

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DE LA HIBRIDACIÓN DEL ARROZ SILVESTRE
***Oryza glumaepatula* CON VARIEDADES DE ARROZ**
CULTIVADO (*O. sativa*) Y SILVESTRE (*O. grandiglumis*)

Tesis de grado para optar al título de Licenciado en
Biología con Énfasis en Biología Molecular y
Biotecnología

Eddier Villalobos Cascante

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2015

ESTUDIO DE LA HIBRIDACIÓN DEL ARROZ SILVESTRE *Oryza glumaepatula* CON VARIEDADES DE ARROZ CULTIVADO (*O. sativa*) Y SILVESTRE (*O. grandiglumis*)

TRIBUNAL EXAMINADOR

_____	Directora de Tesis
Ms. Sc, Griselda Arrieta Espinoza.	
_____	Miembro del Tribunal
Ph. D, Alfonso J. García Piñeres.	
_____	Miembro del Tribunal
Ph. D, Eric Fuchs Castillo.	
_____	Miembro del Tribunal
Ph. D, Federico Albertazzi Castro.	
_____	Presidente del Tribunal
Dra. Laura Solís Ramos	
_____	Postulante
BSc. Eddier Villalobos Cascante.	

DEDICATORIA

A mí querida madre Mari Cascante por darme la vida y por el apoyo durante todos mis años de estudio. A mis abuelos. A la Universidad de Costa Rica que me brindó la beca para poder finalizar este sueño. A todos mis amigos(as) que de una u otra forma estuvieron conmigo y me apoyaron en cada momento de este proyecto de vida. A todos ellos los quiero mucho.

AGRADECIMIENTO

A todos los miembros del tribunal examinador por su enseñanza y guía en las diferentes etapas de esta investigación. A Griselda Arrieta Espinoza por permitirme realizar este proyecto en el Laboratorio de cultivo de tejidos y transformación genética de plantas del CIBCM.

Al Dr. Alfonso García y a los Doctores Evan Jensen y Bertha Valverde del Laboratorio de Estudios Especializados e Investigación del Hospital Nacional de Niños, por su apoyo y orientación en el análisis de citometría de flujo.

A Elena y Adriana, compañeras del Laboratorio y amigas que estuvieron conmigo durante todo este proyecto, apoyándome siempre en cada una de las etapas y con las cuales compartí mucho.

Agradezco a todas las personas que de una u otra manera ayudaron en esta tesis.

INDICE

INDICE	v
Resumen	x
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
3. Justificación	8
4. Hipótesis de trabajo	8
5. Objetivo general	9
5.1. Objetivos específicos	9
6. Materiales y Métodos	10
6.1. Cruces interespecíficos artificiales entre <i>O. glumaepatula</i> y <i>O. sativa</i>	10
6.1.1. Evaluación morfológica de las plantas	11
6.1.2. Confirmación molecular de la naturaleza híbrida de las plantas	12
6.1.3. Análisis estadístico para determinar la hibridación de caracteres en función de la madre del híbrido	15
6.2. Determinación del contenido de ADN de las plantas identificadas como híbridos producto del cruce entre <i>O. glumeapatula</i> y <i>O. grandiglumis</i> mediante Citometría de Flujo	17
7. Resultados	21
7.1. Cruzamientos interespecíficos artificiales entre <i>O. glumaepatula</i> y <i>O. sativa</i>	21
7.2. Confirmación molecular de la naturaleza híbrida de las plantas:	22
7.3. Evaluación morfológica de las plantas	26
7.4. Determinación del contenido de ADN de las plantas identificadas como híbridos producto del cruce entre <i>O. glumaepatula</i> y <i>O. grandiglumis</i> mediante Citometría de Flujo	37
8. Discusión	48
9. Conclusiones	54
10. Recomendaciones	55
11. Referencias	56
Anexos	65

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio para comprobar la calidad de un extracto de ADN total extraído de las siguientes muestras: *O. glumaepatula* x CFX-18 (1-2), CFX-18 x *O. glumaepatula* (3-10), P. Inta x *O. glumaepatula* (11-15), *O. glumaepatula* x P.Inta (16-18).....**22**
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa (2%) teñidos con bromuro de etidio para detectar las bandas de los alelos del gen ALS en la posición A₁₂₂T para P. Inta (2), híbridos P.Inta x *O. glumaepatula* (3-12) y *O. glumaepatula* x P. Inta (17-20). Se indica el fragmento de control interno de las PCRs: alelo normal o silvestre *O. glumaepatula* (14) y H₂O (15).....**24**
- Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio para detectar las bandas de los alelos del gen ALS en la posición S₆₃₅D para CFX-18 (2), híbridos *O. glumaepatula* x CFX-18 (3-4) y CFX-18 x *O. glumaepatula* (5-17). Se indica el fragmento de control interno de las PCRs: alelo normal o silvestre *O. glumaepatula* (19) y H₂O (20).....**25**
- Figura 4.** Muestra de plantas en invernadero evaluadas en el experimento: (a) Puita Inta, (b) híbrido *O. glumaepatula* x Puita Inta, (c) *O. glumeapatula*, (d) CFX-18, (e) híbrido *O. glumaepatula* x CFX-18 y (f) *O. glumeapatula*.....**28**
- Figura 5.** Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para muestras de tejido foliar de *O. glumaepatula* de acuerdo al tipo buffer de extracción evaluado y según el número de eventos o núcleos obtenidos: TRIS (a) y Galbraith (b), representativo de 4 repeticiones realizadas para cada uno.....**38**
- Figura 6.** Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para muestras de *O. glumaepatula* de acuerdo a la cantidad de tejido vegetal evaluado y según el número de eventos o núcleos obtenidos: (a) 10 mg, (b) 20 mg, (c) 30 mg, (d) 40mg, (e) 50 y representativo a dos repeticiones realizadas para cada uno.....**39**

Figura 7. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para las mezclas de tejidos vegetales del estándar *O. grandiglumis* con el híbrido (*O. glumaepatula*- *O. grandiglumis*), de acuerdo a las diferentes proporciones evaluadas y según el número de eventos o núcleos obtenidos: (a) 10mg: 20mg, (b) 15mg: 15mg, (c) 20mg: 10mg y representativo de dos repeticiones realizadas para cada uno.....**41**

Figura 8. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para *Phaseolus vulgaris* según el número de eventos o núcleos obtenidos y representativo de 20 repeticiones (Me: 1852, R: 2351).....**42**

Figura 9. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para las muestras de las plantas evaluadas y según el número de eventos o núcleos obtenidos: *O.glumaepatula* (a), Híbrido (*O.glumaepatula*-*O. grandiglumis*) (b) y *O. grandiglumis* (c) representativos de 11 repeticiones para *O. glumaepatula* y 19 repeticiones para las demás muestras.....**44**

Figura 10. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para las mezclas de tejido foliar y según el número de eventos o núcleos obtenidos: (a) *O. glumaepatula* + Híbrido (*O.glumaepatula*-*O. grandiglumis*) (Me: 262, R: 161 y Me: 184, R: 46) y (b) *O. grandiglumis* + Híbrido (*O.glumaepatula*-*O. grandiglumis*) (Me: 1005.5, R: 2128 y Me: 268.5, R: 253) y representativo de 7 y 26 repeticiones realizadas para cada una respectivamente.....**46**

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cantidad total de cruces realizados y cantidad final de híbridos obtenidos según el tipo de cruce entre <i>O. glumaepatula</i> y las variedades cultivadas.....	21
Cuadro 2. Valores de P según la prueba t-student para la comparación de medias de los descriptores evaluados en los híbridos <i>O.glumaepatula</i> x Puita Inta y Puita Inta x <i>O.glumaepatula</i>	27
Cuadro 3. Valores de P para los descriptores morfológicos evaluados según la prueba t-student realizada para los híbridos: <i>O.glumaepatula</i> x CFX-18 y CFX-18 x <i>O.glumaepatula</i>	27
Cuadro 4. Valores promedio y desviaciones estándar de las características morfológicas evaluados a los 90 días para <i>O. glumapatula</i> , Puita Inta y sus respectivos híbridos: <i>O.glumaepatula</i> x Puita Inta y Puita Inta x <i>O. glumaepatula</i>	29
Cuadro 5. Valores promedio y desviaciones estándar de las características morfológicas evaluadas a los 90 días para CFX-18, <i>O. glumaepatula</i> y su respectivo híbrido CFX-18 x <i>O.glumaepatula</i>	30
Cuadro 6. Análisis de varianza (g.l = 5/149) para los descriptores morfológicos evaluados en la especie silvestre <i>O. glumaepatula</i> , las variedades comerciales CFX-18 y Puita Inta y sus respectivos híbridos.....	31
Cuadro 7. Valores promedio de los descriptores morfológicos evaluados a los 90 días y valores del estadístico F respecto al Análisis de Contrastes entre híbrido <i>O.glumaepatula</i> x Puita Inta y sus progenitores.....	33
Cuadro 8. Valores promedio de los descriptores morfológicos evaluados a los 90 días y valores del estadístico F respecto al Análisis de Contrastes entre el híbrido Puita Inta x <i>O.glumaepatula</i> y sus progenitores.....	33

Cuadro 9. Valores promedio de los descriptores morfológicos evaluados a los 90 días y valores del estadístico F respecto al Análisis de Contrastes entre el híbrido CFX-18 x <i>O.glumaepatula</i> y sus progenitores.....	34
Cuadro 10. Similitud de los híbridos con los parentales para cada uno de los caracteres morfológicos evaluados de acuerdo al Análisis de Contrastes.....	35
Cuadro 11. Picogramos de ADN por núcleo celular para el híbrido <i>O.glumaepatula</i> - <i>O. grandiglumis</i> según los canales de fluorescencia del citómetro de flujo y según la mezcla <i>O. grandiglumis</i> + Híbrido.....	47

Resumen

En esta investigación se estudió el proceso de hibridación interespecífica de la especie silvestre *O. glumaepatula* con variedades comerciales de la especie *O. sativa* y con *O. grandiglumis* mediante evaluación morfológica y citometría de flujo de híbridos. Se produjeron y evaluaron plantas híbridas producto del cruce entre *O. glumaepatula*, ubicada en el humedal del Río Medio Queso y dos variedades de *O. sativa*, Puita Inta y CFX- 18 resistentes a un herbicida. Se utilizó la técnica de Cadena de Reacción de Polimerasa Oligonucleótido Alelo Específica (PCR-ASO) para detectar las mutaciones alélicas en el gen ALS que confieren la resistencia al herbicida, y así confirmar la naturaleza híbrida de las plantas obtenidas en los cruces. En total se obtuvieron 68 híbridos *O. glumaepatula* x P. Inta, 21 híbridos P. Inta x *O. glumaepatula*, 4 híbridos *O. glumaepatula* x CFX-18 y 15 híbridos CFX-18 x *O. glumaepatula*. Se evaluaron 10 descriptores morfológicos del género *Oryza* y se determinó que independientemente de la dirección y tipo de cruce, los híbridos se asemejan a la especie silvestre *O. glumaepatula* para los caracteres: altura, longitud de la panícula y longitud de la lígula. Así mismo, todos los híbridos presentaron similitud a las variedades comerciales en la longitud de la hoja bandera. Para los demás caracteres evaluados, dichos híbridos presentaron efecto materno, heterosis y valores intermedios. Por otro lado, se estandarizó el protocolo de citometría de flujo (CFM) para especies del género *Oryza* y se analizó el contenido de ADN nuclear de 106 muestras de tejido foliar de las especies silvestres *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis* y de los híbridos naturales producto del cruce entre estas especies, identificados morfológicamente por Zamora *et al.* (2003). Se determinó que el contenido de ADN nuclear para el híbrido *O. glumaepatula* x *O. grandiglumis* en promedio es de 0.73 picogramos, que resultó ser intermedio en comparación con *O. grandiglumis* y *O. glumaepatula* que presentan 1.0 y 0.50 picogramos de ADN respectivamente. De esta manera se confirmó la naturaleza molecular de los híbridos.

1. Introducción

El género *Oryza* pertenece a la familia Poaceae e incluye 22 especies de las cuales 20 son silvestres y dos, *O. glaberrima* y *O. sativa* son cultivadas (Zhiping *et al.*, 2005). Esta última, *Oryza sativa* L., de genoma diploide ($2n = 24$) comenzó a cultivarse hace casi 10.000 años, en muchas regiones húmedas de Asia tropical y subtropical (Garris *et al.*, 2005). Actualmente, el arroz es un cereal de gran importancia económica y social ya que representa el 20% de calorías de la dieta diaria para más de un tercio de la de la población mundial (Garris *et al.*, 2005). En el año 2011, este cultivo representó la producción de alrededor de 700.7 millones de toneladas de arroz, siendo Asia el mayor productor con un aporte del 90%, mientras que América Latina representaría el 3.84% (FAO, 2011).

Sin embargo, uno de los principales problemas que afecta la producción de arroz es la competencia por recursos con el arroz maleza o arroz rojo, por lo que en Estados Unidos y Brasil y los países centroamericanos se ha optado por introducir variedades de arroz resistente a herbicidas del grupo de imidazolinonas. Estas variedades han sido obtenidas por medio de mutaciones inducidas del gen ALS que codifica para la enzima acetolactatosintetasa, indispensable en la biosíntesis de los aminoácidos esenciales isoleucina, leucina y valina, y que gracias a dicha mutación el herbicida no las afecta. La variedad CFX-18 por ejemplo, presenta la mutación del gen en la posición S₆₅₃D, mientras que la variedad Puita Inta la presenta en la posición A₁₂₂T (Kadaru *et al.*, 2008 Roso *et al.*, 2010).

Por otro lado, en América se han descrito tres especies de arroz silvestre que presentan una alta diversidad genética, estas incluyen poblaciones de genoma diploide (AA) como *Oryza glumaepatula*, la cual se localiza en diferentes partes de Latinoamérica como Centro y Suramérica, Paraguay, Brasil y Cuba (Marines *et al.*, 2007; Akimoto, 1998), además, de las especies de genoma tetraploide (CCDD)

como *Oryza grandiglumis* y *Oryza latifolia* (Zamora *et al.*, 2003). Estudios recientes han determinado que *O. glumaepatula* es principalmente autógena, adaptada al clima y suelo tropical, con un ciclo de vida y producción de semilla anual. Por otra parte, se ha establecido que esta planta es una de las principales fuentes de germoplasma para mejoramiento de arroz cultivado mediante cruces interespecíficos entre ambos (Brondani *et al.*, 2005).

En Costa Rica, se ha documentado la existencia de dos poblaciones de *O. glumaepatula*. Una población de cientos de plantas en las zonas bajas al noroeste en Cuajiniquil de Guanacaste, y una población mayor distribuida en parches a lo largo del Humedal del río Medio Queso en Los Chiles de Alajuela, al norte del país, cerca del área protegida del Refugio de Vida Silvestre de Caño Negro (Zamora, 2001). Su caracterización morfológica y molecular a través de microsatélites muestra una clara separación de *O. glumaepatula* respecto a las otras especies silvestres del mundo, al arroz maleza y comercial (Arrieta-Espinoza *et al.*, 2005; Trejos, 2006; Zamora *et al.*, 2003).

En la actualidad en los márgenes del río Medio Queso se desarrollan zonas de agricultura con cultivos de arroz comercial y ganadería. Esta situación posibilita el cruce e hibridación entre *O. sativa* y *O. glumaepatula* dentro del agroecosistema (Trejos, 2006). Además, en las zonas en la que se han encontrado estas poblaciones, también se han identificado individuos que según su morfología serían posibles híbridos producto del cruce entre *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis* (Zamora *et al.*, 2003). Las poblaciones de *O. grandiglumis*, al igual que las de *O. glumaepatula* se encuentran distribuidas en tierras bajas, en zonas alteradas como potreros, orilla de las carreteras, de bosques o ríos y en áreas cultivadas (Quesada, 2001).

La hibridación de especies vegetales que utilizan el sistema reproductivo de autopolinización, como en el caso del género *Oryza*, permite la combinación en un

genotipo de la descendencia (H1) de al menos dos o más genotipos de los progenitores, a los cuales se les llama híbridos (Suarez, 2006). La presencia de plantas híbridas H1 representa un aumento en las probabilidades de introgresión genética de alelos entre plantas de diferentes poblaciones, lo que quiere decir, el intercambio y traslado permanente de los genes de un conjunto de poblaciones diferenciadas a otro (De la Cruz, 2010). La incorporación estable de estos alelos da como resultado un aumento en la diversidad genética, esto debido a que la población resultante contiene genes de ambos padres, genotipos únicos y con potencial expresión de ambos caracteres de sus progenitores (SEBiot, 2007). Por otro lado, estudios de hibridación natural sugieren que las plantas domesticadas pueden cruzarse naturalmente con sus parientes silvestres compatibles cuando entran en contacto entre sí, y la única manera de probar que realmente estos procesos han ocurrido es analizar los patrones de variación tanto a nivel morfológico como molecular (Hathaway, 2004).

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la presencia o ausencia de algunos caracteres parentales en los híbridos no necesariamente revela una combinación estable de alelos (Kshirsagar, 2005). Es necesario por lo tanto, estudiar y analizar la naturaleza de los genes, ya que el valor de un genotipo depende de su potencial *per se* y de su capacidad para combinarse (De la Cruz, 2010).

Una de las técnicas que se ha utilizado para realizar este tipo de estudios ha sido la citometría de flujo (CMF), en vista de que permite determinar el tamaño del genoma de los organismos. Ejemplos de aplicación de esta técnica incluyen estudios sobre la evolución, ecología y sistemática de plantas. La CMF permite la cuantificación de la cantidad de ADN en núcleos celulares teñidos con un fluorocromo que fluyen individualmente a través de una celda óptica (Dolezel *et al.* (2007), (Miyabayashi *et al.*, 2007).

Los primeros informes de la utilización de la CMF en especies vegetales datan de 1983. Desde entonces, se ha logrado determinar desde el genoma más pequeño en la especie *Genlisea margaretae* (Lentibulariaceae) con 0.06 pg ADN/núcleo, hasta el genoma más grande en la especie tetraploide *Fritillaria assyriaca* (Liliaceae) con 65.48 pg ADN/núcleo (Bennett & Leitch, 2012). Además esta técnica ha permitido realizar estudios de muy diversa naturaleza, como por ejemplo la determinación de la correlación entre la duración del ciclo celular y el tamaño de las células, caracterizar el ciclo de vida de especies en peligro de extinción y malezas, y estudios fenológicos, entre otros (Galbraith *et al.*, 2005).

En el caso de la valoración del tamaño de genoma, se realiza una estimación cuantitativa del ADN nuclear de las células vegetales, utilizando fluorocromos ADN-selectivos. Para esto, se determinan los picogramos de ADN por núcleo utilizando una planta estándar con una cantidad de ADN conocido (Dolezel *et al.*, 2007). En el caso específico del arroz, Velásquez *et al.* (2010) utilizaron esta técnica para determinar la cantidad de ADN por núcleo y el nivel de ploidía de plantas regeneradas a través de cultivo *in vitro*.

Por lo tanto, para estudiar la hibridación interespecífica de la especie silvestre diploide *O. glumaepatula* con especies de diferente grado de ploidía tales como *Oryza grandiglumis* y *Oryza latifolia* que son tetraploides (Zamora *et al.*, 2001) la citometría de flujo permitiría la identificación de los materiales híbridos entre estas especies silvestres.

2. Antecedentes

La especie silvestre de arroz *O. glumaepatula* se encuentra distribuida en las regiones de centro y sur América. Algunos herbarios archivan muestras en Cuba, Paraguay y Argentina que datan desde 1902 y más recientemente en la década de los noventa, en medio del curso del río Amazonas, en Brasil. En el neotrópico, además de *O. glumaepatula*, se distribuyen otras 3 especies silvestres: *O. grandiglumis*, *O. alta* y *O. latifolia* (Akimoto, 1998).

En Costa Rica se ha determinado la presencia de tres especies silvestres del género *Oryza*: *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis*, *O. latifolia*. Además, se ha analizado la varianza de diversos descriptores morfológicos y su correlación con cada una de estas especies silvestres, esto mediante estudios de análisis de componentes principales (PCA), gracias a lo cual se identificó un posible híbrido producto del cruce entre *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis* (Zamora *et al.*, 2003). Este análisis determinó además, que *O. glumaepatula* presenta rasgos morfológicos únicos, tales como una lígula apergaminada, y considerablemente más grande que la de las demás especies silvestres, panícula corta y una coloración rojiza en las aristas de las semillas. Finalmente, este análisis permitió establecer que esta especie presenta dos picos subsecuentes de floración a inicios de la estación lluviosa entre setiembre y octubre (Zamora *et al.*, 2003).

Desde el surgimiento de la agricultura, una gran variedad especies silvestres han sido seleccionadas y domesticadas por el ser humano. Tal es el caso del trigo (*Triticum turgidum*) y la cebada (*Hordeum turgidum*) en el medio Oriente, el maíz (*Zea mays* L.) y la papa (*Solanum tuberosum*) en América y el arroz (*Oryza sativa* L.) en Asia, los cuales han llegado a ser la base de la alimentación en el mundo (Castañón, 2002). Durante el proceso de selección de estos organismos, las combinaciones de genes resultantes de la hibridación han sido de importancia en la evolución de cada uno de estos (Jarvis & Hodgkin, 1999).

En base a esta información, se ha establecido que la evaluación de la hibridación entre cultivares comerciales y sus parientes silvestres es importante para el reconocimiento y la selección de las plantas híbridas resultantes, y la evaluación de los posibles componentes de riesgo que ello implicaría dentro de un agroecosistema (Jarvis & Hodgkin, 1999). Entre estos se pueden mencionar los estudios de introgresión genética a nivel morfológico y molecular mediante el uso de isoenzimas en tomate (*Lycopersicon esculentum*), para evaluar variación genética y su significancia evolutiva (Rick & Holle, 1990) y los análisis morfológicos de aptitud combinatoria para predecir híbridos a partir de cruces dialélicos en el maíz (*Zea mays*) (Quemé de León *et al.*, 1991).

Además, se han realizado estudios de introgresión genética a nivel morfológico y molecular mediante el uso de isoenzimas en la papa (*Solanum tuberosum*) (Zimmerer & Douches, 1991); análisis de introgresión genética para establecer relaciones morfológicas entre cultivares y sus parientes silvestres en lechuga (*Lactuca sativa*) (van Raamsdonk & van der Maesen, 1996) y análisis morfológicos de aptitud combinatoria mediante cruces dialélicos y sus recíprocos de la rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en México (Ruelas *et al.*, 2008), entre otros.

Desde el punto de vista de mejoramiento genético, las especies silvestres han sido una importante fuente de genes para la mejora de las variedades cultivadas a través de la hibridación y retrocruzamiento. Por ejemplo, se puede mencionar el caso del algodón, en donde la hibridación interespecífica entre especies silvestres tetraploides y la variedad cultivada han sido explotados en el desarrollo de híbridos de algodón comercialmente populares (Vikrant, 2006).

Por otra parte, la citometría de flujo, es otra de las técnicas moleculares que ha sido utilizada en diferentes partes del mundo para evaluar la hibridación entre especies vegetales. En algunos taxa vegetales la citometría de flujo se ha utilizado

determinar el contenido de ADN por núcleo, al comparar con un estándar cuyo tamaño de genoma es conocido (Serrato *et al.*, 2000).

Algunos estudios de este tipo se han realizado en plantas de sandía (*Citrullus lanatus*) para correlacionar el contenido de ADN con el nivel de ploidía y el número de cloroplastos en células guardianas en los estomas de híbridos provenientes del cruce entre especies triploides y tetraploides (Jaskani *et al.*, 2005); por su parte Serrato *et al* (2000) en México utilizó esta técnica para determinar la asociación entre el contenido de ADN nuclear y el nivel de ploidía de varias poblaciones de *Tagetes* spp de la familia Asteraceae. De la misma manera, De Schepper *et al.* (2001) utilizaron esta técnica para evaluar el nivel de ploidía de una colección de plantas de azalea, del género *Rhododendron* e identificaron especies diploides, triploides y tetraploides.

Además, la citometría de flujo también ha sido implementada en leguminosas como *Medicago truncatula* (Ochatt, 2006), para evaluar la estabilidad genética de las plantas en cuanto al contenido de ADN y por tanto el nivel de ploidía de poblaciones transformadas mediante la inserción de genes vía *Agrobacterium tumefaciens*. Por otro lado, esta técnica se ha utilizado con la especie *Mammillaria san-angelensis* de la familia Cactaceae, conocida como Biznaga de san ángel para evaluar de igual manera la estabilidad genética de plantas híbridas regeneradas vía cultivo *in vitro* (Palomino, 2000).

Finalmente, en el caso específico de estudios de caracterización e identificación de especies vegetales, esta técnica ha sido utilizada en diferentes accesiones del género *Bromus* (Tuna *et al* 2001). En relación con esta investigación, existen referencias en donde la citometría de flujo se ha utilizado en plantas silvestres del género *Oryza* para determinar contenido de ADN o tamaño del genoma y relacionarlo con la ploidía y el número y longitud de cromosomas de cada una (Miyabayashi *et al.*, 2007).

3. Justificación

La posible hibridación de la especie silvestre *O. glumaepatula* con el arroz cultivado o con otra especie silvestre podría representar un riesgo en cuanto al mantenimiento de la fuente de genes que posee *O. glumaepatula* para el mejoramiento genético del arroz en el país. Por lo tanto, la caracterización de los híbridos entre *O. glumaepatula* y *O. sativa* permitiría la identificación de las características predominantes en los híbridos producto del cruce entre estas especies. Asimismo, la información generada sería de utilidad para entender el proceso de hibridación y el posible flujo de genes de las variedades comerciales a la especie silvestre. Por otra parte, la utilización de la técnica de citometría de flujo proveería de una herramienta para determinar la identidad de los híbridos naturales entre *O. glumaepatula* y la especie silvestre *O. grandiglumis* identificados por morfología y ubicados en el humedal del río Medio Queso.

4. Hipótesis de trabajo

Según lo descrito por Kanya *et al.* (2012), híbridos del género *Oryza* entre una especie silvestre y una variedad comercial tienen un genoma compuesto por genes de ambos padres los cuales son determinados por selección y cuyos caracteres pueden distinguirse morfológicamente. Con base en este argumento, mediante la presente investigación se espera obtener plantas híbridas producto del cruce entre el arroz silvestre (*O. glumaepatula*) y el arroz cultivado (*O. sativa*) con caracteres de ambos padres. Estos caracteres podrían ser ventajosos debido al dominio de alelos heterocigotos sobre homocigotos en el fenotipo de la primera generación (Sánchez *et al.* 2009). Además, Miyabayashi *et al.* (2007) afirma que la citometría de flujo permite determinar cuantitativamente el tamaño del genoma de los organismos, por lo que con esta investigación se espera confirmar molecularmente la naturaleza híbrida de las plantas *O. glumaepatula*- *O. grandiglumis* con un tamaño de genoma intermedio entre ambos progenitores.

5. Objetivo general

Estudiar el proceso de hibridación interespecífica de la especie silvestre de arroz *O. glumaepatula* con *Oryza sativa* y *Oryza grandiglumis* mediante análisis morfológico, molecular y de citometría de flujo.

5.1. Objetivos específicos

Establecer la capacidad de hibridación y el posible efecto materno sobre las plantas híbridas producto del cruce entre el arroz silvestre (*O. glumaepatula*) y el arroz cultivado (*O. sativa*).

Comparar la morfología y desarrollo de los híbridos *glumaepatula-sativa*, *sativa-glumaepatula*, retrocruces y parentales.

Caracterizar posibles híbridos naturales entre las especies *O. glumaepatua* y *O. grandiglumis* presentes en Costa Rica mediante citometría de flujo.

6. Materiales y Métodos

Material vegetal: Se realizaron giras a la península de Santa Elena, Guanacaste (10°57'03.2" N / 85°36'59.5" W) y al río Medio Queso en Los Chiles de Alajuela (11°01'34.1" N / 84°40'42.8" W) para recolectar plantas en floración y semillas de *O. glumaepatula* ubicadas en áreas identificadas por Zamora *et al.* (2003). Estas plantas se sembraron en el invernadero del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.

6.1. Cruces interespecíficos artificiales entre *O. glumaepatula* y *O. sativa*

Los cruces se realizaron en el invernadero antes mencionado, bajo las siguientes condiciones: iluminación diaria con techo de lámina transparente y con extractores de aire que produjeron una humedad promedio de 56.6% y una temperatura promedio de 32°C. Para estos cruces se utilizaron la especie silvestre *O. glumaepatula*, y las variedades comerciales CFX-18 y Puita Inta. Estas variedades han sido comercializadas en Costa Rica desde el 2005 y presentan resistencia a herbicidas del grupo de las imidazolinonas.

Según la cantidad de plantas con las que se contaba, se realizaron 40 cruces de 2 repeticiones cada uno, en donde la especie *O. glumaepatula* fue la planta receptora de polen y las variedades cultivadas, tanto Puita Inta como CFX-18 fueron las donadoras de polen. Además, se realizaron 20 cruces recíprocos con 2 repeticiones cada uno, en donde las variedades comerciales fueron las receptoras del polen de *O. glumaepatula*. Este proceso de cruzamiento entre especies se llevó a cabo durante los meses de octubre y noviembre ya que es el período en el cual las plantas de *O. glumaepatula* florecen. Los cruces se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sarkarung (1991), manteniendo a las plantas con panículas emasculadas en macetas y con otras modificaciones que se describen a continuación.

Inicialmente las plantas receptoras de polen se emascularon. En la fase de floración temprana se cortó la parte superior de las espiguillas con tijeras pequeñas y se extrajo cada una de las anteras con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío marca GAST (0823-101Q—G608NGX). Al día siguiente de la emasculación la planta fue polinizada manualmente, según el tipo de cruce requerido. Este procedimiento se realizó entre las 12.00md y la 1.00pm, ya que se determinó que es la hora en que estas especies liberan mayor cantidad de polen (Akimoto, 1998). Luego de realizar la polinización se embolsaron cada una de las panículas de la planta, esto para evitar que fuera polinizada por otra planta. Posteriormente, se cosechó la semilla obtenida entre los 15 y 22 días después de la polinización. Las semillas fueron sembradas para evaluar morfológicamente las plantas y confirmar su naturaleza híbrida.

6.1.1. Evaluación morfológica de las plantas

Una vez obtenidas las semillas de los cruces interespecíficos, se procedió a la germinación de las mismas, al igual que las semillas de sus progenitores, a saber las variedades cultivadas: P. Inta y CFX-18 y la especie silvestre: *Oryza glumaepatula*. Esta germinación se realizó en condiciones *in vitro* para mantener las mismas condiciones de todas las plantas durante el experimento, como se describe a continuación.

Se desinfectaron las semillas con dos inmersiones sucesivas en 10 ml de hipoclorito de sodio 3.0 % (Clorox Los Conejos) con dos gotas de Tween en agitación por 20 minutos con 3 y 5 lavados con agua destilada estéril después de cada inmersión, respectivamente. Las semillas se cultivaron en un medio de cultivo de sales MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con Sacarosa a una concentración de 30 g/L y carbón activado a una concentración de 2g/L, se estabilizó la acidez del medio a un pH de 5.8. Una vez que las plántulas desarrollaron al menos dos hojas (entre 1 ó 2 semanas luego de la germinación),

estas se transplantaron a potes de 20 cm de alto y 18 cm de ancho, rellenos con al menos $\frac{3}{4}$ partes de sustrato compuesto de suelo y fibra de coco en una proporción 3:1.

Una vez trasplantadas, todas las plantas (*O. glumaepatula*, variedades comerciales e híbridos) se evaluaron morfológicamente cada 15 días hasta el período de floración. Para los individuos de la especie silvestre *O. glumaepatula* cuya floración es anual, la evaluación se realizó también en función del tiempo de floración de los híbridos, con el objetivo de mantener consistencia en los datos, para el posterior análisis estadístico de los resultados.

Los descriptores morfológicos evaluados en esta investigación para el crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas se eligieron según los valores significativos de los coeficientes de correlación en el análisis de componentes principales y su matriz de correlación realizada por Arrieta *et al* (2005). Dichos caracteres fueron: Altura del eje principal (cm), número de hojas del eje principal de la planta, número de brotes por planta, número de panículas por planta, número de granos por panícula y longitud de la hoja bandera (cm). Además se evaluó la longitud de la lígula, por ser un carácter utilizado para identificar individuos de la especie *O. glumaepatula*.

6.1.2. Confirmación molecular de la naturaleza híbrida de las plantas

Se recolectaron muestras foliares de aproximadamente 40 gramos, de las posibles plantas híbridas obtenidas y sus parentales (Puita Inta, CFX-18 y *O. glumaepatula*) para la extracción de ADN, proceso que se realizó mediante el protocolo de Lodhi *et al.* (1994). La calidad del ADN extraído se verificó en un gel de agarosa al 0.8%, como se describe posteriormente.

La característica de resistencia al herbicida en las variedades comerciales se utilizó para determinar la naturaleza híbrida de las plantas obtenidas en los cruces. Para ello, se utilizaron imprimadores que permiten detectar las mutaciones alélicas en el gen ALS y que confieren la resistencia al herbicida imidazolinona (Shimizu *et al.*, 2011) en las variedades Puita Inta y CFX-18 de acuerdo con la metodología descrita por Roso *et al.* (2010) y por Kadaru *et al.* (2008) respectivamente. Se empleó la técnica molecular de PCR-ASO (Cadena de Reacción de la Polimerasa Oligonucleótido Alelo Específica) para detectar la presencia o ausencia del alelo mutado en los posibles híbridos y los parentales. Este proceso se realizó de la siguiente manera:

Se usó el programa base descrito por Roso *et al.* (2010) para detectar la mutación en el gen ALS en la posición A₁₂₂T en Puita Inta y se modificó la técnica de PCR aplicando Touchdown, esto para obtener amplificaciones más específicas. Para ello, se incrementó en siete grados la temperatura de alineamiento en el primer ciclo de la reacción de PCR y luego se disminuyó en 1 grado en cada ciclo hasta llegar a la temperatura de anillamiento de los imprimadores.

El programa de la reacción se resume a continuación: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, seguido de 7 ciclos de 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 62 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto (bajando un grado cada ciclo la temperatura de alineamiento hasta 55 °C), 25 ciclos adicionales de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minutos 30 segundos, finalizando con una incubación de 10 min a 72 °C.

Además, se modificó el imprimador reverse para así poder amplificar el fragmento que contendría el alelo sin mutar en el gen ALS y que confiere susceptibilidad al herbicida, esto se hizo cambiando un nucleótido en la penúltima posición del extremo 3'.

Para la variedad resistente se utilizaron los siguientes imprimadores:

Forward: 5'-CCAAGACCGGCCGTAAGAAC-3', Reverse: 5'-TGGTGGATCTCCATGGAGGT-3'

Mientras que para las plantas susceptibles se utilizaron los siguientes:

Forward: 5'-CCAAGACCGGCCGTAAGAAC-3', Reverse: 5'-TGGTGGATCTCCATGGAGGC-3'.

Por otro lado, se utilizó el programa para realizar PCR descrito por Kadaru *et al.* (2008) y amplificar la mutación en el gen ALS de la variedad resistente CFX-18 y que se encuentra en la posición S₆₅₃D. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 95 °C por 3 minutos, 27 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 61 °C y 30 segundos a 72 °C y una incubación final de 5 minutos a 72 °C.

Para la variedad resistente se utilizaron los siguientes imprimadores:

Forward: 5'-GTGCTGCCTATGATCCCAAA-3', Reverse: 5'-TGGGTCATTCAGGTCAAACA-3'.

Mientras que para las plantas susceptibles se utilizaron los siguientes

Forward: 5'-GTGCTGCCTATGATCCCAAG-3', Reverse: 5'-TGGGTCATTCAGGTCAAACA-3'.

Para las reacciones de amplificación se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos: 2µL de Taq Buffer, 0.4 µL de dNTPs (10mM), 1 µL de primer forward (10 µM), 1 µL de primer reverse (10 µM), 1.2 µL de MgCl₂ (25 mM). 0.25 µL de Taq Polimerasa (10X KCl), 8.02 µL de H₂O desionizada estéril y 4 µL de ADN. Además, se incluyeron 0.8 µL de BSA (Albúmina Sérica Bovina), para captar iones e inhibidores de la Taq Polimerasa, incrementando la eficiencia del PCR y 1.33 µL de DMSO (Dimetil Sulfóxido) para mejorar las amplificaciones de secuencias ricas en GC. (Casa comercial Fermentas Thermo Scientific). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo Professional basic, marca Biometra.

Se determinó la calidad del ADN genómico extraído de las plantas y de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de Agarosa al 1% y 2% en buffer TAE (Tris-acetate-EDTA) en condiciones corrida a voltaje constante de 100

y 85 Voltios durante 1 hora y 1.5 horas respectivamente (Cámaras de electroforesis horizontal). El ADN fue colocado en los pozos del gel de agarosa en una proporción 1:10 y 5:1 respectivamente (μL de ADN: μL de buffer carga, azul de bromotimol y glicerol). Además, se utilizó un marcador molecular de 1Kb (Fermentas Thermo Scientific) de una concentración de 0.1 mg de ADN/ μL .

Se tiñeron los geles mediante la inmersión en una solución de bromuro de etidio durante 15 minutos y lavados con agua destilada durante 5 minutos en un agitador horizontal. El ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta Uvitec BXT—26M y se tomaron fotografías con cámara digital las cuales se procesaron posteriormente utilizando en programa Adobe Photoshop CS5 (2012).

6.1.3. Análisis estadístico para determinar la hibridación de caracteres en función de la madre del híbrido

Se compararon los promedios de las variables morfológicas en los híbridos en los cuales *O. glumaepatula* fue la madre con aquellos en los que fue el padre. Este análisis se realizó mediante una prueba t-student usando Microsoft Excel 2007 con el objetivo de determinar diferencias significativas entre los híbridos para cada uno de los caracteres evaluados. En los rasgos donde no se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de híbridos ($P > 0.05$), se utilizaron los datos juntos como un único híbrido para aumentar el tamaño de muestra. En aquellos casos en los que se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.05$), los datos se analizaron de forma separada.

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con cada uno de los descriptores morfológicos evaluados en las plantas utilizando el programa JMP 2007, para comparar los híbridos con respecto a sus progenitores. El descriptor morfológico se utilizó como la variable dependiente y cada medida se clasificó en alguna de

los siguientes categorías como los niveles de la variable independiente: híbridos (separados de acuerdo a la dirección del cruce), especie silvestre *O. glumaepatula* o las dos variedades de arroz cultivado (*O. sativa*): CFX-18 y Puita Inta.

Además, en el caso de los conteos al ser datos discretos estos se transformaron con raíz cuadrada para homogenizar varianzas y en cada ANDEVA se analizaron los residuos para determinar su normalidad. En aquellos casos en donde el número de híbridos obtenidos fue bajo, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar la confiabilidad de los resultados del ANDEVA. Se determinó que si las diferencias encontradas en ambas pruebas no coinciden se debió usar los resultados de Kruskal-Wallis. Por otro lado, si las diferencias estadísticas coinciden se utilizaron los resultados del ANDEVA, ya que este permite realizar un Análisis de Contrastes entre categorías.

Finalmente, se realizó una comparación mediante un Análisis de Contrastes (utilizando el programa JMP 2007), para determinar similitud morfológica del híbrido con sus progenitores: la especie silvestre *O. glumaepatula* y con las variedades comerciales (P. Inta y CFX-18). Se realizó este análisis ya que es un método robusto posterior al ANDEVA que permite comparaciones entre grupos de medias cuando se tiene un criterio que permite separar los tratamientos en grupos lógicos (Zar, 1999).

6.2. Determinación del contenido de ADN de las plantas identificadas como híbridos producto del cruce entre *O. glumeapatula* y *O. grandiglumis* mediante Citometría de Flujo

Se analizó el contenido de ADN nuclear de 106 muestras de tejido foliar de plantas del género *Oryza*: *O. glumeapatula*, *O. grandiglumis* e híbridos entre estas especies descritos por Zamora et al. (2003). Este análisis se llevó a cabo siguiendo el protocolo de un solo paso descrito por Dolezel *et al.* (2007), en donde mediante el uso de Yoduro de Propidio (PI), se tiñe el ADN de los núcleos celulares de las plantas para luego realizar una cuantificación de la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN por núcleo. Para este proceso, los núcleos fueron extraídos de cada muestra de tejido foliar de las plantas. En este caso, debido a la rigidez de la pared celular, dichos tejidos debieron ser picados sobre hielo en una placa petri, con un bisturí número 4 y sumergidos en un buffer de extracción que se describirá más adelante.

Además, para realizar las mediciones de fluorescencia se utilizó un citómetro de flujo modelo FACSCalibur que se encuentra ubicado en el Laboratorio de Estudios Especializados y de Investigación del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica, el cual mide la intensidad de fluorescencia del PI asociado al ADN, y que tiene una longitud de onda de entre 515 y 545 nm. La excitación del fluorocromo se hizo mediante un láser de argón con una longitud de onda de 488nm. Además, se realizaron algunas modificaciones a dicho protocolo, que fueron establecidas durante el proceso de optimización del método para trabajar con estas especies, las cuales se describen a continuación.

Inicialmente, se evaluaron dos tipos de buffer de extracción para maximizar la cantidad de núcleos celulares extraídos: 1) Buffer TRIS-MgCl₂ compuesto por 200mM de TRIS (tris-hidroximetil-aminometano ó (HOCH₂)₃CNH₂, 4 mM de MgCl₂·6H₂O, 0.5% (vol/vol) de Triton X-100, y pH de 7.0 ajustado con HCl 1M,

filtrado a través de un filtro de 0.22 μm y guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 2) Buffer Galbraith compuesto por 45mM de MgCl_2 , 20 mM de MOPS (Acido 3-(n-Morfolino)-Propanosulfónico), 30 mM de citrato de Sodio, 0.1% (vol/vol) de Triton X-100, con pH de 7.0 ajustado con NaOH 1M, filtrado a través de un filtro de 0.22 μm y guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 10 ml.

Asimismo, se evaluaron diferentes cantidades de tejido foliar fresco de las plantas del género *Oryza* y los híbridos durante las primeras mediciones para establecer la cantidad que permitía obtener el mayor número de núcleos celulares por muestra y un pico de fluorescencia mejor definido. Es decir; que en el canal de intensidad de fluorescencia correspondiente a los núcleos de la planta no se observe ninguna interferencia por la fluorescencia correspondiente a otra molécula, desechos o residuos celulares en el resultado. Las cantidades que se evaluaron fueron: 10mg, 20mg y 30 mg.

Durante este experimento, el buffer de extracción se preparó el día antes de la medición. Las muestras foliares frescas luego de ser picadas para la extracción de los núcleos celulares, fueron filtradas en alícuotas de 1 ml mediante un filtro de nylon de 0.22 μm . Luego de la filtración, se midió el volumen total obtenido de la alícuota y en base a esto, se le agregó una solución de PI a una concentración de 1 mg/mL, para teñir el ADN de los núcleos celulares, hasta obtener una concentración final en la suspensión de 50 μg /mL. De la misma manera en base al volumen total obtenido de la alícuota, se le agregó una solución de ARNasa a una concentración de 1 mg/mL, hasta obtener una concentración final en la suspensión 20 μg /mL, esto para descartar interferencias por tinciones de ARNs.

Por otro lado, en esta investigación se utilizó tejido foliar fresco de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en cada sesión de medición, como control de calidad para la preparación de la muestra y de desempeño correcto de los ajustes y parámetros del citómetro. En este caso, se evaluó para el control en cada medición, el coeficiente de

variación del pico de fluorescencia de la población G0/G1, como medida de precisión del equipo, con un valor aceptable menor o igual al 5%. Ello para evitar mediciones basadas en datos con una variabilidad alta y obtener la razón del canal de fluorescencia para el pico G2/M vs. G0/G1 en $2\pm 5\%$, como una medida aceptable de la respuesta lineal del instrumento a la fluorescencia.

Se eligió *P. vulgaris* debido a que de acuerdo a resultados obtenidos en investigaciones anteriores los análisis con tejido de plantas de esta especie presentan baja cantidad de residuos o desechos celulares y una cantidad de núcleos considerable, con picos de intensidad fluorescencia bien definidos (Ochatt, 2006). Por otro lado, además de la muestra de *P. vulgaris*, se utilizó como estándar interno una muestra extra de una especie del género *Oryza* cuya cantidad de ADN es conocida: *O. grandiglumis*, la cual presenta 1.0 pg de ADN/núcleo, según la base de datos de Bennett y Leitch (2012), esto para determinar el contenido de ADN por núcleo de los híbridos según los resultados del citómetro de flujo.

Para establecer la cantidad de ADN por núcleo en las plantas híbridas, se trabajó con mezclas de muestras de tejido vegetal de los mismos junto a muestras de la especie estándar *O. grandiglumis*. Para esto se mezclaron muestras de tejido foliar de la planta de referencia y de la planta híbrida por analizar, y se procesó la mezcla como se detalló anteriormente. Se analizaron diferentes proporciones de mezcla tejido híbrido: tejido *O. grandiglumis*, respectivamente se evaluaron: 10mg: 20mg, 15mg: 15mg y 20mg: 10mg, esto para determinar la proporción en la cual se obtiene mayor cantidad de núcleos celulares por muestra y picos de intensidad de fluorescencia mejor definidos y de tamaño similar para ambas especies, sin desechos o residuos celulares que interfieran en los resultados.

Una vez obtenidas las condiciones experimentales con las que se obtuvieron mejores resultados de acuerdo a las evaluaciones anteriores, para realizar la

medición de cantidad de núcleos se programó el citómetro de manera que la suspensión de la muestra fluyera a baja velocidad hasta adquirir al menos 400 eventos o núcleos celulares en el histograma que el citómetro presenta como resultado (intensidad fluorescencia del PI vs. cantidad de núcleos). Se utilizó el software CellQuest para la adquisición de datos en el citómetro de flujo y se ajustó la respuesta del fotomultiplicador de manera que el pico principal de la muestra a medir se adquiriera en el canal 200 de fluorescencia en el histograma para la intensidad de la fluorescencia de PI.

Un gráfico adicional que presenta la difracción frontal del láser versus la difracción lateral se utilizó para separar las señales específicas de los núcleos de interés de los fragmentos o residuos celulares. Además, la escala del eje Y en el histograma de conteo de núcleos se ajustó automáticamente de acuerdo a las cantidades obtenidas en cada medición (ver Anexos: Protocolo estandarizado: Citometría de flujo en Arroz).

Finalmente, la cantidad de ADN por núcleo de las muestras analizadas se calculó utilizando los datos del canal de intensidad de fluorescencia de los núcleos celulares para la especie *O. grandiglumis* y el determinado para los híbridos *O.glumaepatula-O.grandiglumis*. Se realizaron 3 repeticiones de medición de núcleos para cada uno de los individuos, esto con el objetivo de calcular la Moda (M_o) y el Rango (R) como una medida de dispersión de los datos mediante Microsoft Excel 2007. Dado que el contenido de ADN por núcleo de *O. grandiglumis* es conocido, este fue utilizado como un estándar en la estimación para los híbridos en estudio, como describe a continuación:

Picogramos (pg) de ADN/núcleo celular en el híbrido (*O.glumaepatula-O. grandiglumis*) =

$$\frac{\left[\begin{array}{c} \text{Canal de intensidad de fluorescencia del híbrido} \\ \text{(O.glumaepatula-O.grandiglumis)} \end{array} \right] \times \left[\begin{array}{c} \text{Picogramos de ADN/ núcleo celular en} \\ \text{O.grandiglumis (1.0 pg)} \end{array} \right]}{\left[\begin{array}{c} \text{Canal de intensidad de fluorescencia de O. grandiglumis} \end{array} \right]}$$

7. Resultados

7.1. Cruzamientos interespecíficos artificiales entre *O. glumaepatula* y *O. sativa*

De los 120 cruces realizados, 108 sobrevivieron al proceso de cultivo *in vitro*, trasplante y crecimiento en invernadero. Específicamente se obtuvieron 68 híbridos a partir de los cruces entre *O. glumaepatula* y Puita Inta, en donde *O. glumaepatula* fue la aceptora de polen y 21 híbridos de los cruces recíprocos entre estas plantas. Además, se obtuvieron únicamente 4 híbridos a partir de los cruces entre las especies *O. glumaepatula* y CFX-18, en donde *O. glumaepatula* fue la receptora de polen y 15 híbridos de los cruces recíprocos entre estas plantas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cantidad total de cruces realizados y cantidad final de híbridos obtenidos según el tipo de cruce entre *O. glumaepatula* y las variedades cultivadas.

Tipo de cruce	Cantidad de cruces realizados	Cantidad final de híbridos obtenidos
<i>O. glumaepatula</i> x P. Inta	80	68
P. Inta x <i>O. glumaepatula</i>	40	21
<i>O. glumaepatula</i> x CFX-18	80	4
CFX-18 x <i>O. glumaepatula</i>	40	15

7.2. Confirmación molecular de la naturaleza híbrida de las plantas:

La calidad del ADN extraído para cada una de las muestras de los posibles híbridos obtenidos y de las especies parentales fue adecuada y sin degradación. En la figura 1, se observan en un gel de agarosa al 1% bandas definidas y de alto peso molecular del ADN total extraído de algunas de las diferentes muestras analizadas.

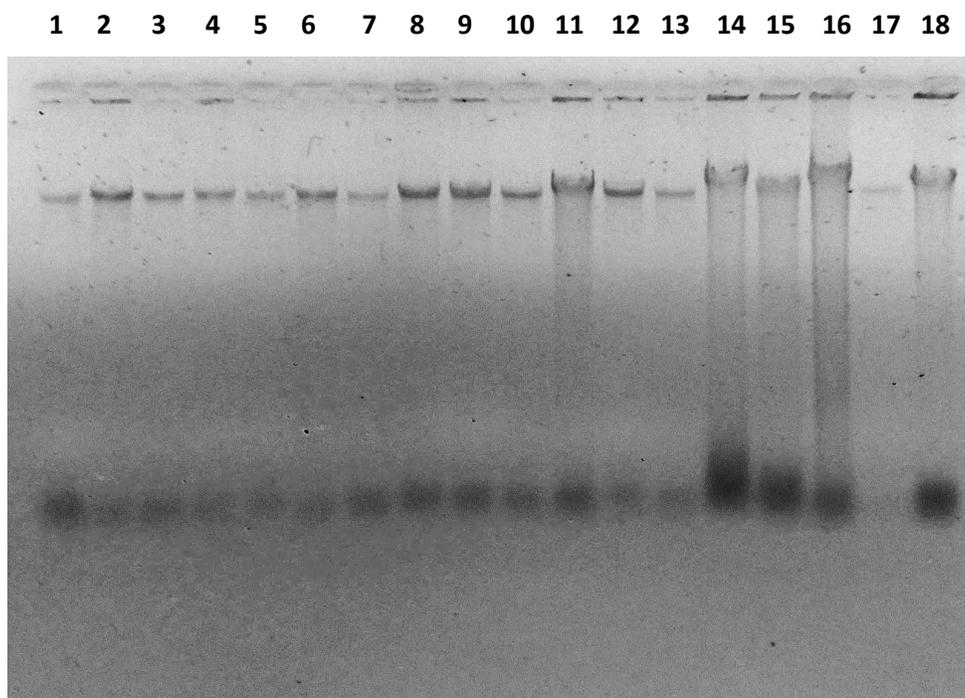


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio para comprobar la calidad de un extracto de ADN total extraído de las siguientes muestras: *O. glumaepatula* x CFX-18 (1-2), CFX-18 x *O. glumaepatula* (3-10), P. Inta x *O. glumaepatula* (11-15), *O. glumaepatula* x P.Inta (16-18).

Por otro lado, en las figuras 2 y 3 se presentan ejemplos de los geles de agarosa al 2% en donde se muestran los productos de amplificación de PCR utilizando imprimadores alelo específicos para detectar la mutación en el gen ALS, que confiere resistencia a herbicidas del grupo de las imidazolinonas en las variedades cultivadas Puita Inta y CFX-18.

Específicamente en la figura 2 se observa los productos de amplificación de las muestras de las posibles plantas híbridas a partir del cruce P.Inta x *O. glumaepatula*, en los carriles 3 a 12. Estas plantas tienen una banda de 250 pb similar a la del control positivo de la variedad P.Inta en el carril 2 y que está ausente los controles negativos *O. glumaepatula* y agua carriles 14 y 15 respectivamente. Asimismo, se observa que existen 2 muestras (carriles 7 y 8) que no amplificaron el producto esperado y no presentan la banda descrita anteriormente. Por lo que estas plantas no se consideran como híbridas para el posterior análisis estadístico. En los carriles del 17 al 20 se presenta la amplificación de las muestras a partir de las plantas producto del cruce *O. glumaepatula* x P. Inta, en este caso todas las muestras evaluadas presentaron dicha banda. En el carril 16 no se montó ninguna muestra con el objetivo de separar los tipos de cruce en el gel.

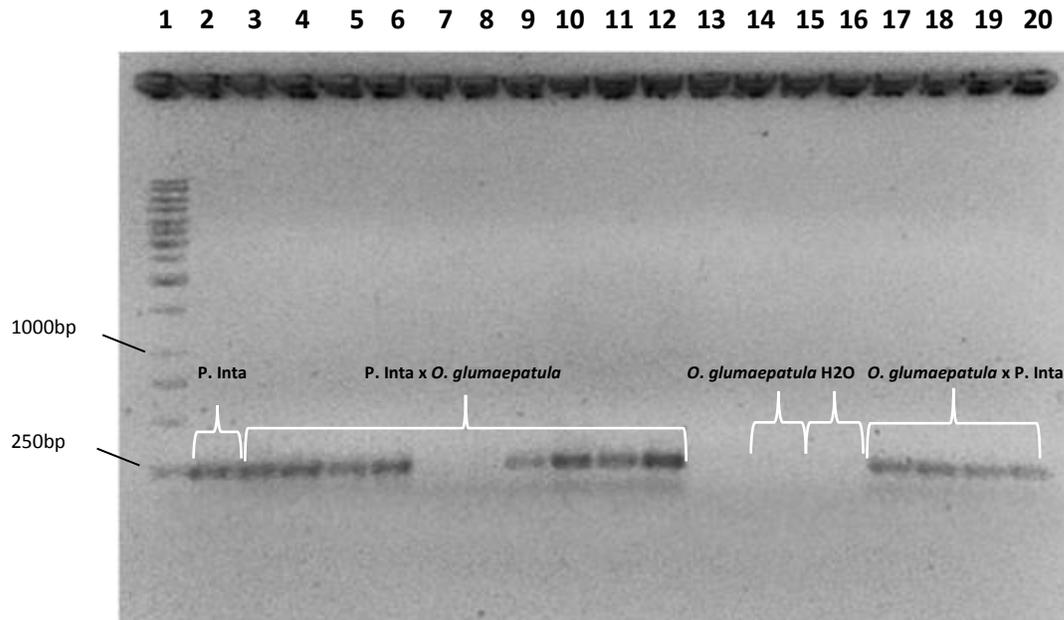


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa (2%) teñidos con bromuro de etidio para detectar las bandas de los alelos del gen ALS en la posición A₁₂₂T para P. Inta (2), híbridos P.Inta x *O. glumaepatula* (3-12) y *O. glumaepatula* x P. Inta (17-20). Se indica el fragmento de control interno de las PCRs: alelo normal o silvestre *O. glumaepatula* (14) y H₂O (15).

Por otro lado, en la figura 3 se observa la amplificación de las bandas que establecen la mutación en el gen ALS para las posibles plantas híbridas producto del cruce entre *O. glumaepatula* x CFX-18 en los carriles 3 y 4, mientras que en los carriles del 8 al 17 se presenta dicha amplificación para los híbridos producto del cruce CFX-18 x *O. glumaepatula*. En este caso, las muestras en los carriles 5, 6 y 7 presentaron una amplificación inespecífica de dicha banda, esto debido a la baja intensidad de las mismas, por lo que las plantas de donde se extrajeron estas muestras tampoco se consideraron híbridas para el posterior análisis estadístico. Además, se indica el fragmento de control interno de las PCRs alelo normal (*O. glumaepatula*) en el carril 19 y el control negativo (H₂O) en el carril 20.

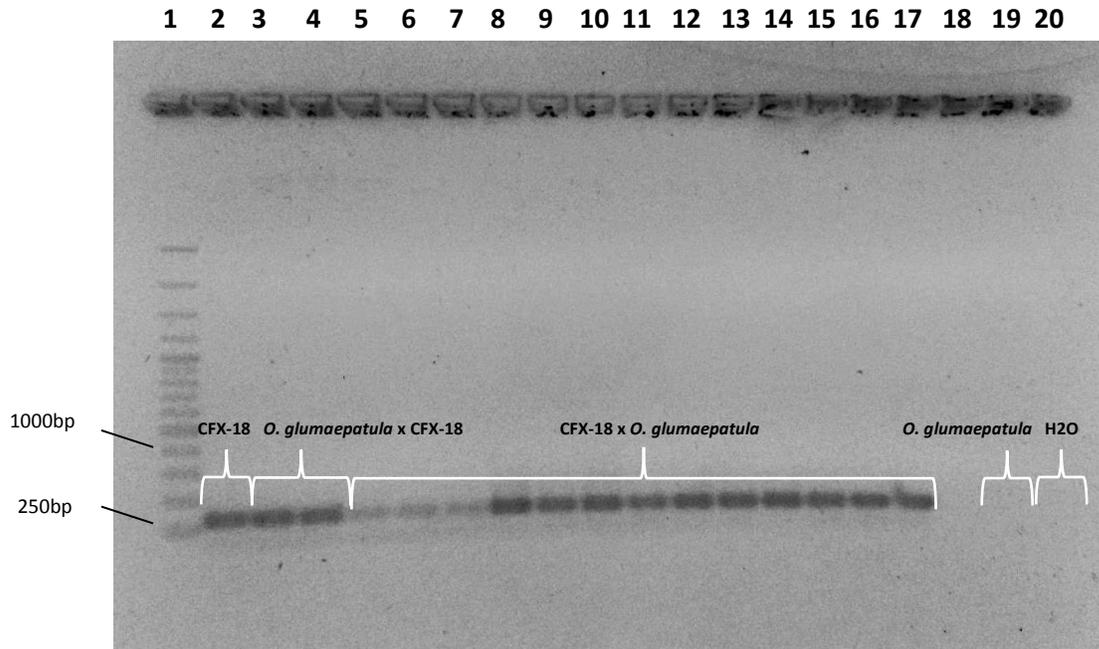


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio para detectar las bandas de los alelos del gen ALS en la posición S₆₃₅D para CFX-18 (2), híbridos *O. glumaepatula* x CFX-18 (3-4) y CFX-18 x *O. glumaepatula* (5-17). Se indica el fragmento de control interno de las PCRs: alelo normal o silvestre *O. glumaepatula* (19) y H₂O (20).

Con base en los resultados obtenidos en la amplificación de los productos de PCR de 250 pb que identifica la presencia de la mutación del gen ALS se obtuvieron 65 híbridos producto del cruce *O. glumaepatula* x Puita Inta, 19 híbridos productos del cruce Puita Inta x *O. glumaepatula*, 4 híbridos producto del cruce CFX-18 x *O. glumaepatula* y 12 híbridos de los cruces recíprocos entre estas plantas.

7.3. Evaluación morfológica de las plantas

Independientemente de la dirección del cruce realizado, todas las plantas híbridas obtenidas presentaron esterilidad durante el período reproductivo (ausencia de anteras en espiguillas). Además, el período de floración en los híbridos fue similar al de las variedades comerciales P. Inta y CFX-18: 90 días después de la germinación (± 5 días).

Una vez establecida la naturaleza híbrida de los individuos, se compararon los datos de los rasgos morfológicos para los individuos dependiendo de la dirección mediante el análisis estadístico de la prueba t-student. Al comparar las variables evaluadas en los híbridos entre *O. glumaepatula* y P. Inta, se determinó que para el número de hojas, la altura, el número de panícula, ramificaciones por panícula y longitud de la lígula se evidencian diferencias significativas en estas características dependiendo de la dirección del cruce *O. glumaepatula* x Puita Inta y Puita Inta x *O. glumeapatula* (Cuadro 2). Por lo tanto, para efecto de análisis posteriores se consideraron como dos grupos de híbridos distintos.

Por otro lado, mediante la misma prueba t-student, se determinó que no existe una diferencia significativa entre los híbridos en cuanto a la dirección del cruce *O. glumaepatula* x CFX-18 y CFX-18 x *O. glumeapatula*. Por lo tanto, los datos se analizaron como un único híbrido: CFX-18 x *O. glumaepatula* (cuadro 3). En la figura 4 se presentan imágenes a medida de ejemplo de las plantas en invernadero con las que se trabajó en esta investigación y con las que se obtuvieron los resultados antes mencionados.

Cuadro 2. Valores de P según la prueba t-student para la comparación de medias de los descriptores evaluados en los híbridos *O.glumaepatula* x Puita Inta y Puita Inta x *O.glumaepatula*.

Descriptor Morfológico	Valor de P
Núm. de hojas	0.044*
Altura (cm)	0.001*
Núm. de brotes	0.122
Núm. de Panículas	0.018*
Longitud de Panícula (cm)	0.145
Núm. de Ramificaciones	0.024*
Núm. de Granos	0.351
Longitud de Hoja Bandera (cm)	0.088
Ancho de Hoja bandera (cm)	0.056*
Longitud de la Lígula (cm)	0.031*

*P<0.05

Cuadro 3. Valores de P para los descriptores morfológicos evaluados según la prueba t-student realizada para los híbridos: *O.glumaepatula* x CFX-18 y CFX-18 x *O.glumaepatula*.

Descriptor Morfológico	Valor de P
Núm. de hojas	0.297
Altura (cm)	0.215
Núm. de brotes	0.276
Núm. de Panículas	0.449
Longitud de Panícula (cm)	0.494
Núm. de Ramificaciones	0.322
Núm. de Granos	0.107
Longitud de Hoja Bandera (cm)	0.064
Ancho de Hoja bandera (cm)	0.244
Longitud de la Lígula (cm)	0.213

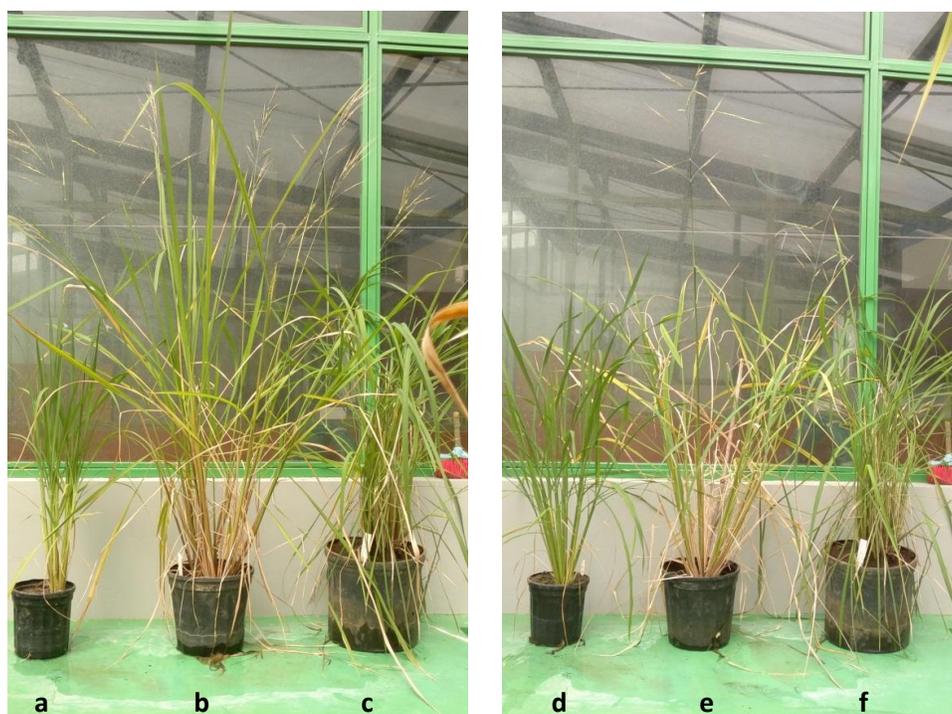


Figura. 4. Muestra de plantas en invernadero evaluadas en el experimento: (a) Puita Inta, (b) híbrido *O. glumaepatula* x Puita Inta, (c) *O. glumeapatula*, (d) CFX-18, (e) híbrido *O. glumaepatula* x CFX-18 y (f) *O. glumeapatula*.

En el cuadro 4 se muestra el valor promedio obtenido a los 90 días para cada carácter morfológico evaluado en los híbridos comparado con los promedio de las líneas parentales: *O. glumaepatula* y P. Inta. En dicho cuadro se puede observar además la desviación estándar como un parámetro de dispersión de los datos. Para efectos de esta investigación, el valor promedio se presenta como un “tipo” de “índice de hibridación” donde el valor del híbrido se puede comparar con los valores promedio de las líneas parentales.

Cuadro 4. Valores promedio y desviaciones estándar de las características morfológicas evaluados a los 90 días para *O. glumapatula*, Puita Inta y sus respectivos híbridos: *O.glumaepatula* x Puita Inta y Puita Inta x *O. glumaepatula*.

	<i>O. glumaepatula</i>	Puita Inta	<i>O.glumaepatula</i> xP.Inta	P.Intax <i>O.glumaepatula</i>
Núm. de Hojas	4.41 (±2.06)	4.16 (±2.24)	4.64 (±1.54)	4.43 (±1.91)
Altura (cm)	121.65 (±12.30)	89.89 (±18.24)	129.96 (±33.20)	120.09 (±17.64)
Núm. de Brotes	9.77 (±6.97)	8.18 (±5.31)	11.30 (±4.73)	9.76 (±1.79)
Núm. de Panículas	4.30 (±1.63)	7.21 (±3.69)	6.42 (±2.76)	5.20 (±2.59)
Longitud Panícula (cm)	27.40 (±3.53)	21.86 (±1.74)	31.85 (±3.99)	32.58 (±1.88)
Núm. de Ramificaciones	10.50 (±1.88)	12.89 (±2.54)	12.32 (±2.32)	10.00 (±1.00)
Núm. de Granos	70.70 (±14.16)	74.89 (±12.66)	74.54 (±18.19)	73.40 (±14.99)
Longitud H. Bandera (cm)	23.21 (±5.30)	37.56 (±5.21)	36.12 (±8.56)	38.80 (±17.07)
Ancho H. Bandera (cm)	1.13 (±0.17)	1.53 (±0.16)	1.37 (±0.20)	1.40 (±0.16)
Longitud de la lígula (cm)	4.20 (±0.46)	2.00 (±0.46)	4.42 (±0.61)	3.83 (±0.82)

La evaluación morfológica de los materiales evidencia que el híbrido *O.glumeapatula*-P. Inta, obtenido a partir del cruce en donde el aceptor de polen fue *O. glumaepatula*, presentó los valores promedio más altos en número de hojas en el eje central (4.64), altura (129.96 cm) y longitud de la lígula (4.42 cm). En comparación con los parentales.

Se observa además que la variedad comercial P. Inta presenta el mayor valor promedio de número de panículas con 7.21 y ramificaciones por panícula con 12.8, mientras que la especie silvestre *O. glumaepatula* presenta el menor número con 4.30. El híbrido P. Inta-*O. glumaepatula*, a partir del cruce en donde el aceptor de polen fue P. Inta, presentó la menor cantidad de ramificaciones por panícula con un promedio de 10.

Por otro lado, en el cuadro 5 se muestra el valor promedio obtenido a los 90 días para cada carácter morfológico evaluado en las plantas de la especie *O. glumaepatula*, la variedad comercial CFX-18 y los híbridos producto del cruce entre estos, con sus respectivas desviaciones estándar.

Cuadro 5. Valores promedio y desviaciones estándar de las características morfológicas evaluadas a los 90 días para CFX-18, *O. glumaepatula* y su respectivo híbrido CFX-18 x *O.glumaepatula*

	<i>O. glumaepatula</i>	CFX-18	CFX-18 x <i>O.glumaepatula</i>
Núm. de Hojas	4.41 (± 2.06)	5.60 (± 0.78)	5.00 (± 0.34)
Altura (cm)	121.65 (± 12.30)	98.46 (± 5.83)	134.13 (± 13)
Núm. de Brotes	9.77 (± 6.97)	5.29 (± 2.49)	8.75 (± 4.75)
Núm. de Panículas	4.30 (± 1.63)	5.54 (± 1.54)	6.50 (± 3.89)
Longitud Panícula (cm)	27.40 (± 3.53)	22.47 (± 2.80)	36.55 (± 0.88)
Núm. de Ramificaciones	10.50 (± 1.88)	13.11 (± 2.95)	13.00 (± 0.35)
Núm. de Granos	70.70 (± 14.16)	72.17 (± 9.15)	77.00 (± 7.78)
Longitud de la H. Bandera (cm)	23.21 (± 5.30)	36.92 (± 7.07)	39.65 (± 3.15)
Ancho de la H. Bandera (cm)	1.13 (± 0.17)	1.50 (± 0.18)	1.50 (± 0.04)
Longitud de la lígula (cm)	4.20 (± 0.46)	1.53 (± 0.37)	4.50 (± 0.95)

En dicho cuadro se observa que la variedad comercial CFX-18 presenta el mayor número de hojas promedio en el eje central con 5.60. Mientras que, el híbrido CFX-18 x *O.glumaepatula* presenta la mayor altura con un promedio de 134.13 cm, y el mayor número de panículas con un promedio de 6.50. El mayor número de brotes por planta por otro lado, lo presenta la especie silvestre *O. glumaepatula* con un promedio de 9.77.

También se muestra como el híbrido CFX-18 x *O.glumaepatula* presenta los mayores valores en longitud de la panícula (36.55 cm), cantidad de granos por panícula (77) y longitud de la hoja bandera (39.65 cm). Este caso la mayor cantidad de ramificaciones por panícula la presenta la variedad comercial CFX-18 con un promedio de 13.11, pero esta misma presenta la menor longitud de la lígula con un promedio de 1.53 cm.

Por otro lado, en el cuadro 6 se muestran los resultados del análisis de varianza (ANDEVA), en este caso se observa que los valores de P obtenidos para cada uno de los descriptores morfológicos evaluados son menores a 0.05, excepto para el carácter número de granos/espiguillas por panícula, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se confirma que existe una diferencia significativa entre las poblaciones de la especie silvestre *O. glumaepatula*, las variedades comerciales CFX-18 y Puita Inta y sus respectivos híbridos.

Cuadro 6. Análisis de varianza (g.l = 5/149) para los descriptores morfológicos evaluados en la especie silvestre *O. glumaepatula*, las variedades comerciales CFX-18 y Puita Inta y sus respectivos híbridos.

Carácter morfológico	Valor F	g.l	Valor P
Núm. de hojas	13.49	5/149	<0.0001*
Altura (cm)	32.11	5/149	<0.0001*
Núm. de brotes	3.44	5/149	0.0058*
Núm. de panículas	4.66	5/149	0.0005*
Longitud de la panícula (cm)	31.59	5/149	<0.0001*
Núm. de ramificaciones	3.67	5/149	0.0019*
Núm. de granos/panícula	0.67	5/149	0.6454
Longitud de la hoja bandera (cm)	9.88	5/149	<0.0001*
Ancho de la hoja bandera (cm)	11.18	5/149	<0.0001*
Longitud de la lígula (cm)	13.77	5/149	<0.0001*

*P<0.05

En Anexos se presentan las figuras de cajas que muestran los promedios y las varianzas de los valores obtenidos para los rasgos morfológicos evaluados en la especie silvestre *O. glumaepatula*, las variedades comerciales CFX-18 y Puita Inta y sus respectivos híbridos, esto según el ANDEVA. Además, en el caso de los híbridos CFX-18 x *O. glumaepatula*, donde el número de muestra fue bajo, los resultados en cuanto las diferencias encontradas según la prueba Kruskal-Wallis coincidieron con la prueba del ANDEVA.

Una vez rechazada la hipótesis nula, a partir del ANDEVA se realizó el Análisis de Contrastes para establecer específicamente entre cuales de estas poblaciones existen diferencias significativas de acuerdo al rasgo morfológico evaluado. Los valores promedio de los descriptores morfológicos evaluados a los 90 días se presentan en los cuadros 7, 8 y 9. En estos cuadros se exponen además los valores obtenidos del estadístico F según la distribución de probabilidad. Los datos identificados con un asterisco muestran los valores para los cuales se determinaron diferencias estadísticamente significativas.

En el cuadro 7, se puede observar que el híbrido *O.glumaepatula* x Puita Inta presenta diferencias significativas con la especie silvestre *O.glumaepatula* en cuanto a los caracteres número de hojas del eje central, número de ramificaciones por panícula y longitud de la hoja bandera, mientras que al comparar con la variedad comercial P. Inta se encontraron diferencias significativas en los caracteres altura, longitud de la panícula y longitud de la lígula. Para los demás caracteres no se establecieron diferencias significativas de acuerdo al análisis realizado.

Por otro lado, en el cuadro 8 se observa que según el análisis estadístico, el híbrido Puita Inta x *O.glumaepatula* presenta igualmente diferencias significativas con *O. glumaepatula* en los caracteres número de hojas y longitud de la hoja bandera, mientras que dicho híbrido presenta diferencias significativas con la variedad comercial P. Inta en los caracteres altura, número de brotes, número de panículas, longitud de la panícula y longitud de la lígula. Para los demás caracteres no se establecieron diferencias significativas de acuerdo al análisis realizado.

Finalmente, se establece en el cuadro 9 que el híbrido CFX-18 x *O.glumaepatula* presenta diferencias significativas con la especie silvestre *O.glumaepatula* en cuanto a los caracteres número de panículas por planta, longitud y ancho de la

hoja bandera, mientras que este mismo híbrido presenta diferencias significativas con la variedad comercial CFX-18 para los caracteres número de hojas en el eje central, altura, número de brotes, longitud de la panícula y de la lígula. Para los demás caracteres no se establecieron diferencias significativas de acuerdo al análisis realizado.

Cuadro 7. Valores promedio de los descriptores morfológicos evaluados a los 90 días y valores del estadístico F respecto al Análisis de Contrates entre híbrido *O.glumaepatula* x Puita Inta y sus progenitores

	<i>O.glumaepatula</i> xPuitaInta	<i>O. glumaepatula</i>	Valor F	Puita Inta	Valor F
Núm. de Hojas	4.64	4.41	8.44*	4.16	0.48
Altura (cm)	129.96	121.65	4.92	89.89	99.03*
Núm. de Brotes	11.30	9.77	1.79	8.18	4.16*
Núm. de Panículas	6.42	4.30	14.6	7.21	1.10
Longitud Panícula (cm)	31.85	27.40	18.87	21.86	77.84*
Núm. de Ramificaciones	12.32	10.50	10.76*	12.89	0.44
Núm. de Granos	74.54	70.70	0.88	74.89	0.0028
Longitud de la H. Bandera (cm)	36.12	23.21	41.93*	37.56	0.55
Ancho de la H. Bandera (cm)	1.37	1.13	26.08	1.53	10.88
Longitud de la lígula (cm)	4.42	4.20	0.35	2.00	34.07*

* P<0.05

Cuadro 8. Valores promedio de los descriptores morfológicos evaluados a los 90 días y valores del estadístico F respecto al Análisis de Contrates entre el híbrido Puita Inta x *O.glumaepatula* y sus progenitores

	PuitaIntax <i>O.glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i>	Valor F	Puita Inta	Valor F
Núm. de Hojas	4.43	4.41	13.66*	4.16	2.95
Altura (cm)	120.09	121.65	0.13	89.89	44.01*
Núm. de Brotes	9.76	9.77	0.12	8.18	1.06*
Núm. de Panículas	5.20	4.30	1.41	7.21	6.10*
Longitud Panícula (cm)	32.58	27.40	6.89	21.86	48.54*
Núm. de Ramificaciones	10.00	10.50	1.32	12.89	4.19
Núm. de Granos	73.40	70.70	0.11	74.89	0.21
Longitud de la H. Bandera (cm)	38.80	23.21	16.21*	37.56	3.38
Ancho de la H. Bandera (cm)	1.40	1.13	7.60	1.53	16.70
Longitud de la lígula (cm)	3.83	4.20	0.71	2.00	14.83*

* P<0.05

Cuadro 9. Valores promedio de los descriptores morfológicos evaluados a los 90 días y valores del estadístico F respecto al Análisis de Contrastes entre el híbrido CFX-18 x *O. glumaepatula* y sus progenitores

	CFX-18 x <i>O. glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i>	Valor F	CFX-18	Valor F
Núm. de Hojas	5.00	4.41	1.85	5.60	18.57*
Altura (cm)	134.13	121.65	2.01	98.46	41.85*
Núm. de Brotes	8.75	9.77	0.07	5.29	7.67*
Núm. de Panículas	6.50	4.30	0.52*	5.54	0.79
Longitud Panícula (cm)	36.55	27.40	25.60	22.47	71.77*
Núm. de Ramificaciones	13.00	10.50	1.29	13.11	3.92
Núm. de Granos	77.00	70.70	4.21	72.17	2.83
Longitud de la H. Bandera (cm)	39.65	23.21	12.45*	36.92	2.50
Ancho de la H. Bandera (cm)	1.50	1.13	32.59*	1.50	0.01
Longitud de la lígula (cm)	4.50	4.20	0.63	1.53	26.28*

* P<0.05

Mediante el Análisis de Contrastes, se determinó las variables morfológicas para las cuales los híbridos presentaron valores similares o no a alguno de sus parentales. Cabe señalar que, no se observó un resultado constante, es decir en un mismo híbrido algunos rasgos se parecen más al progenitor silvestre y otros a la variedad cultivada. Los resultados de este análisis se muestran en el cuadro 8.

En el caso en que difiriera de ambos, se consideró un carácter intermedio si el valor promedio del rasgo estaba entre los valores promedio obtenidos para cada uno de los parentales. Por el contrario, en aquellos casos donde el rasgo difirió de ambos pero el valor promedio fue mayor o menor al de líneas parentales, se denominó un rasgo debido a Heterosis.

Los resultados del cuadro 10 indican el progenitor al que se asemeja el híbrido para cada característica evaluada. En términos generales e independientemente del tipo o dirección del cruce a partir del cual se obtuvieron dichos híbridos, para los caracteres altura, longitud de la panícula y longitud de la lígula los híbridos fueron similares a los obtenidos para la especie silvestre *O. glumaepatula*. Por el contrario, la longitud de la hoja bandera siempre fue similar a las variedades comerciales.

Cuadro 10. Similitud de los híbridos con los parentales para cada uno de los caracteres morfológicos evaluados de acuerdo al Análisis de Contrastes

	<i>O. glumaepatula</i> xPuitaInta	PuitaIntax <i>O. glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i> xCFX-18
Número hojas del eje central	Puita Inta	Puita Inta	<i>O. glumaepatula</i>
Altura (cm)	<i>O. glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i>
Núm. Brotes	Intermedio	<i>O. glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i>
Núm. Panículas	Intermedio	<i>O. glumaepatula</i>	CFX-18
Longitud Panícula (cm)	<i>O. glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i>
Núm. Ramificaciones	Puita Inta	Heterosis	Intermedio
Núm. Granos	Intermedio	Intermedio	Heterosis
Longitud de la H. Bandera (cm)	Puita Inta	Puita Inta	CFX-18
Ancho de la H. Bandera (cm)	Intermedio	Intermedio	CFX-18
Longitud de la lígula (cm)	<i>O. glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i>	<i>O. glumaepatula</i>

Además, se determinó que el híbrido obtenido a partir del cruce en el que *O. glumaepatula* fue la aceptora de polen y P. Inta la donadora se asemeja en altura, número de brotes, longitud de la panícula y longitud de la lígulas a la planta madre *O. glumaepatula*. Mientras que, para los caracteres número de hojas del eje central, y de ramificaciones de la panícula así como longitud de la hoja bandera, fueron similares a los obtenidos en la variedad comercial P. Inta. Para los demás caracteres este híbrido presentó valores intermedios entre ambos progenitores.

Un resultado similar se obtiene, con el híbrido obtenido a partir del cruce recíproco en el cual la variedad comercial fue la aceptora de polen y la especie silvestre *O. glumaepatula* la donadora. Las características altura, longitud de la panícula y de lígula así como número de brotes por planta, número de panículas por planta, fueron similares a los obtenidos en la especie silvestre *O. glumaepatula*, mientras que para los caracteres número de hojas del eje central y longitud de la hoja bandera, los valores promedio en dicho híbrido fueron similares a los obtenidos para la variedad comercial P. Inta.

Por otro lado, como se observa en el cuadro 10, el híbrido P. Inta x *O. glumaepatula* para el carácter número de ramificaciones por panícula presentó mayores valores respecto a sus parentales, este fenómeno se define como heterosis o capacidad de la descendencia híbrida para superar a sus progenitores en características fenológicas de crecimiento y rendimiento, esta capacidad resulta de la interacción de varios factores moleculares independientes con efectos en la expresión morfológica de los individuos y de la interacción propia de los genes aportados por los progenitores (Gaytán & Mayek, 2010, Kirk *et al.*, 2004). Para los demás caracteres este híbrido presentó valores intermedios.

Finalmente con este análisis se determinó que el híbrido obtenido a partir del cruce entre la especie silvestre *O. glumaepatula* y la variedad comercial CFX-18 presentó valores promedio para las características altura, longitud de la panícula y de la lígula además del número de hojas del eje central y el número de brotes, similares a los obtenidos para la especie silvestre *O. glumaepatula*. Las características de número de panículas por planta, longitud y ancho de la hoja bandera fueron morfológicamente similares a la variedad comercial CFX-18.

Sin embargo, como se observa en el cuadro 10, el híbrido CFX-18-*O. glumaepatula* presentó heterosis para el carácter número de granos por panícula, superando a ambos progenitores. Para los demás caracteres, en este caso número de ramificaciones y de granos por panícula, presentaron valores intermedios entre ambos progenitores.

7.4. Determinación del contenido de ADN de las plantas identificadas como híbridos producto del cruce entre *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis* mediante Citometría de Flujo

Para realizar la determinación del contenido de ADN por núcleo en las plantas de este estudio, fue necesario primero determinar las condiciones experimentales para obtener resultados apropiados. Por lo tanto, se realizaron pruebas preliminares para comparar el resultado que se obtiene con diferentes buffers de extracción, así como la cantidad de tejido que maximiza la señal observada, y minimiza el ruido debido a la contaminación con fragmentos celulares. Un resultado se considera apropiado cuando se pueden medir al menos 5000 núcleos de una muestra determinada, y el coeficiente de variación a la mitad de la altura del pico para los núcleos en la fase G0/G1 del ciclo celular es menor al 5%.

Para comenzar, se compararon dos soluciones amortiguadoras para realizar la extracción de núcleos. Los buffers comparados fueron el buffer Tris.MgCl₂ y el buffer de Galbraith con 15 mg de tejido foliar fresco de las plantas *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis* y sus respectivos híbridos. Al comparar los resultados obtenidos para ambas soluciones amortiguadoras, se observa un único pico de fluorescencia que corresponde a células en la fase G0/G1 del ciclo celular, como se muestra en la figura 5. Esta señal se separa de manera apropiada del ruido de fondo en ambos casos. Sin embargo, la cantidad de núcleos que fue posible medir con el buffer Galbraith fue mayor que con el buffer Tris.MgCl₂, específicamente por encima de los 200 eventos, para las cuatro repeticiones realizadas durante el experimento, por lo que se decidió continuar utilizando esta disolución para los siguientes análisis.

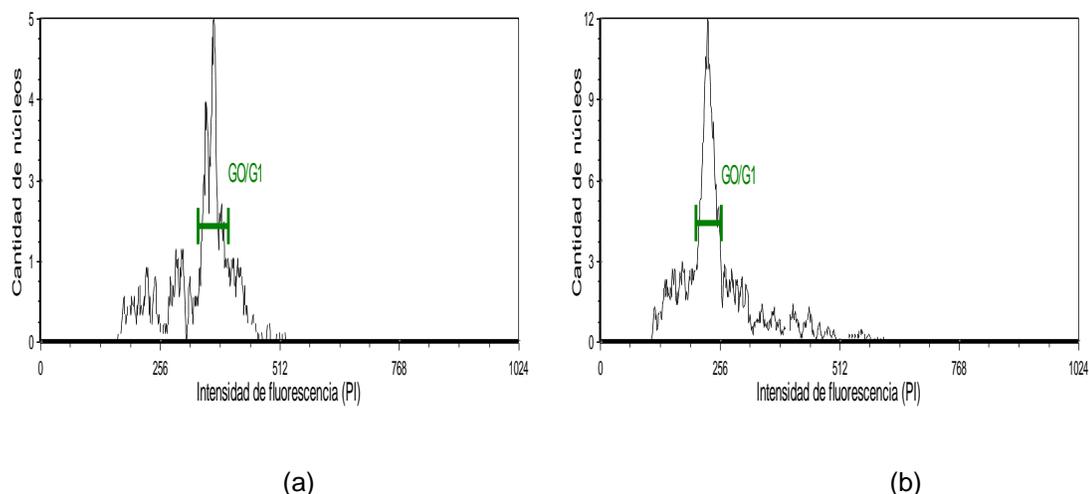


Figura 5. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para muestras de tejido foliar de *O. glumaepatula* de acuerdo al tipo buffer de extracción evaluado y según el número de eventos o núcleos obtenidos: TRIS (a) (Me: 179, R: 35) y Galbraith (b) (Me: 474, R: 36) y representativo de 4 repeticiones realizadas para cada uno.

A continuación, se determinó cuál es la cantidad de tejido foliar que brinda resultados óptimos. Es decir, la cantidad de tejido que permite medir un número máximo de núcleos y con la cual se observa un ruido mínimo por fluorescencia de otros residuos celulares. Para esto se compararon 10mg, 20mg, 30mg, 40mg y 50mg de tejido vegetal con el buffer de Galbraith. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 6 y se concluye que la cantidad óptima de tejido es 30 mg, ya que con esta cantidad se obtiene un mayor número de núcleos. Por otro lado, la intensidad de los picos inespecíficos (ruido) es aceptable cuando se utilizan cantidades menores a 30 mg por muestra. En cambio, al utilizar cantidades mayores, disminuye el rendimiento de núcleos y aumenta la intensidad de los picos no específicos.

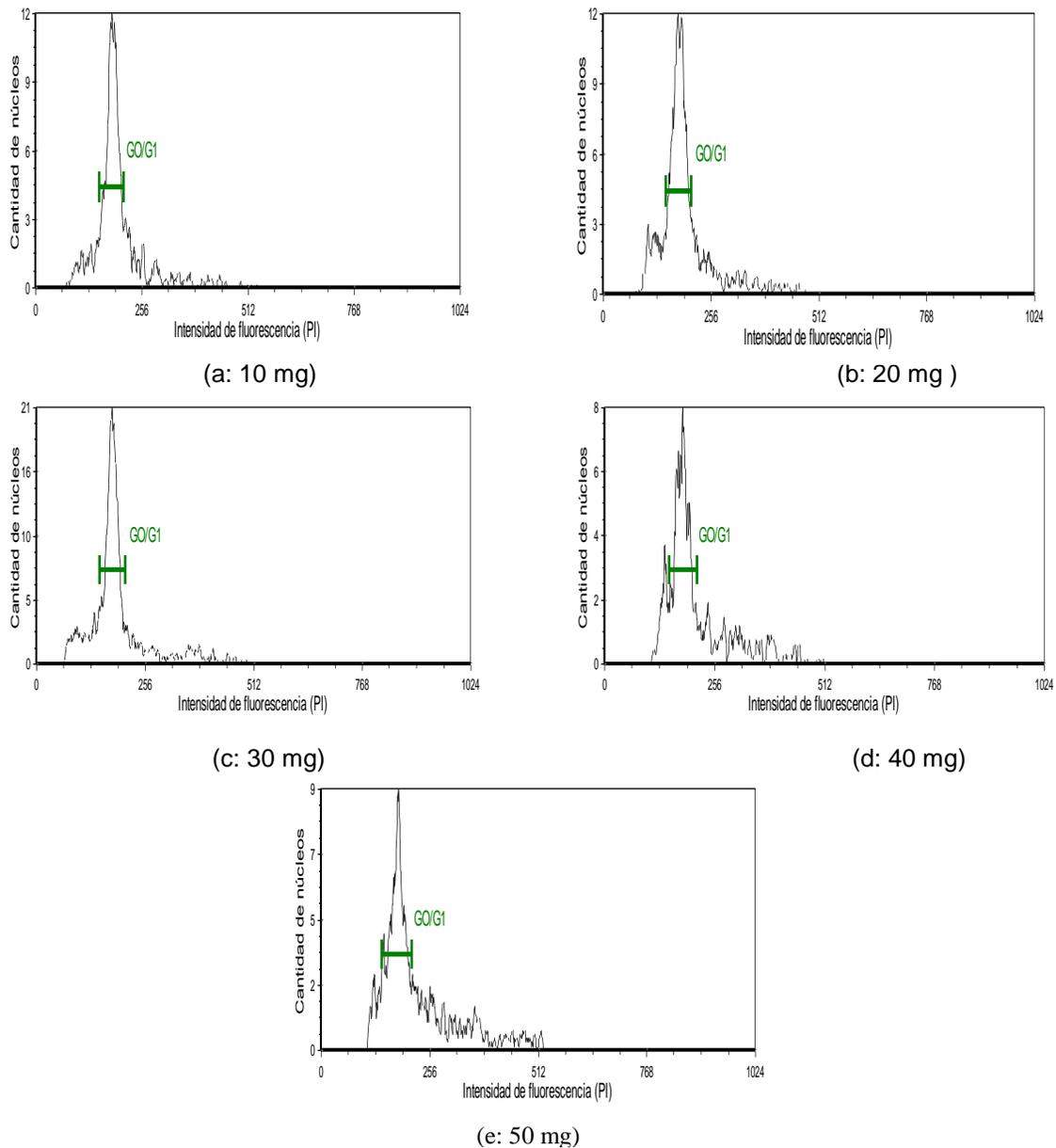


Figura 6. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para muestras de *O. glumaepatula* de acuerdo a la cantidad de tejido vegetal evaluado y según el número de eventos o núcleos obtenidos: (a) 10 mg (Me: 479.5, R: 65), (b) 20 mg (Me: 497.5, R: 101), (c) 30 mg (Me: 574, R: 154), (d) 40 mg (Me: 367, R: 160), (e) 50 mg (Me: 418.5, R: 57) y representativo a dos repeticiones realizadas para cada uno.

Para realizar la comparación de la cantidad de ADN por núcleo entre dos plantas utilizando la técnica de citometría de flujo, fue necesario realizar un análisis de una muestra que consistió en una mezcla de ambos tejidos vegetales, que se prepararon y procesaron juntos. Esto con el propósito de que ambos tipos de núcleo se encontraran en condiciones idénticas, y por lo tanto la única diferencia en la intensidad de la fluorescencia que se observara se debería a la cantidad de ADN en el núcleo. En trabajos previos se ha documentado que diferencias en la concentración de diferentes metabolitos, como por ejemplo los polifenoles, puede afectar la intensidad de la fluorescencia del PI, e incluso inhibirla completamente (Dolezel & Bartos, 2005).

Cuando se hace un análisis de una mezcla de tejidos foliares, se busca que la intensidad de los picos de ambas muestras sea comparable. Por lo tanto, se estandarizó el protocolo utilizando diferentes proporciones de las mezclas de los tejidos vegetales: estándar (*O. grandiglumis*) e híbrido (*O. glumaepatula*- *O. grandiglumis*) y se determinó que con una proporción 15mg: 15mg de cada uno de estos tejidos se obtienen la mayor cantidad de núcleos para ambos, además de una baja detección de desechos celulares como se muestra en la figura 7.

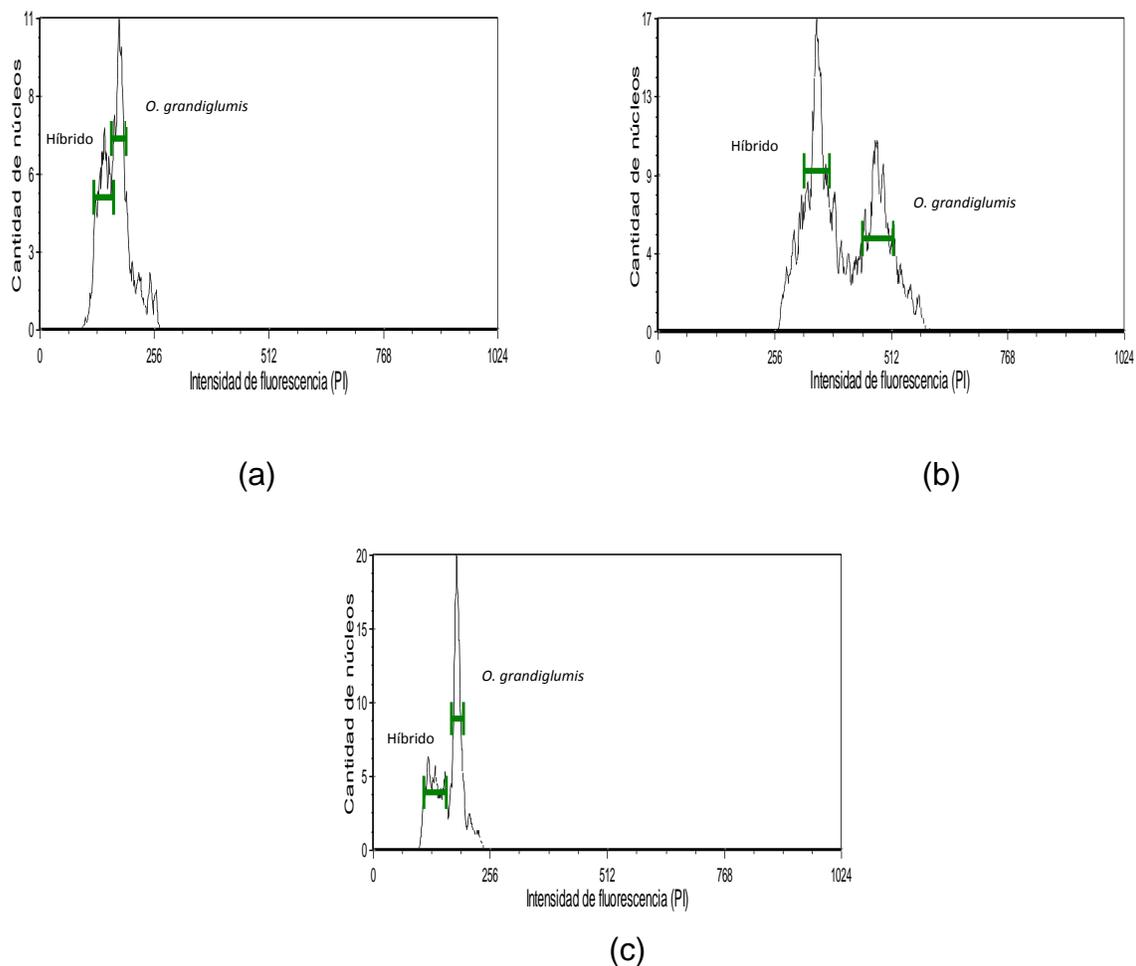


Figura 7. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para las mezclas de tejidos vegetales del estándar *O. grandiglumis* con el híbrido (*O. glumaepatula*- *O. grandiglumis*), de acuerdo a las diferentes proporciones evaluadas y según el número de eventos o núcleos obtenidos: (a) 10mg: 20mg (Me: 342, R: 230 y Me: 204, R: 54), (b) 15mg: 15mg (Me: 407.5, R: 99 y Me: 207.5, R: 47), (c) 20mg: 10mg (Me: 378, R: 84 y Me: 220.5, R: 71) y representativo de dos repeticiones realizadas para cada uno.

Por último, dentro del trabajo de rutina con el citómetro de flujo, fue necesario utilizar un control para asegurar el desempeño apropiado del equipo. Para esto, se utilizó tejido foliar de frijol (*Phaseolus vulgaris*), cuyo histograma se ilustra en la figura 8. Esta muestra se inyectó en el equipo en todas las sesiones de trabajo, con el fin de confirmar que el coeficiente de variación del pico G0/G1 se encontrara por debajo del 5%, lo cual indica que la estabilidad de la señal es apropiada. Adicionalmente, se calculó la razón de las intensidades de los picos G2/(G0/G1), la cual debió ser de $2 \pm 5\%$ como se describió en la metodología. Esta razón de intensidades fue un control de calidad importante para este trabajo, ya que permitió confirmar que la respuesta del equipo a la fluorescencia es lineal. Una razón de 2 es consecuencia de que la cantidad de ADN por núcleo se duplica durante el ciclo celular. El resto de muestras de una sesión de trabajo se midió únicamente si se cumplen estos requisitos en la muestra de control.

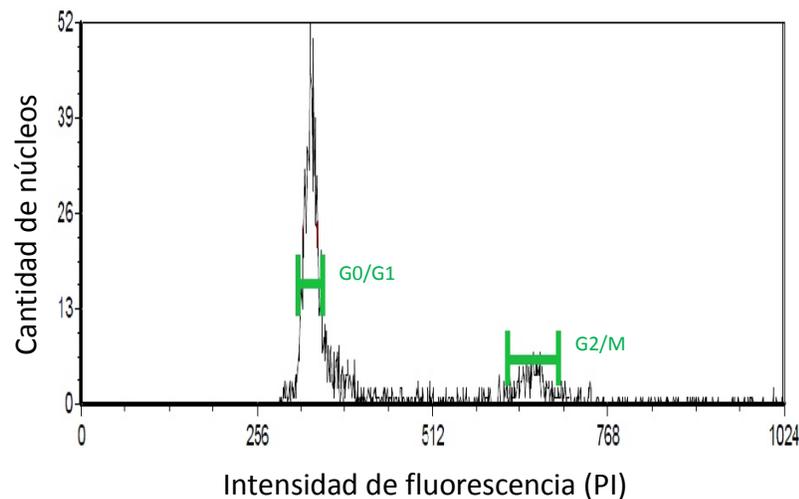
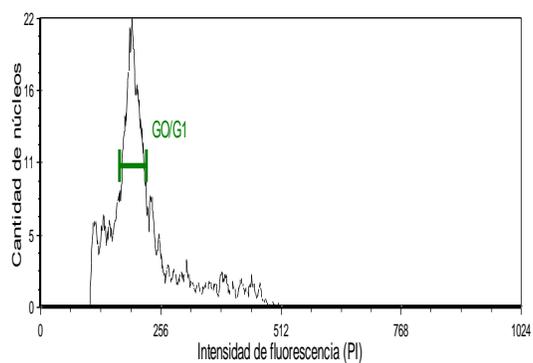


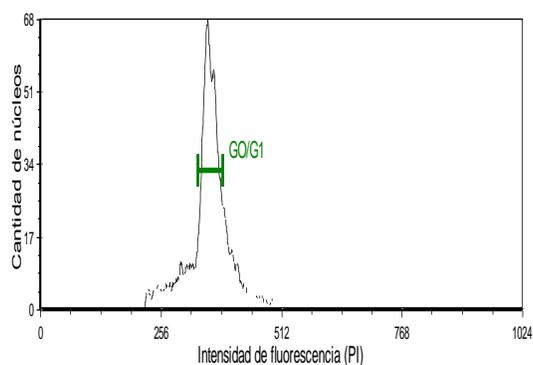
Figura 8. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para *Phaseolus vulgaris* según el número de eventos o núcleos obtenidos y representativo de 20 repeticiones (Me: 1852, R: 2351).

Una vez establecidos el tipo buffer y la cantidad de tejido vegetal con los que se lograron obtener una cuantificación mínima de 400 núcleos, con picos de fluorescencia bien definidos y con una baja cuantificación de residuos celulares, se procedió a determinar la planta más apropiada para utilizar como un estándar en la cuantificación de la cantidad de ADN por núcleo en las plantas híbridas. En este caso, las alternativas disponibles fueron *O.glumaepatula* que posee 0.5 pg de ADN/núcleo y *O. grandiglumis* que posee 1.0 pg de ADN/núcleo según la base de datos de Bennett & Leitch (2012).

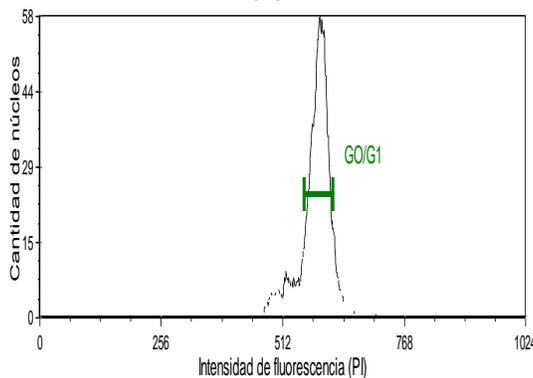
Además de la planta estándar, se midió el híbrido (*O.glumaepatula-O. grandiglumis*), con el fin de confirmar que el equipo tiene la resolución necesaria para distinguir las señales obtenidas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9. Se observa que en las condiciones descritas para esta investigación, la emisión de núcleos de *O. glumaepatula* según la intensidad de fluorescencia de PI se detecta aproximadamente en el canal 200; los núcleos obtenidos de *O. grandiglumis* se detectan aproximadamente en el canal 600, y los núcleos del híbrido (*O. glumaepatula- O. grandiglumis*) aproximadamente en el canal 390 de fluorescencia.



(a)



(b)

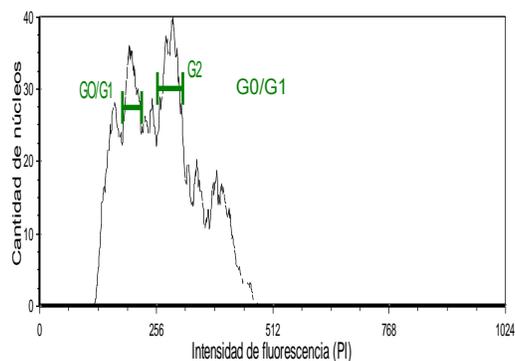


(c)

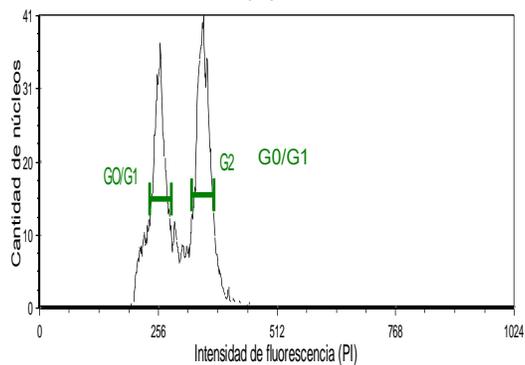
Figura 9. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para las muestras de las plantas evaluadas y según el número de eventos o núcleos obtenidos: *O. glumaepatula* (a) (Me: 447, R: 414), Híbrido (*O. glumaepatula*-*O. grandiglumis*) (b) (Me: 1041, R: 2335) y *O. grandiglumis* (c) (Me: 729, R: 2805), representativos de 11 repeticiones para *O. glumaepatula* y 19 repeticiones para las demás muestras.

De acuerdo a los resultados que se muestran en la figura 9 y tomando en cuenta que las condiciones en las que se midieron las tres muestras fueron idénticas, se estableció que la posición del pico de fluorescencia permite comparar la cantidad de ADN por núcleo entre estas. Por lo tanto, se concluyó que es más apropiado utilizar *O. grandiglumis* como estándar en la determinación de la cantidad de ADN por núcleo en el híbrido (*O.glumaepatula-O. grandiglumis*). Esto porque, a pesar de que se obtiene una buena señal de fluorescencia para *O. glumaepatula*, el hecho de que esta planta tenga una menor cantidad de ADN por núcleo provoca que en algunas muestras esta señal se mezcle con la de fragmentos o residuos celulares, que se detectan cercanos a esta región.

En la figura 10 se comparan las mediciones obtenidas para mezclas de ambas plantas, *O. grandiglumis* (estándar) con el híbrido *O.glumaepatula-O. grandiglumis* y se puede apreciar que los picos de intensidad de fluorescencia se distinguen con mayor facilidad del ruido de fondo cuando se utiliza *O.grandiglumis* como estándar (figura 10b). Estos resultados no se pueden comparar directamente con los que se muestran en la figura 9, ya que las condiciones del equipo se ajustaron de manera que el pico de menor intensidad se ubique en un canal cercano a 200.



(a)



(b)

Figura 10. Histograma de intensidad de fluorescencia del PI para las mezclas de tejido foliar y según el número de eventos o núcleos obtenidos: (a) *O. glumaepatula* + Híbrido (*O. glumaepatula*-*O. grandiglumis*) (Me: 262, R: 161 y Me: 184, R: 46) y (b) *O. grandiglumis* + Híbrido (*O. glumaepatula*-*O. grandiglumis*) (Me: 1005.5, R: 2128 y Me: 268.5, R: 253) y representativo de 7 y 26 repeticiones realizadas para cada una respectivamente.

En total se realizaron 106 mediciones de muestras en suspensión de tejido foliar de las plantas en estudio y sus respectivas mezclas en el citómetro de flujo. De acuerdo con el criterio de calidad previamente establecido, sólo se tomaron en cuenta mediciones en las que se obtuvo un mínimo de 400 eventos y el coeficiente de variación del pico del híbrido menor a un 5%. Por lo tanto, se descartaron un total de 98 mediciones. Con base en esta selección y utilizando la fórmula presentada en la metodología, se logró establecer que la cantidad de ADN por núcleo celular para el híbrido *O.glumaepatula* - *O. grandiglumis* en promedio es de 0.73 picogramos (SD: 0.02). En comparación, *O. grandiglumis* presenta 1.0 picogramos de ADN/núcleo y *O. glumaepatula* 0.50 picogramos de ADN/núcleo (Bennett y Leitch, 2014). Los resultados de las 8 muestras seleccionadas se resumen en el cuadro 11.

Cuadro 11. Picogramos de ADN por núcleo celular para el híbrido *O.glumaepatula*- *O. grandiglumis* según los canales de fluorescencia del citómetro de flujo y según la mezcla *O. grandiglumis* + Híbrido.

Mezcla <i>O.grandiglumis</i> +Híbrido (<i>O. glumaepatula</i> - <i>O. grandiglumis</i>)	Núcleos G0/G1 (<i>O.grandi</i>)	Núcleos G0/G1 (Híb)	CV G0/G1 (<i>O.grandi</i>)	CV G0/G1 (Híb)	Canal G0/G1 (<i>O.grandi</i>)	Canal G0/G1 (Híb)	pg ADN/núcleo
1	1031	1003	4.09	3.44	404	577	0.70
2	980	791	4.20	3.38	404	540	0.75
3	1076	641	4.68	3.98	348	476	0.73
4	1077	942	4.63	3.54	332	450	0.74
5	578	394	4.79	3.91	349	480	0.73
6	1270	633	3.60	3.08	396	543	0.73
7	900	1503	3.45	4.00	370	490	0.76
8	409	590	2.04	3.27	428	594	0.72
Promedio							0.73

G0/G1 (Híb): Resultados según intensidad de fluorescencia para el híbrido *O.glumaepatula* - *O. grandiglumis*.

G0/G1 (*O. grandí*): Resultados según intensidad de fluorescencia para *O. grandiglumis*.

CV: Coeficiente de Variación

8. Discusión

Los resultados de esta investigación en cuanto a la hibridación de la especie silvestre *O. glumaepatula* con las variedades de arroz comerciales coinciden con lo descrito por Acevedo *et al* (2006), quien describe que el género *Oryza* cuenta con una gran variedad de especies silvestres alrededor del mundo y éstas pueden cruzarse con la especie cultivada *O. sativa*. En este trabajo se ha determinado específicamente que la especie *O. glumaepatula* produce mayor cantidad de híbridos al combinarse con la variedad de arroz cultivada P. Inta, ya que se obtuvieron 89 híbridos a partir de 120 cruces, esto en comparación con la variedad CFX-18, en donde se obtuvieron solamente 19 híbridos a partir de 120 cruces.

Por otro lado, para analizar los resultados en cuanto al fenotipo de las plantas híbridas, es necesario tener en cuenta que el arroz posee dos etapas de crecimiento: la fase vegetativa, que incluye la germinación de la semilla, la producción de hojas, la producción de brotes y el crecimiento en altura, además de la fase reproductiva, que incluye la floración, polinización y la fase de producción de semillas. En la naturaleza, el crecimiento de las plantas de arroz en su fase vegetativa es importante para asegurarse una reproducción exitosa en cuanto a la dispersión de semillas. Por el contrario en el caso de las variedades comerciales, estas han sido mejoradas para presentar una madurez temprana y poca altura (Beighley, 2008).

Esta característica morfológica explica que las variedades CFX-18 y Puita Inta fueran considerablemente más pequeñas que la especie silvestre *O. glumaepatula*. En el caso de los híbridos, estos también presentaron alturas mayores, lo que podría deberse a un efecto materno de dominancia o al efecto del vigor híbrido. Este último, según describe Chen (2010), es el proceso genético y de reguladores moleculares por el cual los individuos obtenidos a partir de cruces entre diferentes especies presentan un mayor vigor en crecimiento.

Un resultado similar también fue encontrado por Kanya *et al* (2012), quienes hibridaron una especie silvestre de *Oryza africana* (*O. longistaminata*) con una variedad comercial (*O. sativa*). A partir de este tipo de cruces, una vez maduras las plantas de arroz, la especie silvestre y los respectivos híbridos presentaron mayor altura en relación con las variedades comerciales.

Por otro lado, como se describió en los resultados, la floración de los híbridos fue temprana, similar a las variedades cultivadas que han sido sujetas a mejoramiento para una producción rápida (Beighley, 2008), y no anual como en el caso de *O. glumaepatula*. Kanya *et al* (2012) también obtuvieron estos resultados en su investigación y proponen que este carácter en los descendientes híbridos se debe a que tienen un genoma compuesto por genes de ambos padres y que la expresión de cada carácter es determinada por dominancia.

Por otro lado, Jung *et al.* (2009) describen que el proceso de floración en plantas está determinado por sistemas regulatorios de interacciones genéticas y moleculares que responden a factores exógenos o endógenos, tales como vernalización, fotoperiodo, giberelinas, ritmo circadiano y respuestas autónomas propias de los individuos. En este sentido, Wei *et al.* (2010) afirman que en el proceso de hibridación de arroz, se recombinan loci encargados de rasgos como floración y los genes involucrados se expresan dependiendo de sistemas de regulación genéticas tales como supresión de genes y efecto pleiotropico, lo cual podría explicar los resultados obtenidos en esta investigación.

En cuanto a la cantidad de hojas, se ha determinado que en especies vegetales este carácter depende de factores biológicos como la variedad o tipo de planta y de factores ambientales como el estado nutricional, la humedad del suelo, la época, el método de siembra y la altura de la región (Beighley, 2008). Durante este experimento todas las plantas crecieron en iguales condiciones ambientales, por lo tanto se puede afirmar que la variedad comercial CFX-18 presenta mayor

cantidad de hojas en el eje central en relación a Puita Inta, los híbridos y la especie silvestre *O. glumaepatula*. Esta diferencia se podría deber a que las variedades comerciales ha sido sujeto de mejoramiento genético, con la finalidad de obtener mayor área foliar que asegure una alta producción de granos (Beighley, 2008).

Para los caracteres longitud de la hoja bandera y número de espiguillas o granos por panícula, en todos los híbridos independientemente de la dirección del cruce los valores fueron similares a los encontrados en los parentales comerciales. En relación a esto, Barari *et al* (2009) señala que la hoja bandera tiene un efecto importante en la producción de granos en el arroz, ya que este carácter se presenta en función de los productos de la fotosíntesis, por lo tanto una disposición óptima de la hoja bandera puede aumentar la eficiencia de la producción. Esta afirmación podría relacionarse con los resultados obtenidos, en donde los híbridos y las variedades comerciales presentan los mayores valores con respecto a la longitud de la hoja bandera y también presentan mayor cantidad de espiguillas por panícula en relación a la especie silvestre *O. glumaepatula*.

Además, para el carácter longitud de la hoja bandera en plantas de arroz, Moldenhauer & Slaton (2011), describen que este se correlaciona positivamente con la longitud de la panícula y su desarrollo se presenta a inicio de la etapa reproductiva. Además, Amela *et al.* (2008) estudiaron híbridos a partir de cruces de variedades de arroz con diferentes tamaños de panículas, y encontraron que la variación de este carácter se debe principalmente a efectos maternos dominantes en la descendencia híbrida. Los resultados obtenidos indican que los híbridos y la especie silvestre *O. glumaepatula* presentan los mayores valores de longitud de la hoja bandera y longitud de la panícula.

En cuanto al número de brotes, al igual que en el caso del carácter altura, los híbridos independientemente de la dirección del cruce, presentan similitud con

O. glumaepatula y no con las variedades comerciales. Este resultado podría relacionarse con lo descrito por Alam *et al* (2009) en su estudio de macollaje con plantas de arroz híbridas producto del cruces entre individuos de ascendencia común o endogámicos, los cuales indican que en algunos casos el estado del suelo influye en la cantidad de brotes por planta, sin embargo en otros casos esto varía dependiendo de la variedad y la etapa de crecimiento de la misma. En esta investigación todas las plantas crecieron en iguales condiciones de suelo y durante el mismo periodo del año, por lo que se concluye que los resultados obtenidos se deben al fenotipo de plantas estudiadas, a su cruzamiento y al efecto materno de dominancia en sus híbridos.

Por otro lado, en cuanto a la cantidad de panículas por planta, Beighley (2008) en su análisis sobre el crecimiento vegetativo y fase reproductiva de las plantas de arroz, describe que este carácter depende directamente del número de brotes por planta y que además, una vez que la planta entra en la fase reproductiva deja de producir brotes. Esta afirmación se puede correlacionar con los resultados obtenidos en esta investigación, en donde la variedad P. Inta presentó la mayor cantidad de panículas con un promedio de 7.21 por individuo, mientras que su respectivo híbrido *O. glumaepatula* x Puita Inta presentó la mayor cantidad de brotes, 11.30 en promedio. Este resultado evidencia un efecto materno de dominancia en la descendencia híbrida. Por el contrario, CFX-18 presentó la menor cantidad de panículas y de brotes, 5.54 y 5.29 en promedio respectivamente.

Adicionalmente, Young-Jun *et al.* (2012), estudió el desarrollo de las panículas en variedades de arroz a diferentes temperaturas y describe que caracteres como el sistema de ramificaciones de las panículas en el arroz son de gran importancia porque determinan la cantidad de granos por panícula en una correlación positiva, sin embargo en un ambiente controlado este carácter varía según la variedad en estudio. Esta correlación entre las ramificaciones y el número de granos coincide

con los resultados reportados en esta investigación, en donde las variedades comerciales y sus respectivos híbridos presentaron los mayores valores en cuanto al número de ramificaciones y la cantidad de granos u espiguillas por panícula, evidenciando un efecto materno de dominancia para este carácter en la descendencia híbrida, esto tomando en cuenta que el ambiente era el mismo para todas las plantas.

Cabe señalar además que los resultados del número de granos para las especies parentales o cantidad de espiguillas para la descendencia híbrida por panícula, dependen de muchos factores también descritos por Beighley (2008) tales como la estación en que surgió la panícula, las condiciones ambientales en que creció la planta, las condiciones nutricionales del suelo y el estado físico propio de la planta. En este caso, los híbridos de ambas variedades comerciales presentaron mayor número de espiguillas en relación a sus progenitores, sin embargo las condiciones para todas las plantas fueron las mismas, por lo que se podría afirmar que esta diferencia se debe a su propio fenotipo, esto como resultado del vigor híbrido y no efectos maternos de dominancia.

En cuanto a la esterilidad descrita en esta investigación para los híbridos obtenidos de arroz, Caicedo (2008) describe que este resultado se presenta también en cruces de variedades comerciales con otras especies silvestres alrededor del mundo. Además, indica que este tipo de resultados se deben a que en algunos de los experimentos llevados a cabo existe un desconocimiento en cuanto a la incompatibilidad genética de las poblaciones en estudio. Sin embargo, Caicedo (2008) afirma también que en otros casos se ha logrado transferir características de las especies silvestres al arroz cultivado en la descendencia híbrida, sobre todo entre especies con genomas similares, en donde ha sido necesario realizar dos y hasta tres retrocruces para recuperar la fertilidad de los individuos.

Por otro lado, la citometría de flujo analiza la intensidad relativa de fluorescencia según el contenido relativo de ADN nuclear, por lo tanto el tamaño del genoma de una muestra desconocida puede determinarse mediante una comparación de los picos de intensidad de fluorescencia de núcleos celulares de una muestra estándar de referencia y cuyo tamaño de genoma es conocido (Dolezel & Bartos, 2005). Estudios de este tipo han sido particularmente importantes en las áreas de la taxonomía y la biosistemática (Loureiro, 2009). En esta investigación, una vez que estandarizó el protocolo, se detectó un canal de intensidad de fluorescencia mayor para la especie tetraploide, seguido del híbrido, y por último la especie diploide *O. glumaepatula*, la que contiene la menor cantidad de ADN.

Este resultado permitió cuantificar el contenido de ADN por núcleo del híbrido el cual es de 0.73 ± 0.02 pg que resultó ser intermedio en comparación con el de *O. glumaepatula* 0.50 pg y del *grandi* 1.0 pg según Bennett y Leitch (2014). Lo cual es relevante para efectos de la confirmación de la naturaleza del híbrido ubicado en el Humedal del Rio Medio Queso que hasta la fecha había sido caracterizado únicamente por morfología (Zamora *et al*, 2003).

Así mismo, la validez de la técnica de citometría de flujo para comparar accesiones de una misma especie o que estén estrechamente relacionadas (Emeshwiller, 2002) se confirma con los resultados obtenidos, por cuanto fue posible la diferenciación del híbrido *O. glumaepatula-O.grandiglumis* respecto al parental *O. grandiglumis* (CCDD) a pesar de pertenecer al mismo género. En contraposición, esta técnica se limita para especies que presenten contenidos de ADN por núcleo similares, como en el caso de *O. glumaepatula* y *O. sativa* en los que se reporta que la cantidad de ADN contenida dentro de un juego haploide de cromosomas es de $0.49 (\pm 0.03)$ pg y $0.46 (\pm 0.05)$ pg respectivamente (Miyabayashi, 2007).

9. Conclusiones

1. Se determinó la morfología de híbridos que puedan surgir de un eventual cruce entre la especie de arroz silvestre costarricense *Oryza glumaepatula* con el arroz cultivado *Oryza sativa* y el efecto materno de dominancia o de vigor híbrido en los mismos.
2. Se obtuvieron datos que podrán ser utilizados en investigaciones futuras para la identificación morfológica de dichos híbridos en zonas donde estas dos poblaciones pueden llegar a converger, como en el caso de la península de Santa Elena, en Guanacaste y del río Medio Queso en Los Chiles de Alajuela.
3. Se observó que los híbridos mostraron mayor altura, longitud de la panícula y de la hoja bandera que sus parentales, lo que podría relacionarse con un incremento en el crecimiento y eficiencia reproductiva en los híbridos.
4. Se estableció un procedimiento molecular de citometría de flujo para identificación de individuos del género *Oryza*.
5. Se diferenciaron las especies silvestres *O. glumaepatula* (AA) y *O. grandiglumis* (CCDD), así como el híbrido natural entre ellas, cuantificando y comparando sus contenidos de ADN nuclear mediante la Citometría de Flujo.

10. Recomendaciones

1. Medir otros caracteres que puedan tener relevancia biológica o agronómica en la descendencia híbrida, tales como: largo y ancho del grano, peso del grano, textura y color de la planta, además de hábito de crecimiento de los brotes (abierto o erguido).
2. Realizar retrocruces utilizando los híbridos como aceptores de polen y evaluar varias generaciones, esto con el objetivo de establecer la probabilidad de recuperar la fertilidad en alguna línea híbrida.
3. Estudiar el desarrollo y comportamiento morfológico de los híbridos en el campo, en un área controlada y establecer pruebas de competencia entre los híbridos y los parentales.
4. Evaluar otros procedimientos de extracción de núcleos celulares a partir de muestras foliares de gramíneas, tanto mecánicos como bioquímicos, o usar otros buffers de extracción para aumentar la cantidad de eventos y disminuir el coeficiente de variación.
5. Establecer el tamaño del genoma nuclear de los híbridos *O. glumaepatula*-*O. grandiglumis* mediante otra técnica de análisis molecular como un conteo de cromosomas nucleares o cariotipo.
6. Utilizar los caracteres altura, longitud de la panícula y de la hoja bandera como marcadores morfológicos en la caracterización de individuos producto del cruce entre variedades de arroz cultivado (*O. sativa*) y la especie silvestre *O. glumaepatula* en programas de mejoramiento genético.

11. Referencias

- Acevedo, M; Castrillo, W & Belmonte U. 2006. Origen, distribución y diversidad del arroz. *Agronomía Tropical*, 56 (2): 151-170.
- Akimoto, M. 1998. Population genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by life history traits. *Molecular Ecology*, 7: 1371-1381.
- Alam, M.M; Hasanuzzaman, M & Nahar, K. 2009. Tiller Dynamycs of Three Irrigated Rice Varieties under Varying Phosphorus Levels. *American-Eurasian Journal of Agronomy* 2 (2): 89-94.
- Amela, F.A; Alirio, F; Martínez, C & Borrero, J. 2008. Parámetros genéticos de la longitud de panícula en arroz. *Acta Agron (Palmira)* 57 (4): 233-239.
- Arrieta E, G; Sánchez, E; Vargas, S; Lobo, J; Quesada, T & Espinoza, M. 2005. The weedy rice complex in Costa Rica. I. Morphological study of relationships between commercial rice varieties, wild *Oryza* relatives and weedy types. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 575-587.
- Barari T, D; Gazanchian, A Allah P, H & Nasiri, M. 2009. Flag leaf Morphophysiological Response to Different Agronomical Treatments in a Promising Line of Rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science.*, 5(3): 403-408.
- Beighley, D.H. 2008. Growth and Production of Rice. *Encyclopedia of life Support Systems (EOLSS): Soils, Plant Growth and Crop Production, Vol II.* 11p.

- Bennett MD, Leitch IJ. 2012. Plant DNA C-values database (release 6.0, Dec. 2012) <http://www.kew.org/cvalues/>.
- Brondani, R.P; Zucchi, M.I; Brondani, C; Nakano R, P.H; De Oliveira B, T.C; Nascimento R, P; Magalhães, M.R & Vencovsky, R. 2005. Genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* populations in three Brazilian biomes using microsatellite markers. *Genetica* 125: 115-23.
- Castañón N, G. 2002. La Biotecnología y el Mejoramiento Genético Vegetal. División Académica de Ciencias Biológicas. Revista de Divulgación, vol. VII (14): 1-15.
- Caicedo, Y.J. 2008. Evaluación de características agronómicas de cuatro líneas interespecíficas de arroz (*Oryza sativa/Oryza latifolia*) comparadas con dos variedades comerciales y una nativa en el corregimiento #8 de Zacarías Municipio de Buenaventura. Trabajo de Tesis como requisito para optar al título de Agrónomo del Trópico Húmedo. Universidad del Pacífico. 35p.
- Chen, Z.J. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci.* 15(2): 57.
- De la Cruz, E; Castañón, G; Brito, N.P; Gómez, A; Robledo, V & Lozano, A.J. 2010. Heterosis y aptitud combinatoria de poblaciones de maíz tropical. *Revista Internacional de botánica experimental*, 79: 11-17.
- De Schepper, S; Leus, L; Mertens, M; Van Bockstaele, E & De Loose, M. 2001. Flow Cytometry Analysis of Ploidy in *Rhododendrom* (subgenus *Tsutsusi*). Belgium. *HortScience* 36(1): 125-127.

- Dolezel, J & Bartos, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99-110.
- Dolezel, J; Greilhuber, J & Suda, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*, vol. 2 (9): 2233-2244.
- Emshwiller, E. 2002. Ploidy levels among species in the “*Oxalis tuberosa* Alliance” as inferred by flow cytometry. *Annals of Botany* 89: 741-753.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. *Rice Market Monitor*, vol XIV(1): 1-29.
- Galbraith, D.W; Bartos, J & Dolezel, J. 2005. *Flow Cytometry for Biotechnology*. Oxford University Press, United Kingdom. 291-313p.
- Garris, A; Tai, T.H; Coburn, J; Kresovich, S & McCouch, S. 2005. Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*. 169: 1631-1638.
- Gaytán B, R & Mayek P,N. 2010. Heterosis en híbridos de maíz producidos de cruzamientos entre progenitores de valles altos x tropicales. Universidad Autónoma de Aguas Calientes. *Investigación y Ciencia*. 48: 4-8.
- Hathaway, L. 2004. *Speciation, Hybridization and Introgression in Plants*. Plant Ecology and Systematics. Department of Ecology, Lund University. Suiza. 34p.
- Jarvis, D.I & Hodgkin T. 1999. Wild relatives and crop cultivars: detecting natural introgression and farmer selection of new genetic combinations in agroecosystems. *Molecular Ecology* 8: 159-173.

- Jaskani, M.J; Kwon S.W & Kin, D.H. 2005. Flow Cytometry of DNA contents of Colchicine treated Watermelon as a Ploidy Screening Method at M1 stage. Pak. J. Bot., vol. 37(3): 685-696.
- Jung, C & Muller, A. Flowering time control and applications in plant breeding. 2009. Trends in Plant Science. Vol.14(10): 563-573.
- Kadaru, S; Zhang, W; Yadav, A & Oard, J.H. 2008. Development and application off allele-specific PCR assays for imazethapyr resistance in rice (*Oryza sativa*). Euphytica, 160:431-438.
- Kanya, J.I; Hauser, T.P; Kinyamario, J.I & Amugune, N.O. 2012. Hybridizazion Potencial between Cultivated Rice *Oryza sativa* and African Wild Rice *Oryza longistaminata*. International Journal of Agricultural Research, 7(6): 291-302.
- Kirk, H; Vrieling, K & Klinkhamer, P. 2004. Maternal Effects and Heterosis Influence the Fitness of Plant Hybrids. New Phytologist 166: 685-694.
- Kshirsagar, R.M; Vashi, P.S; Bagade, A.B; Dalvi, V.V & Chauhan, D. 2005. Combining ability analysis for yield and its components in rice. Madras Agriculture, vol. 92(1-3): 154-157.
- Lodhi, M.A; Ye, G.N; Wedeen, N.F; Deiseh, B.T. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction for grapevine cultivars and vitis species. Plant Molecular Biology Reportes, 12(1): 6-13.
- Loureiro, J. 2009. Aplicación de la citometría de flujo en el estudio del genoma vegetal. Ecosistemas 18 (2): 103-108.

- Marines, M; Karasawa, G; Vencovsky, R; Silva, C; Zucchi, M.I; Oliveira, G & Veasey, A. 2007. Mating System of Brazilian *Oryza glumaepatula* populations studied with microsatellite markers. *Annal of Botany* 99: 245-253.
- Miyabayashi, T; Nonomura, K.I; Morishima, H & Kurata, N. 2007. Genome Size of Twenty Wild Species of *Oryza* determined by Flow Cytometric and Chromosome Analyses. *Breeding Science*, 57: 73-78.
- Moldenhauer, K & Slaton, N. 2011. Rice Production. University of Arkansas. División of Agriculture, Cooperative Extension Service. United States of America. 129p.
- Murashige, T & Skoog, F. 1962. *Physiology of Plants*. Vol. 15. 473-497.
- Ochatt, S. J. 2006. Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). INRA, C.R. Dijon, Unité de Génétique et Ecophysiologie des Légumineuses, BP 86510, 21065 Dijonn Cedex, France. 13p.
- Palomino, G. 2000. Genome analysis of Mexican flora. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 921-924.
- Quemé de León, J.L; Larios B, L. Pérez R, C & Soto L, N. 1991. Aptitud combinatoria y predicción de híbridos de Maíz (*Zea mays* L.) de grano amarillo a partir de cruas dialélicas, evaluadas en dos localidades de la zona baja de Guatemala. *Agronomía Mesoamericana* 2: 24-30.

- Quesada, T. 2001. Diversidad genética de la especie silvestre de arroz *O. latifolia* desv. en Costa Rica. Tesis sometida a consideración del Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar por el grado de Magister Scientiae. Universidad de Costa Rica. 94p.
- Rick, C. M; Holle, M. 1990. Andean *Lycopersicon esculentum* var. Cerasifrome: Genetic variation and its evolutionary significance. *Econ. Biot.*, 44: 69-78.
- Roso, A.C; Merotto, A; Delatorre, C.A & Menezes, V.G. 2010. Regional Scale Distribution of Imidazolinone Herbicide-Resistant Alleles in Red Rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. *Field Crops Research* 119: 175-182.
- Ruelas H, P.G; Caro V, F.de J; Pérez G, R & Valdivia B, R. 2008. Aptitud Combinatoria y Heterosis en un cruzamiento dialélico en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(3): 325-330.
- Sánchez, E.R; Arrieta, G; Lobo, J.A & Espinoza, A.M. 2009. Assessment of gene flow from a herbicide-resistant indica rice (*Oryza sativa* L.) to the Costa Rican weedy rice (*Oryza sativa*) in Tropical America: factors affecting hybridization rates and characterization of F1 hybrids. *Transgenic Research*: 18 (4): 633-647.
- Sarkarung, S. 1991. A simplified crossing method for rice breeding: A manual. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali. 32 p.
- Serrato, M.A; Hernández, M; Savidan Y & Barcenas N.M. 2000. Contenido de ADN y nivel de ploidía en *Tagetes* spp. utilizando citómetro de flujo. *Agrociencia* 34: 729-734.

- Shimizu, M; Kawai, K; Kaku, K; Shimizu, T & Kobayashi, H. 2011. Application of Mutated Acetolactate Synthase Genes to Herbicide resistance and Plant Improvement. *Herbicides, Theory and Applications*. 193-112p.
- Sociedad Española de Biotecnología (SEBiot). 2007. Plantas transgénicas: preguntas y respuestas. *Biotecnología en pocas palabras*, séptima Edición. 52p.
- Suarez, C.E. 2006. I curso de capacitación y mejoramiento genético en arroz. Instituto de Investigaciones del Arroz (IIArroz). La Habana, Cuba. 9p.
- Trejos, R. 2006. Estudios básicos en bioseguridad ambiental: caracterización molecular del arroz maleza y biología reproductiva de la especie silvestre *O. glumaepatula*. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología. Universidad de Costa Rica. 105p.
- Tuna, M; Vogel, K.P; Arumuganathan, K & Gill, K.S. 2001. DNA Content and Ploidy Determination of Bromegrass Germplasm Accessions by Flow Cytometry. *Crop Science*, 41: 1629 – 1634.
- Van Raamsdonk, LWD; Van der Maesen, LDG. 1996. Crop–weed complexes: the complex relationship between crop plants and their wild relatives. *Acta Botanica Neerlandica*, 45: 135–155.
- Velázquez, R; Noguera, A; Blanca, I & Mata, J. 2010. Evaluación de dos metodologías para la determinación del nivel de ploidía en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) regeneradas por cultivo de anteras. *Revista Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela*, 36(1): 1-6.

- Vikrant, D. 2006. Studies on introgression for fibre traits in cotton. Thesis submitted to the University of Agricultural Sciences, Dharwad In partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science (Agriculture) In Genetics and Plant Breeding. 111p.
- Wei, X; Ku, J; Guo, H; Jiang, L; Chen, S; Yu, C; Zhou, Z; Hu, P; Zhai, H & Wan, J. 2010. DTH8 Suppresses Flowering in Rice, Influencing Plant Height and Yield Potential Simultaneously. *Plant Physiology*. Vol. 153, pp. 1747-1758.
- Young-Jun, M; Kim, K; Park, H; Ko, J; Shin, W; Nam, J; Kim, B & Ko, J. 2012. Changes in the panicle-related traits of different rice varieties under high temperature condition. *Australian Journal of Crop Science* 6(3): 436-443.
- Zamora, A. 2001. Diversidad morfológica y genética del género *Oryza* (Poaceae) en Costa Rica. Tesis de maestría. Programa de Estudios de Posgrado en Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 178 p.
- Zamora, A; Barboza, C; Lobo, J & Espinoza A.M. 2003. Diversity of native rice (Poaceae: *Oryza*) species of Costa Rica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 855-870.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Fourth edition. Ed. Prentice Hall. Mexico. 929p.
- Zhiping, S; Bo, L; Jiakuan, C & Bao-Rong, L. 2005. Genetic diversity and conservation of common wild rice (*Oryza rufipogon*) in China. *Plant Species Biology*, 20: 83–92.

Zimmerer, K; Douches, DS. 1991. Geographical approaches to crop conservation: the partitioning of genetic diversity in Andean potatoes. *Economic Botany*, 45: 176–189.

Anexos

Anexo 1

Gráficos de cajas según Análisis de Varianza (ANDEVA) para las plantas del género *Oryza* evaluadas usando el programa JMP 2007:

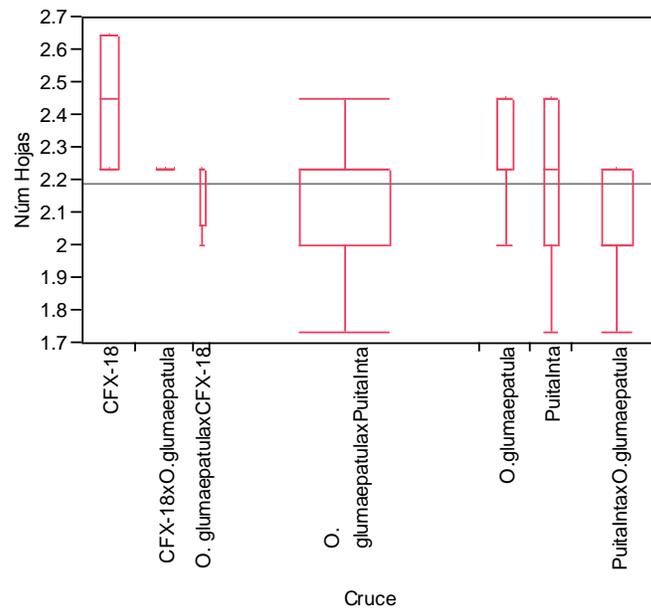


Figura 1. Número de hojas del eje principal a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 13.49$; $gl = 5/149$; $P < 0.0001$).

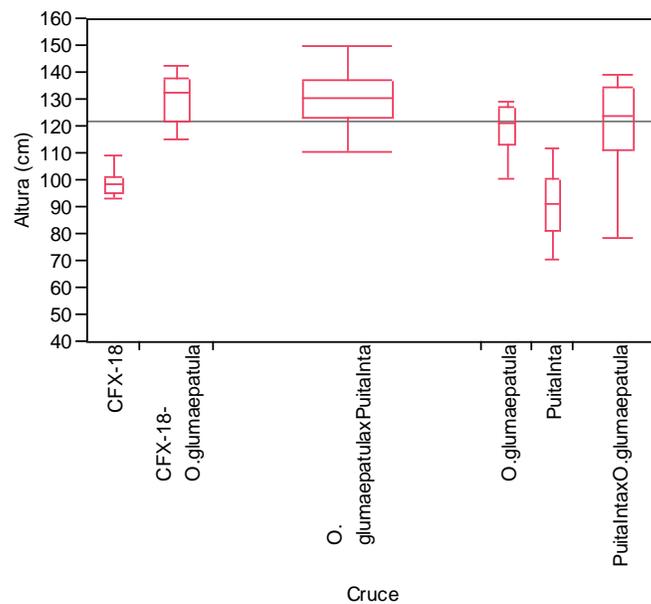


Figura 2. Altura (cm) a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 32.11$; $gl = 5/149$; $P < 0.0001$).

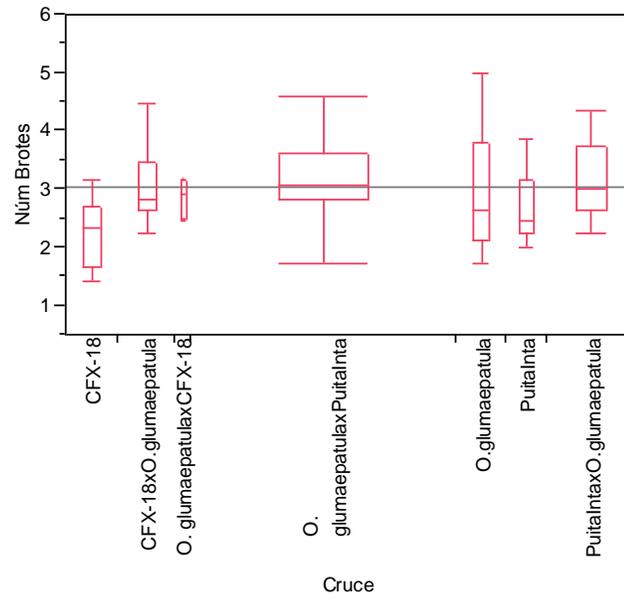


Figura 3. Número de brotes a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 3.44$; $gl = 5/149$; $P = 0.0058$).

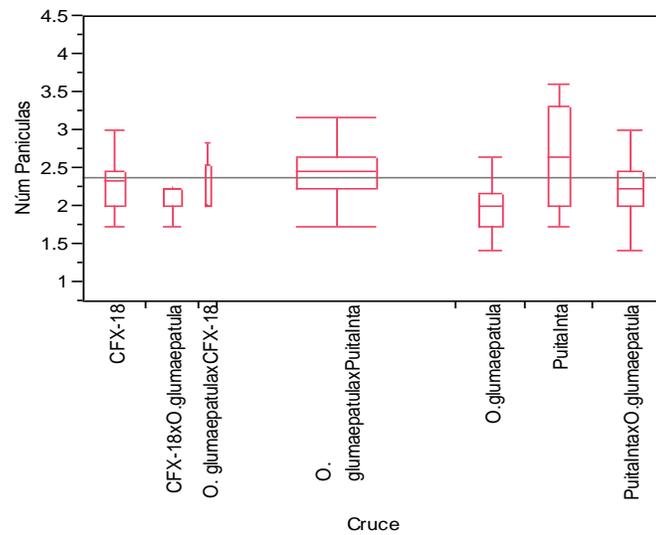


Figura 4. Número de panículas por planta a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 4.66$; $gl = 5/149$; $P = 0.0005$).

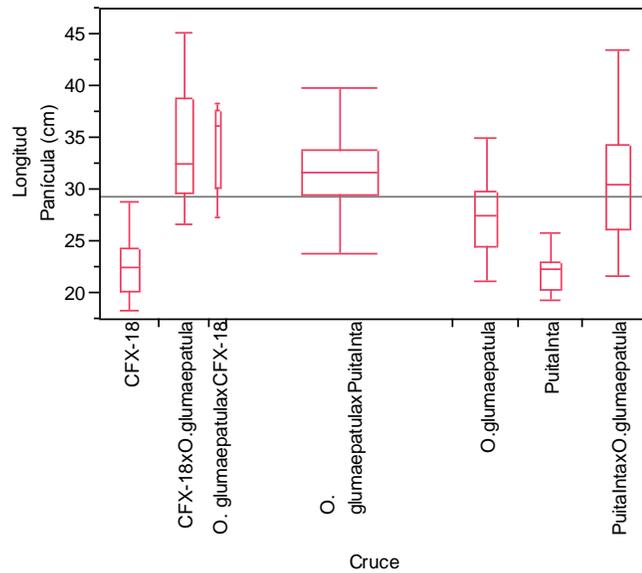


Figura 5. Longitud de las panículas por planta a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 30.64$; $gl = 5/149$; $P < 0.0001$).

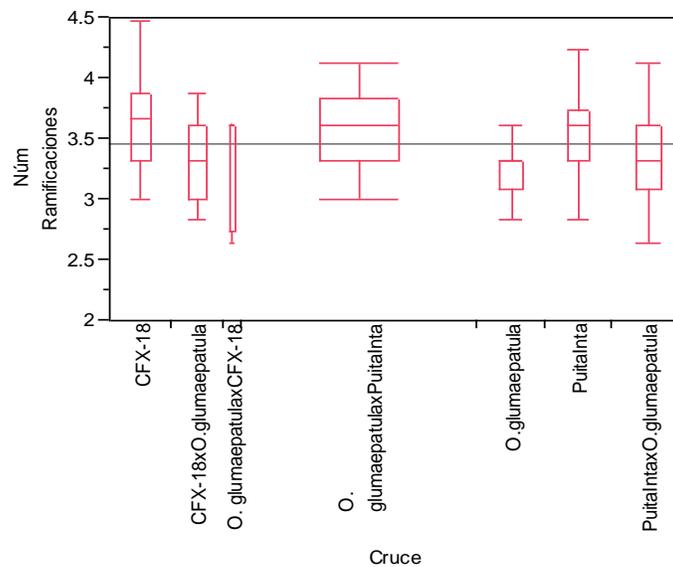


Figura 6. Número de ramificaciones por panícula a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 3.56$; $gl = 5/149$; $P = 0.0025$).

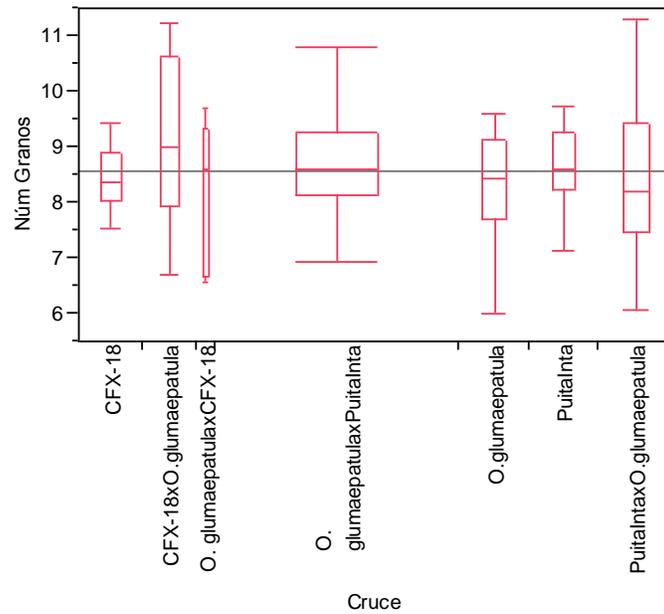


Figura 7. Número de granos y espiguillas por panícula a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 0.67$; $gl = 5/149$; $P = 0.6454$).

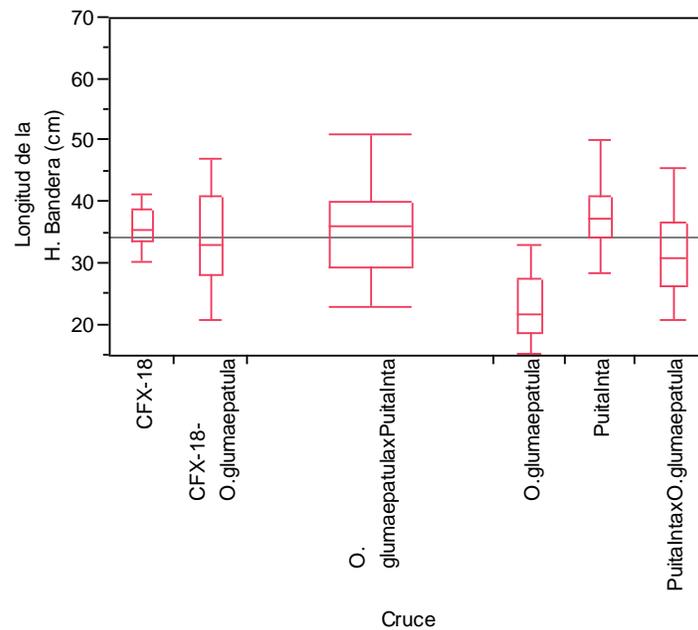


Figura 8. Longitud de la hoja bandera a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 9.88$; $gl = 5/149$; $P < .0001$).

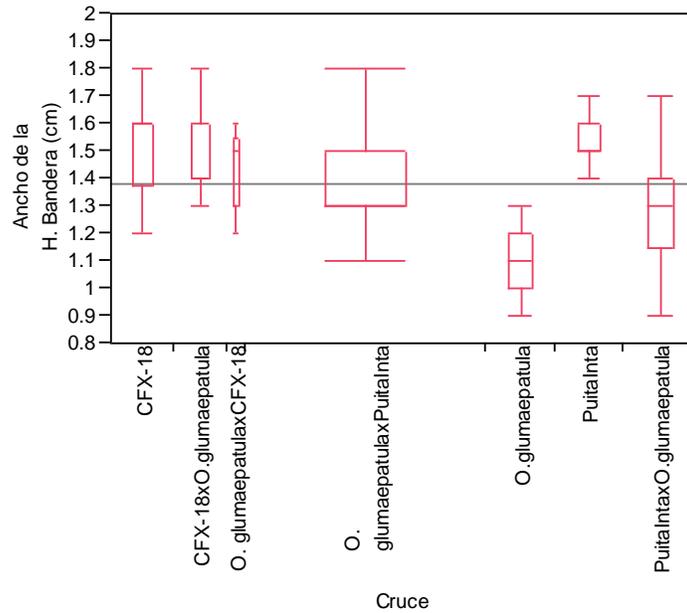


Figura 9. Acho de la hoja bandera a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 11.18$; $gl = 5/149$; $P < .0001$).

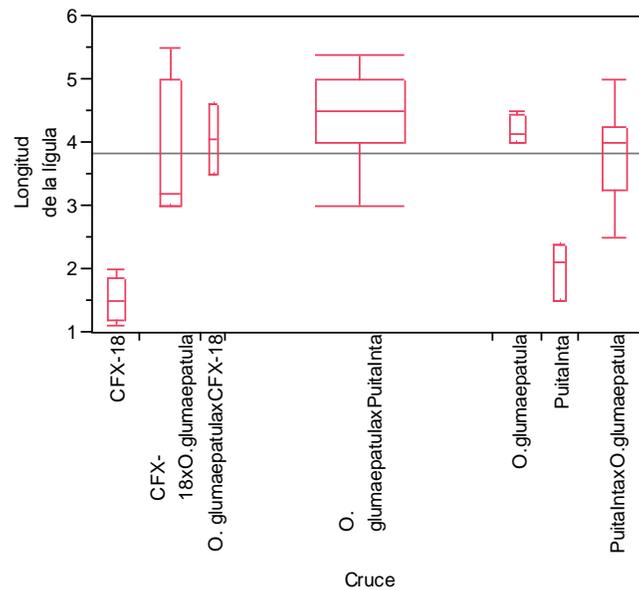


Figura 10. Longitud de la lígula a los 90 días de crecimiento para los híbridos de los cruces, retrocruces y sus progenitores ($F = 14.55$; $gl = 5/149$; $P < .0001$).

Anexo 2

Valores de F de acuerdo a la distribución de probabilidad y Valores de P según el Análisis de Contrastes realizado entre los híbridos y las líneas parentales: *O. glumaepatula* y las variedades comerciales (CFX-18 y Puita Inta)

Cuadro 1. Valores de F según el Análisis de Contrates realizado entre los híbridos y las líneas parentales: *O. glumaepatula* y las variedades comerciales (CFX-18 y Puita Inta)

	Número de Hojas	Altura	Número de brotes	Número de Panículas	Longitud de Panícula	Ramificaciones	Número de granos	la hoja bandera	Hoja bandera	Longitud de la ligula
(<i>O. glumaepatula</i> x Puita)-Puita	0.697	99.030	3.351	1.099	77.839	0.518	0.003	0.556	10.886	34.072
(Puita x <i>O. glumaepatula</i>)-Puita	3.233	44.017	0.691	6.801	48.540	4.401	0.077	3.388	16.704	14.836
(<i>O. glumaepatula</i> x Puita)- <i>O. glumaepatula</i>	9.035	4.920	0.931	12.249	18.874	10.700	0.957	41.935	26.086	0.356
(Puita x <i>O. glumaepatula</i>)- <i>O. glumaepatula</i>	13.955	0.131	0.000	1.161	6.889	1.288	0.224	16.211	7.600	0.712
(<i>O. glumaepatula</i> x CFX-18)-CFX-18	11.590	25.667	0.991	0.123	34.558	3.783	0.280	0.157	0.406	18.762
(CFX-18 x <i>O. glumaepatula</i>)-CFX-18	22.176	41.856	5.350	0.436	71.771	4.336	3.861	2.500	0.010	26.285
(<i>O. glumaepatula</i> x CFX-18)- <i>O. glumaepatula</i>	1.686	3.090	0.256	0.313	12.086	0.065	0.137	15.340	11.074	0.066
(CFX-18 x <i>O. glumaepatula</i>)- <i>O. glumaepatula</i>	2.201	2.008	0.000	0.439	25.601	1.257	5.073	12.448	32.596	0.636

Cuadro 2. Valores de P según el Análisis de Contrates realizado entre los híbridos y las líneas parentales: *O. glumaepatula* y las variedades comerciales (CFX-18 y Puita Inta)

	Núm de Hojas	Altura	Número de brotes	Número de Panículas	Longitud de Panícula	Ramificaciones	Número de granos	la hoja bandera	Hoja bandera	Longitud de la ligula
(<i>O. glumaepatula</i> x Puita)-Puita	0.405	0.000	0.069	0.296	0.000	0.473	0.959	0.457	0.001	0.000
(Puita x <i>O. glumaepatula</i>)-Puita	0.074	0.000	0.407	0.010	0.000	0.037	0.782	0.068	0.000	0.000
(<i>O. glumaepatula</i> x Puita)- <i>O. glumaepatula</i>	0.003	0.028	0.336	0.001	0.000	0.001	0.329	0.000	0.000	0.550
(Puita x <i>O. glumaepatula</i>)- <i>O. glumaepatula</i>	0.000	0.718	0.994	0.283	0.010	0.258	0.637	0.000	0.007	0.399
(<i>O. glumaepatula</i> x CFX-18)-CFX-18	0.000	0.000	0.321	0.726	0.000	0.054	0.597	0.692	0.525	0.000
(CFX-18 x <i>O. glumaepatula</i>)-CFX-18	0.001	0.000	0.022	0.510	0.000	0.039	0.051	0.116	0.919	0.000
(<i>O. glumaepatula</i> x CFX-18)- <i>O. glumaepatula</i>	0.196	0.081	0.614	0.577	0.001	0.799	0.711	0.000	0.001	0.770
(CFX-18 x <i>O. glumaepatula</i>)- <i>O. glumaepatula</i>	0.140	0.000	0.988	0.509	0.000	0.039	0.026	0.001	0.000	0.333

Anexo 3

Protocolo estandarizado de Citometría de Flujo para análisis de cantidad de ADN por núcleo en plantas del género *Oryza*

A. Preparación de la muestra:

1. Pesar 30 miligramos de tejido foliar, preferiblemente de brotes tiernos de la planta.
2. Pesar 10 miligramos de tejido foliar de frijol para usar como control. Este control se debe medir como una muestra separada cada día de trabajo, con el fin de confirmar el desempeño apropiado del equipo.
3. Colocar la muestra en un plato petri, el cual debe estar sobre hielo.
4. Agregar con micropipeta 1 ml de solución buffer Galbraith fresco, preparado como máximo 24 horas antes de la medición y puesto en refrigeración (0-10°C). Este buffer se prepara mezclando 45mM de MgCl, 20mM MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico), 30mM de citrato de sodio, 0.1% (vol/vol) de Triton X-100 y ajustando el pH a 7.0 con NaOH 1M, filtrando con una malla de 0.22µm, y manteniéndolo a -20°C en alícuotas de 10ml.
5. Picar la muestra finamente con un bisturí dentro de la solución buffer, de forma que no se mueva o se aplaste el tejido vegetal.
6. Mezclar la muestra usando la micropipeta y evitar en lo posible la formación de burbujas.

7. Filtrar usando una malla de Nylon con tamaño de malla de al menos 70 μM hacia un tubo de cultivo estéril de polietileno de 12x75 mm.
8. Determinar el volumen aproximado del filtrado usando una micropipeta.
9. Basado en el volumen determinado en el paso 8, determinar la cantidad de yoduro de propidio (PI, Sigma-Aldrich, cat. no. P4170; Molecular Probes, cat. no. D-1306), el cual se prepara a una concentración de 1mg/ml, filtrando a través de un filtro de 0.22 μm , removiendo las pequeñas partículas y manteniéndolo a -20°C en alícuotas de 1ml. Para este procedimiento la concentración final de PI debe ser de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se debe trabajar con precaución, debido a que el PI es mutágeno y moderadamente tóxico.
10. De la misma manera que en el paso 9 se debe determinar el volumen a usar de ARNasa (Sigma-Aldrich, cat. no. D9542; Molecular Probes, cat. no. P-3566), el cual se prepara a una concentración de 1mg/ml, calentando a 90°C por 15 minutos para inactivar las ADNasas. Luego filtrando a través de un filtro de 0.22 μm y manteniéndolo a -20°C en alícuotas de 1ml.

B. Trabajo en el Citómetro de Flujo:

11. Encender el equipo y esperar 10 minutos antes de comenzar las mediciones.
12. Antes de comenzar las mediciones, realizar un lavado de la celda de medición ejecutando el procedimiento “**prime**”.
13. Encender la computadora.

14. Iniciar el programa **CellQuest**.
15. Es esencial trabajar con el citómetro con el flujo de muestra en **Low** para obtener el coeficiente de variación más bajo posible.
16. Escoger los parámetros con los que se va a medir la muestra en y luego en .
17. Nombrar la medición en .
18. Escoger en la carpeta en la que se va a guardar la información y nombrarla en .
19. Usar "Command 1, 2, 3 y 4" para abrir las ventanas en donde se presentan los parámetros de operación del equipo.
20. En la opción buscar, abrir el para modificar el aspecto de los histogramas obtenidos (Escala y Gate).
21. Al comenzar la medición, se debe trabajar en modo para elegir y modificar los parámetros que se consideren necesarios. Una vez que se tienen las condiciones apropiadas, se abandona el modo set up para realizar la adquisición de datos, como se indica en el paso 12.
22. Para realizar la medición formal se debe elegir , luego y .
23. Se debe dejar correr el programa hasta adquirir al menos 10 000 eventos dentro del gate R2.

24. En la opción imprimir se pueden guardar los resultados como PDF.
25. Al finalizar se deben realizar los lavados correspondientes con cloro y agua destilada según el protocolo de uso del citómetro.