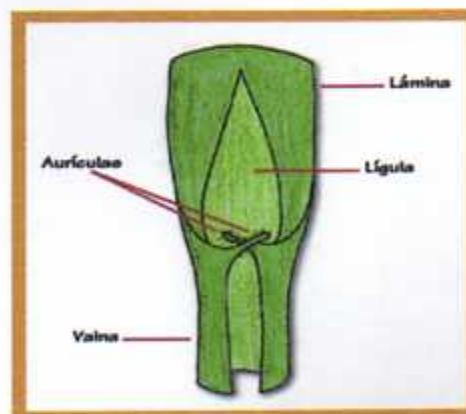


Figura 6. Estructura y posición de las aurículas en la hoja de la planta de arroz.

Esta característica se expresará en términos de porcentaje de líneas con una característica determinada.

3.1.6.1.6. Color de las aurículas

- 1 = crema
- 2 = café
- 3 = morado

3.1.6.1.7 Días a prefloración ("panzoneo")

Es el número de días transcurridos desde la siembra hasta que la planta inicia la floración. Se dice que la planta ya "panzoneó" cuando se detecta que la espiga está totalmente cubierta por las hojas; pero, a su vez viene saliendo por el tallo principal. Además, se deben diferenciar bien la hoja bandera y la primera hoja de la planta.

3.1.6.2 Estado de floración

3.1.6.2.1. Hábito predominante de crecimiento

Los tallos secundarios y terciarios forman un ángulo con respecto a una línea perpendicular imaginaria que pasa por el centro de la planta (Figura 7). Con base en este ángulo se consideran los siguientes hábitos de crecimiento:

- 1 = erecto
ángulo de 10°
- 3 = semierecto
ángulo entre 11° y 30°
- 5 = intermedio
ángulo entre 31° y 50°
- 7 = abierto
ángulo entre 51° y 70°
- 9 = procumbente
ángulo entre 71° y 90°

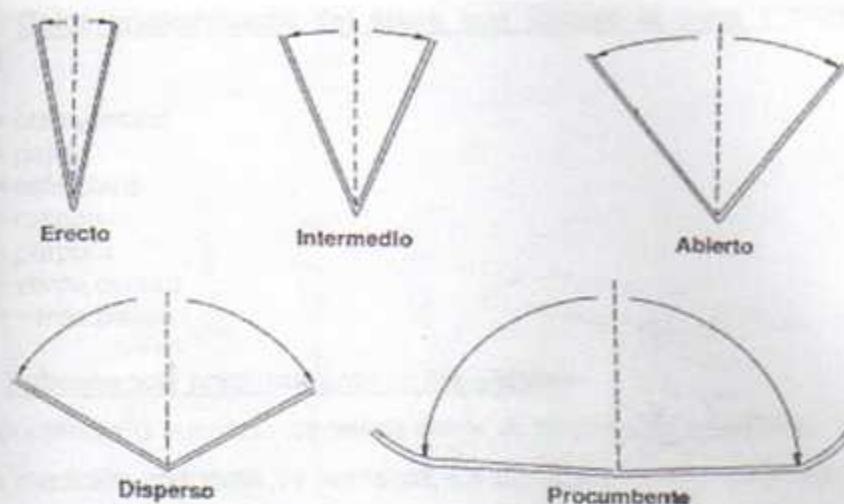


Figura 7. Hábito predominante de crecimiento.

Esta característica se expresará en términos de porcentaje de líneas con una característica determinada.

3.1.6.2.2 Capacidad predominante de macollamiento

Se cuentan todos los hijos (tallos secundarios y terciarios) que estén verdes al momento de realizar el conteo. Este factor es muy variable porque los factores ambientales (por ejemplo, el contenido de nitrógeno del suelo y/o el sistema de siembra) lo afectan considerablemente. Esta característica se expresará en términos de número promedio de tallos por línea.

3.1.6.2.3 Días a antesis

Las flores de las plantas de arroz están agrupadas en una inflorescencia llamada panícula. Se refieren al número de días transcurridos desde el momento de la siembra hasta el momento en que aparecen las primeras anteras en el 50% de las plantas de la población.

3.1.6.2.4 Duración de la antesis

Es el número de días transcurridos desde el momento en que aparecen las primeras anteras en el 50% de las plantas, hasta la aparición de las anteras en la última planta de la población seleccionada.

3.1.6.2.5 Color predominante del ápice que forman la lema y la palea en la espiguilla

- 1 = blanquecino
- 2 = pajizo
- 3 = café claro
- 4 = rosado
- 5 = púrpura
- 6 = verde oscuro
- 7 = verde pálido

3.1.6.2.6 Pubescencia predominante de las glumas

Indica la presencia o ausencia de vellos sobre la lema y sobre la palea. Se aconseja realizar la medición con lente de aumento. En ausencia de éste, al poner las glumas contra el sol, la pubescencia simula haces luminosos sobre las glumas. Se clasifica como:

- 1 = glabra o lisa
- 3 = pubescencia en la quilla (unión entre la lema y la pálea)
- 5 = pubescencia hacia el ápice de la lema y la pálea
- 7 = parcial o totalmente cubiertas con vello corto
- 9 = parcial o totalmente cubiertas con vello largo

3.1.6.2.7 Posición predominante de la hoja bandera

La hoja superior por debajo de la panícula es la hoja bandera. Este descriptor se evalúa observando el ángulo formado entre la hoja bandera y la prolongación del pedúnculo floral en el tallo más alto de la planta (Figura 8).

- 1 = erecta
ángulo entre 0° y 10°
- 3 = semierecta
ángulo entre 11° y 40°
- 5 = intermedia
ángulo entre 41° y 70°
- 7 = horizontal
ángulo entre 71° y 90°
- 9 = descendente
ángulo mayor de 90°

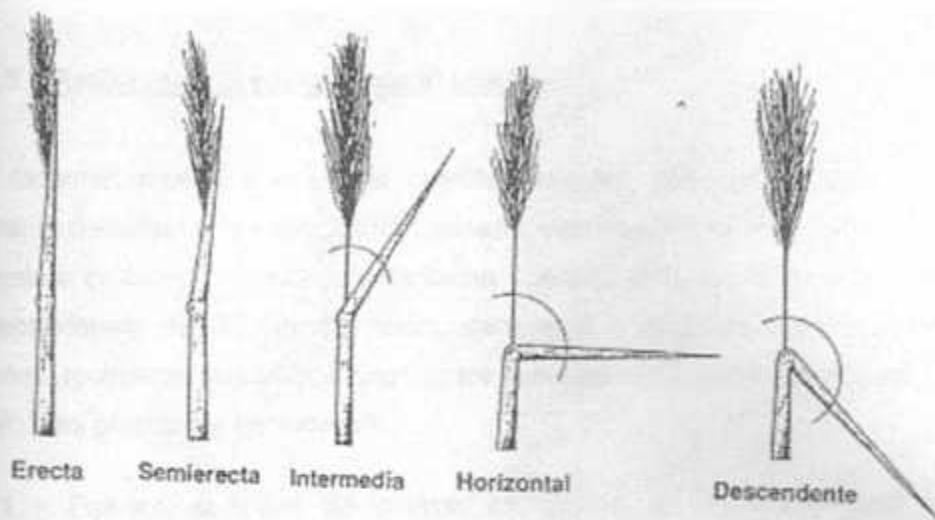


Figura 8. Posición predominante de la hoja bandera.

Esta característica se expresará en términos de porcentaje de líneas con una característica determinada.

3.1.6.2.8 Longitud de la lámina de la hoja bandera

Se evalúa en centímetros sobre la hoja bandera del tallo más alto de la planta. Se mide desde el ápice hasta el punto de unión de la lámina con la vaina.

3.1.6.2.9 Ancho de la lámina de la hoja bandera

Es la distancia, en centímetros, medida de borde a borde en la parte más ancha de la lámina de la hoja bandera del tallo más alto de la planta.

3.1.6.3 Estado de maduración

3.1.6.3.1 Días a la madurez

Es el número de días transcurridos desde la siembra hasta que las semillas de una muestra de la población seleccionada para realizar la descripción varietal, tengan un 20% de humedad. En campo se dice que la línea está madura cuando el 50% de las plantas presentan granos maduros.

3.1.6.3.2 Altura de la planta

Se mide en centímetros desde el suelo hasta el nudo ciliar de la panícula del tallo más alto de la planta.

3.1.6.3.3 Resistencia predominante al acame

Es un carácter varietal que puede cambiar con las condiciones ambientales. Al aumentar la densidad o la fertilidad nitrogenada, disminuye la resistencia al acame. Se debe evaluar en campo, de la siguiente forma: Se baja la punta de los tallos hasta una altura aproximada de 30 cm del suelo, para que al soltarlos, los tallos fuertes y resistentes, recuperen su posición original; los susceptibles al acame permanecen cerca del suelo. Las plantas se consideran:

1 = Fuertes; si todas las plantas conservan su posición original (no hay volcamiento)

3 = Moderadamente fuertes, si la mayor parte (más del 85%) de las plantas a las cuales se les aplica presión retornan a su posición original

5 = Intermedias, si entre un 50% y un 84% de las plantas retornan a su posición original

7 = Débiles, si menos de un 50% de las plantas retornan a su posición original

9 = Muy débiles, si todas las plantas permanecen en el suelo.

3.1.6.3.4. Tamaño de las aristas

La arista es una estructura filiforme ubicada en el ápice de la lema y se reconocen después de la floración completa (Figura 9). El tamaño de las aristas se evalúa en la arista más larga de la panícula analizada. Se consideran los siguientes tamaños de aristas:

- 1 = corta
entre 1 y 5 mm
- 3 = media
entre 6 y 20 mm
- 5 = semilarga
entre 21 y 30 mm
- 7 = larga
entre 31 y 50 mm
- 9 = muy larga
más de 50 mm

Esta característica se expresará en términos de porcentaje de líneas con una característica determinada.

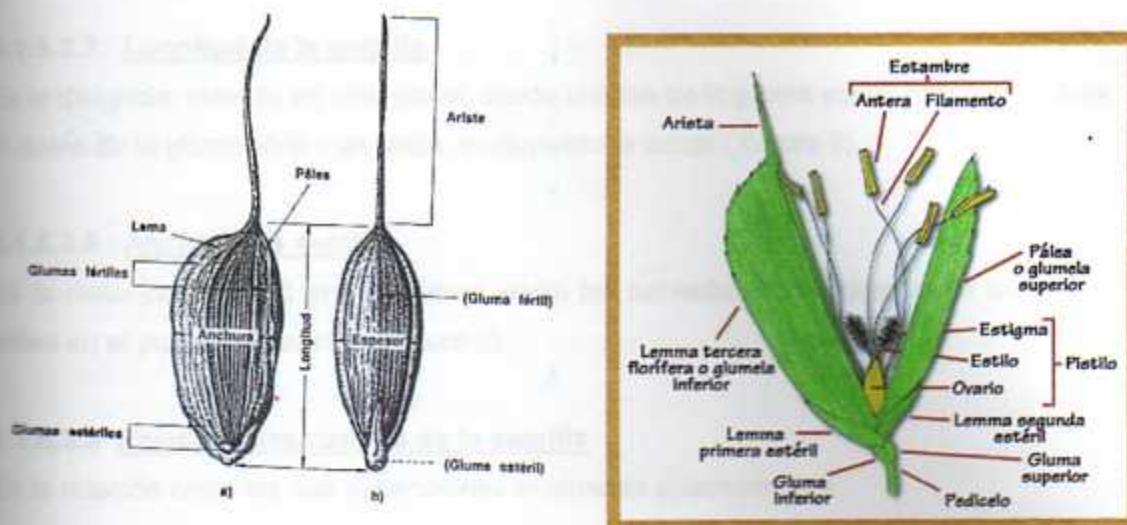


Figura 9. Estructura de la semilla de arroz.

3.1.6.3.5 Tipo de aristado predominante de la semilla

Para evaluar este carácter se deben utilizar todas las panículas de la planta. Se clasifican como:

- 1 = arista ausente
- 3 = arista corta y presente en menos del 50% de los granos
- 5 = arista corta y presente en más del 50% de los granos
- 7 = arista larga y presente en menos del 50% de los granos
- 9 = arista larga y presente en más del 50% de los granos

Esta característica se expresará en términos de porcentaje de líneas con una característica determinada.

3.1.6.3.6 Color predominante de las glumas fértiles (lema y pálea) del grano apical de la panícula

Las glumas fértiles (lema y pálea) presentan diferentes colores según la variedad cuando las espigas maduran. Clasificación:

- 0 = pajizo
- 1 = dorado
- 2 = surcos dorados sobre fondo pajizo
- 3 = manchas cafés sobre fondo pajizo
- 4 = café amarillento
- 5 = café rojizo o púrpura
- 6 = manchas púrpura sobre fondo pajizo
- 7 = púrpura
- 8 = negro

3.1.6.3.7 Longitud de la semilla

Es la distancia, medida en milímetros, desde la base de la gluma estéril más baja, hasta el ápice de la gluma fértil más larga, excluyendo la arista (Figura 9).

3.1.6.3.8 Ancho de la semilla

Es la distancia, medida en milímetros, entre las nervaduras centrales de la lema y la pálea en el punto más ancho (Figura 9).

3.1.6.3.9 Relación largo:ancho de la semilla

Es la relación entre las dos dimensiones evaluadas anteriormente

3.1.6.3.10 Espesor de la semilla

Es la máxima distancia, medida en milímetros, entre las paredes laterales de la semilla (Figura 9).

3.1.6.3.11 Densidad predominante de la panícula

Es la mayor o menor aglutinación de las ramificaciones primarias y secundarias de la panícula. Se evalúa en la panícula del tallo más alto de la planta. Es necesario remover todas las semillas de ella (Figura 10). Se clasifican del modo siguiente:

- 1 = abierta
- 3 = semiabierta
- 5 = intermedia
- 7 = semicompacta
- 9 = compacta

Esta característica se expresará en términos de porcentaje de líneas con una característica determinada.

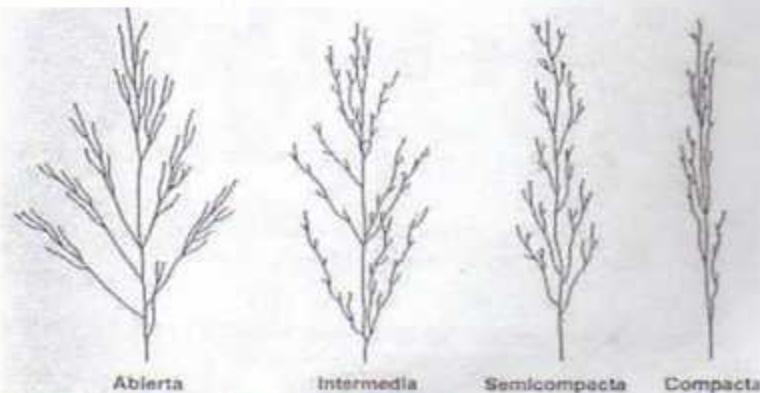


Figura 10. Densidad predominante de la panícula.

3.1.6.3.12 Exerción predominante de la panícula

Se evalúa teniendo en cuenta la posición del nudo ciliar con respecto a la vaina de la hoja bandera (Figura 11). Se clasifica como:

- 1 = Bien emergida,
cuando el nudo ciliar aparece muy por encima de la vaina de la hoja bandera
- 3= Moderadamente emergida,
cuando el nudo ciliar esta sobre la vaina de la hoja bandera (de 1 a 4 cm)
- 5 = Coincidente,
- cuando el nudo ciliar coincide con la zona de unión de la hoja bandera
- 7 = Parcialmente incluida,
cuando el nudo ciliar esta cubierto por la vaina de la hoja bandera
- 9 = Incluida,
cuando la panícula esta casi totalmente cubierta por la vaina de la hoja bandera

Esta característica se expresará en términos de número de plantas con una característica determinada.

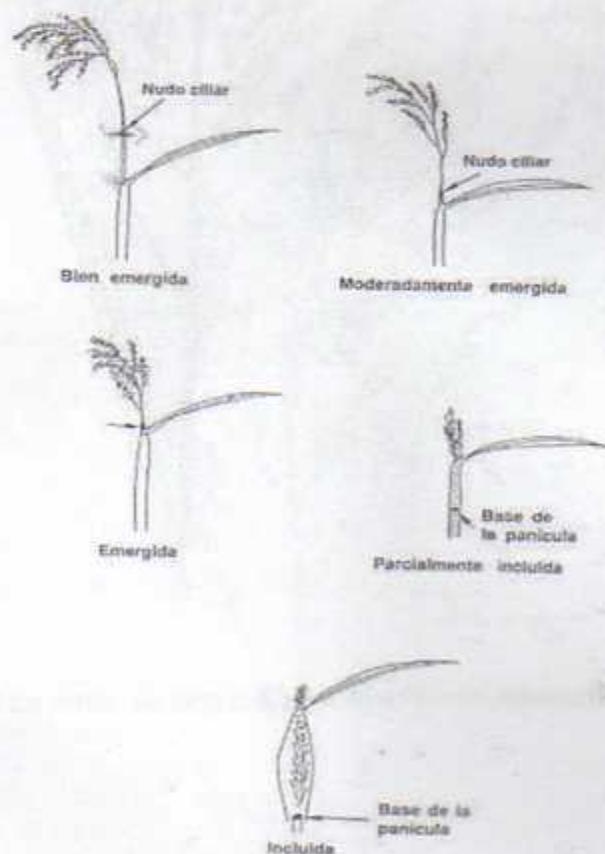


Figura 11. Exerción predominante de la panícula.

3.1.6.3.13 Longitud de la panícula

Se mide en centímetros desde la base de la panícula o nudo ciliar hasta el ápice de la misma (Figura 12). Se utiliza la panícula del tallo más alto de la planta.

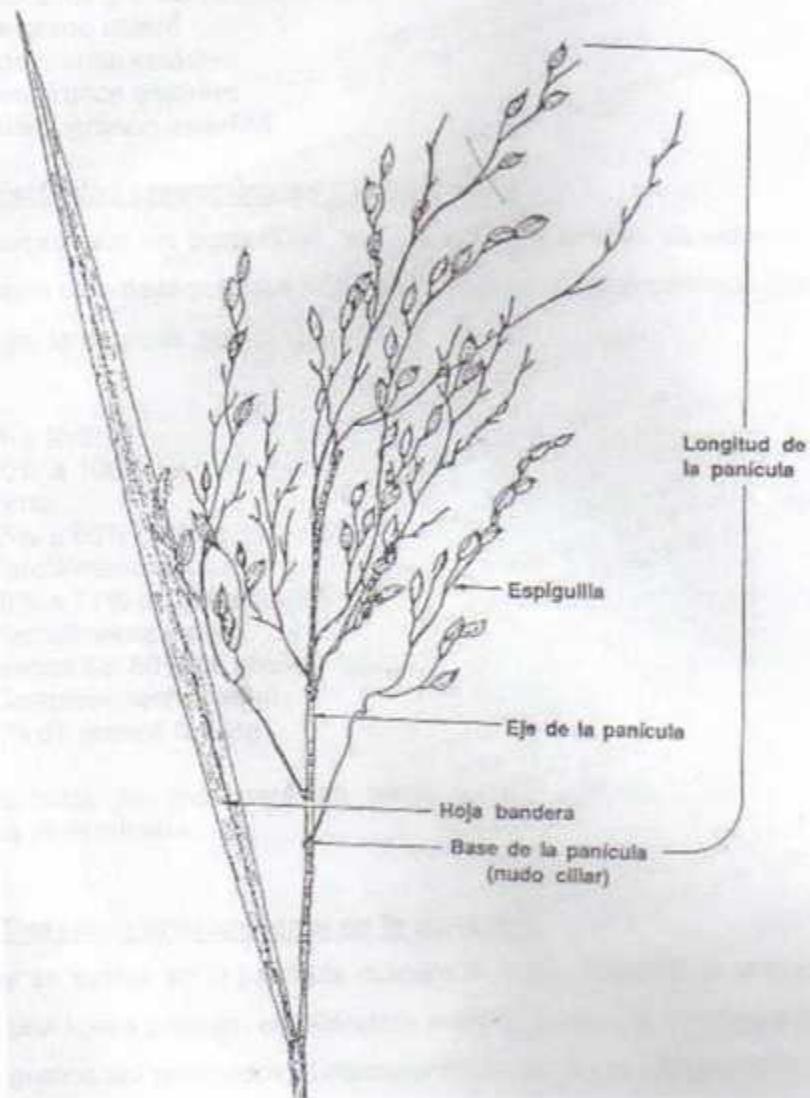


Figura 12. Panícula de arroz, su longitud y características adyacentes.

3.1.6.3.14 Número de granos vanos (estériles) en el ápice de la panícula

Se toman 4 granos del ápice de la panícula del tallo más alto de la planta y se determinan cuántos de ellos son fértiles o estériles.

- 1 = todos los granos fértiles
- 3 = un grano estéril
- 5 = dos granos estériles
- 7 = tres granos estériles
- 9 = cuatro granos estériles

3.1.6.3.15 Fertilidad predominante de la panícula

Este valor, expresado en porcentaje, se estima comparando visualmente la relación entre los granos bien desarrollados y los granos vanos de una panícula madura. Según ese porcentaje, la panícula puede ser:

- 1 = Muy fértil,
90% a 100% de granos fértiles
- 3 = Fértil,
75% a 89% de granos fértiles
- 5 = Parcialmente fértil,
50% a 71% de granos fértiles
- 7 = Parcialmente estéril,
menos del 50% de granos fértiles
- 9 = Completamente estéril,
0% de granos fértiles

Esta característica se expresará en términos de porcentaje de líneas con una característica determinada.

3.1.6.3.16. Desgrane predominante de la panícula

Este carácter se evalúa en la panícula madura del tallo más alto de la planta, a la cual se le aplica una ligera presión, enrollándola entre la palma de la mano y los dedos. La cantidad de granos así removidos, determina 5 categorías de desgranado:

- 1 = difícil
cuando no se desprenden los granos o lo hacen hasta un 15%
- 3 = moderadamente difícil
cuando se desprenden entre el 16% y el 30% de los granos
- 5 = intermedio
cuando se remueven entre el 31% y el 45% de los granos
- 7 = moderadamente susceptible
cuando se remueven entre el 46% y el 60% de los granos
- 9 = susceptible
cuando se remueven más del 61% de los granos de la panícula

3.1.6.3.17 Relación del número de granos vanos y llenos en la panícula.

3.1.6.3.18 Número de ramificaciones de la panícula.

3.1.6.3.19 Evaluación del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) con infección natural.

3.1.7 Análisis Estadístico

Con las mediciones de las características morfológicas y fenológicas se estableció una base de datos, de la cual se confeccionaron matrices para realizar el análisis estadístico por medio del programa estadístico SPSS 8.0, el cual consistió en cuatro etapas:

3.1.7.1 Estadísticas descriptivas, para conocer cada una de las líneas independientemente, con respecto a todas las características evaluadas.

3.1.7.2 Análisis de varianza, para saber si las diferencias encontradas eran o no significativas. Si $p < \alpha$ entonces, las líneas eran significativamente diferentes, pero si $p > \alpha$ entonces no existían diferencias. Este análisis se hizo de forma directa para los grupos integrados con pocas líneas. Por ejemplo CP, el cual estaba integrado por CP2-3, CP2-14 y CP2-12; mientras que para el grupo N y CPM, los cuales contaban con 20 y 9 líneas respectivamente. Se requirió primero hacer un análisis de conglomerados y con base en las agrupaciones, se procedió a realizar el análisis de varianza, debido a que dicho análisis no es muy confiable cuando los datos son muchos.

3.1.7.3 Análisis de conglomerados jerárquicos, para identificar grupos de casos (o de variables) lo más homogéneos posibles internamente y a su vez heterogéneos entre sí. Se utilizó el método de Ward, para encontrar las diferencias entre conglomerados.

Se excluyeron las líneas N9-7, N4-8, CPM80-11 y CPM10-14 debido a que tenían 20% o más de no respuesta en todas las variables evaluadas.

3.1.7.4 Análisis de contrastes, para conocer si las diferencias entre los grupos de plantas transgénicas y las variedades comerciales no transgénicas eran o no significativas. Dicho análisis se dividió en dos etapas, una para analizar las líneas derivadas de la variedad CR1821, por medio de la Prueba Dunnet, la cual es una extensión de la prueba t y compara varios promedio (del grupo AS, N, C y CP) contra un control. La segunda etapa fue para analizar las líneas derivadas de la variedad CR-5272, en la que se utilizó la Prueba t directamente, debido a que eran únicamente las líneas de un solo grupo (CPM) contra su control.

3.2 TERCERA GENERACIÓN (T3)

3.2.1 Cultivares y líneas transgénicas

Se sembró semilla de sesenta y seis líneas transgénicas T3 de arroz de las variedades CR-5272 y CR-1821 que contienen el gen *bar* (resistencia a PPT) y el gen (o versión modificada) de la proteína de cubierta (CP) del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) en la finca San Rafael en San Rafael, Guápiles. Se estableció una réplica de este ensayo en la empresa Agribiotecnología de Costa Rica S.A., en San Antonio del Tejar de Alajuela, la cual se utilizó sólo para incremento de semilla. En ambos sitios se sembró semilla de las variedades CR-5272 y CR-1821 como controles.

3.2.2 Descripción y preparación del terreno

Se preparó un lote de aproximadamente 2000 m² (figura 13A). El lote experimental se dividió en 80 parcelas de 2m x 2m, separadas entre sí, 1m. Se cubrió el lote con malla antipájaros colocada sobre postes de bambú de 3 m de altura. En la parte inferior de la malla se colocó una banda de zarán de aproximadamente 40 cm de ancho para evitar el ingreso de plagas vertebradas y evitar posible salida de semillas por corrientes de agua. En Agribiotecnología se estableció el ensayo en el mismo lote preparado para el estudio de la segunda generación de plantas.

3.2.3 Siembra de semilla

La cantidad total de semilla por línea se dividió en tres partes: un gramo de cada línea se sembró en Agribiotecnología, una cantidad igual se almacenó como banco de germoplasma en el CIBCM y la semilla restante se sembró en Guápiles (Cuadro 2). La siembra se llevó a cabo en forma manual colocando semilla de una sola línea en cada parcela dentro de surcos paralelos de 1-2 cm de profundidad (figura 13B).

3.2.4 Prueba de tolerancia al herbicida PPT en campo

Se aplicó a las plantas una solución de 5 ml/L de FINALE[®] 15 SL (AgrEvo), equivalente a 200 L de mezcla por ha, complementada con 0.5 cc/L del compuesto NP7 104 L (BAYER) como adherente. La solución se aplicó también a las plantas control de las variedades CR-1821 y CR-5272. La aplicación se realizó cuatro semanas después

de la siembra y la tolerancia de las líneas transgénicas al herbicida se evaluó cinco días después de la aplicación.

3.2.5 Evaluación morfológica y fenológica

Además de la resistencia al PPT y la resistencia al RHBV mediante infección natural, en cada una de las líneas se evaluaron las siguientes características:

- 3.2.5.1 Altura de la planta.
- 3.2.5.2 Longitud de la lámina de la hoja bandera.
- 3.2.5.3 Ancho de la lámina de la hoja bandera.
- 3.2.5.4 Longitud de la panícula.
- 3.2.5.5 Número de ramificaciones de la panícula.
- 3.2.5.6 Número de granos vanos.
- 3.2.5.7 Número de granos llenos.
- 3.2.5.8 Exercción de la panícula.
- 3.2.5.9 Capacidad de Macollamiento.
- 3.2.5.10 Resistencia al acame.
- 3.2.5.11 Granos vanos (estériles) en el ápice de la panícula.

Basándose en estas características, se seleccionaron las mejores líneas en la etapa de maduración. En esta selección se contó con el apoyo de fitomejoradores del Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica.



Figura 13. Establecimiento del tercer ensayo de campo en la finca San Rafael, Guápiles. **A)** Parcelamiento del lote para la siembra. **B)** Siembra de semilla de las líneas transgénicas y variedades control.

Cuadro 2. Distribución de semilla de las líneas transgénicas en los sitios de establecimiento del tercer ensayo de campo y banco de germoplasma

LINEA T3	PESO TOTAL (g)	GUAPILES (g)	AGRI (g)	CIBCM (g)
AS10-7-1	5.3	3.3	1	1
AS10-7-2	23.9	21.9	1	1
AS10-7-6	5	3	1	1
AS10-7-7	19.5	17.5	1	1
AS10-7-9	13.6	11.6	1	1
AS10-7-10	9.7	7.7	1	1
AS10-7-11	7.6	5.6	1	1
AS10-7-12	3.6	1.6	1	1
AS10-7-13	4.5	2.5	1	1
AS10-7-14	3.4	1.4	1	1
AS10-7-15	17.5	15.5	1	1
AS10-4-1	15.3	13.3	1	1
AS10-4-2	6.4	4.4	1	1
AS10-4-3	3.1	1.1	1	1
AS10-4-4	6.8	4.8	1	1
AS10-4-5	4.2	2.2	1	1
AS10-4-7	16	14	1	1
AS10-4-8	17	15	1	1
AS10-4-10	3.2	1.2	1	1
AS10-4-11	2.3	0.3	1	1
AS10-4-12	8.9	6.9	1	1
AS10-4-14	2.5	0.5	1	1
AS10-4-15	30.1	28.1	1	1
AS10-4-16	8.7	6.7	1	1
AS10-4-18	8.4	6.4	1	1
AS10-4-19	22.2	20.2	1	1
AS10-4-20	4.6	2.6	1	1
CPM10-14-1	6.3	4.3	1	1
CPM10-14-2	20.4	18.4	1	1
CPM10-14-3	12.8	10.8	1	1
CPM10-14-4	10.1	8.1	1	1
CPM10-14-6	15.1	13.1	1	1
CPM10-14-8	13.3	11.3	1	1
C37S-7-1	4.5	2.5	1	1
C37S-7-2	6.2	4.2	1	1

C37S-7-3	5.5	3.5	1	1
C37S-7-4	2.4	0.4	1	1
C37S-7-7	4.4	2.4	1	1
C37S-7-8	3.3	1.3	1	1
C37S-7-9	2.5	0.5	1	1
C37S-7-10	2.7	0.7	1	1
C37S-7-11	10.7	8.7	1	1
C37S-7-13	6.3	4.3	1	1
C37S-7-14	18.5	16.5	1	1
CPM10-22-1	6	4	1	1
CPM10-22-5	5.2	3.2	1	1
CPM10-22-6	10.8	8.8	1	1
CPM10-22-7	4.3	2.3	1	1
CPM10-22-9	9.2	7.2	1	1
CPM10-22-10	8.1	6.1	1	1
CPM10-22-11	4.2	2.2	1	1
CPM80-4-5	9.9	7.9	1	1
CPM80-4-6	3.3	1.3	1	1
CPM80-4-7	6.7	4.7	1	1
CPM80-4-9	9.6	7.6	1	1
CPM80-4-10	11.5	9.5	1	1
CPM80-4-11	13.4	11.4	1	1
CPM80-4-12	18.9	16.9	1	1
CPM80-4-13	9.8	7.8	1	1
CPM80-11-1	4.2	2.2	1	1
CPM80-11-5	4.4	2.4	1	1
CPM80-11-6	8.5	6.5	1	1
CPM80-11-7	9.2	7.2	1	1
CPM80-11-9	12.9	10.9	1	1

4. RESULTADOS

4.1 SEGUNDA GENERACIÓN (T2)

4.1.1 Prueba de tolerancia al herbicida PPT en el invernadero

Se evaluó en invernadero la resistencia al herbicida PPT en las plantas T2. En la mayoría de los casos se observaron plantas tolerantes y susceptibles al PPT entre la progenie de una misma planta (Figura 14A), independientemente de la identidad de la línea. En la progenie de las 580 plantas T1 evaluadas, se obtuvo que 508 plantas T1 mostraron heterocigosis del carácter de resistencia al herbicida en la segunda generación, 31 no germinaron y 41 conservaron el carácter homocigota, para un total de 30 líneas puras T2 (Cuadro 3). Todas las plantas control (CR-5272 y CR-1821) mostraron susceptibilidad evidente al herbicida (Figura 14A).

4.1.2 Germinación de semilla T2 en campo e invernadero

Se sembró en campo semilla T2 de 22 líneas transgénicas homocigotas. Se tomó en cuenta la cantidad de semilla disponible en el banco de germoplasma del CIBCM. Después de dos semanas, se observó que la germinación de las líneas puras en campo fue muy baja. Varió entre 0% y 60%. Esto mismo se observó en las parcelas con los controles no transgénicos. Además, gran parte del material sembrado se perdió porque gran parte de las plantas germinaron poco (Figura 14B). Por tal razón, se repitió la siembra bajo condiciones de invernadero donde se obtuvo un porcentaje de germinación que varió entre 50 y 100%. El porcentaje de germinación de los controles CR-5272 y CR-1821 fue cercano al 100%. (Figura 15). Después de dos semanas, las plántulas mostraron un desarrollo normal con pequeñas diferencias en tamaño entre los individuos de algunas líneas.

Cuadro 3. Líneas puras de una población T2 de plantas transgénicas que expresan el gen *bar* obtenidas de la prueba de tolerancia al PPT en invernadero

Cultivar	Línea	Fracción de plantas T2 tolerantes al PPT
CR-1821	AS10	59/62
CR-1821	AS9	17/18
CR-1821	AS19	34/35
CR-5272	CPM1-16	23/23
CR-5272	CPM2-5	25/28
CR-5272	CPM6-64	6/6
CR-5272	CPM7-14	12/12
CR-5272	CPM9-19	20/20
CR-5272	CPM10	78/83
CR-5272	CPM73	55/55
CR-5272	CPM80	75/75
CR-5272	CPM103-52	22/24
CR-1821	CP2	93/96
CR-1821	CPA1-13	47/47
CR-1821	C37-17	9/9
CR-1821	C37S-7	18/20
CR-1821	C31-25	20/21
CR-1821	NIT	99/103
CR-1821	N4T	52/55
CR-1821	N5T-9	27/27
CR-1821	N6T-24	23/26
CR-1821	N9T	131/136
CR-1821	N10T	63/63
CR-1821	N11T-9	31/31
CR-1821	N16T	100/103
CR-1821	N4S	77/77
CR-1821	N5S	211/224
CR-1821	N9S-14	40/44
CR-1821	N11S	31/31
CR-1821	N16S-7	20/23
CR-1821	CONTROL	0/72
CR-5272	CONTROL	0/399



Figura 14. (A) Evaluación en invernadero de la resistencia a PPT de plantas T2 de líneas transgénicas de arroz que expresan el gen bar. **(B)** Planta T2 en campo con baja germinación.

4.1.3 Infección natural con RHBV

En la etapa de prefloración las plantas mostraron síntomas de hoja blanca causados por infección natural del RHBV. Se midió el porcentaje de infección en cada una de las líneas, y se observó que las líneas N, es decir, las que contienen el extremo 5' del gen de la proteína de cubierta de RHBV, fueron en general las más susceptibles a la infección natural, mientras que las líneas CPM, que contienen secuencias MAR, mostraron menor incidencia de la enfermedad (Figura 16). Solamente la línea CPM2-5 no mostró síntomas de infección viral.

4.1.4 Prueba de tolerancia al herbicida PPT en campo

Todas las líneas se asperjaron con el herbicida PPT un mes después de establecidas en campo. Cinco días después el efecto del herbicida fue evidente en las plantas control, mientras que todas las líneas transgénicas mostraron clara resistencia. El efecto del PPT se observó como una quema total de la planta (Figura 17).

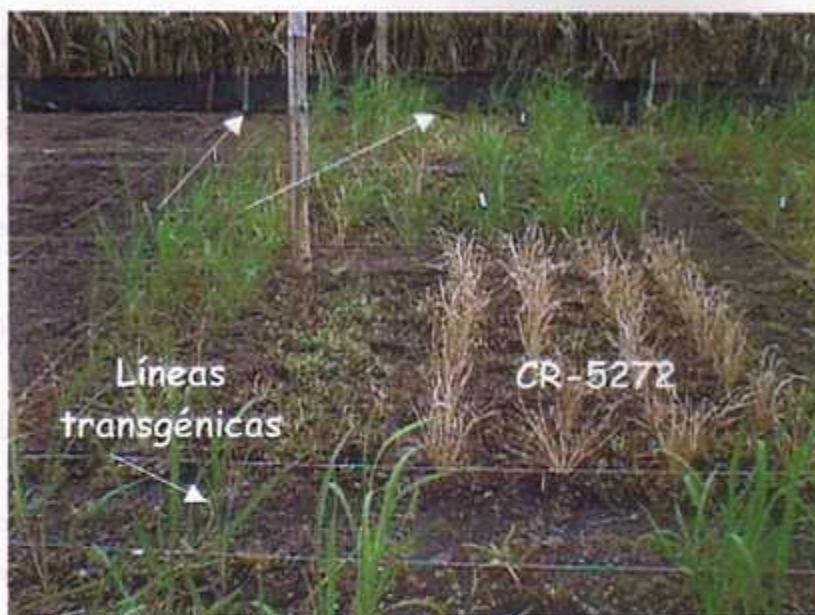


Figura 17. Líneas transgénicas y plantas control cinco días después de ser aplicadas con una dosis de 5ml/L de FINALE (equivalente a 200L de mezcla por hectárea). Se observa una clara diferencia en el efecto del herbicida sobre plantas control (der) y las líneas transgénicas (izq. y atrás).

4.1.5 Evaluación morfológica y fenológica

El análisis de las mediciones morfológicas y fenológicas se muestra en forma separada, según el origen de las líneas transgénicas; por grupo de transformación, y si son derivadas del cultivar CR-1821 ó CR-5272. Además se presentan separadamente, las variables cualitativas de las variables cuantitativas.

4.1.5.1 Variables cualitativas evaluadas en la segunda generación (T2)

4.1.5.1.1 Vellosidad predominante de la lámina de la hoja 1

En términos generales, 91.84% de las plantas transgénicas evaluadas presentaron vellosidad lisa, y algunas de ellas tuvieron vellosidad áspera (3.04%). Las líneas transgénicas que presentaron pubescencia áspera (el 3.04%) y que coincidieron con los controles fueron las líneas AS9-1, N9-1, N6-26, CPM10-39 y CPM9-19.

Las líneas con vellosidad pubescente de la mitad de la lámina hacia el ápice fueron las líneas N16-14, N1-8, CPM80-11, CPM80-3, CPM2-5, CPM1-16 y CPM10-22. Esta característica no se presentó en ninguno de los controles ya que las variedades comerciales no transgénicas presentaron 88.89% de vellosidad áspera y solamente un 11.11% fue lisa (Anexo 1.Cuadro 4).

4.1.5.1.2 Color predominante de la lámina foliar

La coloración de la lámina de la hoja, tanto en las líneas transgénicas como en los controles, fue verde pálido y verde. Sin embargo, se presentaron algunas líneas transgénicas con coloración foliar verde oscuro en un porcentaje bastante bajo (5.88%) (Anexo 1). Los controles CR-5272 y CR-1821 presentaron tanto láminas foliares verde pálido como verdes, pero no hojas color verde oscuro, las cuales se presentaron solamente en las siguientes líneas: N4-6, N4-8, N4S-2, N1-9, N5-9, N6-24, N5S-18, N5S-24, N1-8, C31-25, CPM2-5.

La línea CPM80-11 presentó 100% de las plantas con lámina foliar verde pálido, lo cual es interesante, ya que a nivel de campo es fácil distinguir este tipo de líneas provenientes de la variedad CR-5272, las cuales por lo general, siguen esta tendencia de coloración independientemente de la fertilización aplicada (Figura 18).

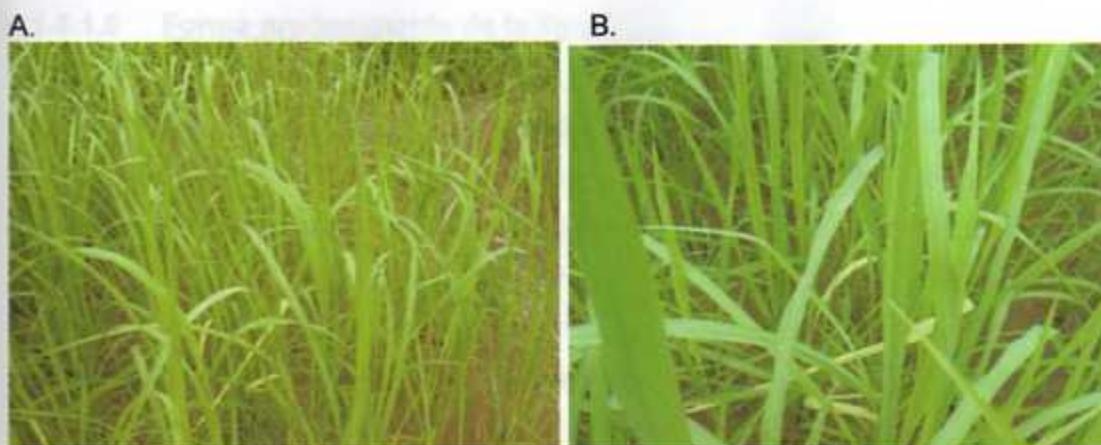


Figura 18. Color predominante de la lámina foliar en plantas derivadas de la variedad CR-5272 (A) y CR-1821 (B).

4.1.5.1.3 Posición predominante de la hoja bandera

La posición predominante de la hoja bandera fue la semierecta. Este patrón se presentó tanto en las líneas transgénicas y las variedades comerciales. La posición horizontal y la descendente únicamente se observó, aunque en baja proporción, en las transgénicas (6.5 y 0.19 respectivamente).

Solamente unas pocas plantas presentaron posición erecta, tanto en las transgénicas como en las no transgénicas.

4.1.5.1.4 Tamaño y color predominante de las aurículas

El tamaño de las aurículas se presentó en porcentajes muy variados. Se obtuvieron aurículas desde muy pequeñas (menores a 2.1 mm) hasta muy grandes (mayores a los 5 mm). En las líneas transgénicas el 38.9% presentó aurículas pequeñas seguidas por aurículas grandes (23.2%), mientras que en las no transgénicas cerca del 30% tuvo aurículas muy pequeñas, seguidas de las pequeñas (24.4%) y las grandes (24.4%) (Anexo 1).

Se observó que el 100% de las aurículas evaluadas presentó color crema, tanto en las plantas transgénicas como en las no transgénicas (testigos).

4.1.5.1.5 Forma predominante de la lígula

En las líneas transgénicas el 96.96% de las plantas presentó lígula hendida (Anexo 1). La línea CP2-14 fue la única que presentó una planta con lígula truncada. Las cinco plantas que presentaron lígula aguda, estuvieron representadas en las siguientes líneas: AS10-7, AS10-4, N9-1, y CPM10-39.

Con respecto a los controles, CR-5272 presentó plantas con lígula en forma hendida y semihendida en las plantas muestreadas, mientras que CR-1821 tuvo todas sus 15 plantas (100%) con lígula hendida.

4.1.5.1.6 Tipo de aristado predominante de la semilla y tamaño de las aristas

Los controles en su mayoría no presentaron arista (93.33%), mientras que en las plantas transgénicas cerca del 70% tuvo aristas cortas y presentes en más del 50% de los granos (Figura 19). Solamente 4.42% de las plantas transgénicas no presentó arista (Anexo 1). Con respecto al tamaño de la arista, en las plantas transgénicas el 67.15% presentó arista media (entre 6 y 20 mm) y 32.85% tuvo arista corta (entre 1 y 5 mm). No se presentaron aristas semilargas, largas o muy largas (Anexo 1). En los controles, las tres únicas plantas con arista tuvieron tamaño de la arista corta.

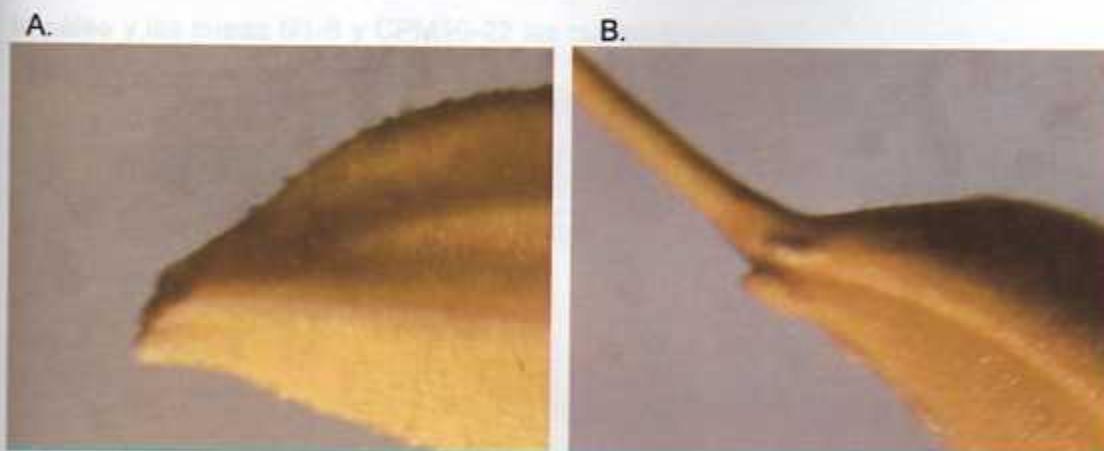


Figura 19. Aristado predominante de la semilla. **A.** Arista ausente en el control CR-1821 **B.** Presencia de arista en semillas transgénicas de la variedad CR-1821.

4.1.5.1.7 Color predominante del ápice que forman la lema y la pálea en la espiguilla

Las líneas transgénicas tuvieron un 92.92% de ápices color verde pálido, seguido por 5.98% café claro. Las no transgénicas tuvieron un patrón similar, 97.78% ápices color verde pálido y 2.22% café claro (Anexo 1).

Los controles no presentaron ápices ni púrpuras ni blanquecinos, mientras que las transgénicas sí, aunque en un porcentaje muy bajo. Las líneas con ápices color blanquecino fueron: N9-8, C31-25, CPM10-39 y CPM80-3. Mientras que la línea CP2-3 presentó un único ápice púrpura (Anexo 1).

4.1.5.1.8 Pubescencia predominante de las glumas

Esta característica difiere notablemente entre las líneas transgénicas y las no transgénicas. La totalidad de las plantas control (45 glumas evaluadas) presentó glumas parcial o totalmente cubiertas con vello largo (Figura 20). Esta característica no se presentó en ninguna de las líneas transgénicas evaluadas (554) (Anexo 1).

Todas las líneas transgénicas presentaron una gran variabilidad a nivel de esta característica. Debido a que en todas ellas se observaron plantas con pubescencia en la quilla, pubescencia hacia el ápice de la lema y la pálea y/o cubiertas con vello corto. Únicamente la línea N11-9, presentó 100% de pubescencia hacia el ápice de la lema y la pálea y las líneas N1-8 y CPM10-22 las cuales tuvieron un 100% de glumas cubiertas con vello corto.

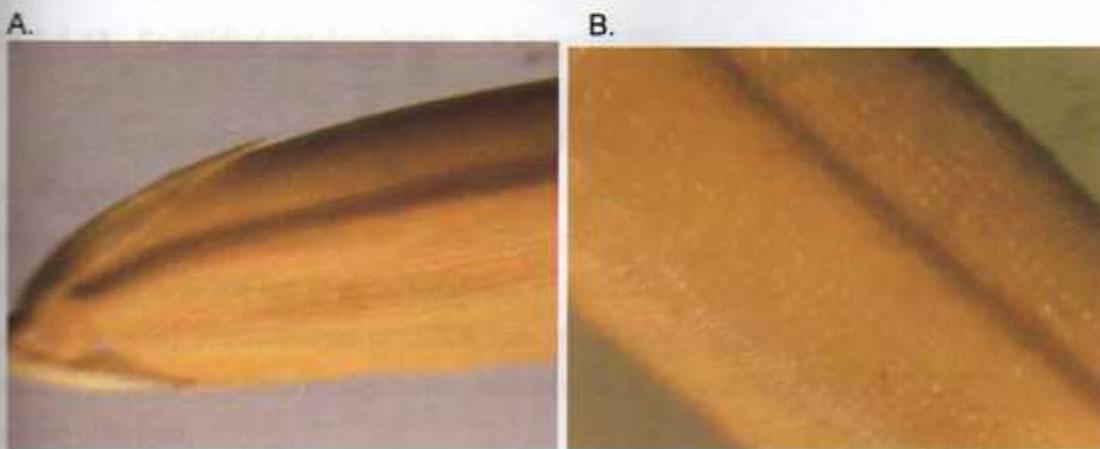


Figura 20. Pubescencia predominante de las glumas. **A.** Glumas transgénicas de la variedad CR-1821, se observa poca pubescencia **B.** Glumas del control CR-1821, mayor cobertura de vellos.

4.1.5.1.9 Densidad predominante de la panícula

Con respecto a esta característica, en los controles, el 91.11% de las plantas presentó panículas compactas y el 8.89% semicompactas. Ningún control presentó densidad intermedia (Anexo 1).

Las transgénicas presentaron un 68.18% panículas con densidad compacta, 31.22% semicompacta y un 0.6% intermedia. Las únicas tres panículas intermedias se presentaron en las líneas N1-9, CPM10-39 y CPM2-5. Las plantas de las líneas N9-1, N5-9, N1-8 y C31-25 presentaron todas 100% panículas compactas, al igual que el testigo CR-5272.

4.1.5.1.10 Número de granos vanos (estériles) en el ápice de la panícula

Se observó un alto porcentaje de plantas con granos estériles en el ápice de la panícula. En general, de 551 panículas analizadas (39 líneas transgénicas y 2 controles), 82.9% (457) presentó cuatro granos estériles en el ápice de la panícula, 12.9% tres granos estériles, 3.1% dos granos estériles y 1.1% presentó un grano estéril (Anexo 1). Se presentó el mismo patrón de un porcentaje mayor con cuatro granos estériles, tanto en los controles como en las líneas transgénicas, (55.6% y 85.37% respectivamente), y un menor porcentaje con un grano estéril (4.4% y 0.79%).

4.1.5.1.11 Fertilidad predominante de la panícula

La fertilidad de las panículas en la generación de líneas T2 fue muy baja, tanto en las líneas transgénicas como en los controles. Del total de panículas analizadas, incluyendo líneas transgénicas y controles, 88.7% (489) fueron parcialmente estériles (menos del 50% de los granos fértiles), el 10.3% fue completamente estéril (0% de granos fértiles) y solamente un 0.9% fue parcialmente fértil (50% a 71% de granos fértiles) (Anexo 1). Ni las líneas transgénicas ni los controles presentaron panículas muy fértiles o fértiles.

4.1.5.1.12 Desgranado predominante de la panícula

Esta característica fue similar tanto para las líneas transgénicas como para las variedades comerciales. El 100% de los controles presentó desgrane difícil. En las líneas transgénicas el 95.65% presentaron desgrane difícil, 4.15% moderadamente difícil y 0.2% intermedio. Ni las transgénicas ni los controles tuvieron desgrane moderadamente susceptible y/o susceptible (Anexo 1).

4.1.5.1.13 Color de las glumas fértiles (lema y pálea) del grano apical de la panícula

Con respecto a la coloración que presentan las glumas fértiles del grano apical de la panícula, se observó gran variabilidad tanto en las líneas transgénicas como en los controles. En las líneas transgénicas el color de las glumas que presentó un mayor porcentaje fue el café amarillento (64.26%), mientras que en los controles fue el de surcos dorados sobre fondo pajizo (77.8%) (Anexo 1).

Algo interesante de resaltar fue que de los siete colores que muestra dicho descriptor varietal, se observó que en las variedades comerciales no transgénicas, no se presentaron glumas fértiles de color púrpura, ni café rojizo o púrpura, ni tampoco glumas con manchas púrpura sobre fondo pajizo, a diferencia de las líneas transgénicas (Anexo 2).

4.1.5.1.14 Hábito predominante de crecimiento

Las líneas transgénicas y las no transgénicas mostraron hábitos de crecimiento similares. Las transgénicas presentaron en su mayoría crecimiento intermedio (38.2%) y semierecto (37.6%), y los testigos tuvieron crecimiento intermedio (48.9%) y abierto (26.7%) (Anexo 1). En ambas plantas (transgénicas y testigos) se presentaron los cinco tipos de hábitos de crecimientos para dicho descriptor varietal.

4.1.5.1.15 Capacidad predominante de macollamiento

La capacidad de macollamiento de las líneas transgénicas y los testigos fue entre muy prolifera (más de 20 hijos) y buena (de 15 a 19 hijos) en general (Anexo 1).

Se observó que las líneas transgénicas tuvieron un 10.5% de macollamiento muy pobre (menos de 7 hijos), el cual no se presentó en las variedades comerciales. Sin embargo, es importante destacar que las líneas transgénicas aunque producen menos hijos que los testigos, poseen mayor proporción de panículas por tallo que las plantas no transgénicas.

4.1.5.1.16 Resistencia predominante al acame

Con respecto a la resistencia al volcamiento de las plantas, se observó que el 99.3% de plantas evaluadas para esta característica no mostró acame y solamente el 0.7% no conservó su posición original (Anexo 1). El 100% de los testigos no transgénicos no presentó volcamiento.

En las plantas transgénicas un 99.21% no se volcó, mientras que un 0.79% (cuatro plantas) sí. Las líneas que tuvieron plantas sin resistencia al acame fueron: CP2-12 (dos plantas), N9-10 (una planta), CPM80-3 (una planta).

4.1.5.1.17 Exerción predominante de la panícula

La exerción de la panícula presentó un comportamiento distinto entre las líneas transgénicas y las variedades comerciales. De las 551 plantas evaluadas, se observó que el 62.97% presentaron exerción del tipo incluida (nudo ciliar cubierto por la vaina de la hoja bandera) lo cual puede afectar en gran medida su producción, 23.60% emergente (nudo ciliar por encima de la vaina de la hoja bandera) y 13.43% coincidente (cuando el nudo ciliar coincide con la zona de unión de la hoja bandera). Todas las plantas control evaluadas (45), tanto de la variedad CR-5272 como CR-1821 presentaron exerción incluida. Ninguna presentó exerción emergente, ni coincidente, lo cual, sí se observó en las líneas transgénicas (Figura 21).

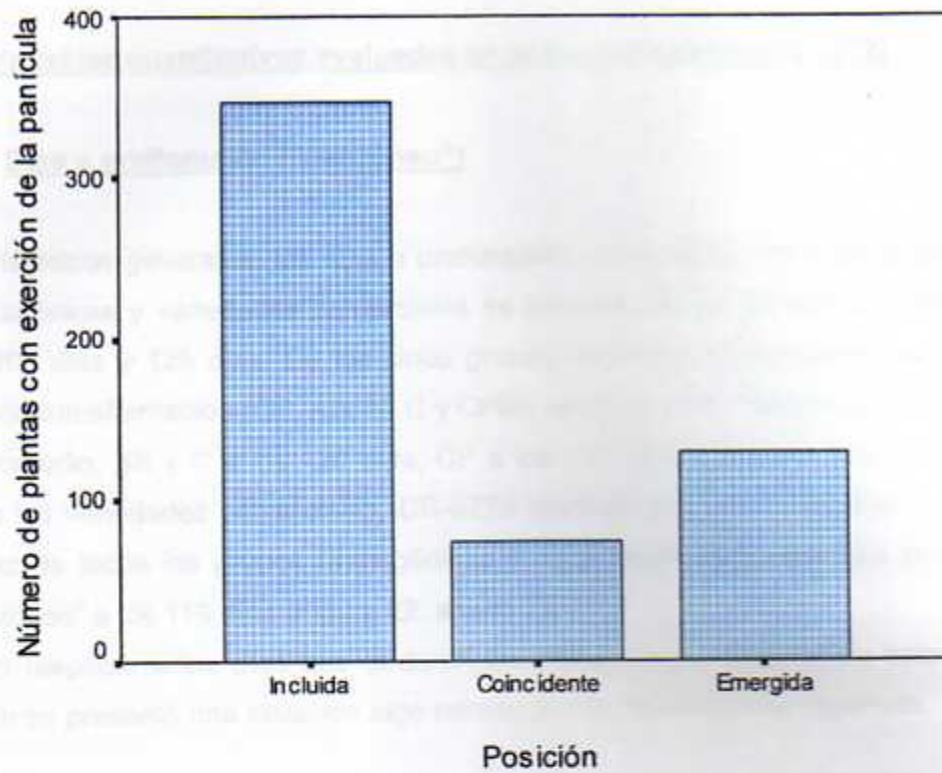


Figura 21. Número de plantas con ejerción incluida, coincidente o emergida de las plantas evaluadas en la generación T2, Alajuela.

4.1.5.2 Variables cuantitativas evaluadas en la segunda generación (T2)

4.1.5.2.1 Días a prefloración ("panzoneo")

En términos generales, los días a prefloración, observados entre los grupos de líneas transgénicas y variedades comerciales se presentó en un ámbito comprendido entre los 103 días y 125 días. De los cinco grupos de líneas transgénicas, según su estrategia de transformación (CP, AS, N, C y CPM), el grupo CPM "panzoneo" a los 119 días en promedio, AS y C a los 120 días, CP a los 121 días y N a los 125 días. Con respecto a las variedades comerciales, CR-5272 tardó en promedio 103 días y fue el más precoz de todos los grupos (transgénicas y no transgénicas); mientras que CR-1821 "panzoneo" a los 118 días (Figura 22, anexo 2).

Con respecto a los días que tardaron las plantas para alcanzar su estado de prefloración se presentó una situación algo retrasada a lo normalmente esperado.

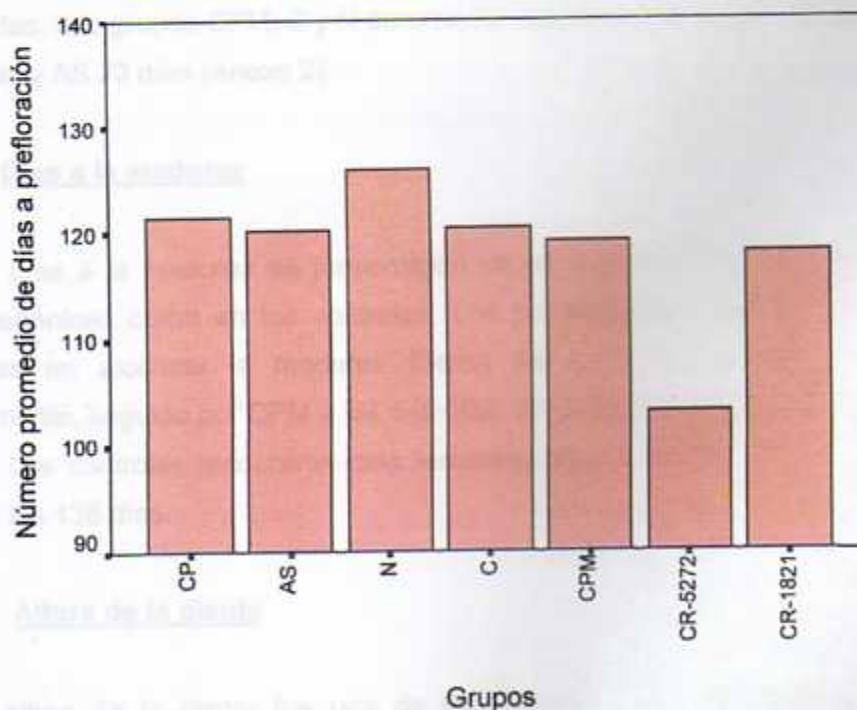


Figura 22. Número promedio de días a prefloración según grupo de transformación, segunda generación (T2), Alajuela.

4.1.5.2.2 Días a antesis

Los días a antesis (días transcurridos entre la siembra y el momento en que aparecieron las primeras anteras en el 50% de la población evaluada) se presentaron muy seguidos a los días a prefloración; y prácticamente coincidió con ésta.

De las líneas transgénicas, el grupo que alcanzó la antesis de primero fue CPM a los 119 días en promedio, posteriormente el grupo AS a los 120 días, C a los 121, CP a los 124 días y N a los 125 días (Anexo 2). Por otra parte, los controles CR-5272 y CR-1821 llegaron a la madurez a los 110 y 124 días respectivamente.

4.1.5.2.3 Duración de la antesis

La duración de la antesis (días transcurridos desde la aparición de las primeras anteras en el 50% de la plantas hasta la aparición de las anteras en la última planta de la población) fue muy similar entre las líneas transgénicas y las variedades no transformadas. Los grupos CPM, C y N duraron 20 días en antesis; CP, CR-5272 y CR-1821 22 días y AS 23 días (Anexo 2).

4.1.5.2.4 Días a la madurez

Los días a la madurez se presentaron en un ámbito variado, tanto entre las líneas transgénicas como en los controles. Los primeros dos grupos de las líneas transgénicas en alcanzar la madurez fueron AS y C, a los 142 y 143 días respectivamente, seguido por CPM a los 146 días, CP a los 149 días y N a los 154 días (Anexo 2). Los controles maduraron más tempranamente; CR-5272 a los 124 días y CR-1821 a los 138 días.

4.1.5.2.5 Altura de la planta

La altura de la planta fue una de las variables que evidenció diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las variedades comerciales. Las líneas con el extremo 3' del gen de la proteína de cápside del RHBV (grupo C), fueron las que presentaron mayor tamaño (84.19cm en promedio); seguidas por las líneas N con 76.46cm, AS con 72.56cm, CP con 71.67cm y CPM con 61.80cm (Anexo 2). Las

variedades CR-5272 y CR-1821 presentaron alturas bastante menores a las líneas transgénicas, 33.63cm y 26.27cm en promedio respectivamente; alturas muy por debajo de lo esperado para las variedades (entre 50 y 60 cm).

Por otra parte, si se comparan las líneas transgénicas que integran los grupos CP, AS, N y C individualmente contra su progenitor comercial no transgénico CR-1821 se puede observar que la línea más alta fue C37S-7 con 93.20cm y la más baja N9-7 (57.30cm) (Anexo 3) (Figura 23).

Al comparar las líneas CPM contra CR-5272 (Figura 24), se observa que CPM80-4 es la más alta (83.81cm en promedio) y CPM2-5 la más baja (47.25 cm); sin embargo, en ambos casos (CR-1821 y CR-5272), siguen siendo más altas las transgénicas que las variedades comerciales.

Según los análisis estadísticos, dentro de los cinco grupos de transformación el grupo CP y AS no presentaron diferencias significativas en altura de la planta ($p > \alpha$) ($p=0.186$ y $p=0.163$), mientras que C, CPM y N si presentaron diferencias significativas ($p=0.000$). Por otra parte, entre todos los grupos de transformación, se presentaron diferencias significativas ($p=0.000$) (Anexo 4).

El análisis de contrastes reveló que los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes en la altura ($p=0.000$).

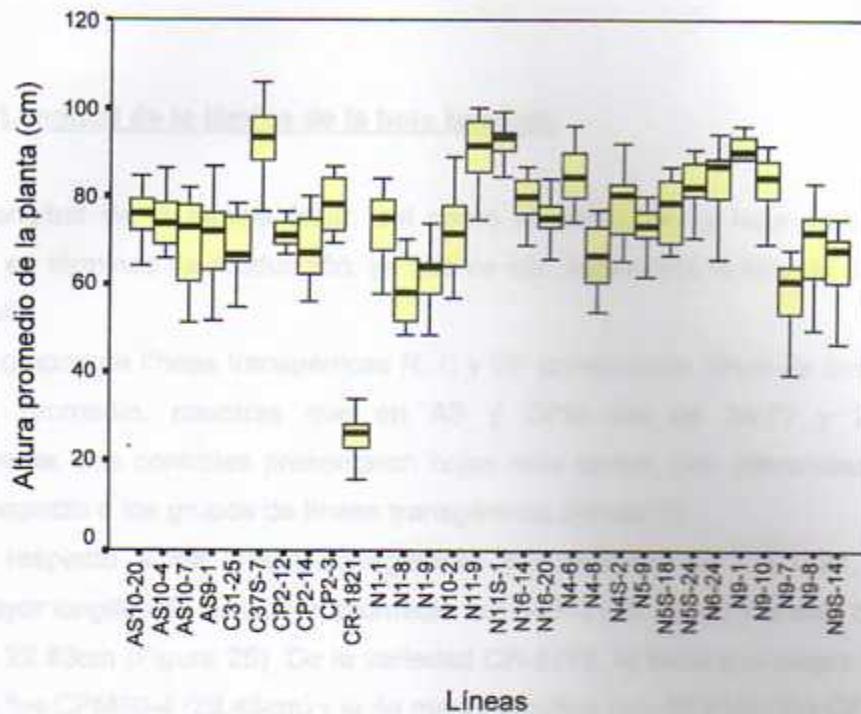


Figura 23. Altura promedio de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.

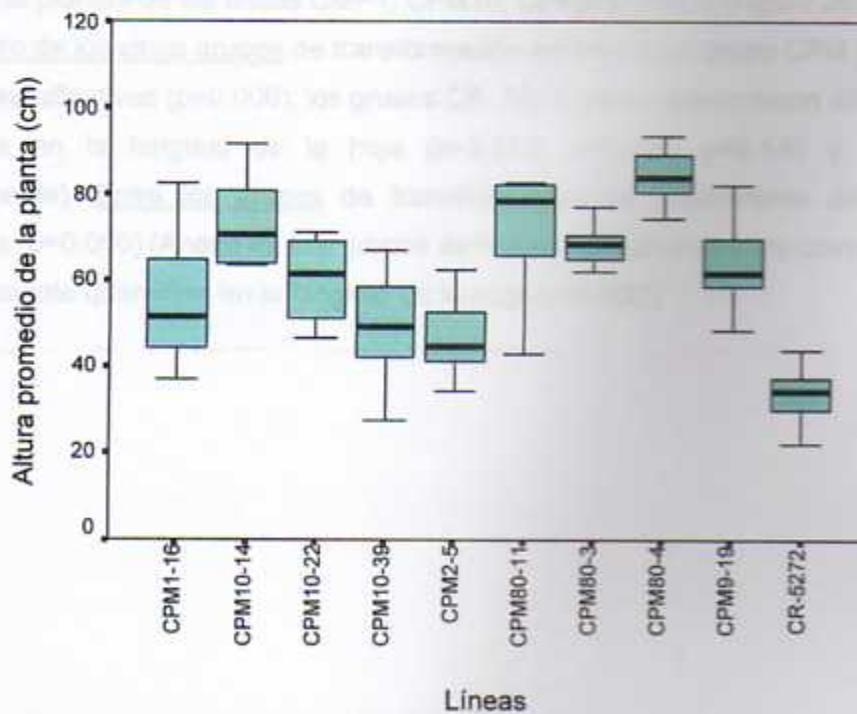


Figura 24. Altura promedio de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.

4.1.5.2.6 Longitud de la lámina de la hoja bandera

La longitud de la lámina foliar, así como el ancho de la hoja es de suma importancia en términos de producción, ya que de ello dependerá el llenado del grano de la panícula.

Los grupos de líneas transgénicas N, C y CP presentaron 29cm de longitud de la hoja en promedio, mientras que en AS y CPM fue de 24.77 y 24.41cm respectivamente. Los controles presentaron hojas más cortas, con diferencias de 5 y 10cm con respecto a los grupos de líneas transgénicas (Anexo 2).

Con respecto a las líneas transgénicas provenientes de CR-1821, la que presentó mayor longitud de la hoja en promedio fue N4S-2 (35.22cm) y la más corta fue AS10-7 con 22.83cm (Figura 25). De la variedad CR-5272, la línea con mayor longitud de la lámina fue CPM80-4 (29.48cm) y la de menor longitud con 19.91cm fue CPM10-22 (Figura 26). Cabe señalar que dentro de la variedad CR-5272 se nota que las líneas CPM80 (11, 3 y 4) tienen mayor longitud promedio de la hoja, así como también de altura, que las plantas de las líneas CMP1, CPM10, CPM2 y CPM 9 (Figura 26).

Dentro de los cinco grupos de transformación solamente el grupo CPM presentó diferencias significativas ($p=0.000$); los grupos CP, AS, C y N no presentaron diferencias significativas en la longitud de la hoja ($p=0.652$, $p=0.290$, $p=0.140$ y $p=0.138$ respectivamente). Entre los grupos de transformación, se presentaron diferencias significativas ($p=0.000$) (Anexo 4). Los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes en la longitud de la hoja ($p=0.000$).

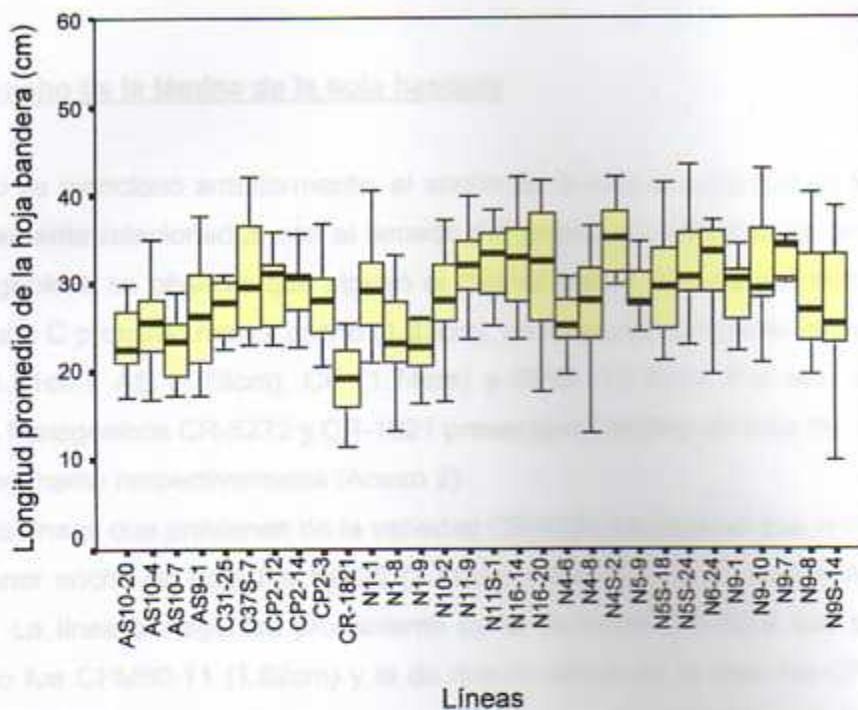


Figura 25. Longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.

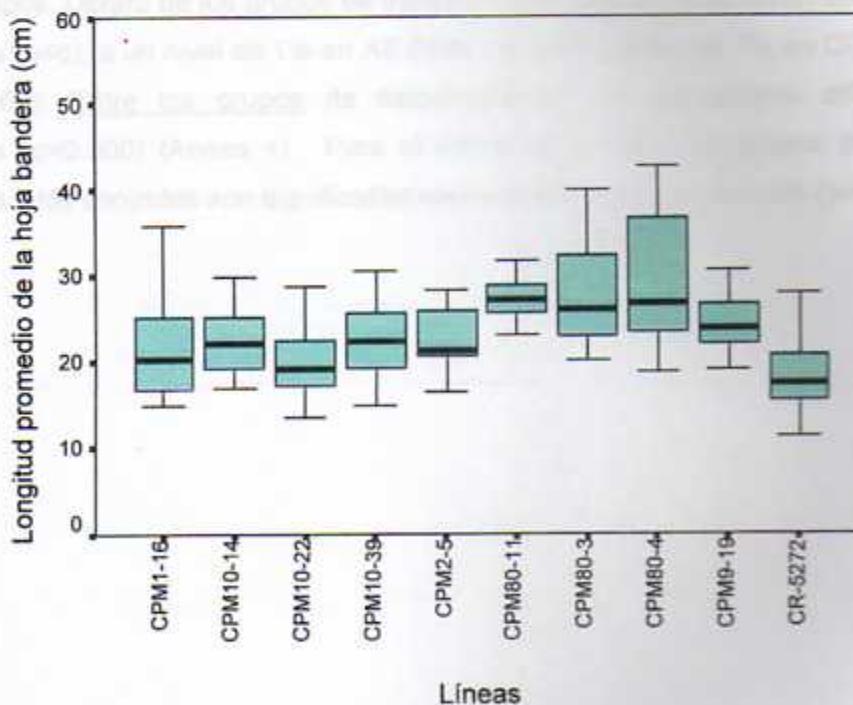


Figura 26. Longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.

4.1.5.2.7 Ancho de la lámina de la hoja bandera

Como se mencionó anteriormente, el ancho de la hoja al igual que su longitud, están directamente relacionados con el llenado del grano. Al comparar los grupos de líneas transgénicas se observa que siguen el mismo patrón que se presentó con la altura. El grupo C presentó mayor ancho (1.83cm), de forma descendente le siguen los grupos N (1.81cm), AS (1.79cm), CP (1.74cm) y CPM (1.61cm). Por otro lado, los controles no transgénicos CR-5272 y CR-1821 presentaron anchos de hoja de 1.45cm y 1.37cm en promedio respectivamente (Anexo 2).

De las líneas que provienen de la variedad CR-1821 se observó que la línea con mayor y menor ancho de hoja fue N6-26 (2.11cm) y N9-7 (1.38cm) respectivamente (Figura 27). La línea transgénica proveniente de la variedad CR-5272 que presentó mayor ancho fue CPM80-11 (1.82cm) y la de menor ancho de la hoja fue CPM10-39 (1.42cm) (Figura 28).

Con respecto al ancho de la hoja se observó gran variabilidad, tanto dentro como entre los grupos. Dentro de los grupos de transformación todos presentaron diferencias significativas ($p < \alpha$), a un nivel de 1% en AS CPM y N ($p=0.000$), y de 5% en CP (0.047) y C ($p=0.000$). Entre los grupos de transformación, se presentaron diferencias significativas ($p=0.000$) (Anexo 4). Para el ancho de la hoja, los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes a un nivel 2% ($p=0.000$).

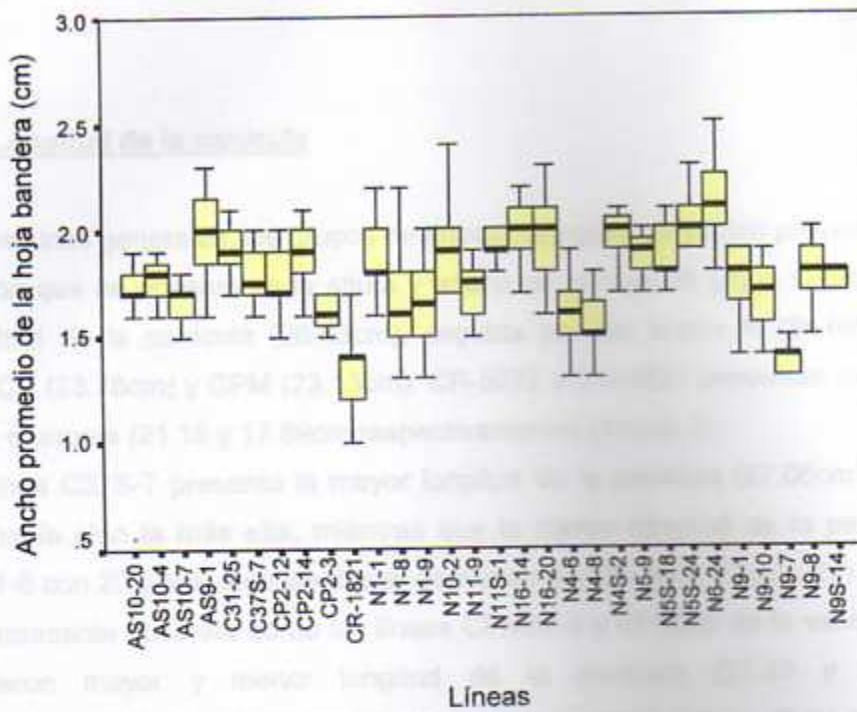


Figura 27. Ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.

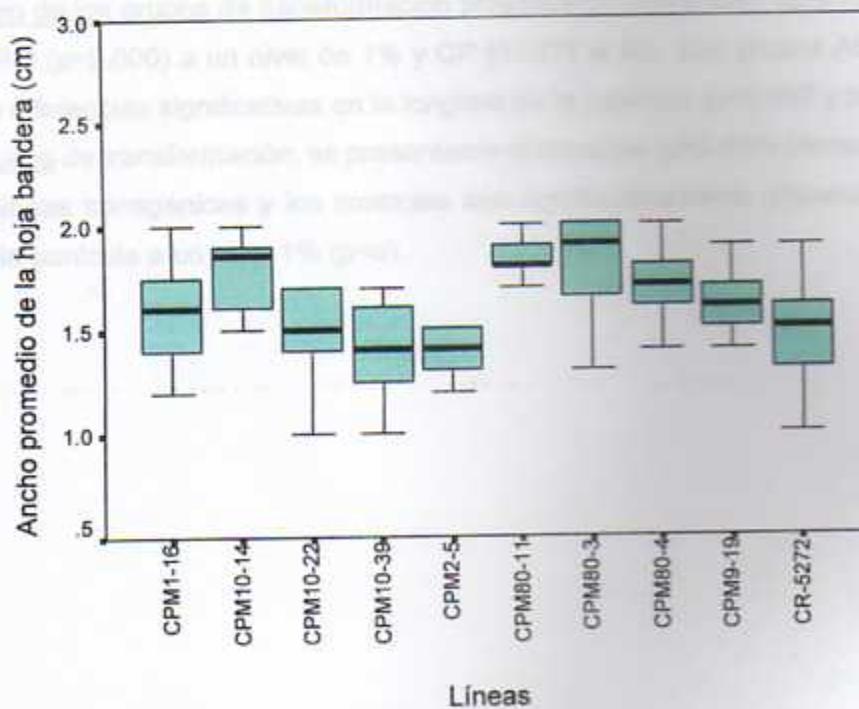


Figura 28. Ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.

4.1.5.2.8 Longitud de la panícula

En términos generales, los grupos de líneas transgénicas siguen presentando el mismo patrón que se observó en la altura y ancho de la hoja. El grupo C presenta la mayor longitud de la panícula (26.03cm), seguida por las líneas N (24.69cm), AS (24.29cm), CP (23.78cm) y CPM (23.13cm). CR-5272 y CR-1821 presentan longitudes de panícula menores (21.15 y 17.89cm respectivamente) (Anexo 2).

La línea C37S-7 presentó la mayor longitud de la panícula (27.06cm), misma línea que había sido la más alta; mientras que la menor longitud de la panícula la presentó N1-8 con 20.98cm para las líneas derivadas de CR-1821 (Figura 29). Por otro lado, es interesante observar como las líneas CPM80-4 y CPM2-5 de la variedad CR-5272, tuvieron mayor y menor longitud de la panícula (25.80 y 20.73cm respectivamente) siguiendo el mismo patrón que se presentó con la altura en dichas líneas (Figura 30).

Dentro de los grupos de transformación presentaron diferencias significativas C (0.002) y CPM ($p=0.000$) a un nivel de 1% y CP (0.027) al 5%. Los grupos AS y N no presentaron diferencias significativas en la longitud de la panícula ($p=0.097$ y $p=0.082$). Entre los grupos de transformación, se presentaron diferencias ($p=0.000$) (Anexo 4). Los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes en la longitud de la panícula a un nivel 1% ($p<\alpha$).

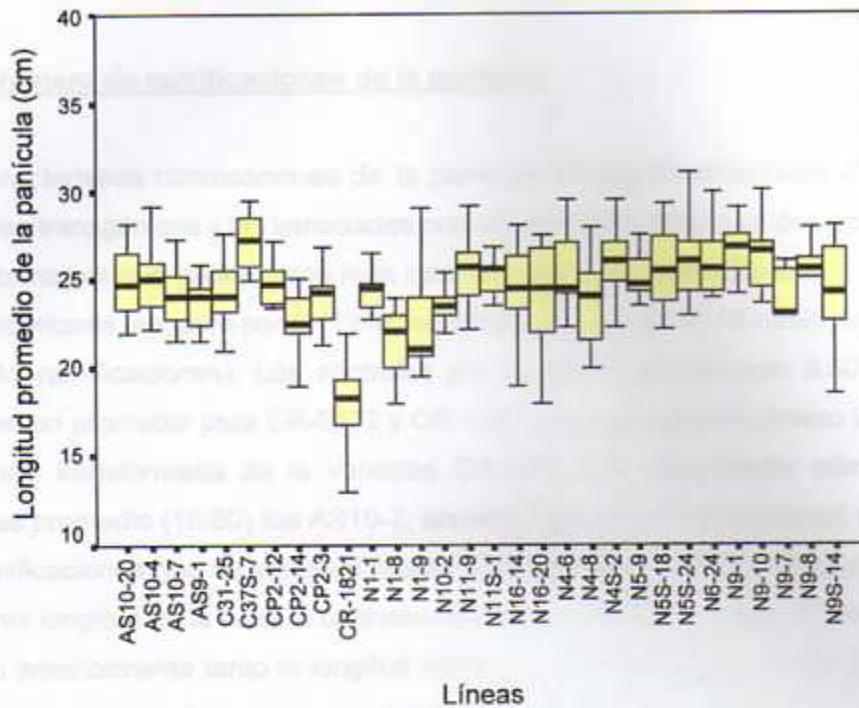


Figura 29. Longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.

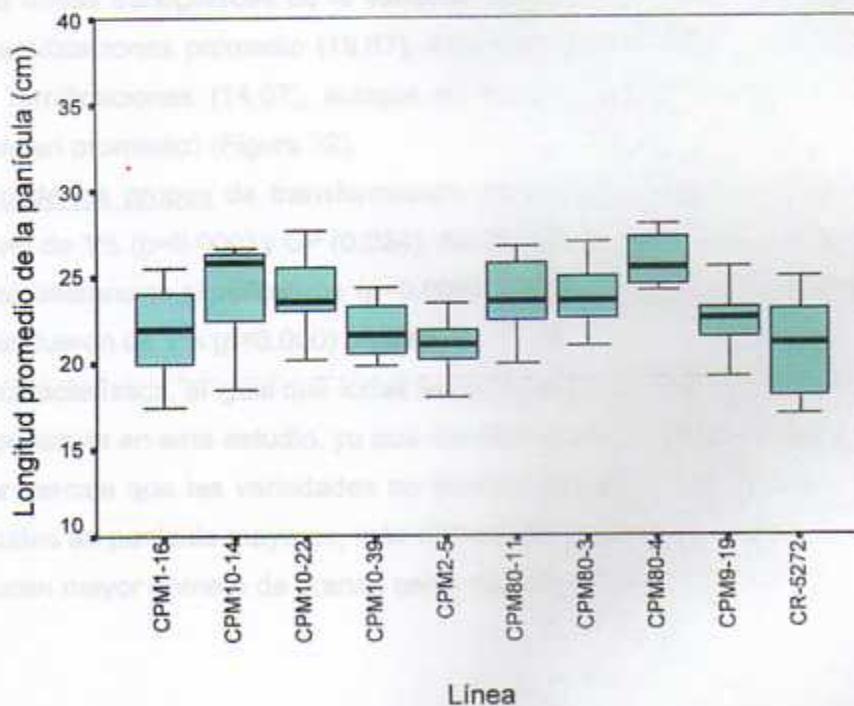


Figura 30. Longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.

4.1.5.2.9 Número de ramificaciones de la panícula

La característica ramificaciones de la panícula fue significativamente diferente entre las líneas transgénicas y las variedades comerciales ($p=0.000$). Los dos grupos de líneas transformadas que presentaron más ramificaciones en promedio fueron CP y N con 20 ramificaciones, seguido por C (19.45 ramificaciones), AS (18.18 ramificaciones) y CPM (17.41 ramificaciones). Los controles por su parte, presentaron 9.50 y 7.67 ramificaciones en promedio para CR-5272 y CR-1821 respectivamente (Anexo 2).

La línea transformada de la variedad CR-1821 que tuvo menor número de ramificaciones promedio (16.80) fue AS10-7, sin embargo dicha línea presentó más del doble de ramificaciones que su variedad madre (CR-1821). Esta misma línea presentó además menor longitud de la hoja; lo cual es una relación bastante válida, ya que como se mencionó anteriormente tanto la longitud como el ancho de la hoja tienen estrecha relación con las características de producción. La línea con mayor número de ramificaciones (22.33) fue N11S-1 (Figura 31).

En las líneas transgénicas de la variedad CR-5272, CPM80-3 presentó mayor número de ramificaciones promedio (19.67), mientras que CPM1-16 manifestó menor cantidad de ramificaciones (14.07), aunque en mayor número que el control (9.50 ramificaciones en promedio) (Figura 32).

Dentro de los grupos de transformación presentaron diferencias significativas CPM a un nivel de 1% ($p=0.000$) y CP (0.024), AS (0.027) y C ($p=0.067$) al 5%. El grupo N no presentó diferencias significativas ($p=0.066$). Entre los grupos de transformación, las diferencias fueron de 1% ($p=0.000$) (Anexo 4).

Esta característica, al igual que todas las que tienen relación con producción son de suma importancia en este estudio, ya que como se observa, las líneas transgénicas tienen mayor ventaja que las variedades no transformadas; lo anterior, debido a que tienen longitudes de panícula mayores, más número de ramificaciones por panícula y a su vez producen mayor número de granos como se presentará más adelante.

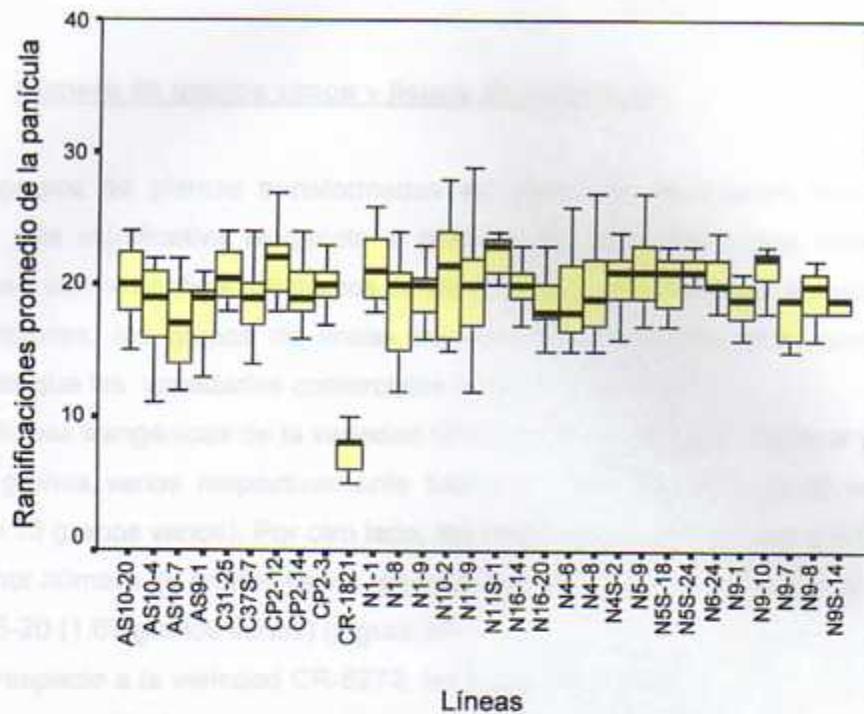


Figura 31. Número promedio de ramificaciones de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.

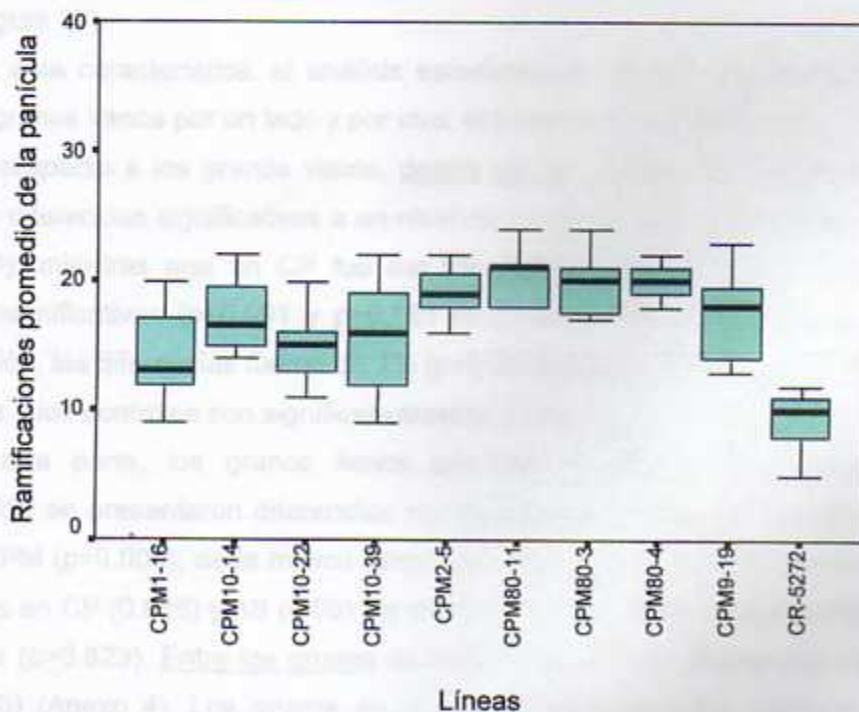


Figura 32. Número promedio de ramificaciones de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.

4.1.5.2.10 Número de granos vanos y llenos de la panícula

Los grupos de plantas transformadas así como las variedades comerciales presentaron una significativa tendencia a producir en promedio mayor número de granos vanos y menor cantidad de granos llenos (Anexo 2). Sin embargo, a pesar de las malas condiciones, los grupos de líneas transgénicas produjeron más número de granos totales que las variedades comerciales (Figura 33,34 y 35).

Las líneas transgénicas de la variedad CR-1821 que presentaron mayor y menor número de granos vanos respectivamente fueron N11S-1 (304.67 granos vanos) y AS10-7 (140.13 granos vanos). Por otro lado, las líneas de dicha variedad que tuvieron mayor y menor número de granos llenos respectivamente fueron AS10-4 (44.93 granos llenos) y N16-20 (1.67 granos llenos) (Figura 36).

Con respecto a la variedad CR-5272, las líneas con mayor y menor cantidad de granos vanos promedio fueron respectivamente CPM80-11 (234 granos) y CPM10-39 (116.38 granos). Las líneas de la variedad CR-5272 con mayor y menor cantidad de granos llenos promedio (41.60 y 8.07 granos) fueron respectivamente CPM80-3 y CPM2-5 (Figura 37).

Para esta característica, el análisis estadístico se dividió en dos, tomando el número de granos vanos por un lado y por otro, el número de granos llenos.

Con respecto a los granos vanos, dentro de los grupos de transformación se presentaron diferencias significativas a un nivel de 1% ($p < \alpha$) en el grupo N ($p=0.002$) y CPM (0.000); mientras que en CP fue del 5% ($p=0.031$). AS y C no presentaron diferencias significativas ($p=0.091$ y $p=0.163$ respectivamente). Entre los grupos de transformación, las diferencias fueron de 1% ($p=0.000$) (Anexo 4). Los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes ($p=0.000$).

Por otra parte, los granos llenos presentaron dentro de los grupos de transformación se presentaron diferencias significativas a un nivel de 1% ($p < \alpha$) en el grupo N y CPM ($p=0.000$); de la misma forma que se presentó para los granos vanos, mientras que en CP (0.016) y AS (0.05) fue del 5%. El grupo C no presentó diferencias significativas ($p=0.823$). Entre los grupos de transformación, las diferencias fueron de 1% ($p=0.000$) (Anexo 4). Los grupos de líneas transgénicas y los controles fueron significativamente diferentes a un nivel 1% ($p < \alpha$), excepto en los grupos CP y N, en los cuales no se dieron diferencias significativas ($p > \alpha$).

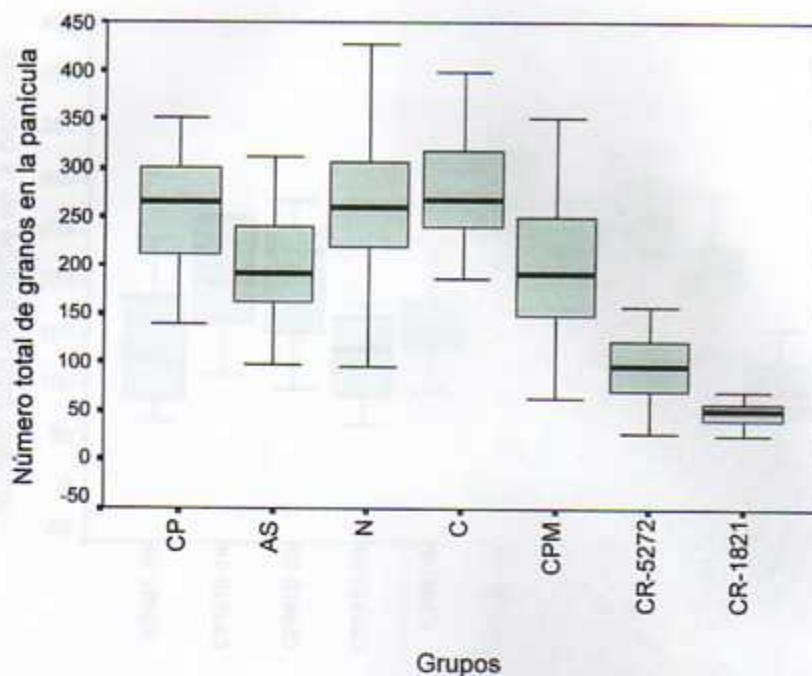


Figura 33. Número total de granos promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 según grupo de transformación, Alajuela.

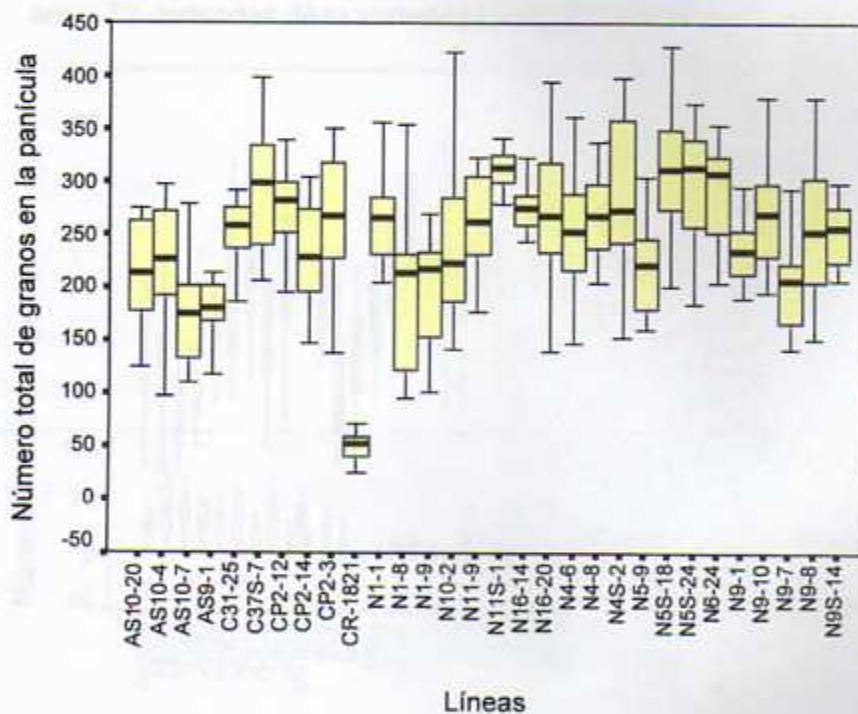


Figura 34. Número total de granos promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.

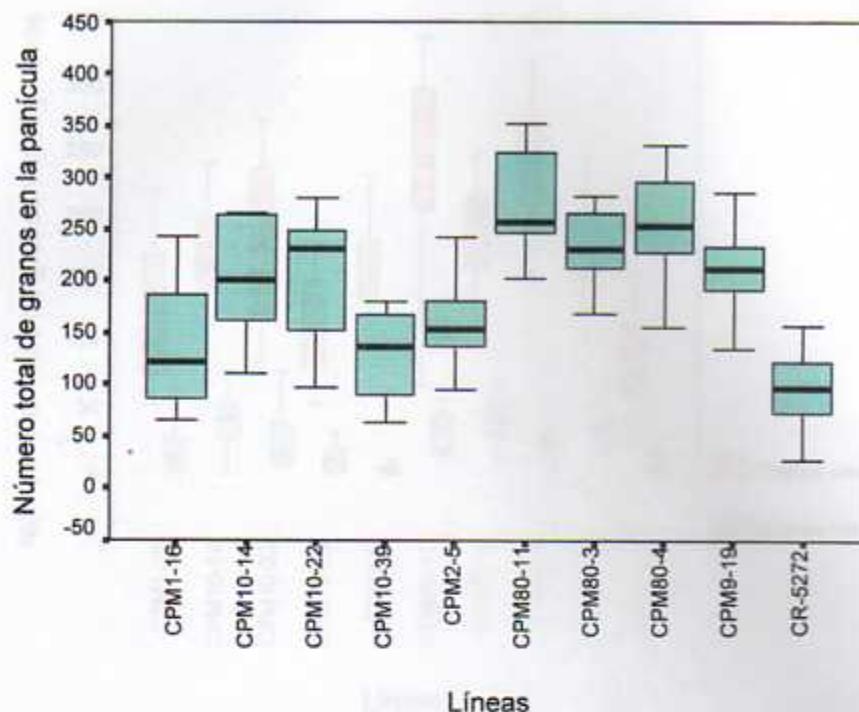


Figura 35. Número total de granos promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.

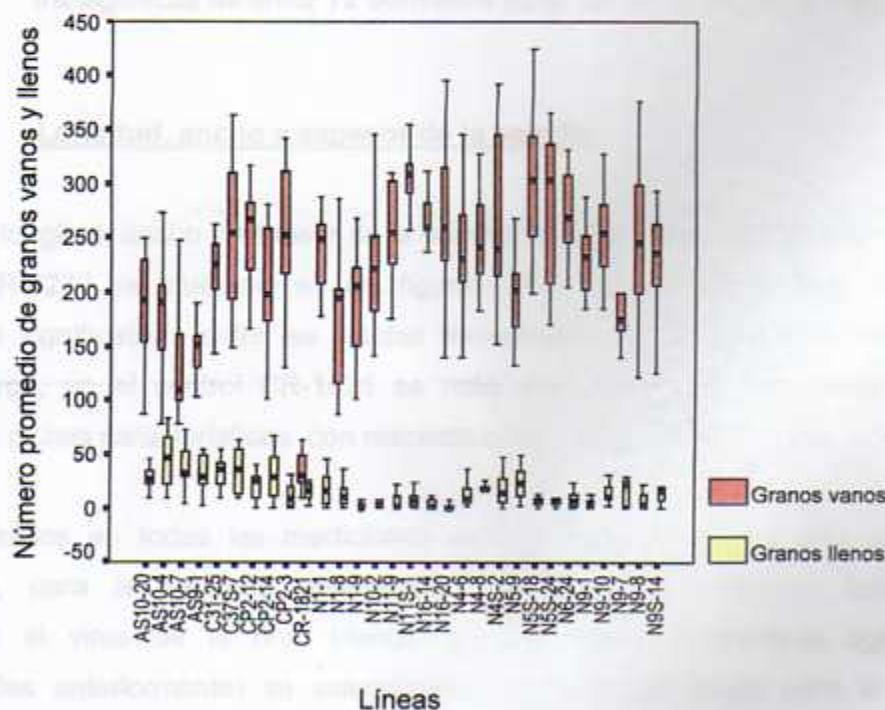


Figura 36. Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.

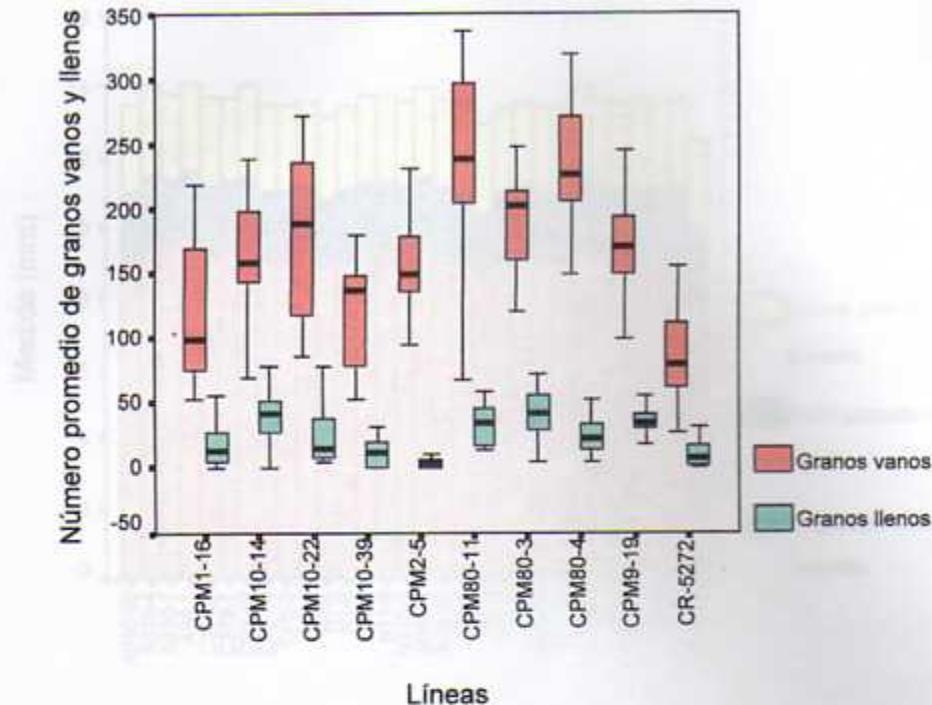


Figura 37. Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.

4.1.5.2.11 Longitud, ancho y espesor de la semilla

La longitud, ancho y espesor de la semilla para las líneas de las variedades CR-1821 y CR-5272 se muestran en las figuras 38 y 39 respectivamente. No existen diferencias significativas entre las plantas transgénicas y las variedades comerciales. Sin embargo, en el control CR-1821 se nota una leve diferencia, presenta menor medida de dichas características con respecto a las líneas transformadas.

Basados en todas las mediciones que se describieron en esta sección de resultados, para la segunda generación, (resistencia al herbicida fosfotricina, resistencia al virus de la hoja blanca, y todas las características agronómicas mencionadas anteriormente) se seleccionaron las mejores líneas para la siguiente generación (T3) (Cuadro 8)

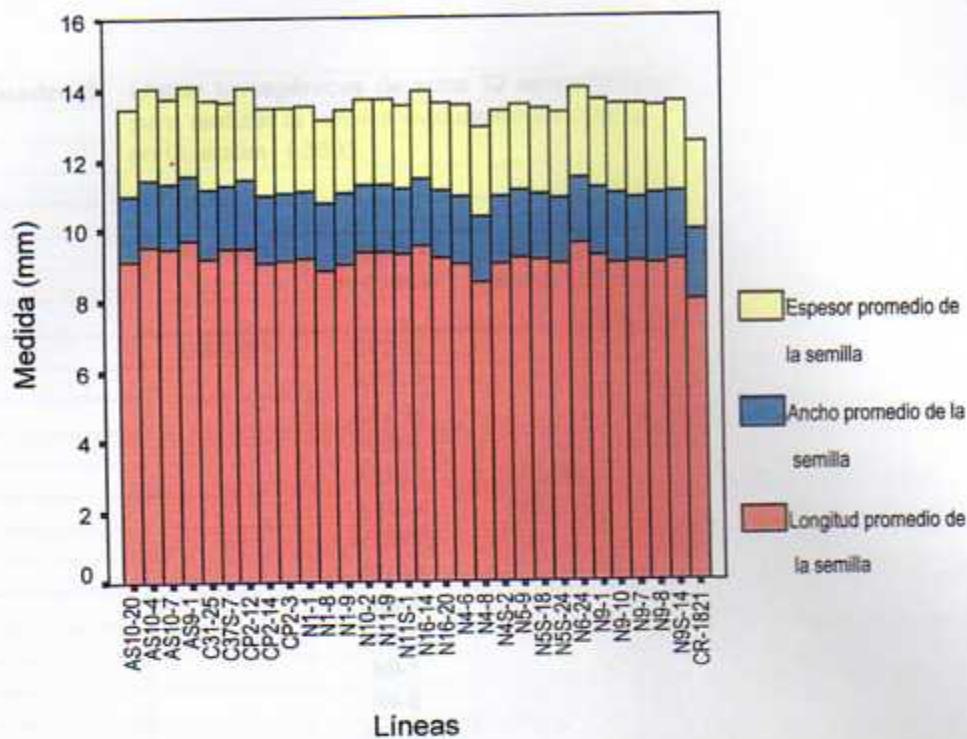


Figura 38. Longitud, ancho y espesor promedio de la semilla de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-1821, Alajuela.

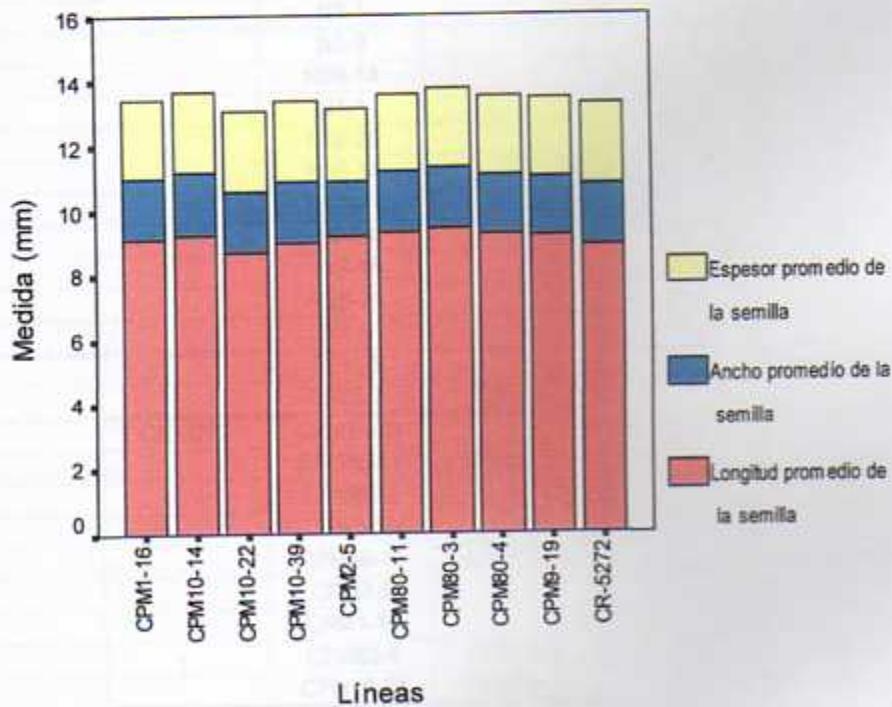


Figura 39. Longitud, ancho y espesor promedio de la semilla de líneas transgénicas de arroz T2 derivadas de la variedad CR-5272, Alajuela.

Cuadro 8. Líneas transgénicas de arroz T2 seleccionadas para realizar la tercera evaluación de campo en Guápiles, I-2003.

Variedad	Líneas T2 evaluadas	Líneas T2 seleccionadas
CR-1821	CP2-12	
	CP2-3	
	CP2-14	
	AS9-1	
	AS10-7	AS10-7
	AS10-4	AS10-4
	AS10-20	
	N9-10	
	N9-7	
	N9-8	
	N9-1	
	N4-6	
	N11-9	
	N4-8	
	N4S-2	
	N10-2	
	N9-1	
	N5-9	
	N9S-14	
	N1-1	
	N16-20	
	N16-14	
	N11S-1	
N6-24		
N5S-18		
N5S-24		
N1-8		
C31-25		
C37S-7	C37S-7	
CR-5272	CPM10-39	
	CPM80-11	CPM80-11
	CPM80-3	
	CPM9-19	
	CPM10-14	CPM10-14
	CPM2-5	
	CPM1-16	
	CPM80-4	CPM80-4
CPM10-22	CPM10-22	

4.1.6 Análisis de conglomerados

El análisis de conglomerados se definió para siete grupos, debido a que se evaluaron siete grupos, cinco transgénicos (AS, N, C, CP y CPM) y dos controles (CR-1821 y CR-5272).

Los resultados de dicho análisis muestran cómo están integrados cada uno de los siete grupos. El primero, está integrado principalmente por líneas N, una línea CPM (CPM80-4) y dos de las tres líneas CP (CP2-3 y CP2-12); el segundo grupo lo integran exclusivamente las líneas N; el tercero, dos líneas N (N1-9 y N1-8) y una CPM (CPM2-5), el cuarto por líneas CPM y uno de los dos controles de CR-5272 lo cual es bastante lógico ya que las líneas CPM derivan de dicho control; el quinto grupo, está representado únicamente por los dos controles (CR-1821 y CR-5272), el sexto grupo por las líneas AS, algunas CPM (CPM9-19 y CPM80-3), una línea CP (CP2-14) y una C (C31-25) y por último, el sétimo grupo exclusivamente por la línea C37S-7.

Los grupos al irse reduciendo a seis, cinco, cuatro, etc, hasta llegar a dos grupos se van integrando de forma completa o compacta al grupo con las siete características de producción más similares a las suyas (Figura 40).

Se han descrito los resultados de todas las características para las plantas evaluadas en la segunda generación. Incluyendo su análisis descriptivo, sus pruebas estadísticas de análisis de variancia para observar las diferencias dentro y entre las líneas; y los contrastes para definir las diferencias entre transgénicas y controles, específicamente para las siete características de producción; además del análisis de conglomerados. Seguidamente se describen los resultados en la tercera generación.

CONDOMINIO	7 GRUPOS	6 GRUPOS	5 GRUPOS	4 GRUPOS	3 GRUPOS	2 GRUPOS
1	NS-14 NS-0 NS-10 NS-1 NS-9 CP2-3 CP2-12	NS-14 NS-8 NS-10 NS-1 NS-24 NS-24 NS-18 NS-9 NS-2 NS-6 NS-20 NS-14 NS-14 NS-18-1	NS-14 NS-8 NS-10 NS-1 NS-24 NS-24 NS-18 NS-9 NS-2 NS-6 NS-20 NS-14 NS-14 NS-18-1	NS-14 NS-8 NS-10 NS-1 NS-24 NS-24 NS-18 NS-9 NS-2 NS-6 NS-20 NS-14 NS-14 NS-18-1	NS-14 NS-8 NS-10 NS-1 NS-24 NS-24 NS-18 NS-9 NS-2 NS-6 NS-20 NS-14 NS-14 NS-18-1	NS-14 NS-0 NS-10 NS-1 NS-9 CP2-3 CP2-12 40 AS10-4 41 AS10-20
2	NS-24 NS-24 NS-18 NS-2 NS-20 NS-14	NS-24 NS-24 NS-18 NS-2 NS-20 NS-14	NS-24 NS-24 NS-18 NS-2 NS-20 NS-14	NS-24 NS-24 NS-18 NS-2 NS-20 NS-14	NS-24 NS-24 NS-18 NS-2 NS-20 NS-14	NS-24 NS-24 NS-18 NS-2 NS-20 NS-14
3	NS-9 NS-14 CPM2-6	NS-9 NS-14 CPM2-6	NS-9 NS-14 CPM2-6	NS-9 NS-14 CPM2-6	NS-9 NS-14 CPM2-6	NS-9 NS-14 CPM2-6
4	CR-8272B CPM10-39 CPM10-22 CPM1-16	CR-8272B CPM10-39 CPM10-22 CPM1-16	CR-8272B CPM10-39 CPM10-22 CPM1-16	CR-8272B CPM10-39 CPM10-22 CPM1-16	CR-8272B CPM10-39 CPM10-22 CPM1-16	CR-8272B CPM10-39 CPM10-22 CPM1-16
5	CR-8272 CR-1821	CR-8272 CR-1821	CR-8272 CR-1821	CR-8272 CR-1821	CR-8272 CR-1821	CR-8272 CR-1821
6	CPM8-19 CPM80-3 CP2-14 C31-25 41 AS10-20	CPM8-19 CPM80-3 CP2-14 C31-25 41 AS10-20	CPM8-19 CPM80-3 CP2-14 C31-25 41 AS10-20	CPM8-19 CPM80-3 CP2-14 C31-25 41 AS10-20	CPM8-19 CPM80-3 CP2-14 C31-25 41 AS10-20	CPM8-19 CPM80-3 CP2-14 C31-25 41 AS10-20
7	C37S-7	C37S-7	C37S-7	C37S-7	C37S-7	C37S-7

Figura 40. Conformación de los conglomerados de las líneas transgénicas de arroz T2 y los controles no transgénicos en Agribiocnología, Alajuela.

4.2 TERCERA GENERACION (T3)

4.2.1 Resistencia al herbicida PPT

Se evaluó la resistencia al herbicida PPT en las líneas transgénicas y en plantas de las variedades CR-5272 y CR-1821 siete días después de ser asperjadas con una solución del herbicida FINALE. Se observó una clara diferencia entre la respuesta de las líneas transgénicas (figura 41A) y las variedades control (figura 41B), ya que en las primeras, la mayoría de las plantas no mostraron daño por el herbicida como clorosis o poco crecimiento, mientras que en las parcelas control predominó la necrosis y detención del desarrollo causada por el PPT.

A



B



Figura 41. A) Líneas transgénicas una semana después de la aplicación de FINALE. B) Plantas de la variedad CR-1821 una semana después de la aplicación de FINALE; la mitad de la parcela se mantuvo sin aplicación con el fin de evidenciar el efecto del herbicida.

Sin embargo, algunas plantas de las líneas transgénicas mostraron susceptibilidad al herbicida. Estas plantas fueron eliminadas con el fin de no considerarlas en las siguientes evaluaciones y no coleccionar su semilla, en caso de que lograran madurar y desarrollar panículas viables. En total, 26 líneas transgénicas (40,6%) segregaron el carácter de resistencia al herbicida, es decir, que mostraron

plantas susceptibles y plantas resistentes. Mientras que 38 líneas (59,4%) no segregaron la característica de resistencia.

4.2.2 Resistencia a infección natural de RHBV

Se evaluó la respuesta de las líneas transgénicas a la infección natural por el virus de la hoja blanca (RHBV) causada por una población natural del insecto vector, *Tagosodes orizicolus*. Aunque los primeros síntomas se observaron dos semanas después de la siembra, la evaluación se realizó cuando las plantas tenían dos meses de edad, con el fin de registrar los niveles más altos de infección. Las líneas y variedades control se clasificaron en cinco categorías, según el porcentaje de infección que presentaron: 0% de infección, 10% de infección, 25% de infección, 50% de infección, 75% de infección y 100% de infección (figuras 42 a 45).

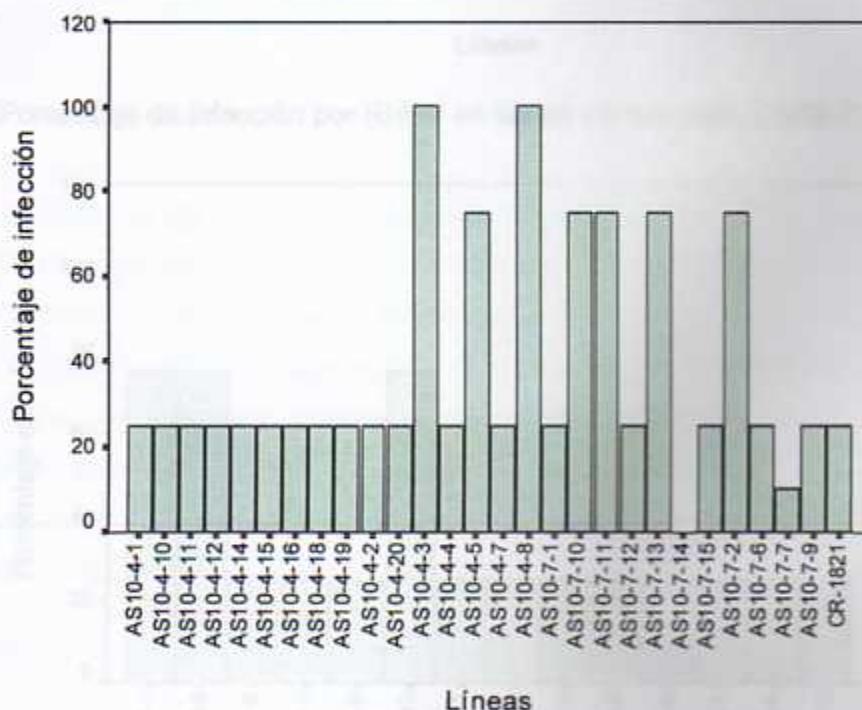


Figura 42. Porcentaje de infección por RHBV en líneas transgénicas AS10, Guápiles.

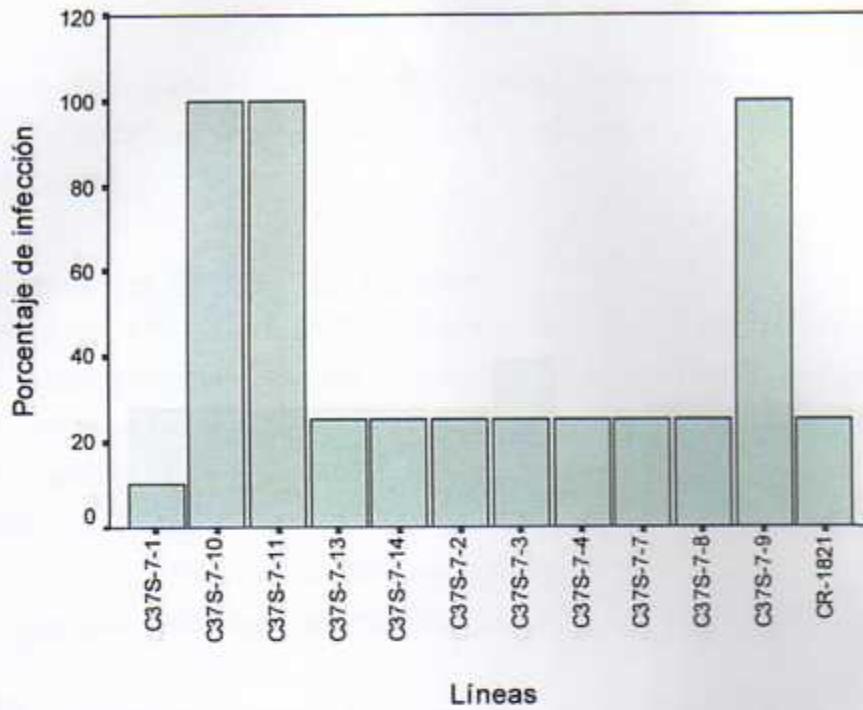


Figura 43. Porcentaje de infección por RHBV en líneas transgénicas C37S-7, Guápiles.

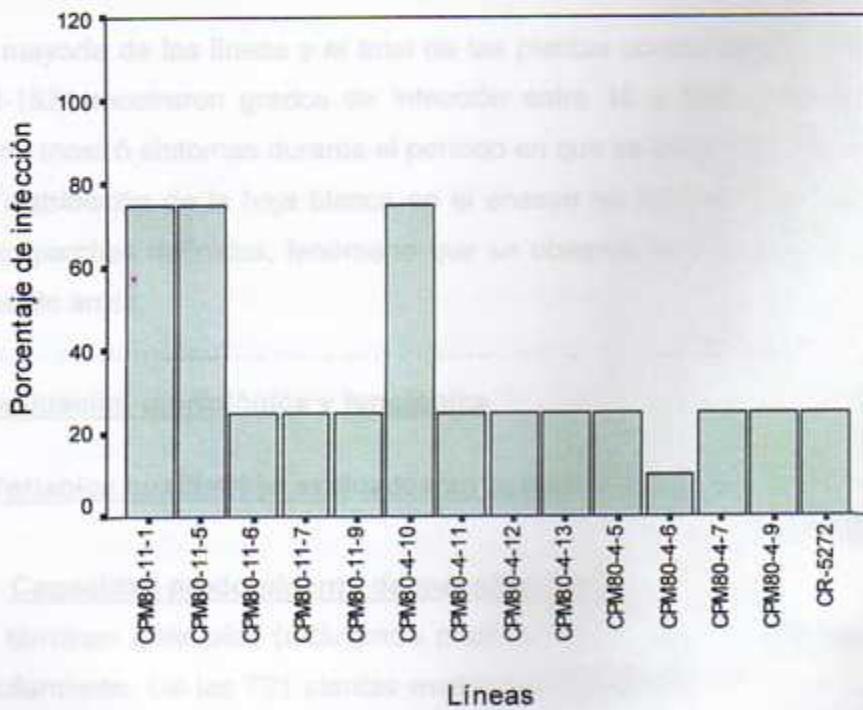


Figura 44. Porcentaje de infección por RHBV en líneas transgénicas CPM80, Guápiles.

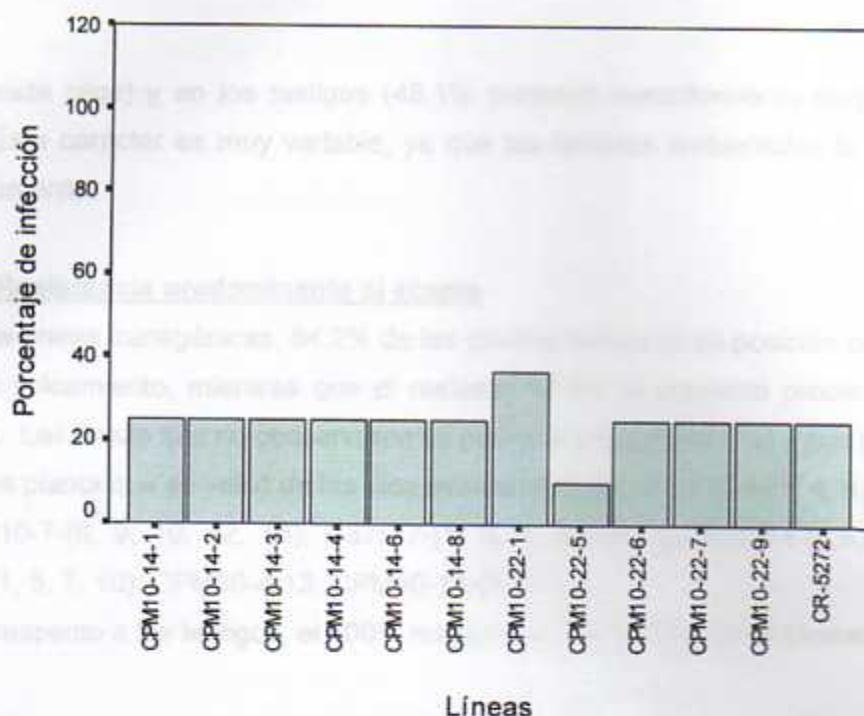


Figura 45. Porcentaje de infección por RHBV en líneas transgénicas CPM10, Guápiles.

La mayoría de las líneas y el total de las plantas control de las variedades CR-5272 y CR-1821 mostraron grados de infección entre 10 y 50%. Solamente la línea AS10-7-14 no mostró síntomas durante el período en que se desarrolló el ensayo.

La distribución de la hoja blanca en el ensayo no fue homogénea, sino que se presentó en parches definidos, fenómeno que se observa también en las plantaciones comerciales de arroz.

4.2.3 Evaluación morfológica y fenológica

4.2.3.1 Variables cualitativas evaluadas en la tercera generación (T3)

4.2.3.1.1 Capacidad predominante de macollamiento

En términos generales (incluyendo plantas transgénicas y testigos) se observó poco macollamiento. De las 721 plantas evaluadas, 77.4% presentó una capacidad de macollamiento muy pobre (menos de siete hijos), según el descriptor. El mismo patrón se observó específicamente en las líneas transgénicas (donde el 79.76% produjo

menos de siete hijos) y en los testigos (48.1% presentó macollamiento muy pobre) (Anexo 5). Este carácter es muy variable, ya que los factores ambientales lo afectan considerablemente.

4.2.3.1.2 Resistencia predominante al acame

En las líneas transgénicas, 84.2% de las plantas conservó su posición original y no presentó volcamiento, mientras que el restante 15.8% sí presentó problemas de volcamiento. Las líneas que no conservaron su posición original (15.8%) y que tuvieron al menos una planta que se volcó de las diez evaluadas fueron :AS10-4-(1, 4, 8, 11, 15, 19, 20); AS10-7-(6, 9, 10, 12, 14); C37S-7-(1, 3, 4, 8, 14); CPM10-14-(4,5,6,8,13); CPM10-22-(1, 5, 7, 10); CPM80-4-13; CPM80-11-(5, 7).

Con respecto a los testigos, el 100% mantuvo su posición original (Anexo 5).

4.2.3.1.3 Número de granos vanos (estériles) en el ápice de la panícula

La característica, número de granos vanos en el ápice de la panícula reflejó un resultado contrario al de la generación T2, en la que se presentó mayor esterilidad. De 316 panículas analizadas en total (incluyendo transgénicas y testigos), 47.8% presentaron un grano estéril en el ápice de la panícula, 28.5% dos granos estériles, 21.8% presentó todos los granos fértiles (opción que no se presentó en la T2), 1.6% presentó tres granos estériles y solamente el 0.3% (una panícula) tubo cuatro granos estériles (Anexo 5). El mismo patrón se presentó en las líneas transgénicas (19.2% presentó todos los granos fértiles, 47.4% presentó un grano estéril, 31.2% dos granos estériles, 1.8% tres granos estériles y solamente 0.4% cuatro granos estériles) y en los controles no transgénicos; un porcentaje mayor con uno y dos granos estériles y un menor porcentaje con tres granos estériles.

4.2.3.1.4 Exerción predominante de la panícula

En la generación T3 se presentó una situación inversa a la observada en la generación T2 con respecto a la exerción de la panícula. En la T2 la mayor parte de las plantas tuvieron panículas incluidas, mientras que en la T3 el 93.34% de las plantas evaluadas presentó exerción emergida, 3.46% coincidente y 3.2 incluida. De igual manera, los controles se comportaron de forma diferente al de los de la generación T2;

CR-5272 presentó plantas con ejerción incluida y emergente, mientras que CR-1821 presentó plantas con ejerción coincidente y emergente (Figura 46).

Si comparamos la ejerción de la panícula, en las generaciones T2 y T3, se puede decir que dicho carácter es bastante variable dependiendo de las condiciones ambientales en que se desarrolle la planta.

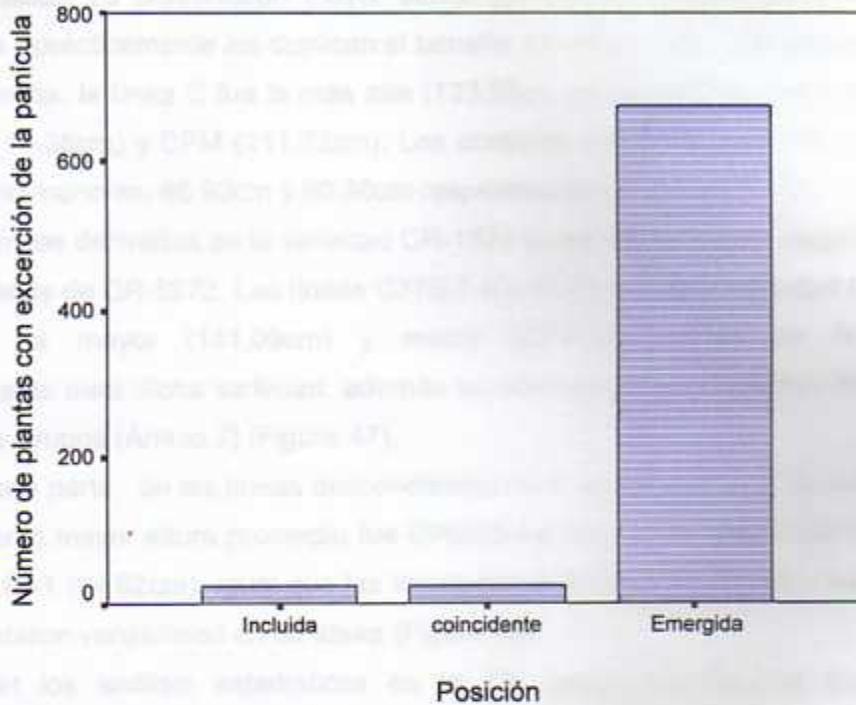


Figura 46. Número de plantas con ejerción incluida, coincidente o emergida de las plantas evaluadas en la generación T3, Guápiles.

4.2.3.2 Variables cuantitativas evaluadas en la tercera generación

4.2.3.2.1 Altura promedio de la planta

En términos generales, al igual que en la generación T2, las líneas transgénicas de la generación T3 presentaron mayor altura que las variedades comerciales no transgénicas y prácticamente les duplican el tamaño a los controles. Con respecto a los grupos de líneas, la línea C fue la más alta (133.36cm en promedio), seguida por las líneas AS (114.35cm) y CPM (111.72cm). Los controles CR-5272 y CR-1821 tuvieron alturas mucho menores, 66.93cm y 60.30cm respectivamente (Anexo 6).

Las líneas derivadas de la variedad CR-1821 presentaron alturas mayores a las líneas derivadas de CR-5272. Las líneas C37S-7-9 y AS10-4-7 de la variedad CR-1821 presentaron la mayor (141.09cm) y menor (92.47cm) altura de la planta respectivamente para dicha variedad; además se observa gran variabilidad de alturas dentro de los grupos (Anexo 7) (Figura 47).

Por otra parte, de las líneas descendientes de la variedad CR-5272, en la línea que se observó mayor altura promedio fue CPM80-4-6 con 133cm y la línea más baja fue CPM10-14-1 (94.62cm). Igual que las líneas provenientes de CR-1821, las de CR-5272 presentaron variabilidad en su altura (Figura 48).

Según los análisis estadísticos en la T3, dentro de los tres grupos de transformación (AS, C y CPM) todos presentaron diferencias significativas ($p=0.000$, $p=0.001$ y $p=0.000$ respectivamente). Por otra lado, entre los grupos de transformación, se presentó la misma situación, diferencias significativas a un nivel de 1% ($p=0.000$) (Anexo 8).

El análisis de contrastes reveló que los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes en la altura a un nivel de 1% ($p=0.000$).

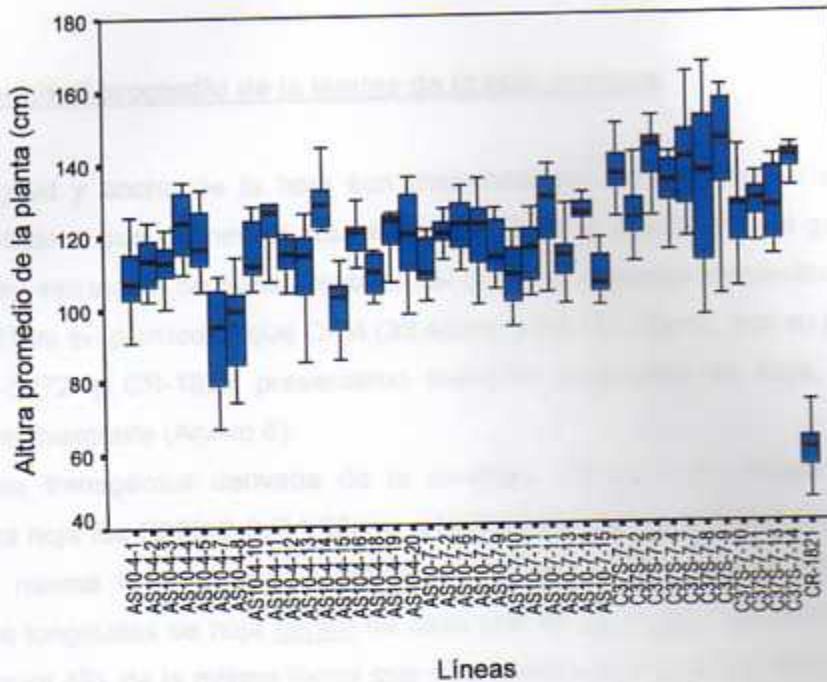


Figura 47. Altura promedio de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.

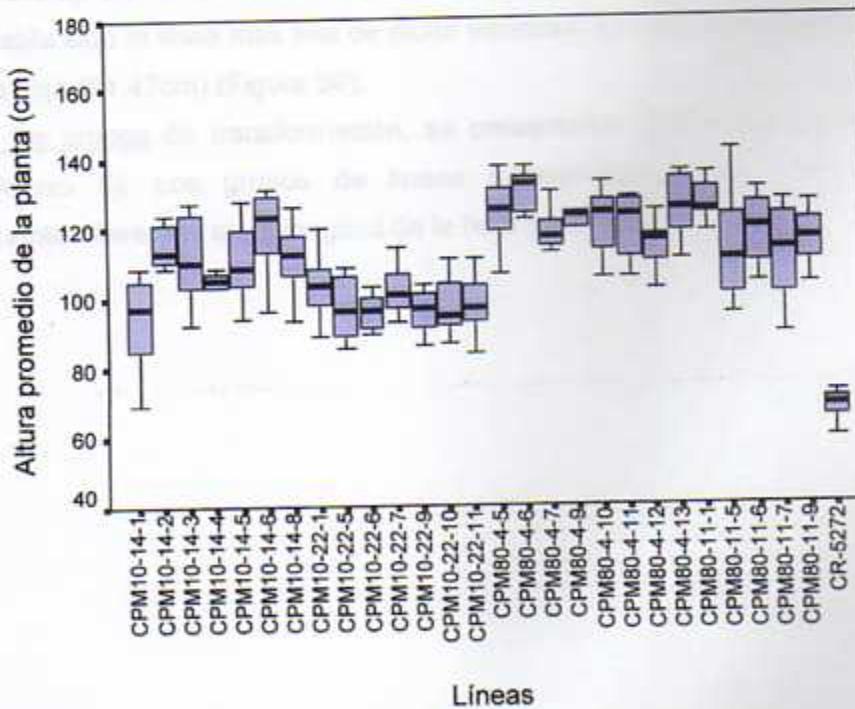


Figura 48. Altura promedio de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.

4.2.3.2.2 Longitud promedio de la lámina de la hoja bandera

La longitud y ancho de la hoja son determinantes en las características de producción debido a que definen el área fotosintética de la planta. De los grupos de líneas según su estrategia de transformación, el grupo C presentó longitudes de hoja mayores (43.21cm en promedio) que CPM (38.45cm) y AS (33.75cm); por su parte, los controles CR-5272 y CR-1821 presentaron menores longitudes de hoja, 24.10 y 20.17cm respectivamente (Anexo 6).

La línea transgénica derivada de la variedad CR-1821 con mayor longitud promedio de la hoja fue C37S-7-8 (51.56cm), y la línea con menor longitud fue AS10-4-7 (18.36cm), misma línea que presentó la menor altura. Se observó significativa variabilidad de longitudes de hoja dentro de cada uno de los grupos AS ($p=0.000$) y C ($p=0.001$) (Figura 49), de la misma forma que se presentó para la altura. Por otro lado, las líneas derivadas de la variedad CR-5272 no tuvieron diferencias significativas ($p=0.068$) (Anexo 8). La línea CPM80-4-6 presentó mayor longitud de la hoja (51.10cm) y a su vez, había sido la línea más alta de dicha variedad; CPM80-4-5 fue la de menor longitud de la hoja (31.47cm) (Figura 50).

Entre los grupos de transformación, se presentaron diferencias significativas ($p=0.000$) (Anexo 8). Los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes en la longitud de la hoja ($p=0.000$).

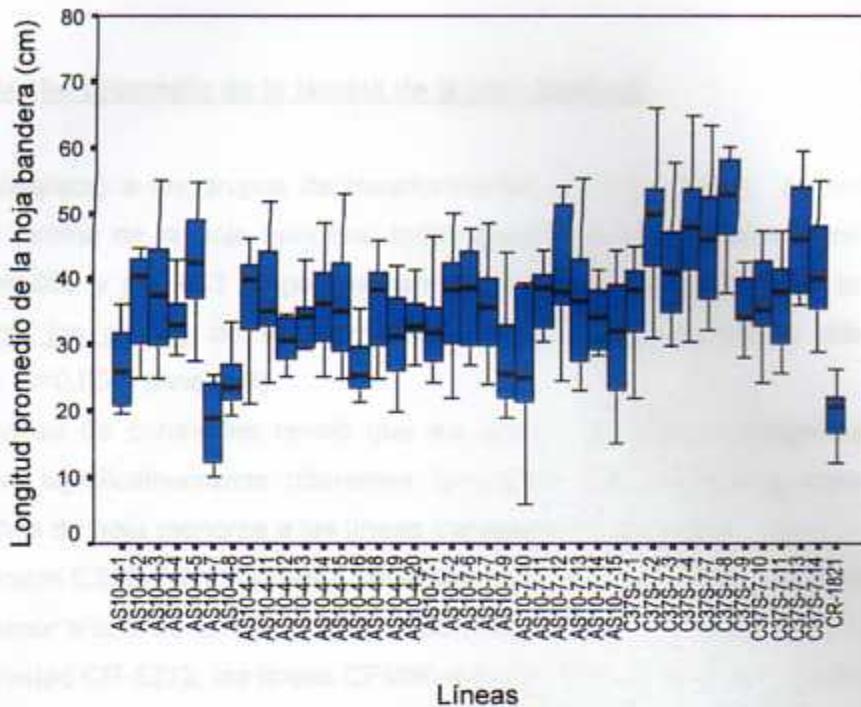


Figura 49. Longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.

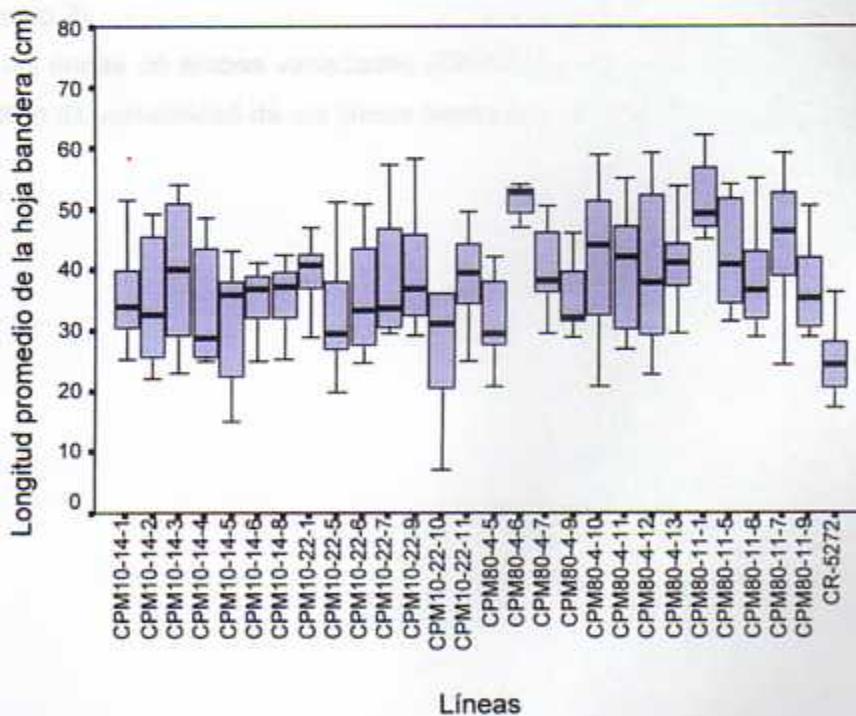


Figura 50. Longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.

4.2.3.2.3 Ancho promedio de la lámina de la hoja bandera

Con respecto a los grupos de transformación (C, AS y CPM), en relación al ancho de la lámina de la hoja bandera, todos presentaron diferencias significativas ($p=0.000$, $p=0.000$ y $p=0.003$ respectivamente), dentro de los grupos. De la misma manera, entre los grupos de transformación, también se presentaron diferencias significativas ($p=0.000$) (Anexo 8).

El análisis de contrastes reveló que los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes ($p=0.000$). Las variedades comerciales tuvieron anchos de hoja menores a las líneas transgénicas (Anexo 6).

Las líneas C37S-7-2 y AS10-4-8 derivadas de la variedad CR-1821, presentaron el mayor y menor ancho de la hoja (2.69 y 1.8cm respectivamente) (Figura 51), mientras que de la variedad CR-5272, las líneas CPM80-4-6 y CPM10-22-10 presentaron anchos de hoja de 2.54 y 1.95 cm respectivamente (Figura 50). Las diferencias en el ancho de la hoja entre las líneas CR-5272 es de aproximadamente 6 mm y 9 mm en las líneas de CR-1821 (Anexo 7).

Para las líneas de ambas variedades (CR-5272 y CR-1821) se sigue reflejando el mismo patrón de variabilidad de las líneas dentro de los grupos (Figuras 51 y 52).

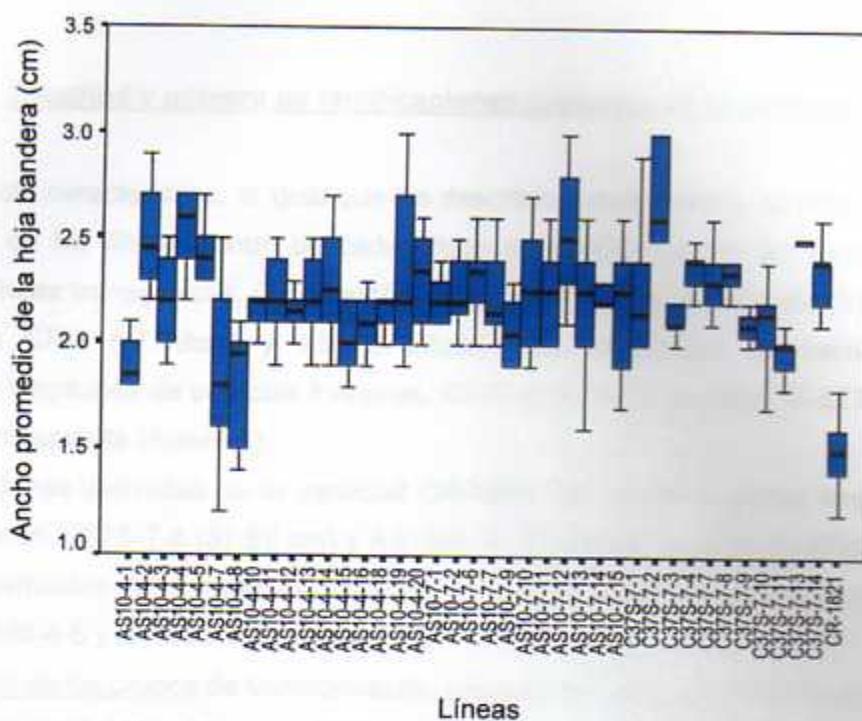


Figura 51. Ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.

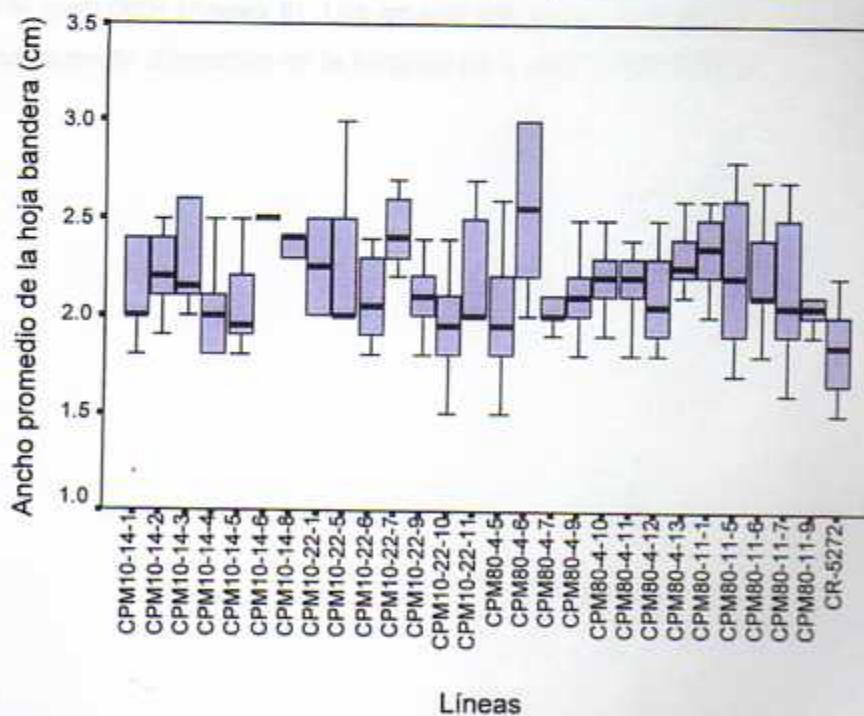


Figura 52. Ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.

4.2.3.2.4 Longitud y número de ramificaciones promedio de la panícula

En esta característica, al igual que las descritas anteriormente, se observa gran variabilidad de las líneas dentro de cada grupo de transformación. En términos de grupos de líneas transgénicas, C presentó la mayor longitud de la panícula (32.48cm), seguido de CPM (27.49cm) y AS (27.26cm). Las variedades no transgénicas presentaron longitudes de panícula menores, 23.07cm y 21.47cm para CR-5272 y CR-1821 respectivamente (Anexo 6).

Las líneas derivadas de la variedad CR-1821, con mayor y menor longitud de panícula fueron: C37S-7-8 (37.87 cm) y AS10-4-16 (23.04 cm) (Anexo 7). (Figura 53). Las líneas derivadas de la variedad CR-5272, con mayor y menor longitud de panícula fueron: CPM80-4-6 y CPM10-14-5 (Figura 54).

Dentro de los grupos de transformación presentaron diferencias significativas AS ($p=0.000$) y C ($p=0.001$). El grupo CPM no presentó diferencias significativas en la longitud de la panícula ($p=0.058$). Entre los grupos de transformación, las diferencias fueron de 1% ($p=0.000$) (Anexo 8). Los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes en la longitud de la panícula ($p=0.000$).

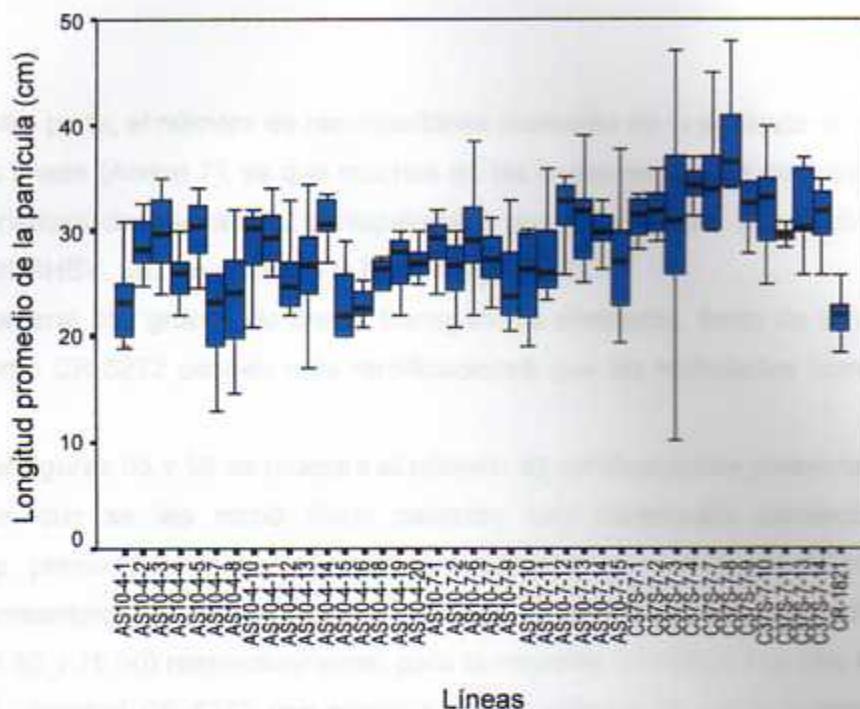


Figura 53. Longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.

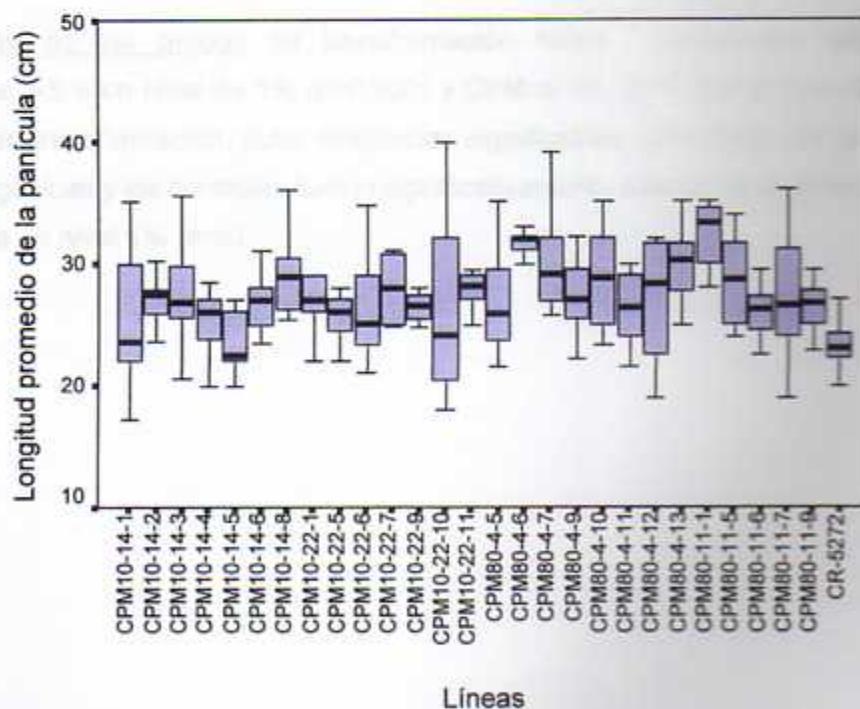


Figura 54. Longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.

Por otro parte, el número de ramificaciones promedio de la panícula no se midió en todas las líneas (Anexo 7), ya que muchas de las líneas se habían descartado, por sus características desfavorables, principalmente por volcamiento, susceptibilidad al herbicida o al RHBV, una de ellas fue la línea del grupo C.

En general, los grupos de líneas transgénicas derivadas, tanto de la variedad CR-1821 como CR-5272 poseen más ramificaciones que las variedades comerciales (Anexo 6).

En las figuras 55 y 56 se muestra el número de ramificaciones presentes en las líneas a las que se les midió dicho carácter. Las variedades comerciales no transgénicas, presentaron menor número de ramificaciones. Las líneas AS10-4-10 y AS10-4-1 presentaron el mayor y menor número de ramificaciones promedio de la panícula (24.80 y 15.60) respectivamente, para la variedad CR-1821. Por otro lado, las líneas de la variedad CR-5272 con mayor y menor número de ramificaciones de la panícula fueron: CPM10-14-6 (25.70) y CPM10-14-3 (20 ramificaciones) (Figuras 55 y 56).

Dentro de los grupos de transformación todos presentaron diferencias significativas, AS a un nivel de 1% ($p=0.000$) y CPM al 5% ($p=0.025$) (Anexo 8). Entre los grupos de transformación, hubo diferencias significativas ($p=0.000$). Los grupos de líneas transgénicas y los controles fueron significativamente diferentes en la longitud de la panícula a un nivel 1% ($p<\alpha$).

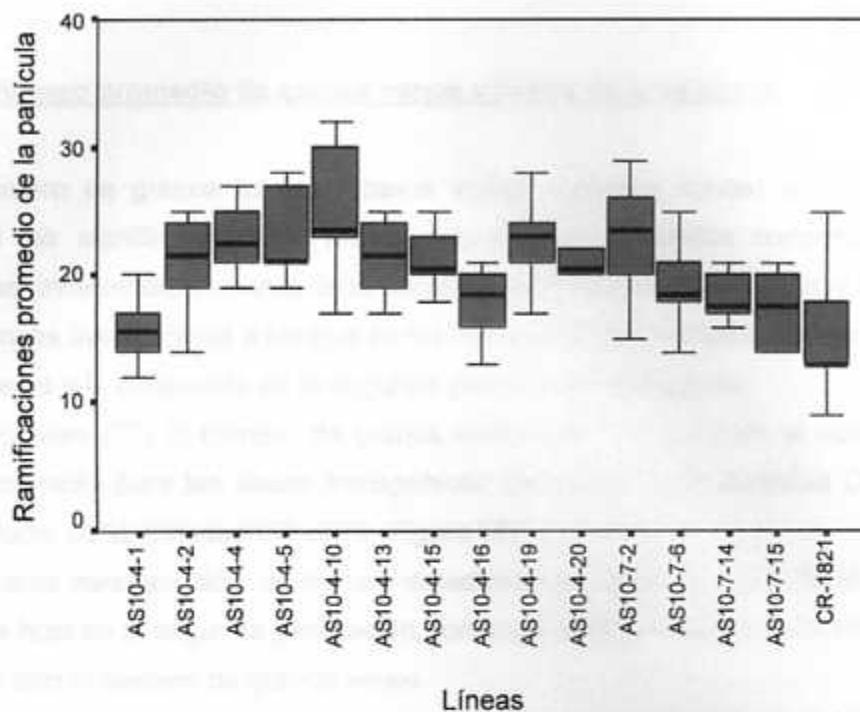


Figura 55. Número promedio de ramificaciones de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.

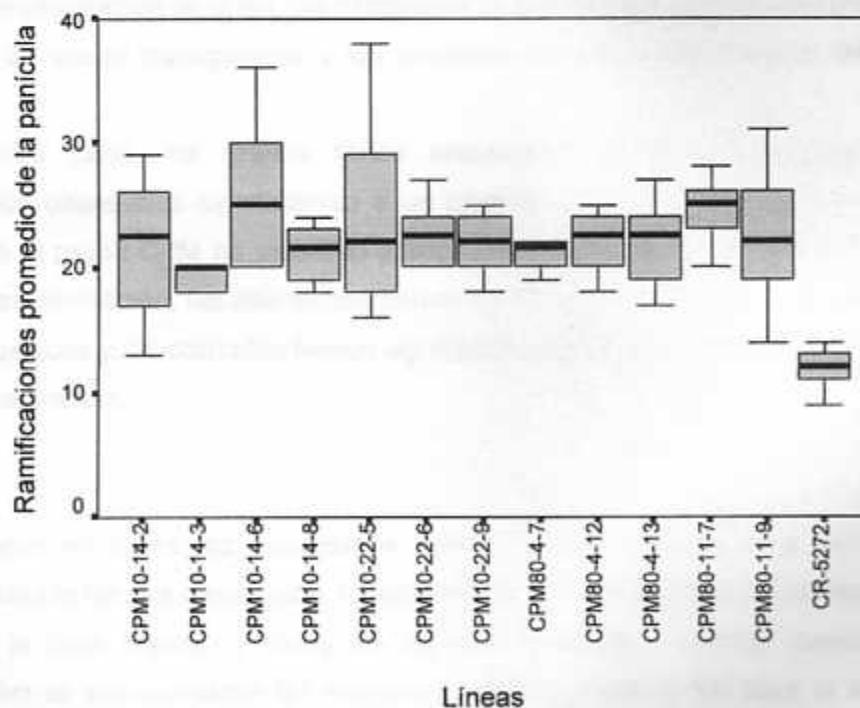


Figura 56. Número promedio de ramificaciones de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.

4.2.3.2.5 Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula

El número de granos totales (granos vanos + granos llenos) en las líneas transgénicas fue significativamente mayor que en las variedades comerciales no transformadas, independientemente de la variedad de la que provienen (Anexo 6).

Las líneas transgénicas a las que se les midió esta característica, reflejaron una situación inversa a la observada en la segunda generación en Alajuela.

En Guápiles (T3) el número de granos llenos fue mucho mayor al número de granos vanos, tanto para las líneas transgénicas derivadas de la variedad CR-1821 (Figura 57) como de la variedad CR-5272 (Figura 58).

Para esta característica, el análisis estadístico se dividió en dos de la misma forma que se hizo en la segunda generación, tomando el número de granos vanos por un lado y por otro el número de granos llenos.

Con respecto a los granos vanos, dentro de los dos grupos de transformación evaluados (AS y CPM) se presentaron diferencias significativas ($p=0.000$). Entre los grupos de transformación también, las diferencias fueron evidentes ($p=0.000$) (Anexo 8). Los grupos de líneas transgénicas y los controles son significativamente diferentes ($p=0.000$).

Por otra parte, los granos llenos presentaron dentro de los grupos de transformación diferencias significativas a un nivel de 1% ($p=0.000$) en el grupo AS, mientras que el grupo CPM no presentó diferencias significativas ($p=0.096$). Entre los grupos de transformación, las diferencias fueron de 1% ($p<\alpha$) (Anexo 8). Los grupos de líneas transgénicas y los controles fueron significativamente diferentes ($p=0.000$), en el análisis de contrastes.

Basados en todas las mediciones que se describieron en esta sección de resultados, para la tercera generación, (resistencia al herbicida fosfotricina, resistencia al virus de la hoja blanca, y todas las características agronómicas mencionadas anteriormente) se seleccionaron las mejores líneas T3 (Cuadro 13) para la siguiente generación (T4) en Guápiles.

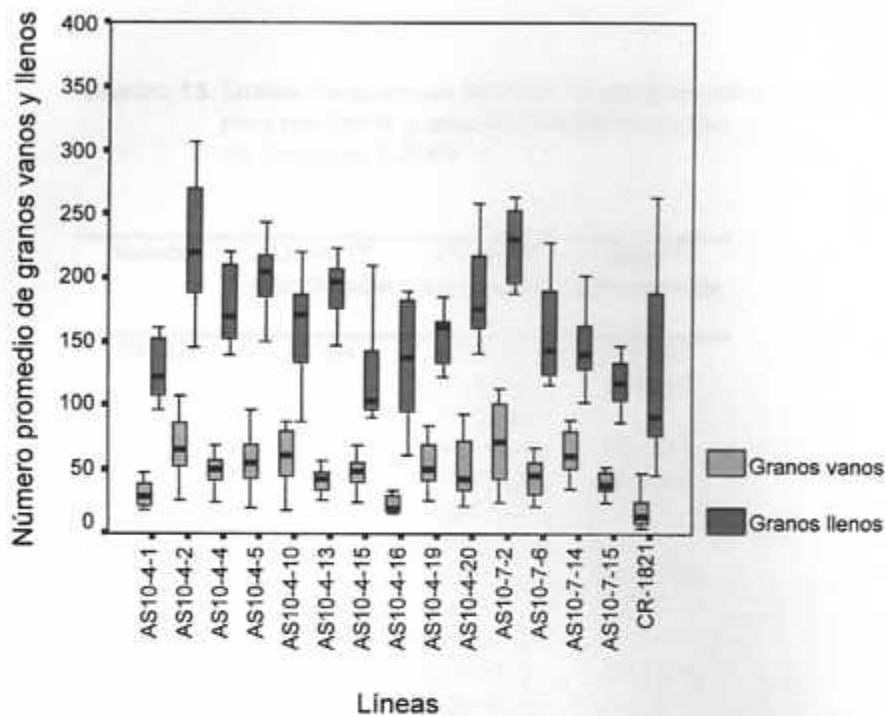


Figura 57. Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-1821, Guápiles.

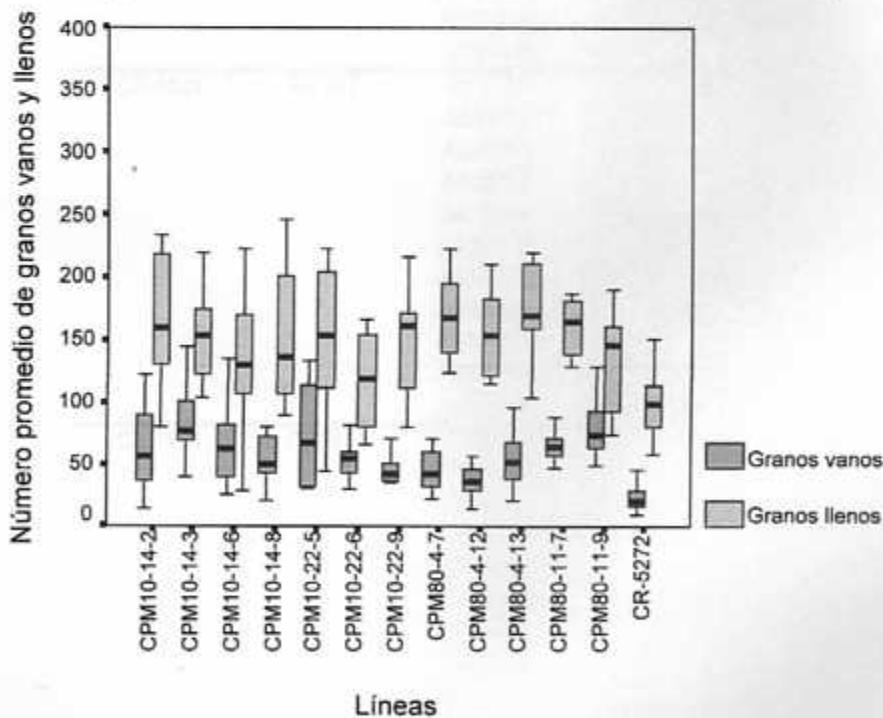


Figura 58. Número promedio de granos vanos y llenos de la panícula de líneas transgénicas de arroz T3 derivadas de la variedad CR-5272, Guápiles.

Cuadro 13. Líneas transgénicas de arroz T3 seleccionadas para realizar la cuarta evaluación de campo en Guápiles, II-2003.

Variedad	Líneas T2 seleccionadas	Líneas T3 evaluadas	Líneas T3 seleccionadas		
CR-1821	AS10-4	AS10-4-1	AS10-4-1		
		AS10-4-2	AS10-4-2		
		AS10-4-3			
		AS10-4-4	AS10-4-4		
		AS10-4-5	AS10-4-5		
		AS10-4-7			
		AS10-4-8			
		AS10-4-10	AS10-4-10		
		AS10-4-11			
		AS10-4-12			
		AS10-4-13	AS10-4-13		
		AS10-4-14			
		AS10-4-15	AS10-4-15		
		AS10-4-16	AS10-4-16		
		AS10-4-18	AS10-4-18		
		AS10-4-19	AS10-4-19		
		AS10-4-20	AS10-4-20		
		CR-1821	AS10-7	AS10-7-1	
				AS10-7-2	AS10-7-2
				AS10-7-6	AS10-7-6
AS10-7-7					
AS10-7-9					
AS10-7-10					
AS10-7-11					
AS10-7-12					
AS10-7-13					
AS10-7-14	AS10-7-14				
AS10-7-15	AS10-7-15				
CR-1821	C37S-7			C37S-7-1	
				C37S-7-2	
				C37S-7-3	
				C37S-7-4	
		C37S-7-7			
		C37S-7-8			
		C37S-7-9			
		C37S-7-10			
		C37S-7-11			
		C37S-7-13			
		C37S-7-14			

Continuación del cuadro 13. Líneas transgénicas de arroz T3 seleccionadas para realizar la cuarta evaluación de campo en Guápiles, II-2003.

CR-5272	CPM10-14	CPM10-14-1	
		CPM10-14-2	CPM10-14-2
		CPM10-14-3	CPM10-14-3
		CPM10-14-4	
		CPM10-14-5	
		CPM10-14-6	CPM10-14-6
		CPM10-14-8	CPM10-14-8
		CPM10-14-13	
CR-5272	CPM10-22	CPM10-22-1	
		CPM10-22-5	CPM10-22-5
		CPM10-22-6	CPM10-22-6
		CPM10-22-7	
		CPM10-22-9	CPM10-22-9
		CPM10-22-10	
CR-5272	CPM80-4	CPM80-4-5	
		CPM80-4-6	
		CPM80-4-7	CPM80-4-7
		CPM80-4-9	
		CPM80-4-10	
		CPM80-4-11	
		CPM80-4-12	CPM80-4-12
		CPM80-4-13	CPM80-4-13
CR-5272	CPM80-11	CPM80-11-1	
		CPM80-11-5	
		CPM80-11-6	
		CPM80-11-7	CPM80-11-7
		CPM80-11-9	CPM80-11-9

4.2.4 Destrucción de remanentes

Los desechos de los lotes en los que se llevó a cabo los ensayos de campo de la segunda y tercera generación de plantas transgénicas de arroz se eliminaron de la siguiente forma. Después de la cosecha se realizó una aplicación con el herbicida Gramurón para eliminar las plantas, después de una semana se volvió a aplicar Gramurón y en la siguiente semana se limpió y recogió el rastrojo para su incineración. De esta manera, una vez que se eliminaron las plantas se favoreció la germinación de la semilla remanente sobre el suelo. Dos semanas después, se realizó de nuevo el procedimiento descrito anteriormente para realizar una eliminación total de los remanentes de la semilla transgénica (Figura 59).



Figura 59. Destrucción de remanentes de líneas transgénicas de arroz transgénico en Agribiotecnología, Alajuela, (A) y en la finca San Rafael, Guápiles (B).

4.2.5 Análisis de Conglomerados

El análisis de conglomerados se definió para seis grupos, debido a que se evaluaron seis líneas, tomando en cuenta las siete variables de producción, del mismo modo que se hizo en el análisis de conglomerados en la T2. El grupo de transformación C no fue incluido, por la falta de información en las variables de número de ramificaciones, número de granos vanos y llenos, además de que para esta época del estudio la línea ya se había descartado.

Los seis grupos de conglomerados están integrados cada uno por líneas distintas o del mismo grupo de transformación (AS y CPM). El primer grupo está integrado únicamente por líneas AS, el segundo grupo lo integran tanto líneas AS como CPM; el tercero, sigue el mismo patrón del anterior (líneas AS y CPM), el cuarto por líneas AS; el quinto grupo está representado únicamente por líneas CPM y el sexto por los dos controles (CR-1821 y CR-5272).

Los grupos al irse reduciendo a cinco, cuatro, tres etc, hasta llegar a dos grupos se van integrando de forma completa o compacta al grupo con las siete características de producción más similares a las suyas de la mismo modo que se observó en la T2 (Figura 60).

CONGLOMERADO	6 GRUPOS		5 GRUPOS		4 GRUPOS		3 GRUPOS		2 GRUPOS	
1	AS10-4-1		AS10-4-1		AS10-4-1		AS10-4-1		AS10-4-1	CPM80-11-7
	AS10-4-16		AS10-4-16		AS10-4-16		AS10-4-16		AS10-4-16	CPM80-11-9
	AS10-7-15		AS10-7-15		AS10-7-15		AS10-7-15		AS10-7-15	CPM10-14-3
									AS10-4-10	CPM10-14-6
									AS10-4-13	CPM10-22-5
									AS10-4-19	CPM10-22-6
									AS10-4-20	CPM10-22-9
									AS10-4-4	CPM80-4-12
									AS10-7-14	AS10-4-15
									AS10-7-6	AS10-4-2
									CPM10-14-2	AS10-4-5
								CPM 10-14-8	AS10-72	
								CPM80-4-13		
								CPM80-4-7		
2	AS10-4-10	AS10-7-6	AS10-4-10	AS10-7-6	AS10-4-10	CPM80-4-7	AS10-4-10	CPM80-11-7	CR5372	
	AS10-4-13	CPM10-14-2	AS10-4-13	CPM10-14-2	AS10-4-13	CPM80-11-7	AS10-4-13	CPM80-11-9	CR1821	
	AS10-4-19	CPM 10-14-8	AS10-4-19	CPM 10-14-8	AS10-4-19	CPM80-11-9	AS10-4-19	CPM10-14-3		
	AS10-4-20	CPM80-4-13	AS10-4-20	CPM80-4-13	AS10-4-20	CPM10-14-3	AS10-4-20	CPM10-14-6		
	AS10-4-4	CPM80-4-7	AS10-4-4	CPM80-4-7	AS10-4-4	CPM10-14-6	AS10-4-4	CPM10-22-5		
	AS10-7-14		AS10-7-14	CPM80-11-7	AS10-7-14	CPM10-22-5	AS10-7-14	CPM10-22-6		
			CPM10-14-3	CPM80-11-9	AS10-7-6	CPM10-22-6	AS10-7-6	CPM10-22-9		
			CPM10-14-6		CPM10-14-2	CPM10-22-8	CPM10-14-2	CPM80-4-12		
			CPM10-22-5		CPM 10-14-8	CPM80-4-12	CPM 10-14-8	AS10-4-15		
					CPM80-4-13	AS10-4-15	CPM80-4-13	AS10-4-2		
							CPM80-4-7	AS10-4-5		
							AS10-72			
3	CPM10-22-6	CPM80-4-12	CPM10-22-6	CPM80-4-12	AS10-4-2	AS10-72	CR5372			
	CPM10-22-9	AS10-4-15	CPM10-22-9	AS10-4-15	AS10-4-5		CR1821			
4	AS10-4-2	AS10-72	AS10-4-2	AS10-72	AS-CR5372					
	AS10-4-5		AS10-4-5		CR1821					
5	CPM10-14-3	CPM80-11-7	CR5372							
	CPM10-14-6	CPM80-11-9	CR1821							
	CPM10-22-5									
6	CR5372	CR1821								

NOTA: Con color se identifican las agrupaciones y su transición al unir conglomerados

Figura 60. Configuración de los conglomerados de las líneas transgénicas de arroz T3 y los controles no transgénicos en Guápiles.

4.3 COMPARACIÓN DE LA SEGUNDA Y TERCERA GENERACIÓN (T2 y T3)

Una vez descritas las características cualitativas y cuantitativas de los grupos de transformación, las líneas transgénicas y los controles en la segunda y tercera generación se procedió a comparar ambas generaciones. La comparación entre generaciones se hizo con base en ciertas variables, específicamente las relacionadas con producción (altura de la planta, longitud de la hoja bandera, ancho de la hoja bandera, longitud de la panícula, ramificaciones de la panícula, número de granos vanos y número de granos llenos) y se comparó por grupo de transformación. Los grupos de transformación por comparar entre T2 y T3 fueron AS, C y CPM, y no los 5 grupos originales (AS, C, CP, N y CPM), ya que el grupo N y CP se descartaron a partir de la segunda generación principalmente por problemas de susceptibilidad al herbicida fosfotricina, poca resistencia al virus de la hoja blanca, volcamiento y/o arquitectura de la planta con características agronómicas desfavorables, como excreción incluida, etc.

Las líneas transgénicas T2 que fueron seleccionadas para la siguiente siembra fueron: AS10-4, AS10-7, C37S-7, CPM10-14, CPM10-22, CPM80-4 y CPM80-11; el resto de las líneas fueron descartadas.

Como se describe a continuación se comparó los grupos de líneas transformadas AS, C y CPM, además de las variedades comerciales no transformadas de la segunda y tercera generación, en Alajuela y Guápiles respectivamente.

Figura 51. Comparación de los grupos de transformación AS, C y CPM en la segunda y tercera generación en Alajuela y Guápiles respectivamente.

4.3.1 Altura promedio de la planta

En general, la altura de la planta de las líneas transgénicas fue mayor a la de las variedades comerciales CR-1821 y CR-5272, tanto en la segunda (T2) como en la tercera generación (T3) (Figura 61). Todos los grupos de líneas transgénicas de la tercera generación presentaron alturas de la planta mayores que los grupos de la segunda generación. Los controles no transgénicos presentaron la misma tendencia (mayores altura de planta en los testigos de la tercera generación); sin embargo esa diferencia en altura se observó de forma más enfática en los controles de la T3, los cuales prácticamente duplican el tamaño de los controles de T2.

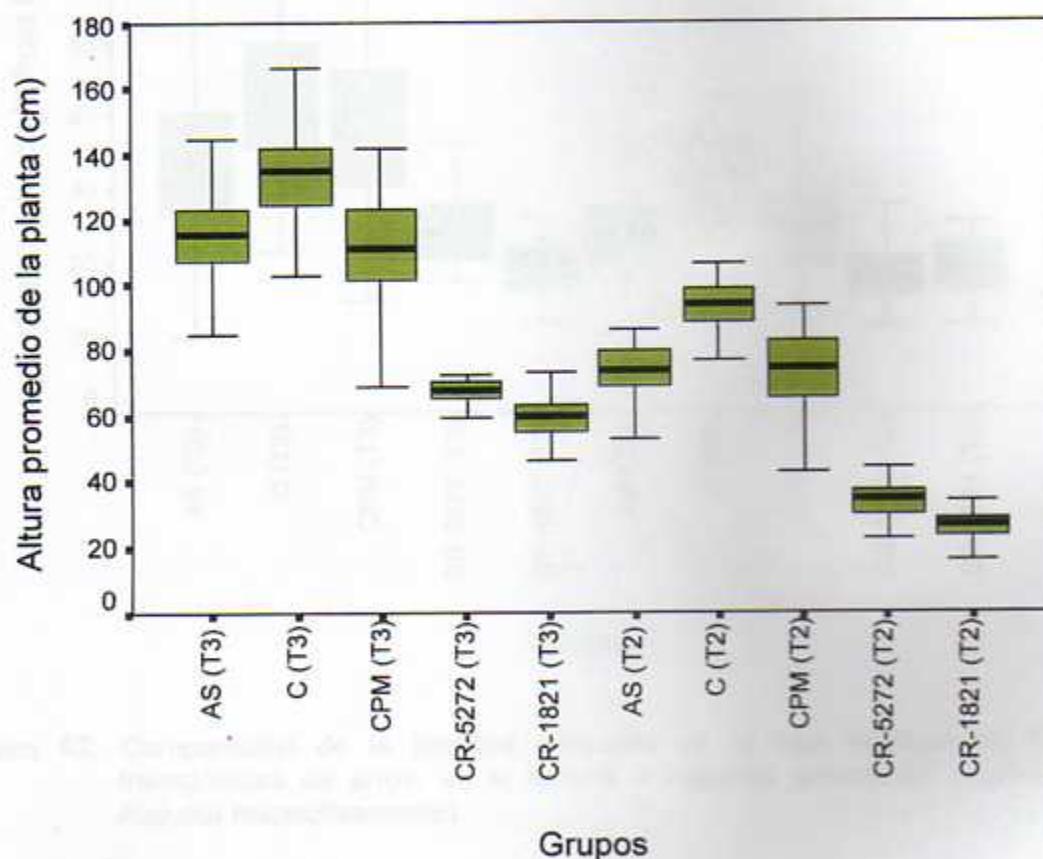


Figura 61. Comparación de la altura promedio de la planta de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación (Guápiles y Alajuela respectivamente).

4.3.2 Longitud de la hoja bandera

La longitud de la hoja bandera en las líneas transgénicas así como en los controles fue mayor en la tercera generación (T3), con diferencias más marcadas en los grupos de líneas transgénicas que en los controles. Sin embargo, el control CR-1821 presenta muy poca diferencia en la longitud de la hoja de una generación a la otra (19 cm en la T2 y 20 cm en la T3), al igual que CR-5272 (Figura 62).

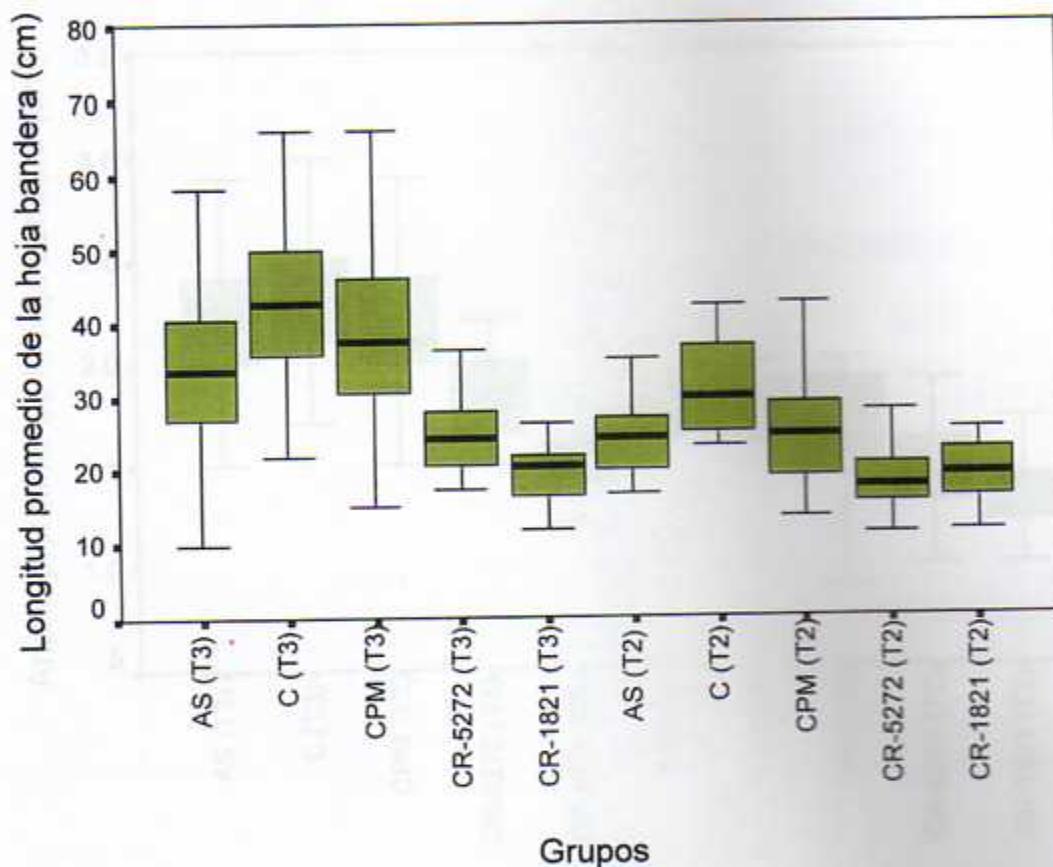


Figura 62. Comparación de la longitud promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación (Guápiles y Alajuela respectivamente).

4.3.3 Ancho de la hoja bandera

La característica ancho de la hoja bandera, presentó el mismo patrón que se observó en la altura de la planta y la longitud de la hoja; hojas más anchas en la tercera generación en Guápiles, tanto para las líneas transgénicas como para las variedades comerciales no transgénicas (Figura 63).

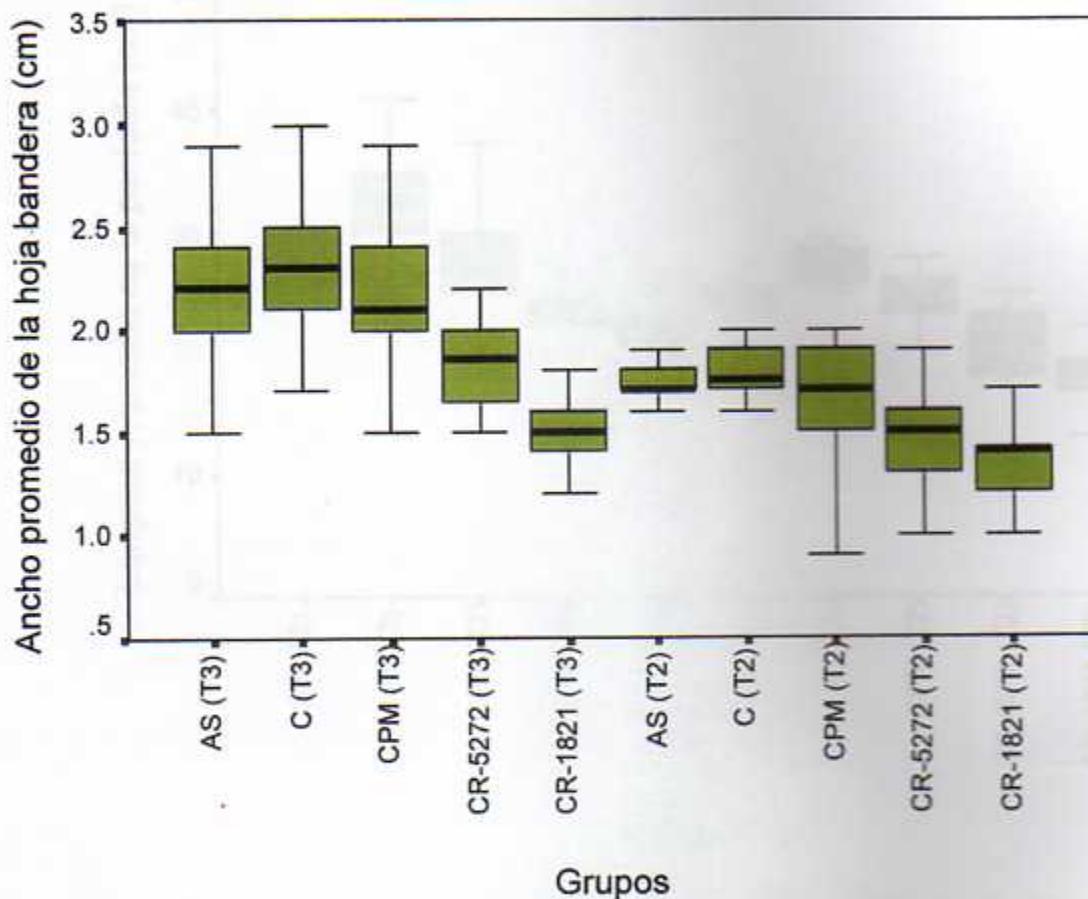


Figura 63. Comparación del ancho promedio de la hoja bandera de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación (Guápiles y Alajuela respectivamente).

4.3.4 Longitud de la panícula

La longitud de la panícula también fue mayor en la T3 tanto para las líneas transgénicas como para los controles, sin embargo las diferencias no fueron tan evidentes como se observó en la altura de la planta, longitud y ancho de la hoja excepto en el grupo de líneas C, donde se dio una diferencia promedio en la longitud de 7 cm aproximadamente (Figura 64).

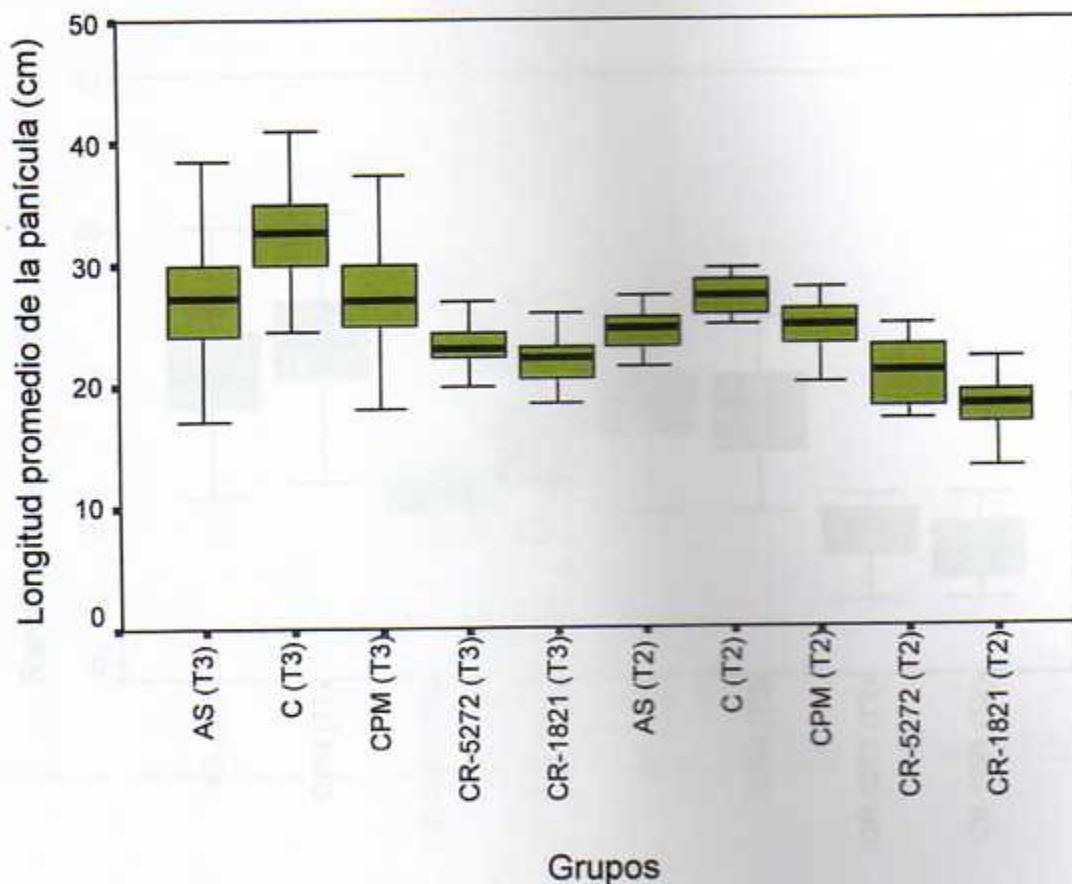


Figura 64. Comparación de la longitud promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación (Guápiles y Alajuela respectivamente).

4.3.5 Ramificaciones de la panícula

Esta característica no fue evaluada para el grupo de líneas C, ya que para esta época se habían eliminado dichas líneas, por los problemas anteriormente mencionados.

Las ramificaciones de la panícula fueron mayores en los grupos de líneas transgénicas (AS y CPM) y en los controles de la T3; las mayores diferencias entre generaciones se presentaron en el grupo CPM y el control CR-1821 (Figura 65).

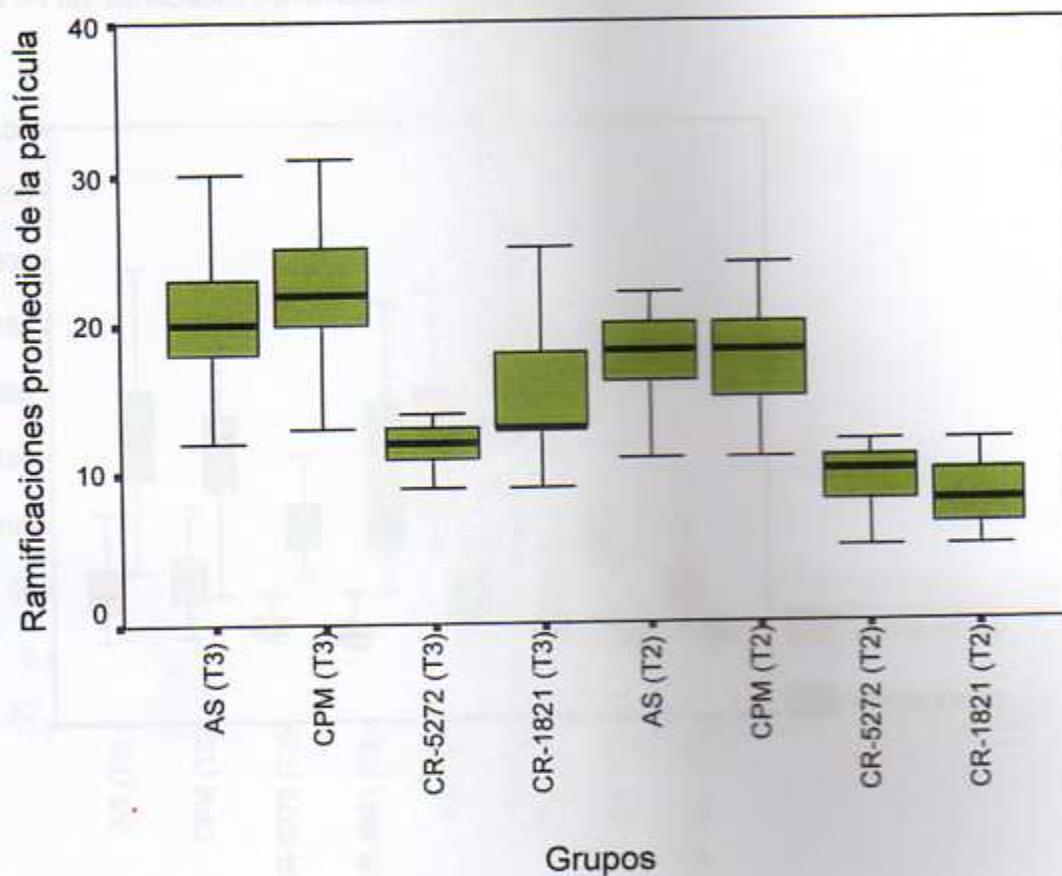


Figura 65. Comparación del número de ramificaciones promedio de la panícula de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación (Guápiles y Alajuela respectivamente).

4.3.6 Número de granos vanos y llenos

El número de granos vanos y llenos de la panícula es quizás la característica donde se evidencia de forma más clara el comportamiento totalmente diferente de las plantas entre ambas generaciones. Las plantas (transgénicas y controles) en Alajuela presentaron un alto número de granos vanos y muy pocos granos llenos; por otra parte, las plantas en Guápiles presentaron un comportamiento totalmente contrario al que se dio en Alajuela, un alto grado de granos llenos y pocos granos vanos (Figura 66). Sin embargo en ambas generaciones se observó que el número total de granos en las líneas transgénicas fue mucho mayor al número total de granos en las variedades comerciales (Figura 67).

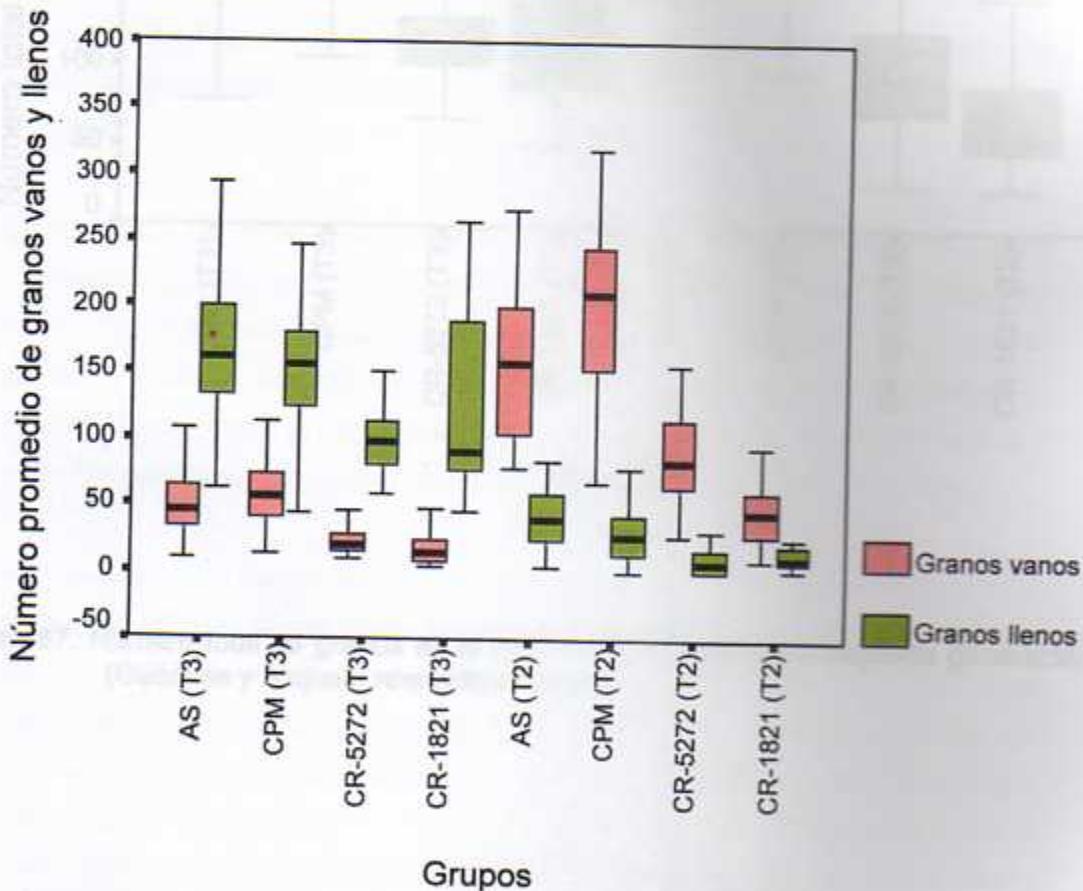


Figura 66. Comparación del número promedio de granos vanos y llenos en la panícula, de líneas transgénicas de arroz, en la tercera y segunda generación (Guápiles y Alajuela respectivamente).

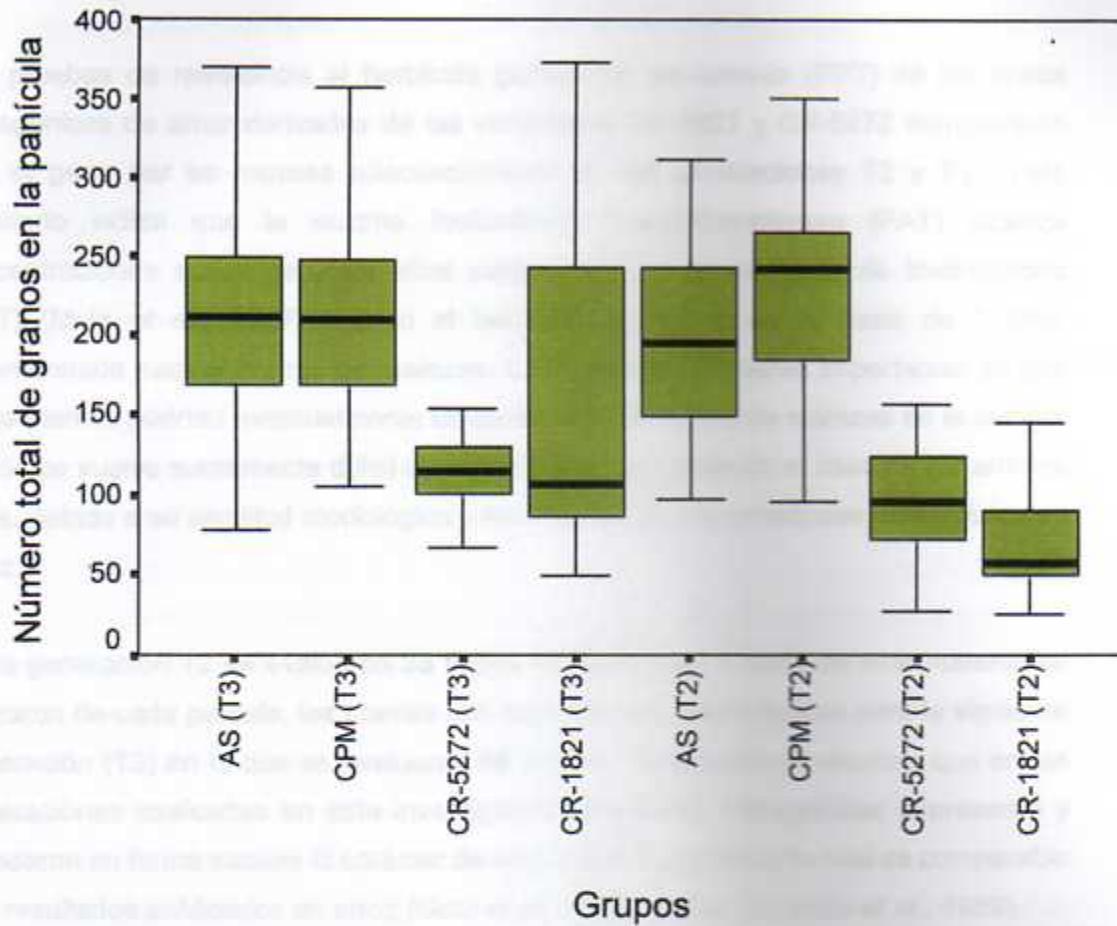


Figura 67. Número total de granos en la panícula, en la tercera y segunda generación (Guápiles y Alajuela respectivamente).

5. DISCUSIÓN

Las pruebas de resistencia al herbicida glufosinato de amonio (PPT) de las líneas transgénicas de arroz derivadas de las variedades CR-1821 y CR-5272 demostraron que el gene *bar* se expresa adecuadamente en las generaciones T2 y T3. Este resultado indica que la enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (PAT) alcanza concentraciones suficientemente altas para detoxificar la molécula de fosfinotricina (PPT) (Metz *et al.*, 1998) cuando el herbicida se utiliza en la dosis de 1 lt/ha, recomendada para el control de malezas. Lo anterior es de suma importancia ya que estas plantas podrían eventualmente utilizarse para el control de malezas en el campo; donde se vuelve sumamente difícil su control, principalmente en el caso de los arrozos rojos, debido a su similitud morfológica y fenológica con las variedades comerciales de arroz.

En la generación T2 se evaluaron 38 líneas transgénicas. A partir de este material se utilizaron de cada parcela, las plantas con las mejores características para la siguiente generación (T3) en la que se evaluaron 66 líneas. Es importante recalcar que en las generaciones evaluadas en esta investigación, las líneas transgénicas expresaron y heredaron en forma estable el carácter de resistencia al herbicida lo cual es comparable con resultados publicados en arroz (Goto *et al.*, 1993) y soya (Christou *et al.*, 1989).

Durante los ensayos de campo se evaluó la aparición de síntomas del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) en las líneas transgénicas a los 60 días de edad. En las dos generaciones evaluadas se observaron porcentajes de infección entre 10 y 100%. Las líneas con los menores porcentajes de incidencia de la enfermedad fueron las denominadas CMP, tanto en la segunda como en la tercera generación, mientras que las líneas del grupo N mostraron mayores porcentajes de infección y por lo que fueron descartadas para la T3. Es interesante destacar que la línea CPM2-5 en T2 no mostró síntomas virales, sin embargo no fue seleccionada para la siguiente generación por problemas en la arquitectura de la planta. La línea AS10-7, en la generación T2, presentó 50% de infección de RHBV, mientras que la línea AS10-7-14 derivada de esta no presentó infección en la tercera generación.

Los resultados obtenidos en campo en relación a la infección viral sugieren que las líneas transgénicas evaluadas no son resistentes al virus. Sin embargo, la presencia del virus no afectó severamente la producción de las líneas. Lentini *et al.* (2003) evaluaron variedades de arroz transformadas con la nucleoproteína del RHBV, mediante la inoculación controlada del virus en plantas de 15 a 25 días de edad obteniendo como resultado síntomas en las hojas inoculadas pero no en las hojas nuevas producidas después de la inoculación. Existe entonces la posibilidad de que las líneas transgénicas utilizadas en este estudio muestren cierto grado de tolerancia al virus en estadios más tempranos de desarrollo.

En términos generales, se observó una clara diferencia entre la expresión de la resistencia al herbicida y al RHBV. Este resultado probablemente se deba a que el gen de la nucleoproteína viral, que se colocó bajo el control del promotor de la actina I del arroz en los plásmidos para la transformación, sufrió un proceso de silenciamiento. Existen muchos estudios que reportan supresión o silenciamiento de genes en plantas transgénicas (de Carvalho *et al.*, 1992; Goring *et al.*, 1991; Matzke *et al.*, 1989; Napoli *et al.*, 1990). Se ha demostrado que algunas posibles explicaciones de dicho fenómeno son la metilación de promotores, la interferencia de la hebra del ARN con el proceso de transcripción y la degradación de los ARNm, cualquiera que sea el mecanismo es claro que las plantas poseen algún sistema para silenciar los transgenes cuando ellos exceden o sobrepasan el número de copias límite (Fagard y Vaucheret., 2000; Rathore *et al.*, 1993).

La evaluación morfológica y fenológica en el campo de las líneas transgénicas de la segunda y tercera generación en Alajuela y Guápiles respectivamente permitió describir en detalle las líneas evaluadas. Asimismo, se evidenciaron las similitudes y diferencias dentro y entre líneas así como con las variedades comerciales que les dieron origen. Además, la evaluación exhaustiva del material permitió la selección de las mejores líneas.

Las líneas transgénicas de arroz y los controles fueron significativamente distintas en cuanto a sus características morfológicas. Las características cualitativas que caracterizan a las líneas transgénicas y a su vez las diferencian de los controles no

transformados fueron: la vellosidad lisa de la hoja, la ausencia de arista, la ausencia de vello largo en las glumas fértiles, la exéresis coincidentes y en muy pocos casos emergida de la panícula en la T2. Sin embargo, esta característica presentó una situación contraria en la T3, ya que la mayoría de las plantas tuvieron exéresis emergida. Probablemente, la falta de agua y nutrientes, además de los cambios de temperatura entre el día y la noche que sufrieron las plantas en Alajuela haya causado dicha diferencia. Estas condiciones también influyeron en el número de granos llenos en las panículas ya que en la generación T2 la mayoría de plantas (tanto transgénicas como controles) mostraron un alto grado de esterilidad que no se presentó en las plantas de la generación T3 en Guápiles.

La recuperación de la fertilidad en la generación T3, evaluada en Guápiles, implica que el llenado del grano (así como las otras características de producción) dependieron en su mayoría de las condiciones ambientales en las que se desarrollaron las plantas y no de una deficiencia en las mismas producto de la transformación genética.

Entre los dos ensayos, se observaron diferencias en la floración de las plantas, normalmente transcurre una semana a quince días entre los días a prefloración y los días a antesis pero en la generación T2, evaluada en Alajuela, ambas fases prácticamente coincidieron. Este resultado se presentó como consecuencia del estrés al que estuvieron sometidas las plantas en esa localidad. En Guápiles, en donde se evaluó la generación T3 la prefloración, la antesis y la madurez se dio en forma homogénea y sincronizada entre las líneas transgénicas y los controles.

Por otra parte, la capacidad predominante de macollamiento varió muy poco, las transgénicas presentaron menor número de hijos por planta que los controles, pero tuvieron mayor proporción de panículas por tallo, ya que en las plantas transgénicas cada hijo produjo una panícula generalmente; mientras que en las variedades comerciales hay muchos hijos que no necesariamente producen panículas, característica que los fitomejoradores del Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS) catalogaron equivalente a tener igual o mayor número de hijos que los controles.

En comparación con los testigos, el análisis de conglomerados evidencia que las líneas transgénicas son estadísticamente diferentes a las variedades comerciales CR-5272 y CR-1821 sin transformar. Las líneas transgénicas mostraron una morfología muy definida en ambas generaciones presentaron mayor altura, hojas bandera más largas y anchas, panículas más largas y con mayor número de ramificaciones (el doble de los controles) y un mayor número total de granos (mayor en las transgénicas). Los grupos de líneas en los conglomerados se integraban de forma compacta conforme se reducía de siete a dos grupos; lo cual es sumamente raro para este tipo de análisis, ya que la tendencia por lo general es que las variables (en nuestro caso las líneas) se esperaría se integren de forma individual a los diferentes grupos. En este estudio el hecho que se estén integrando grupos completos, indica que dichos grupos tienen características sumamente definidas dentro del grupo, pero distintas entre los otros grupos.

Las diferencias entre las plantas transgénicas y las variedades comerciales pueden ser explicadas como efecto del procedimiento *in vitro* utilizado para dar origen a estas plantas en el laboratorio. Estas líneas fueron originadas a partir de suspensiones celulares con el fin de multiplicar masivamente los micro callos embriogénicos que se utilizaron para incorporar los genes de interés. Existe evidencia de que esta técnica de multiplicación celular puede inducir alteraciones fenotípicas en las plantas y es probable que dichas plantas sean variantes somaclonales (Forche y Yerman, 1980; Medina *et al.*, 2000; Pacheco *et al.*, 2001).

En plantas regeneradas por medio de cultivo de tejidos, frecuentemente pueden surgir individuos que se distinguen de la planta original en una o más características y esas alteraciones pueden ser estables y transmisibles a la descendencia (Pacheco *et al.*, 2001). La variación somaclonal ha sido observada en muchas monocotiledóneas, tales como avena (Beer *et al.*, 1993), maíz (Kaepler y Phillips, 1993), cebada (Devaux *et al.*, 1993), trigo (Li y Dong, 1994) y arroz (Abdullah *et al.*, 1989; Adkins *et al.*, 1995; Castiglione *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999; Mezencev *et al.*, 1995; Sathish *et al.*, 1995).

La composición química del medio de cultivo es uno de los factores que puede inducir la variación somaclonal de los tejidos en los que se cultiva. Los reguladores de

crecimiento como el ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) pueden ejercer gran influencia en las alteraciones del cariotipo, provocando un crecimiento desordenado de las estructuras celulares, con consecuente surgimiento de células con anomalías (Pacheco *et al.*, 2001). El 2,4 D es uno de los reguladores de crecimiento que más se utiliza en los medios de cultivo en arroz y fue el que se utilizó en esta investigación para promover la división celular.

Publicaciones anteriores han reportado resultados similares de diferencias fenotípicas entre plantas transgénicas y las plantas que les dieron origen. En caña de azúcar cuando se consideraron cinco clones tolerantes a insectos bajo pruebas de campo en Cuba, de los 39 descriptores agronómicos, morfológicos e industriales evaluados, 33 caracteres fueron idénticos a los del genotipo original, mientras que 6 rasgos morfológicos fueron diferentes de aquellos del clon original (Castiglione *et al.*, 2001). Lee *et al.*, 1999 también informó sobre diferencias entre plantas protoclonales de arroz y plantas control derivadas de semillas cuando se utilizaron cuatro diferentes procedimientos de cultivo; la altura promedio de los protoclones fue de 55.9 cm bastante más pequeñas que las plantas control (115.7 cm), en nuestro caso la situación fue contraria, las plantas tuvieron mayor altura. Los autores mencionados anteriormente de las investigaciones realizadas en arroz transgénico (Abdullah *et al.*, 1989; Adkins *et al.*, 1995; Castiglione *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999; Mezencev *et al.*, 1995; Sathish *et al.*, 1995) también han reportaron variación en la altura de la planta, capacidad de macollamiento, fertilidad, densidad de la panícula, y el número, tipo, calidad, producción y tamaño del grano.

6. CONCLUSIONES

1. Los estudios de campo permitieron conocer el potencial agronómico de las diferentes líneas transgénicas y seleccionar las más aptas para las investigaciones futuras del Programa de Biotecnología del Arroz, incluyendo estudios de flujo de genes.
2. Con base en los resultados, a través de las tres generaciones (T1, T2 y T3), se descartaron los grupos de líneas N, CP y C principalmente por problemas de susceptibilidad al herbicida, la incidencia de hoja blanca en campo y la evaluación morfológica y fenológica, tal como el volcamiento y/o la arquitectura de la planta con características agronómicas desfavorables.
3. Los resultados obtenidos, muestran que los problemas de esterilidad y producción observados en la generación T2, se debieron a factores ambientales, principalmente temperatura y estrés hídrico. Además que, la evidente estabilidad y heredabilidad de la resistencia al herbicida PPT a través de las tres generaciones demuestra que las líneas pueden ser una alternativa para el control efectivo de malezas.
4. Se debe destacar que estas líneas transgénicas de arroz son de gran importancia debido a su potencial uso en programas de fitomejoramiento dado el caso en que se obtengan líneas que no presenten todas las características deseadas en una variedad.
5. La evaluación en campo de las líneas transgénicas de arroz desarrolladas en la Universidad de Costa Rica, constituye una fase del Programa de Biotecnología del Arroz del CIBCM (PBA-CIBCM) en procura de la eventual liberación de las líneas al mercado. El siguiente paso del PBA-CIBCM es continuar una estrategia que incluya la evaluación de la inocuidad del nuevo alimento, realizar estudios de bioseguridad ambiental e identificar y resolver derechos de propiedad intelectual.

7. RECOMENDACIONES

1. Utilizar únicamente las variables de producción, como altura de la planta, longitud y ancho de la hoja bandera, longitud y ramificaciones de la panícula, y número de granos (vanos, llenos y totales) para posteriores evaluaciones en campo, dado su importante aporte en el conocimiento de las líneas transgénicas.
2. Evaluar las líneas transgénicas de arroz seleccionadas en campo de forma dirigida y bajo condiciones controladas en invernadero para poder establecer su resistencia al RHBV, utilizando una colonia altamente virulífera de *Tagosodes orizicolus* establecida en el insectario.
3. Realizar la evaluación de las características industriales (molienda, pulido, quebrado de grano) organolépticas (concentración de almidones, cocción, sabor, olor) y de inocuidad (toxicidad y alergenicidad) en las líneas transgénicas promisorias seleccionadas en campo.
4. Es aconsejable realizar los ensayos de campo de las posteriores generaciones de plantas transgénicas en zonas arroceras para observar su comportamiento y poder comparar con los resultados obtenidos en las generaciones T2, T3 y T4.
5. Tomar en cuenta que estas líneas transgénicas de arroz tienen un uso potencial muy grande, ya sea a mediano o largo plazo en programas de fitomejoramiento o en forma directa, dado el caso en que se obtengan líneas que no presenten todas las características deseadas en una variedad.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulla, R.J.A., Thompson, G.S., Khush, R., Kaushi K, P. y E.C. Cocking. 1989. Protoclonal variation in the seed progeny of plants regenerated from the rice protoplast. *Plant Sci.* 65: 97-101.
- Agüero, R. 1996. Malezas del arroz y su manejo. I.M.R, S.A. Costa Rica. 246P.
- Atkins, S.W., Kunanuvatchaidach, R. y I.D. Godwin 1995. Somaclonal variation in rice-drought tolerance and other agronomic characters. *Austral. J. Bot.* 43: 201-209.
- Baulcombe, D. 1996. Mechanisms of pathogen derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant cell.* 8: 1833-1844.
- Beer, S.C., Goffreda, J., Phillips T.D., Murphy, J.P., y M.E. Sorrells. 1993. Assessment of genetic variation in *Avena sterilis* using morphological traits, isozymes and RFLP's. *Crop Sci.* 33:1386-1393.
- Castiglioni, S; Sala, F; Labra, M; Savini, C; Bracale, M; Pelucchi, N., 2001. Somaclonal Variation In Transgenic Plant. Abstract. Depart. Biologia, Univ. Milano.
- Christou, P., Swain, W.F., Yang, N.S. y D.E. McCabe. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc. Nat. Acad-Sci. (USA)* 86: 7500-7504.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1993. Descriptores varietales: Arroz, frijol, maíz, sorgo. CIAT, Colombia.
- CNPq (Consejo Nacional de Producción). 1999. Comunicación personal.
- Diarra, A; Smith, R.J; Talbert, R.E. 1985. Growth and Morphological Characteristics of Red Rice (*Oriza sativa*) Biotypes. *USA. Weed Science* 33: 310-314

- De Carvalho F., Gheysen, G., Van Montagu, My, Inze, D. y D. Castresana. 1992. Supresión of B-1,3-glucanase trangene expression in homozygous plants. *EMDO J.* 11: 2595-2602.
- Devaux, P., Kilian, A. y A. Kleinhofs. 1993. Anther culture and Mordeum bulbosum-derived barley doubled haploides: mutations and methylation. *Mol. Gen. Genet.* 241: 674-679.
- De Vine, M., Duke, S. O., and C. Fedke. 1993. *Physiology of herbicide action.* Prentice Hall, New Jersey. Pp 251-294
- Fagard M, Vaucheret H. 2000. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 51: 167-197.
- FAO. 2000. In: <http://apps.FAO.org./inicio.htm>.
- Forche, E. y M.M, Yerman. 1980. Cell proliferation and growth in callus culture. *In: PERSPECTIVE in plant cell and tissue culture.* New York: Academic Press. P. 1-24.
- Gaunt, S; Riley, A ; Lazzeri, P ; y Barcelo, P. 1999. A facile method for screening for phosphinothricin (PPT)-resistant transgenic wheats. *Molecular Breeding* 5: 255-262.
- Goring, D.R., Thomson, L. y S.J. Rothstein. 1991. Transformation of partial hopaline synthase gene into tobacco suppresses the expression of a resident wild-type gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 1770-1774.
- Goto, F., Toki, S. y H. Uchimiya. 1993. Inheritance of a co-transferred foreign gene in the progenies of transgenic rice plants. *Transgenic Reseach.* 2: 300-305.

- Hull, R. 1994. Resistance to plant viruses: obtaining genes by non-conventional approaches. *Euphytica* 75: 195-205.
- IRRI (International Rice Research Institute). 1996. Standard Evaluation System for RICE. Genetic Resources Center. Manila, Philipinas. Pp 51
- Jennings, P. 1963. Estimating yield loss in rice caused by hoja blanca. *Phytopatology* 53: 492.
- Kaepler, S.M. y R.L. Phillips. 1993a. Tissue culture-induce DNA methylation variation in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 90: 8773-8776.
- Lamey, H. 1967. Varietal resistance to hoja blanca. In *The Virus Diseases of the Rice Plant*. John Hopkins Press, Baltimore, US Pp 293-311.
- Lee, S-H; Shon, Y; Kim, C; Chun, H; Cheong, Y; Kim, H; Choe, R; Choi, J; Cho, M. 1999. Variation in the morphology of rice plants regenerated from protoplasts using different culture procedures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57:179-187
- Lentini, Z; Lozano, I; Tabares, E; L. Fory. 2003. Expression and inheritance of hypersensitive resistance to rice hoja blanca virus mediated by the viral nucleocapsid protein gene in transgenic rice. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1018-1026.
- Lentini, Z. 1995a. Project 5: Diversified *Tagosodes*/Rice hoja blanca virus. Rice Program. Annual Repert. CIAT, Colombia Pp 108-123.
- Lentini, Z; Calvert, L., Tabares, E., Lozano, I. y B. Ramírez. 1995b Genetic Transformation of rice with viral genes for novel resistance against Rhbu. In *Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium*, 16-20. October 1995. Philippines. P. 172.

- Li, L.H. y Y.S. Dong. 1994. Somaclonal variation in tissue culture of *Triticum aestivum* x *Agropyron desertorum* F1 hybrid. *Plant Breed.* 112: 160-16.
- Matzke, M.A., Primig, M., Trnousek, J. y AJM, Matzke. 1989. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBOJ* 8: 643-649.
- McElroy, D. 1999. Moving agribiotech downstream. *Nature Biotechnology* 17: 1071-1074.
- Medina, R.; Mirta, F., Marassi, M.A; L. Moroginski 2000. Variabilidad enzimática de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) regeneradas in vitro a partir de callos.
- Metz, L.J.P; Stiekeman, J.W. y J. Nam. 1998. A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricin-tolerant plants. *Molecular Breeding* 4: 335-341.
- Mezencev, N., Clement, G. y E. Guiderdoni. 1995. Variation among progenies of diploid plants regenerated from haploid, microspore-derived cell suspension protoplast rice. (*Oryza sativa* L.) *Plant Breed.* 114: 149-154.
- Muñoz, M. 2000. Sequences of hoja blanca viruses and attempts to develop resistant indica rice cultivars through genetic engineering. Ph.D. Thesis. Cornell University.
- Napoli, C., Lemieux, C. y R. Jorgensen. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant cell.* 2: 279-289.
- Pacheco, S.A.E., De Barros, F.A; M. Dyane Díaz. 2001. Variação somaclonal em algumas características do grão e do ciclo de planta de arroz (*Oryza sativa* L.). *Ciênc.agrotec., Lauras, U.* 25, n.2: 336-345.

- Peñaranda, V., Reyes, A., Perafan, R., Devia, I., Hernández, P. 1999. Manejo integrado de Sogata (*Tagosodes orizicolus*) Muir en el cultivo del arroz en los llanos orientales. FEDEARROZ . Pp 14
- Rathore, S.K.; Chowdhury, K.V; T.K. Hodges. 1993. Use of *bar* as a detectable marker gene and for the production of herbicide-resistance rice plants pro protoplasts. *Plant Molecular Biology*. 21: 871-884.
- Sathish, P., Gamborg, O.L. y M.W. Nabors. 1995. Rice anther culture: callus initiation and androclonal variation in progenies of regenerated plants. *Plant cell Rep.* 14: 432-436.
- Thompson, C. J., Movva, N. R., Tichard, R., Cramer, R., Davies, J. E., Lauwereys, M. 1987. Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO Journal* 6:2519-2523
- Vargas J. 1985. La hoja blanca: descalabro de CICA-8. *Arroz (Bogotá, Colombia)* 34: 18-19.
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J. And Schulz, A. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14: 1274-1279.
- Wilson, T. 1993. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 3134-3141.
- Zeigler R. S., Pubiano M. And Pineda A. 1988. A field screening method to evaluate rice breeding lines for resistance to the hoja blanca virus. *Annual of Applied Biology* 112:151-158.
- Zeigler, R. S., Pantoja, A., Duque, M and Weber, G. 1994. Characteristics of resistance in rice to hoja blanca (*Rhbv*) and its vector, *Tagosodes orizicolus* (Muir). *Annuals of Applied Biology* 124: 429-440.

Zeigler, R. S., Rubiano, M. y A. Pineda. 1998. A field screening method to evaluate rice breeding lines for resistance to the hoja blanca virus. *Annals of Applied Biology*. 112: 151-158.

ANEXOS

Anexo 1

105

Cuadro 4. Porcentaje de plantas en cada variable cualitativa para las líneas transgénicas de arroz y los controles CR-5272 y CR-1821 (no transgénicos) en la generación T2.

CARACTERÍSTICA	TRANSGÉNICAS		NO TRANSGÉNICAS		TOTAL
	(%)	(n)	(%)	(n)	
Hoja					
Vellosidad de la lámina de la hoja 1					
Glabra o lisa	91.84		11.11		85.5
Pubescente de la mitad de la lámina hacia el ápice	5.12		0		4.7
Escabrosa, áspera al tacto	3.04		88.89		9.8
Color de la lámina foliar					
Verde pálido	47.63		53.33		48.1
Verde	46.48		46.67		46.5
Verde oscuro	5.88		0		5.4
	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Posición de la hoja bandera					
Erecta (ángulo entre 0° de 10°)	0.19		4.4		0.5
Semierecta (ángulo entre 11° y 40°)	54		88.9		56.8
Intermedia (ángulo entre 41° y 70°)	39		6.7		36.5
Horizontal (ángulo entre 71° y 90°)	6.5		0		6
Descendente (ángulo mayor de 90°)	0.19		0		0.2
Aurícula					
	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Tamaño de las aurículas (mm)					
Muy pequeñas (menor de 2.1)	17.6		28.9		18.4
Pequeñas (entre 2.1 y 3)	38.9		24.4		37.8
Medianas (entre 3.1 y 3.5)	18.5		17.8		18.4
Grandes (entre 3.6 y 5)	23.2		24.4		23.4
Muy grandes (mayoras de 5)	1.8		4.4		2

CARACTERÍSTICA	TRANSGÉNICAS		NO TRANSGÉNICAS		TOTAL
<u>Ligula</u>					
(%)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
(n)	(527)	(45)	(45)	(572)	(572)
Forma de la ligula					
Aguda o acuminada	0.95	0	0.9	95.3	96.3
Hendida	96.96	86.56	24.44	3.7	93.3
Semihundida	1.9	24.44	0	0.2	26.38
Truncada	0.19	0	0	0.2	0.39
Arista					
(%)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
(n)	(498)	(45)	(45)	(543)	(543)
Tipo de aristado					
Arista ausente	4.42	93.33	11.8	0.4	16.24
Corta y presente en menos del 50% de los granos	0.4	0	0.4	64.6	65.0
Corta y presente en más del 50% de los granos	69.88	6.67	13.6	9.6	80.15
Larga y presente en menos del 50% de los granos	14.86	0	0	33.3	33.3
Larga y presente en más del 50% de los granos	10.44	0	0	66.7	66.7
Tamaño de las aristas (mm)					
(%)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
(n)	(484)	(3)	(3)	(487)	(487)
Corta (entre 1 y 5)	32.85	100	33.3	66.7	66.7
Media (entre 6 y 20)	67.15	0	66.7	33.3	33.3
Espiguilla					
(%)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
(n)	(551)	(45)	(45)	(596)	(596)
Color del ápice que forman la lema y la pálea					
Blanquecino	0.91	0	0.8	5.7	6.61
Café claro	5.98	2.22	5.7	0.2	6.2
Púrpura	0.18	0	0.2	93.3	93.3
Verde pálido	92.92	97.78	93.3	0	93.3

CARACTERÍSTICA	TRANSGÉNICAS	NO TRANSGÉNICAS	TOTAL
(%)	(100)	(100)	(100)
(n)	(554)	(45)	(599)
Pubescencia de las glumas			
Glabra o lisa	0.18	0	0.2
Pubescencia en la quilla	6.68	0	6.2
Pubescencia hacia el ápice de la lema y la pálea	57.4	0	53.1
Parcial o totalmente cubierta con vello corto	35.7	0	33.1
Parcial o totalmente cubierta con vello largo	0	100	7.5
Panicula			
(%)	(100)	(100)	(100)
(n)	(506)	(45)	(551)
Densidad de la panicula			
Intermedia	0.6	0	0.5
Semicompacta	31.22	8.89	29.4
Compacta	68.18	91.11	70.1
Número de granos vanos (estériles) en el ápice de la panicula.			
Un grano estéril	0.79	4.4	1.1
Dos granos estériles	2.37	11.11	3.1
Tres granos estériles	11.46	28.89	12.9
Cuatro granos estériles	85.37	55.6	82.9
Fertilidad de la panicula			
Parcialmente fértil	0	11.1	0.9
Parcialmente estéril	90.1	73.3	88.7
Completamente estéril	9.9	15.6	10.3
Desgranado de la panicula			
Difícil	95.65	100	96
Moderadamente difícil	4.15	0	3.8
Intermedio	0.2	0	0.2

CARACTERÍSTICA

TRANSGÉNICAS

NO TRANSGÉNICAS

TOTAL

**Color de las glumas fértiles (lema y pálea)
del grano apical de la panícula.**

	(%)	(100)	(100)	(100)
Dorado	(n)	(498)	(45)	(543)
Surcos dorados sobre fondo pajizo		6.02	2.2	5.7
Manchas café sobre fondo pajizo		18.47	77.8	23.4
Café amarillento		0.2	8.89	0.9
Café rojizo o púrpura		64.26	11.11	59.9
Manchas púrpura sobre fondo pajizo		3	0	2.8
Púrpura		2.81	0	2.6
		5.22	0	4.8

Tallos

	(%)	(100)	(100)	(100)
Hábito de crecimiento	(n)	(521)	(45)	(566)
Erecto (ángulo de 10°)		5	2.2	4.8
Semierecto (entre 11° y 30°)		37.6	20	36.2
Intermedio (entre 31° y 50°)		38.2	48.9	39
Abierto (entre 51° y 70°)		17.7	26.7	18.4
Decumbente (entre 71° y 90°)		1.5	2.2	1.6

Capacidad de macollamiento

	(%)	(100)	(100)	(100)
Muy prolifera (mas de 20 hijos)	(n)	(507)	(45)	(552)
Buena (de 15 a 19 hijos)		22	15.6	21.4
Mediana (de 11 a 14 hijos)		16.7	15.6	16.6
Pobre (de 7 a 10 hijos)		14.8	2.2	13.8
Muy pobre (menos de 7 hijos)		10.5	0	9.7

Resistencia al acame

	(%)	(100)	(100)	(100)
Si conservan su posición (no hay volcamiento)	(n)	(507)	(45)	(552)
No conservan su posición (si hay volcamiento)		99.21	100	99.3
		0.79	0	0.7

Anexo 2

109

Cuadro 5. Promedio y desviación estándar de las características cuantitativas evaluadas en las líneas transgénicas de arroz según la estrategia de transformación utilizada y para las variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). Evaluación de la segunda generación (T₂). Alajuela, 2002.

Característica	Grupos de líneas transformadas												Variedades sin transformar								
	CP1			AS			N			C			CPM		CR-5272		CR-1821				
	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x			
Días a "panzoneo"	45	121.42	6.08	60	120.07	7.21	283	125.87	8.15	23	120.28	7.73	117	119.03	8.67	30	103.00	0.00	15	118.00	0.00*
Días a antesis	33	124.00	0.00	46	119.96	2.84	196	125.48	7.05	16	121.00	0.00	83	119.08	2.32	30	110.00	0.00	15	124.00	0.00
Duración de la antesis	45	22.00	0.00	60	23.00	5.79	280	19.98	4.45	22	20.00	0.00	114	20.37	3.54	16	22.00	0.00	15	22.00	0.00
Días a la madurez	30	149.00	3.05	30	142.00	4.07	128	154.52	5.83	22	143.00	0.00	12	146.00	0.00	30	124.00	0.00	15	138.00	0.00
Longitud de la lamina de la hoja bandera	45	29.16	5.15	60	24.77	5.34	280	29.68	6.34	22	29.64	5.64	114	24.41	6.23	30	18.61	4.46	15	19.13	4.33
Ancho de la lamina de la hoja bandera	45	1.74	0.23	60	1.79	0.20	279	1.81	0.25	22	1.83	0.15	114	1.61	0.25	30	1.45	0.21	15	1.37	0.24
Altura de la planta	45	71.67	9.58	60	72.56	8.53	270	76.46	12.28	22	64.19	14.44	112	61.80	15.46	30	33.63	5.55	15	26.27	4.81
Longitud de la panícula	45	23.78	1.94	60	24.29	1.95	270	24.69	2.68	22	26.03	2.21	109	23.13	2.85	30	21.15	3.50	15	17.89	2.42
Número de granos vanos	45	236.80	63.40	60	164.80	52.64	266	250.78	68.53	22	245.09	65.49	113	171.65	64.18	30	88.50	33.66	15	36.07	21.95
Número de granos llenos	45	20.36	17.13	60	35.12	18.96	266	11.17	12.67	22	34.05	17.87	113	25.50	21.39	30	11.50	14.88	15	14.93	8.29
Número de ramificaciones de la panícula	45	20.29	2.35	60	18.18	3.17	266	20.15	2.84	22	19.45	2.52	113	17.41	3.68	30	9.50	1.94	15	7.67	1.80
Longitud promedio de la semilla	37	9.25	0.35	59	9.46	0.55	164	9.12	0.41	22	9.37	0.36	95	9.17	0.39	21	8.89	0.41	14	7.98	0.32
Ancho promedio de la semilla	37	1.92	0.09	59	1.85	0.10	164	1.90	0.08	22	1.85	0.08	95	1.84	0.08	21	1.88	0.11	14	1.96	1.17
Espesor promedio de la semilla	37	2.50	0.12	59	2.50	0.12	164	2.91	5.96	22	2.42	0.13	95	2.41	0.13	21	2.43	0.12	14	2.46	0.16

Nota: 1. CP: Proteína de cápside del RHBV en orientación sentido.

AS: Proteína de cápside del RHBV en orientación anti-sentido.

N: Extremo 5' del gen de la proteína de cápside del RHBV

C: Extremo 3' del gen de la proteína de cápside del RHBV

CPM: Proteína de cápside del RHBV orientación sentido, flanqueada por secuencias MAR

2. La desviación estándar 0.00 indica que todas las plantas evaluadas presentaron la misma característica.

Cuadro 6. Promedio y desviación estándar de las variables cuantitativas graficadas para las líneas transformadas y las variedades CR-5272 y CR1821 en la segunda generación (T2), Aajuéla, 2002.

Línea	Altura		Longitud de la hoja		Ancho de la hoja		Long. panícula		Ramif. panícula		Granos vanos		Granos llenos								
	N	X	N	X	N	X	N	X	N	X	N	X	N	X							
AS10-20	15	75.39	5.03	15.00	24.41	5.92	15.00	1.72	0.18	15.00	24.79	1.98	15.00	20.07	2.87	15.00	184.27	51.51	15.00	27.13	10.87
AS10-4	15	74.65	6.30	15.00	25.33	4.82	15.00	1.80	0.14	15.00	24.94	1.96	15.00	18.33	3.20	15.00	176.87	54.09	15.00	44.93	22.99
AS10-7	15	69.77	10.93	15.00	22.83	3.99	15.00	1.65	0.10	15.00	24.07	1.88	15.00	18.80	3.32	15.00	140.13	54.73	15.00	37.47	19.54
AS9-1	15	70.41	9.79	15.00	26.50	6.18	15.00	2.00	0.20	15.00	23.36	1.95	15.00	17.53	2.56	15.00	157.93	42.90	15.00	30.93	17.04
CS1-25	8	68.41	7.64	8.00	27.19	3.22	8.00	1.91	0.12	8.00	24.24	2.01	8.00	20.75	2.12	8.00	219.00	38.34	8.00	32.88	15.18
C37S-7	14	93.20	8.05	14.00	31.04	6.61	14.00	1.79	0.14	14.00	27.06	1.61	14.00	18.71	2.48	14.00	260.00	74.01	14.00	34.71	19.77
CP2-12	15	72.12	5.02	15.00	30.13	5.57	15.00	1.75	0.18	15.00	24.74	1.16	15.00	21.60	2.38	15.00	252.93	48.78	15.00	20.47	12.29
CP2-14	15	68.25	7.73	15.00	28.95	4.50	15.00	1.85	0.32	15.00	22.87	2.26	15.00	19.47	1.98	15.00	202.20	60.36	15.00	29.07	22.01
CP2-3	15	74.65	13.46	15.00	28.40	5.50	15.00	1.61	0.08	15.00	23.71	1.88	15.00	19.80	2.24	15.00	255.27	68.42	15.00	11.53	11.03
CPM1-16	15	54.10	13.05	15.00	21.82	6.10	15.00	1.57	0.26	15.00	21.86	2.59	15.00	14.07	3.43	15.00	118.67	57.06	15.00	21.27	24.23
CPM10-14	8	69.81	16.38	8.00	22.50	4.33	8.00	1.78	0.19	8.00	25.08	4.25	8.00	17.25	2.92	8.00	163.13	51.16	8.00	39.63	23.34
CPM10-22	10	57.27	15.00	12.00	19.91	4.23	12.00	1.47	0.27	10.00	23.92	2.29	10.00	15.10	2.47	10.00	181.40	65.96	10.00	22.50	23.10
CPM10-39	13	49.89	12.47	12.00	22.43	4.58	12.00	1.42	0.22	10.00	22.21	2.27	13.00	15.31	4.39	13.00	116.38	41.92	13.00	10.31	10.78
CPM2-5	15	47.25	8.62	15.00	23.34	4.70	15.00	1.45	0.20	15.00	20.73	2.30	15.00	19.33	2.64	15.00	153.13	34.66	15.00	8.07	17.75
CPM80-11	9	71.84	12.93	9.00	27.67	3.50	9.00	1.82	0.12	9.00	23.77	2.17	9.00	19.56	3.71	9.00	234.00	83.98	9.00	32.78	17.61
CPM80-3	15	67.73	6.49	15.00	27.44	6.23	15.00	1.78	0.24	15.00	24.20	2.59	15.00	19.67	2.26	15.00	189.40	37.67	15.00	41.60	20.15
CPM80-4	12	83.81	5.97	13.00	29.48	8.89	13.00	1.71	0.21	12.00	25.80	1.43	13.00	19.23	2.59	13.00	233.54	50.33	13.00	23.15	14.92
CPM9-19	15	63.57	8.84	15.00	24.86	5.35	15.00	1.61	0.13	15.00	22.24	2.04	15.00	17.13	3.25	15.00	180.27	49.51	15.00	36.33	12.13
CR-1821*	15	26.27	4.81	15.00	19.13	4.33	15.00	1.37	0.24	15.00	17.89	2.42	15.00	7.67	1.80	15.00	38.07	21.95	15.00	14.93	8.29
CR-5272*	30	33.63	5.55	30.00	18.61	4.46	30.00	1.45	0.21	30.00	21.15	3.50	30.00	9.50	1.94	30.00	86.50	33.66	30.00	11.50	14.86
N1-1	15	73.38	8.33	15.00	28.76	5.17	15.00	1.88	0.20	15.00	24.24	1.04	15.00	21.47	2.72	15.00	243.67	43.13	15.00	18.20	16.70
N1-8	14	58.82	7.40	14.00	23.77	5.46	14.00	1.64	0.24	14.00	20.98	2.84	13.00	18.38	3.86	13.00	190.31	79.87	13.00	11.69	10.39
N1-9	11	62.09	6.88	12.00	23.83	5.67	12.00	1.64	0.22	11.00	22.53	2.80	11.00	19.84	2.01	11.00	179.09	75.98	11.00	6.00	10.85
N10-2	14	71.71	9.29	14.00	29.04	6.57	14.00	1.91	0.21	14.00	23.92	2.15	14.00	21.00	4.13	14.00	235.14	75.40	14.00	7.43	11.76
N11-9	14	90.51	8.11	14.00	31.44	5.43	14.00	1.66	0.21	14.00	25.62	2.10	14.00	20.14	4.09	14.00	256.43	41.14	14.00	5.36	7.47
N11S-1	15	92.03	3.70	15.00	32.34	4.30	15.00	1.91	0.08	15.00	25.04	0.98	15.00	22.33	1.45	15.00	304.67	27.89	15.00	7.80	7.67
N16-14	15	77.95	9.24	15.00	31.87	5.60	15.00	1.95	0.16	15.00	24.42	2.28	15.00	19.80	2.01	15.00	265.53	41.17	15.00	4.13	5.46
N16-20	15	75.32	4.36	15.00	31.70	7.62	15.00	1.95	0.21	15.00	24.15	3.10	15.00	18.60	2.85	15.00	265.20	69.06	15.00	1.67	2.47

Anexo 4

Cuadro 7. Significancias del análisis de variancia para las siete características de producción, de acuerdo al grupo de transformación, dentro y entre grupos. Alajuela (T2).

	Dentro de los grupos					Entre grupos
	CP	AS	C	CPM	N	
Altura de la planta	0.186	0.163	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
Longitud de la hoja	0.652	0.290	0.140	0.000*	0.138	0.000*
Ancho de la hoja	0.018**	0.000*	0.047**	0.000*	0.000*	0.000*
Longitud de la panícula	0.027**	0.097	0.002*	0.000*	0.082	0.000*
Ramificaciones de la panícula	0.024**	0.027**	0.067**	0.000*	0.066	0.000*
Granos vanos	0.031**	0.091	0.163	0.000*	0.002*	0.000*
Granos llenos	0.016**	0.05**	0.823	0.000*	0.000*	0.000*

- No hay diferencias significativas
- α=1%
- α=5%

Continuación Cuadro 6

Linea	Altura			Longitud de la hoja			Ancho de la hoja			Long. panicula			Ramific. panicula			Granos vanos			Granos llenos		
	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x
N4-6	15	84.57	6.69	15.00	25.70	3.50	15.00	1.63	0.17	15.00	25.49	1.96	15.00	19.27	3.43	15.00	280.53	101.51	15.00	13.40	10.39
N4-8	8	66.44	8.08	11.00	26.67	7.22	11.00	1.57	0.20	8.00	23.11	3.82	7.00	19.86	4.18	7.00	249.86	53.10	7.00	18.14	5.05
N4S-2	15	76.79	11.52	15.00	35.22	4.28	15.00	1.95	0.20	15.00	25.74	2.55	15.00	20.47	2.42	15.00	267.73	78.02	15.00	18.87	15.65
N5-9	15	72.43	7.69	15.00	29.13	4.20	15.00	1.82	0.22	15.00	24.49	3.20	15.00	21.20	3.05	15.00	204.93	62.93	15.00	22.80	14.07
N5S-18	14	77.16	7.01	15.00	29.64	6.12	15.00	1.85	0.26	14.00	25.51	2.11	15.00	20.53	2.07	15.00	301.87	61.92	15.00	8.67	8.06
N5S-24	12	82.68	5.89	15.00	32.43	6.08	15.00	1.97	0.26	12.00	25.90	2.25	13.00	21.31	1.75	13.00	283.38	69.89	13.00	13.31	18.14
N6-24	15	84.20	7.71	15.00	32.84	7.06	15.00	2.11	0.21	15.00	25.93	1.83	15.00	20.93	1.62	15.00	276.47	40.11	15.00	12.93	22.43
N9-1	15	88.96	6.16	15.00	29.17	4.17	15.00	1.75	0.17	15.00	26.56	1.41	15.00	18.80	1.61	15.00	228.40	32.88	15.00	6.00	5.66
N9-10	15	82.54	7.03	15.00	31.51	6.35	15.00	1.67	0.15	15.00	25.77	2.80	15.00	21.13	1.88	15.00	259.93	52.23	15.00	13.40	8.60
N9-7	5	57.30	11.03	5.00	32.98	2.54	5.00	1.38	0.08	5.00	23.28	2.78	5.00	17.80	1.95	5.00	189.40	49.30	5.00	16.00	13.55
N9-8	13	68.21	10.42	15.00	28.34	6.18	15.00	1.80	0.16	13.00	24.94	2.86	12.00	19.58	1.93	12.00	245.58	71.25	12.00	8.50	9.40
N9S-14	15	64.39	10.11	15.00	27.18	7.67	14.00	1.76	0.19	15.00	24.09	2.92	12.00	18.50	2.32	12.00	239.17	62.48	12.00	14.42	9.66
Total	554	69.31	17.68	566.00	27.19	6.85	565.00	1.73	0.26	551.00	23.94	2.97	551.00	18.44	4.26	551.00	209.08	83.85	551.00	18.50	18.37

Nota: * controles

Cuadro 9. Porcentaje de plantas en cada variables cualitativas evaluadas para las líneas transgénicas de arroz y los controles CR-5272 y CR-1821 (no transgénicos) en la generación T3.

CARACTERÍSTICA	TRANSGÉNICAS		NO TRANSGÉNICAS		TOTAL
	%	n	%	n	
Tallos					
Capacidad de macollamiento	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
Muy prolifera	(667)	(54)	(721)		
Buena	1.35	3.7	1.5		
Mediana	2.25	3.7	2.4		
Pobre	4.35	22.2	5.7		
Muy pobre	12.29	22.2	13		
	79.76	48.1	77.4		
Resistencia al acame	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
Si conservan su posición (no hay volcamiento)	(652)	(52)	(704)		
No conservan su posición (si hay volcamiento)	84.2	100	85.4		
	15.8	0	14.6		
Panicula					
%	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
n	(266)	(50)	(316)		
Granos vanos (estériles) en el ápice de la panicula					
Todos los granos fértiles	19.2	36	21.8		
Un grano estéril	47.4	50	47.8		
Dos granos estériles	31.2	14	28.5		
Tres granos estériles	1.8	0	1.6		
Cuatro granos estériles	0.4	0	0.3		

Anexo 6

114

Cuadro 10. Promedio y desviación estándar de las características cuantitativas evaluadas en las líneas transgénicas de arroz, según la estrategia de transformación utilizaday en las variedades de arroz (*Oryza sativa* L). Evaluación de la tercera generación (T3). Guápiles 2003.

Característica	Grupos de líneas transgénicas						Variedades sin transformar								
	AS ¹			C ²			CPM ³			CR-5272			CR-1821		
	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x	N	X	σ_x
Longitud de la lamina de la hoja bandera	290	33.75	9.15	107	43.21	9.87	270	38.45	10.28	24	24.10	6.72	30	20.17	5.13
Ancho de la lamina de la hoja bandera	290	2.21	0.29	107	2.28	0.30	270	2.19	0.28	24	1.84	0.22	30	1.47	0.24
Altura de la planta	290	114.35	15.37	107	133.36	13.24	270	111.72	13.79	24	66.93	4.35	30	60.30	10.25
Longitud de la panicula	290	27.26	4.47	107	32.48	5.50	270	27.49	4.06	24	23.07	1.49	30	21.47	2.66
Número de granos vanos	139	49.53	23.64	-	-	-	127	60.33	30.52	20	22.80	12.02	30	27.17	32.06
Número de granos llenos	139	164.99	49.63	-	-	-	127	152.84	43.70	20	96.60	24.31	30	124.10	69.87
Número de ramificaciones de la panicula	139	20.60	4.01	-	-	-	127	22.54	4.17	20	11.90	1.37	30	15.73	5.34

Nota: 1. AS: Proteína de cápside del RHBV en orientación sentido.

2. C: Extremo 3' del gen de la proteína de cápside del RHBV.

3. CPM: Proteína de cápside del RHBV en orientación sentido, flanqueada por secuencias MAR.

- : significa que esa característica no se midió, no hay dato

Continuación del cuadro 11.

Linea	Longitud de la hoja		Ancho de la hoja		Altura		Long. panícula		Ramif. panícula		Granos vanos		Granos llenos								
	N	X	N	X	N	X	N	X	N	X	N	X	N	X							
C37S-7-1	10	38.04	9.51	10	2.27	0.33	10	136.24	7.50	10	30.73	2.76	-	-							
C37S-7-10	10	37.07	7.64	10	2.1	0.19	10	123.79	11.38	10	32.73	4.21	-	-							
C37S-7-11	10	37.36	7.42	10	1.95	0.10	10	128.15	5.65	10	29.67	1.49	-	-							
C37S-7-13	10	46.55	8.18	10	2.5	0.24	10	128.65	10.11	10	31.65	3.82	-	-							
C37S-7-14	10	40.92	8.17	10	2.35	0.15	10	140.71	5.17	10	31.48	2.77	-	-							
C37S-7-2	10	48.85	10.18	10	2.69	0.22	10	127.20	12.43	10	31.35	3.94	-	-							
C37S-7-3	10	41.41	8.85	10	2.18	0.18	10	140.52	8.64	10	28.87	11.79	-	-							
C37S-7-4	10	47.77	10.28	10	2.35	0.23	10	132.83	8.74	10	34.45	1.73	-	-							
C37S-7-7	10	46.41	10.81	10	2.22	0.39	10	137.92	14.20	10	34.63	4.73	-	-							
C37S-7-8	10	51.56	7.18	10	2.36	0.18	10	134.23	22.02	10	37.87	4.41	-	-							
C37S-7-9	7	38.04	9.29	7	2.09	0.21	7	141.09	21.30	7	34.46	7.02	-	-							
CPM10-14-1	10	35.75	8.17	10	2.11	0.22	10	94.62	12.90	10	25.49	5.57	-	-							
CPM10-14-13	10	39.16	12.00	10	2.25	0.25	10	112.33	11.78	10	28.17	5.03	-	-							
CPM10-14-2	10	34.92	9.89	10	2.22	0.19	10	115.32	5.73	10	27.18	3.17	10	21.50	5.58	10	61.60	32.74	10	165.90	50.66
CPM10-14-3	10	39.16	12.0	10	2.25	0.25	10	112.33	11.8	10	28.17	5.03	10	20.00	2.05	10	90.40	41.09	10	152.40	35.90
CPM10-14-4	10	33.40	9.45	10	2.02	0.22	10	103.33	5.48	10	25.27	2.69	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPM10-14-6	10	32.01	9.31	10	2.07	0.24	10	110.35	9.91	10	23.40	2.63	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPM10-14-6	10	36.25	7.73	10	2.5	0.24	10	120.00	11.08	10	27.05	2.31	10	25.70	5.46	10	74.60	52.04	10	135.10	57.03
CPM10-14-8	10	36.10	5.19	10	2.36	0.19	10	111.67	10.00	10	29.11	3.19	10	21.80	3.22	10	52.00	19.69	10	155.50	57.80
CPM10-22-1	10	39.75	5.17	10	2.25	0.26	10	103.40	8.92	10	28.90	2.28	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPM10-22-10	10	33.96	19.96	10	1.95	0.27	10	100.09	13.70	10	28.89	7.74	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPM10-22-11	10	38.85	7.61	10	2.22	0.29	10	97.55	7.42	10	27.80	2.58	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPM10-22-5	10	32.50	8.85	10	2.25	0.35	10	97.30	8.28	10	26.05	2.50	10	23.50	7.09	10	71.30	41.52	10	153.60	58.91
CPM10-22-6	10	34.92	9.05	10	2.09	0.20	10	95.61	4.85	10	26.19	4.14	10	22.00	3.53	10	53.50	16.20	10	118.40	39.56
CPM10-22-7	10	39.52	11.34	10	2.42	0.18	10	101.34	6.45	10	29.05	5.06	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPM10-22-9	10	39.44	9.13	10	2.11	0.16	10	96.37	6.02	10	25.94	2.41	9	21.67	2.60	9	45.78	12.69	9	148.78	42.01
CPM80-11-1	10	48.94	9.90	10	2.34	0.18	10	123.55	10.27	10	31.57	3.85	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPM80-11-5	10	41.84	8.74	10	2.23	0.35	10	111.90	14.70	10	28.35	3.54	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPM80-11-6	10	38.04	7.89	10	2.2	0.25	10	118.13	9.29	10	25.94	2.20	-	-	-	-	-	-	-	-	
CPM80-11-7	10	44.54	11.77	10	2.13	0.37	10	111.60	12.58	10	27.51	5.16	10	25.00	2.98	10	63.40	12.38	10	159.60	22.58

Continuación del cuadro 11.

Linea	Longitud de la hoja		Ancho de la hoja		Altura		Long. partícula		Ramific. partícula		Granos vanos		Granos llenos								
	N	X	\bar{O}_x	N	X	\bar{O}_x	N	X	\bar{O}_x	N	X	\bar{O}_x	N	X	\bar{O}_x						
CPM80-11-9	10	36.90	6.85	10	2.07	0.13	10	115.90	7.49	10	26.55	2.00	18	22.83	3.84	18	69.67	24.43	18	150.22	40.89
CPM80-4-10	10	41.12	12.64	10	2.22	0.33	10	120.55	9.36	10	28.94	3.91	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPM80-4-12	10	39.53	12.71	10	2.1	0.24	10	114.47	8.27	10	27.04	4.73	10	22.00	2.67	10	37.10	13.16	10	153.30	31.77
CPM80-4-13	10	40.90	7.48	10	2.29	0.23	10	124.88	8.37	10	29.83	2.91	10	22.20	3.33	10	52.60	21.30	10	173.50	35.08
CPM80-4-5	10	31.47	7.15	10	2.01	0.33	10	122.67	11.79	10	26.68	4.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPM80-4-6	10	51.10	5.22	10	2.54	0.39	10	133.00	11.01	10	32.00	1.70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPM80-4-7	10	39.76	6.25	10	1.99	0.12	10	118.13	5.22	10	29.63	4.04	10	22.00	3.77	10	43.10	16.16	10	169.50	32.53
CPM80-4-9	10	36.17	8.93	10	2.1	0.19	10	122.21	7.48	10	27.31	3.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CR-1821*	30	20.17	5.13	30	1.47	0.24	30	60.30	10.25	30	21.47	2.66	30	14.82	3.76	30	22.87	20.65	30	111.40	46.26
CR-5272*	24	24.10	6.72	24	1.84	0.22	24	66.93	4.35	24	23.07	1.49	20	11.65	1.36	20	22.80	11.72	20	96.60	23.23
Total	721	36.03	10.82	721	2.17	0.33	721	113.88	46.57	721	27.74	4.98	316	20.37	5.03	316	50.05	29.34	316	151.90	51.69

Nota: * Variedades comerciales no transgénicas
 -: Significa que esa característica no se midió, no hay dato

Anexo 8

Cuadro 12. Significancias del análisis de variancia para las siete características de producción, de acuerdo al grupo de transformación, dentro y entre grupos. Guápiles (T3).

	Dentro de los grupos			Entre grupos
	AS	C	CPM	
Altura de la planta	0.000*	0.001*	0.000*	0.000*
Longitud de la hoja	0.000*	0.000*	0.060	0.000*
Ancho de la hoja	0.000*	0.000*	0.003*	0.000*
Longitud de la panicula	0.000*	0.001*	0.058	0.000*
Ramificaciones de la panicula	0.000*	▣	0.025**	0.000*
Granos vanos	0.000*	▣	0.000*	0.000*
Granos llenos	0.000*	▣	0.096	0.000*

■ No hay diferencias significativas

• $\alpha=1\%$

** $\alpha=5\%$

▣ No se evaluó