

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y MEJORAMIENTO VEGETAL
UNIDAD CIENTÍFICO TECNOLÓGICA DE BASE "LOS PALACIOS"



*Obtención de cultivares de arroz
(Oryza sativa L.) resistentes a
Pyricularia grisea Sacc. con buen
comportamiento agronómico*

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

Autora: Ing. Noraida de Jesús Pérez León

Tutores: Dra. C. María Caridad González Cepero
Dr. C. Manuel Aguilar Portero

MAYABEQUE, 2012

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y MEJORAMIENTO VEGETAL
UNIDAD CIENTÍFICO TECNOLÓGICA DE BASE "LOS PALACIOS"

Obtención de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) resistentes a *Pyricularia grisea* Sacc. con buen comportamiento agronómico

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

Autora: Ing. Noraida de Jesús Pérez León

MAYABEOQUE, 2012

Dedicatoria

A mi hija querida, Anays, por ser la luz de mis días.

*A mi madre, Esperanza León, por darme su amor y apoyo durante toda
mi carrera profesional.*

A mis hermanos y familiares por su apoyo y cariño.

A mi esposo Rodolfo Castro por darle amor a mi vida.

A todos los que de una forma u otra me han ayudado a lograr este fin.

Agradecimientos

Es posible que en este momento no recuerde todos los nombres, ya que han sido muchas las personas valiosas que siempre han estado a mi lado y colaborado incondicionalmente para la realización exitosa de este trabajo, pero siempre estarán todos presentes en mi corazón.

A mis tutores María Caridad González y Manuel Aguilar por sus experiencias, buenos consejos y por su amistad.

A Marta Álvarez, Ramona Márquez y María Margarita Hernández por sus experiencias y apoyo.

A Rogelio Morejón por su excelente apoyo en la edición de gráficos, figuras y presentaciones.

A todos los trabajadores del INCA, de manera especial a los amigos de la UCTB Los Palacios, del Departamento de Genética y Mejora de las Plantas y a Higinio, Mireya, Ernesto, Martha y Magdalena, mis queridos técnicos, algunos ya jubilados, pero todos siempre han estado presentes cuando los necesito.

A todos muchas gracias por su apoyo, ayuda y amistad.

El principal problema fitopatológico que provoca los bajos rendimientos del cultivo del arroz en Cuba es la Piriculariosis causada por el hongo *Pyricularia grisea*. Conociendo este antecedente, se desarrolló el presente trabajo, que tuvo como objetivo la selección de cultivares de arroz, resistentes a *P. grisea* y de buen comportamiento agronómico, obtenidos mediante el empleo del cultivo *in vitro* de anteras de plantas F₂. Se efectuaron cruzamientos entre progenitores resistentes a la Piriculariosis y de buen comportamiento agronómico y las anteras de las plantas F₂ fueron cultivadas *in vitro* para la formación de callos y posterior regeneración de plantas. A la primera y segunda generación de plantas obtenidas se le evaluaron caracteres agronómicos y a la segunda generación, además, el comportamiento frente a la Piriculariosis. Las líneas que combinaron resistencia a la Piriculariosis y buenos caracteres agronómicos fueron evaluadas en condiciones controladas frente a haplotipos agresivos aislados en Cuba y en condiciones de infección natural, con alta presión del patógeno y las que resultaron resistentes fueron caracterizadas, atendiendo a 51 descriptores morfoagronómicos. Como resultados del trabajo fueron identificados cuatro cultivares resistentes a *P. grisea* y seis de buen comportamiento agronómico como progenitores, para el programa de mejora desarrollado. El genotipo y el medio de cultivo empleado fueron determinantes para el éxito del cultivo *in vitro* de anteras. El medio de cultivo NL produjo una mayor formación de callos y tres combinaciones tuvieron la mejor respuesta. En la segunda generación, bajo infección natural de *P. grisea* en campo, se identificaron nueve líneas que combinaron resistencia al patógeno y altos rendimientos, siete de ellas mostraron también resistencia cuando fueron inoculadas con aislamientos de haplotipos cubanos del patógeno y tres líneas mostraron resistencia en campo frente a toda la variabilidad de *P. grisea* existente en "Caribe", localidad que se ratificó como ideal para la evaluación de la enfermedad en Cuba. Se conformó un procedimiento metodológico que acortó el ciclo de mejora, creó variabilidad y logró una rápida fijación de los caracteres, así como una adecuada selección de las líneas por su resistencia a *P. grisea* y principales caracteres agronómicos; una de las cuales ('Anays LP-14') fue inscrita en el Registro Comercial de Variedades Cubanas.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Generalidades sobre el cultivo del arroz.	5
2.1.1. Taxonomía e Importancia del cultivo.	5
2.1.2. Problemas que afectan la producción arrocerá.	6
2.2. Piriculariosis enfermedad causada por <i>Pyricularia grisea</i> Sacc.	6
2.2.1. Haplotipos y linajes genéticos identificados.	7
2.2.2. Factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad.	9
2.2.3. Sintomatología de la enfermedad.	11
2.2.4. Mecanismos empleados por las plantas para evadir la Piriculariosis.	12
2.3. Mejoramiento genético del arroz.	14
2.3.1. Métodos de mejoramiento empleados.	14
2.4. Empleo del cultivo de anteras en el mejoramiento genético.	17
2.4.1. Factores que influyen en la respuesta <i>in vitro</i> de las anteras.	18
2.5. Mejoramiento genético para la resistencia a <i>P. grisea</i> .	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Selección de progenitores por su resistencia a la Piriculariosis y comportamiento agronómico.	30
3.1.1. Evaluación de cultivares comerciales y precomerciales en canteros bajo infección natural de <i>P. grisea</i> .	30
3.1.2. Evaluación de cultivares comerciales y precomerciales en diferentes zonas de producción arrocerá de Los Palacios, Pinar del Río.	33
3.2. Evaluación de haplotipos de <i>P. grisea</i> aislados en Cuba para su utilización en la selección de cultivares resistentes a la enfermedad.	35
3.3. Método de mejoramiento empleado para la obtención de nuevas líneas.	37
3.3.1. Hibridaciones entre los cultivares seleccionados por su resistencia a la Piriculariosis y comportamiento agronómico.	37
3.3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de anteras de plantas F ₂ , provenientes de cruces entre	39

los progenitores seleccionados.	
3.4. Evaluación y selección de líneas isogénicas que integren resistencia a la Piriculariosis con buenos caracteres agronómicos.	40
3.4.1. Evaluación de la primera generación de líneas isogénicas obtenidas <i>in vitro</i> .	40
3.4.2. Evaluación de la segunda generación de líneas isogénicas.	42
3.4.3. Selección de líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis en condiciones semicontroladas con inoculación artificial.	43
3.4.4. Selección de líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis en canteros bajo infección natural.	44
3.4.5. Caracterización de las líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis por su comportamiento agronómico.	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1. Selección de progenitores por su resistencia a la Piriculariosis y comportamiento agronómico.	47
4.1.1. Evaluación de cultivares comerciales y precomerciales en canteros bajo infección natural de <i>P. grisea</i> .	47
4.1.2. Evaluación de cultivares comerciales y precomerciales en diferentes zonas de producción arroceras de Los Palacios, Pinar del Río.	49
4.2. Evaluación de haplotipos de <i>P. grisea</i> aislados en Cuba para su utilización en la selección de cultivares resistentes a la enfermedad.	55
4.3. Método de mejoramiento empleado para la obtención de nuevas líneas.	57
4.3.1. Hibridaciones entre los cultivares seleccionados por su resistencia a la Piriculariosis y comportamiento agronómico.	57
4.3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de anteras de plantas F ₂ , provenientes de cruces entre los progenitores seleccionados.	59
4.4. Evaluación y selección de líneas isogénicas que integren resistencia a la Piriculariosis con buenos caracteres agronómicos.	67
4.4.1. Evaluación de la primera generación de líneas isogénicas obtenidas <i>in vitro</i> .	67

4.4.2. Evaluación de la segunda generación de líneas isogénicas.	71
4.4.3. Selección de líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis en condiciones semicontroladas con inoculación artificial.	82
4.4.4. Selección de líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis en canteros bajo infección natural.	84
4.4.5. Caracterización de las líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis por su comportamiento agronómico.	89
V. CONCLUSIONES	97
VI. RECOMENDACIONES	99
VII. REFERENCIAS	i
VIII. ANEXOS	ii

I. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cereales de mayor producción a nivel mundial y, junto con el trigo, la carne y el pescado, constituyen la base de la alimentación humana; el 75% de la población mundial lo incluye en su dieta alimenticia diaria y puede superar, en algunos casos, el consumo de otros cereales (Álvarez *et al.*, 2008; Méndez, 2011).

En Cuba constituye la principal fuente de carbohidratos en la alimentación de la población, con un consumo aproximado de 670 000 toneladas al año. Hasta el momento, la producción nacional solo satisface un poco más del 50% de las necesidades, por lo que el país se ve obligado a completarlas con importaciones. El rendimiento agrícola promedio se mantiene cercano a las 3 t.ha⁻¹, inferior a la media mundial, lo que es motivado por diferentes causas, entre las que se encuentran: siembras fuera de la época óptima, malas atenciones culturales, carencia de riego, la continua salinización de los suelos y las afectaciones provocadas por plagas (MINAG, 2011).

Entre las plagas importantes que atacan al cultivo se destaca el hongo *Magnaporthe grisea* Barr (*Pyricularia grisea* Sacc) que provoca la Piriculariosis, enfermedad considerada como la más devastadora a nivel mundial, debido a su amplia distribución (Castejón-Muñoz, 2008). Afecta hojas, tallos, nudos de la planta y las diferentes partes de las panículas y granos, lo que produce una significativa disminución en los rendimientos agrícolas (Castejón-Muñoz *et al.*, 2007) y en ocasiones, la pérdida completa de la cosecha, todo lo cual presenta a esta enfermedad como una seria limitación en la producción de este cultivo y es el principal problema fitopatológico en Cuba (Cárdenas *et al.*, 2007a).

La producción arrocera cubana estuvo sustentada durante mucho tiempo por un solo cultivar, J-104, susceptible a la Piriculariosis, lo que trajo como consecuencias afectaciones

severas de los rendimientos, así como la realización de aplicaciones de fungicidas para atenuar los daños del hongo, que encarecieron los costos de producción del cultivo y aumentaron la contaminación del medio ambiente. Aunque en la actualidad se siembran entre dos y cuatro cultivares por zona arroceras, estas no son resistentes a la enfermedad; por lo que el problema persiste y el desarrollo de cultivares resistentes, es aún una vía económica importante para el control de la enfermedad con menor impacto ambiental (Zambrano *et al.*, 2006).

Por otro lado, se conoce que varios genes están involucrados en la herencia de la resistencia a la enfermedad y la alta variabilidad que muestra el patógeno, provoca la aparición de nuevos haplotipos capaces de superar la resistencia de los cultivares (Berrio *et al.*, 2004; Livore, 2008). Todo ello implica que, para realizar la selección de progenitores y líneas resistentes, se requiere tener identificado el sitio donde exista una alta presión y diversidad del patógeno, asociada a condiciones ambientales favorables para su desarrollo, lo que permitirá la selección de líneas de arroz que combinen un gran número de genes, que posibiliten que la resistencia sea más estable y duradera (Zambrano *et al.*, 2006).

En Cuba, la localidad "Caribe", perteneciente al Complejo Agroindustrial Arroceros "Los Palacios", ha mostrado históricamente una alta incidencia de la enfermedad (MINAG, 2011) y se utiliza para los trabajos de mejoramiento genético del cultivo, que incluyen entre sus objetivos, desarrollar cultivares con resistencia a la Piriculariosis.

Por otra parte, en todo programa de mejora para resistencia a enfermedades, se necesita poseer la fuente de resistencia genética, establecer las condiciones idóneas de infección del patógeno, con el fin de garantizar una efectiva selección y escoger el método de mejoramiento adecuado.

Dentro de ellos, el cultivo *in vitro* de anteras de plantas F₂ presenta numerosas ventajas, ya que la población proveniente de esta combinación de métodos de mejora (hibridaciones y cultivo *in vitro*), representa la variabilidad genética de la población F₂ y las plantas obtenidas *in vitro* son genéticamente homocigóticas. Esto reduce el tiempo para la obtención de los nuevos cultivares, ahorra recursos financieros y materiales y aumenta la eficiencia de la selección, lo cual facilita la identificación de individuos superiores (Ramakrishnan *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; MINAG-Perú, 2009).

En Cuba, los programas de mejoramiento para agroecosistemas de aniego se han sustentado principalmente en las hibridaciones, mediante las cuales se han obtenido cultivares de alto potencial de rendimiento pero susceptibles a la Piriculariosis (Suárez *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2000; IIArroz, 2001). Teniendo en cuenta la problemática planteada fue concebida la siguiente:

Hipótesis: El cultivo *in vitro* de anteras de plantas F₂ procedentes de cruces en los que intervienen cultivares resistentes al hongo *P. grisea*, crea variabilidad y permite la selección de cultivares de arroz resistentes al patógeno y de buen comportamiento agronómico, bajo las condiciones cubanas.

Para dar respuesta a esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General: Selección de cultivares de arroz, resistentes a *P. grisea* y de buen comportamiento agronómico, obtenidos mediante el empleo del cultivo *in vitro* de anteras de plantas F₂.

Objetivos específicos:

1. Seleccionar progenitores con resistencia a la Piriculariosis y buen comportamiento agronómico para el programa de cruzamientos.

2. Obtener líneas isogénicas a partir del cultivo *in vitro* de anteras de plantas F₂, provenientes de cruces entre los progenitores seleccionados.
3. Evaluar las líneas obtenidas y seleccionar aquellas que integren resistencia a la Piriculariosis con buen comportamiento agronómico.

Novedad Científica.

Se desarrolla un procedimiento metodológico, dirigido a la obtención de cultivares cubanos de arroz resistentes a la Piriculariosis y de buen comportamiento agronómico, que integra el cultivo *in vitro* de anteras de plantas F₂ como método de mejora con una adecuada selección de progenitores y de las líneas logradas.

Importancia práctica.

Se obtienen, por primera vez en Cuba, cultivares de arroz que combinan resistencia a *P. grisea* con buenos caracteres agronómicos y se acorta el ciclo de mejora, lo que constituye una vía más económica para enfrentar el ataque de la enfermedad. Se inscribe el cultivar 'Anays LP-14', en el Registro de Variedades Comerciales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades sobre el cultivo del arroz.

2.1.1. Taxonomía e importancia del cultivo.

El arroz (*Oryza sativa* L.), planta monocotiledónea ubicada dentro del Grupo Fanerógama, Tipo Espermatofita, Subtipo Angiosperma, Clase Monocotiledónea, Orden Glumiflora, Familia Gramínea, Subfamilia Panicoideas, Tribu *Oryzae*, Subtribu *Oryzineas* y Género *Oryza* (Alvarado, 2007), constituye el alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Ocupa el segundo lugar con respecto a superficie cosechada y proporciona más calorías que cualquiera de los otros cereales cultivados (Acevedo *et al.*, 2006).

Dentro de sus virtudes alimenticias se destaca que es rico en vitaminas y minerales, es bajo en grasa y sal y está libre de colesterol (CIAT, 2006). Aunque, como todos los cereales, tiene un aporte básicamente calórico a la dieta, no debe menospreciarse el componente proteico, cuyo contenido medio es 8,7% en el arroz cargo (descascarado sin pulir) y 7,8% en el elaborado (Carreres y León, 1999).

Para el año 2030 el mundo debe producir más arroz para satisfacer las demandas del rápido crecimiento de la población; para enfrentar este desafío se considera una estrategia importante, aumentar la potencialidad de rendimiento de los cultivares (Yamazaki, 2001).

El cultivo del arroz llega a Cuba después de 1770 y se cultiva junto a las viandas y frijoles (Deus, 1995); en la actualidad se ha extendido a casi todas las regiones del país y cobra cada día mayor importancia, pues constituye unas de las principales fuentes de carbohidratos en la alimentación de la población.

2.1.2. Problemas que afectan la producción arrocerá.

El papel del clima en la agricultura ha sido visto como pasivo (Espriella *et al.*, 2001); sin embargo factores climáticos tales como la temperatura, la radiación solar y el viento tienen influencia sobre el rendimiento del arroz, ya que afectan el crecimiento de la planta y los procesos fisiológicos relacionados con la formación del grano (Chaudhary *et al.*, 2005).

En Cuba el rendimiento agrícola promedio se mantiene cercano a las 3 t.ha⁻¹, inferior a la media mundial, lo que es motivado por diferentes causas, entre las que se encuentran: siembras fuera de la época óptima, malas atenciones culturales, carencia de riego, la continua salinización de los suelos y las afectaciones provocadas por plagas (MINAG, 2011). Estas últimas, en determinadas condiciones ambientales, constituyen los factores limitantes de mayor importancia en la explotación de este cereal (Cordero y Rivero, 2001).

El hongo *Pyricularia grisea* es el causante de la enfermedad más importante en el cultivo del arroz y la principal limitante de la producción (Correa-Victoria y Prado, 2004). Se encuentra en todos los agroecosistemas de los trópicos y las zonas templadas en que se cultiva el arroz comercialmente (Castejón-Muñoz *et al.*, 2007).

2.2. Piriculariosis, enfermedad causada por *Pyricularia grisea* Sacc.

La Piriculariosis, causada por *Pyricularia grisea* Sacc, ataca las hojas, tallos, nudos de la planta y las diferentes partes de las panículas y granos, produciendo una significativa disminución de los rendimientos agrícolas (Alves y Fernández, 2006; Castejón-Muñoz *et al.*, 2007; Galbieri y Urashima 2008).

El empleo de cultivares resistentes ha sido el método más usado para el control de la enfermedad, pero la resistencia es efectiva por dos o tres años, debido al surgimiento de nuevas formas virulentas del patógeno; por esta razón, el manejo integrado del patógeno

requiere de la resistencia de los cultivares como componente fundamental, del uso racional de fungicidas y de prácticas culturales adecuadas (Correa-Victoria y Zeigler, 1994; Santos *et al.*, 2003; Rangel *et al.*, 2006; Prabhu y Filippi, 2006).

En Cuba las zonas más afectadas por la enfermedad son los Complejos Agroindustriales Arroceros "Sur del Jíbaro" (provincia Sancti Spiritus) y "Los Palacios" (provincia Pinar del Río) y dentro de este último, la localidad "Caribe", donde la Piriculariosis es uno de los factores limitantes en la producción; esta se presenta también en otras áreas arroceras, razón por la cual constituye el principal problema fitopatológico del cultivo en el país (Cárdenas *et al.*, 2007a; MINAG, 2011).

2.2.1. Haplotipos y linajes genéticos identificados.

La Piriculariosis está considerada como una enfermedad compleja, debido a su variabilidad patogénica (Anjos *et al.*, 2009) y la rapidez con la que el hongo que la provoca vence la resistencia de la planta de arroz (Infoagro, 2005).

Con la aplicación de técnicas moleculares, Levy *et al.* (1991) agruparon la alta diversidad de patotipos de la población en un grupo más pequeño de linajes, según su similitud genética. La estructura de linaje genético es consistente con la forma de reproducción del patógeno. Se asume que el hongo se reproduce asexualmente en el campo, pues el estado perfecto se ha obtenido sólo bajo condiciones de laboratorio.

Estos mismos autores constataron una asociación de patotipos y linajes en el transcurso de 30 años, que refuerza la hipótesis de una preexistencia de diferentes patotipos en las poblaciones del patógeno, más que la existencia de un alto ritmo de variabilidad. En trabajos posteriores, Levy *et al.* (1993) y Correa-Victoria y Zeigler (1994) mostraron una relación patotipo-linaje más compleja, donde cada linaje expresó un subconjunto específico

de los patotipos presentes en la población (39 razas) y los patotipos de cada subconjunto mostraron un espectro de virulencia estrechamente relacionado (Correa-Victoria *et al.*, 1994; Manry *et al.*, 2000).

En Filipinas, Zeigler *et al.* (1995), en estudios desarrollados con poblaciones del patógeno, identificaron 71 haplotipos pertenecientes a seis linajes genéticos y observaron una consistente incompatibilidad para la mayoría de las combinaciones hospedero-linaje, lo que condujo a la suposición de que, aunque algunos genes de resistencia pueden ser fácilmente superados o vencidos por un linaje dado del patógeno, estos mismos genes de resistencia pueden ser un buen obstáculo para otros linajes de la población, y viceversa (Livore, 2008).

En Cuba, la primera documentación sobre estudios de identificación de razas del hongo *P. grisea* data del año 1984 (Fabregat, 1984) y mostró la presencia de cuatro razas descritas internacionalmente (1A-1, 1A-2, 1B-1, ID-5).

En trabajos posteriores se evaluó la diversidad genética del hongo, en dos zona del país que históricamente habían sido afectadas por la enfermedad ("Los Palacios" y "Sur del Jíbaro"), durante los años 1995-1997; los resultados mostraron que la población total del patógeno estuvo formada por cuatro linajes genéticos clonales estrechamente relacionados y se caracterizó por la presencia de un alto número de haplotipos (134). La población del patógeno de la región de "Los Palacios" presentó la mayor diversidad genética y el mayor número de linajes genéticos, lo que está en correspondencia con el hecho de ser esta región la de mayor incidencia de la enfermedad en el país (Fuentes, 1998). Concluye este mismo autor además, que las poblaciones del patógeno en Cuba, muy posiblemente estén relacionadas genéticamente con las poblaciones colombianas, en particular con los linajes SRL 4, SRL-5 y SRL-6.

La gran variabilidad patogénica del hongo *P. grisea* es una de las mayores limitantes en el mejoramiento genético, por lo que la caracterización de los linajes, presentes en cada país, contribuye de manera significativa al establecimiento de estrategias de mejoramiento basadas en la teoría de exclusión de linajes, tomando en cuenta que en cada región donde se cultiva arroz existen grupos de linajes diferentes y, por lo tanto, se deberán seleccionar progenitores que aporten genes de resistencia a dichos grupos (Zambrano *et al.*, 2006).

2.2.2. Factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad.

Los factores del ambiente y la planta que favorecen el desarrollo del hongo son las bajas temperaturas en las noches, seguidas de días calurosos y de humedad relativa alta, lloviznas prolongadas, luminosidad escasa, vientos suaves, períodos de rocío de 12 a 24 horas, la fertilización nitrogenada, la constitución genética de los cultivares y el tipo y las características del suelo (Meneses *et al.*, 2001).

La temperatura óptima para que se desarrolle el micelio del hongo en las plantas es de 28°C y las lesiones se producen cuando la humedad relativa está cercana al 90% (Piñeiro y García, 2000; Meneses *et al.*, 2001; Infoagro, 2005). La producción de conidios ocurre aproximadamente seis días después de la inoculación y el máximo potencial de esporulación es a temperaturas próximas a los 20°C, pero se alcanza más temprano a temperaturas un poco más altas (Cordero y Rivero, 2001).

Según Castaño (1985), el suelo seco y una alta humedad relativa favorecen el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, Kim (1987) sugirió que las diferencias observadas en la susceptibilidad a *P. grisea* entre las plantas crecidas bajo diferentes condiciones de humedad del suelo no tienen relación con la actividad de penetración del hongo en esas plantas.

Asimismo, Cordero y Rivero (2001) aseguran que la mayoría de las esporas se producen y liberan durante la noche y que las gotas de agua sirven de vehículo para su traslado desde las zonas de esporulación hasta las zonas más bajas de la planta, por lo que la lámina de agua del aniego, con su efecto termorregulador, limita la aparición de las gotas de rocío y contribuye a eliminar esa vía de infección.

Por otra parte, el viento y la lluvia actúan como agentes diseminadores (Ou, 1972). En estudios realizados en Cuba por Fabregat (1988), se determinó que la diseminación conidial fue superior a 110 conidios / cm² en los meses de enero a junio con fuerza de los vientos hasta de 3 m / seg; la mayor diseminación ocurrió en los meses de febrero a abril y junio a julio, con 150 y 50 conidios / cm² a 50 cm de altura y 140 y 40 conidios / cm² a 100 cm de altura. Por su parte, Kim *et al.* (1989), en pruebas realizadas para estudiar el proceso de liberación de conidios durante la lluvia, revelaron que los conidios fueron liberados continuamente durante la lluvia, existiendo dos picos aparentes entre la 1 y las 2 a.m. y las 7 a.m., con un mayor número de conidios en las lesiones de siete días.

Con respecto al efecto que provoca la fertilización, se ha observado que el ataque del patógeno es más drástico cuando se aplican fertilizantes nitrogenados de acción rápida, tales como el sulfato de amonio o cuando se manifiesta algún efecto retardado de la fertilización, lo cual ocurre porque la aplicación fue con una dosis muy alta o la temperatura fue muy baja en las primeras etapas de crecimiento de la planta; de igual forma, en algunos cultivares de arroz que poseen alto contenido de nitrógeno y de aminoácidos libres, se facilita el establecimiento del patógeno y el desarrollo de la enfermedad (Meneses *et al.*, 2001); algo similar sucede si las concentraciones en nitrógeno del agua de riego son elevadas (Infoagro, 2005).

En este sentido, Barbosa (1987) indicó que la alta susceptibilidad a la enfermedad por aumento de nitrógeno se debe a una mayor área foliar como respuesta de la planta al nitrógeno; con ello, baja la resistencia de las células de la epidermis a la infección del hongo, baja el contenido de sílice en las células de la epidermis y aumenta el nitrógeno soluble principalmente de aminoácidos, aminas y carbohidratos constituyendo; esta situación un buen medio de cultivo para el hongo.

Las fenofases del arroz más sensibles a la Piriculariosis son: el inicio del ahijamiento y la paniculación. La infección decrece gradualmente con la edad de la planta en todos los cultivares y, tanto en cultivares resistentes como susceptibles, puede disminuir la sensibilidad a la enfermedad en los estadios tardíos de crecimiento (Koh *et al.*, 1987).

Otro factor a tener en cuenta es que el hongo *P. grisea* cuenta con un gran número de plantas hospederas, que incluye gramíneas y algunas dicotiledóneas, (Mackill, 1986; Devulapalle y Suryanarayanan, 1995) las que pueden estar presentes en los campos de arroz y favorecer el desarrollo y propagación de la enfermedad.

2.2.3. Sintomatología de la enfermedad.

La piriculariosis puede manifestarse en la hoja, los nudos del tallo, el cuello de la panícula y la panícula misma del arroz; las lesiones foliares varían desde pequeños puntos de color café hasta rombos o diamantes de color verde olivo o gris, rodeados por un halo más claro; los bordes de la lesión son de color pardo o pardo oscuro; completamente desarrolladas las lesiones pueden medir entre 1-1,5 cm de longitud y de 0,3-0,5 cm de ancho y pueden crecer hasta juntarse unas con otras. La forma, color, tamaño y número de las lesiones varían según las condiciones ambientales, la edad de la planta y el grado de susceptibilidad del cultivar (Meneses *et al.*, 2001).

En los nudos de los tallos, los síntomas son lesiones de color café oscuro en forma de anillos, el pulvínulo de la vaina foliar se pudre, se dobla y se parte permaneciendo unido a la vaina sólo por el septo (Meneses *et al.*, 2001).

En el cuello de la panícula se forma inicialmente una mancha de color pardo grisáceo que rodea su base. Si el ataque se presenta durante la floración puede ocurrir vaneamiento total de la panícula y cuando el grano se halla en estado lechoso, la maduración puede anticiparse y se cosecharán granos manchados, vanos o parcialmente formados y normales de baja calidad molinera (Correa-Victoria *et al.*, 1997; Meneses *et al.*, 2001; Cárdenas *et al.*, 2005b).

2.2.4. Mecanismos empleados por las plantas para evadir la Piriculariosis.

Las plantas no se comportan como hospederos pasivos frente a los microorganismos con los que interactúan, se defienden con un grupo de mecanismos clasificados en pasivos o preexistentes, en los que se incluyen barreras estructurales (cutícula, reservorios de compuestos antimicrobianos localizados estratégicamente) y activos, los cuales se dan en respuesta a un patógeno invasor (Zipfel, 2008; Boller y He, 2009; Ojito-Ramos y Portal, 2010).

De forma general, la respuesta de defensa de las plantas la podemos separar en dos fases, la primera, que involucra el reconocimiento de los ejecutores del patógeno por parte de la célula vegetal y una segunda, que implica la activación de las diferentes rutas de defensa; entre ellas se encuentra la respuesta de hipersensibilidad, generación de especies de oxígeno reactivas, fortificación de la pared celular y síntesis de compuestos con actividad antimicrobiana, como lipoxigenasas y fitoalexinas, así como también la activación de rutas

de señalización dirigidas por el ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (Jones y Dang, 2006; He *et al.*, 2007).

Existe una amplia gama de mecanismos defensivos de las plantas, agrupados bajo lo que se ha denominado respuesta de hipersensibilidad (Pérez, 2002). Esta involucra una muerte rápida de células situadas alrededor del sitio de penetración del patógeno, que puede ser responsable de la detención del crecimiento de éste. Las células necróticas a menudo sirven como reservorios de compuestos antimicrobianos, incluyendo fitoalexinas que son sintetizadas en las células que rodean la lesión (de Wit, 1992).

Algunos autores plantean, que la invasión a la planta por un determinado microorganismo da lugar a una estimulación de sus defensas mediante los elicitores, que son moléculas de origen biótico, producto de la acción de las enzimas hidrolasas del patógeno sobre el tejido vegetal o viceversa; estas sustancias desencadenan en las plantas mecanismos defensivos que provocan una resistencia sistémica ante el ataque de los patógenos. Dentro de estos mecanismos se incluyen, el incremento en la activación de enzimas, tales como la fenilalanina amonio liasa, la cual es clave en la síntesis de metabolitos defensivos importantes, donde se destacan las fitoalexinas (antibióticos vegetales), que constituyen compuestos altamente tóxicos, también se inducen otras enzimas defensivas entre las que se encuentran β -1,3 glucanasas, quitinasas, quitosanasas y las PR proteínas (Lawrence *et al.*, 1996; Inui *et al.*, 1997, citados por Rodríguez, 2003).

Así mismo, las plantas poseen genes "R" que interactúan con los genes "Av" de avirulencia en el patógeno los que son por lo tanto, en su mayoría, responsables de la resistencia, ya que el reconocimiento a tiempo del patógeno puede favorecer la rápida respuesta de la planta y así evitar que ocurra la infección. En arroz se han identificado más de 25 genes de

resistencia (R), muchos de los cuales son alelos o se encuentran ligados a la familia *Pi-ta*, los que le confieren resistencia a la planta portadora por medio del reconocimiento del gen *AVR-Pita* del patógeno; este es translocado al interior de la célula, donde el receptor citoplasmático *Pi-ta* es capaz de detectarlo, disparando así la respuesta de defensa (Qu *et al.*, 2006, citados por Franco y Galindo-Castro, 2009).

2.3. Mejoramiento genético del arroz.

En programas de mejoramiento genético de especies autógamas se utiliza la variabilidad genética disponible en los cultivares locales o introducidos. Cuando esta variabilidad no existe, el fitomejorador debe formar nuevas poblaciones para realizar selección (Acevedo *et al.*, 2007). Muchas son las herramientas utilizadas en este proceso, dentro de las que se encuentran las hibridaciones, la inducción de mutaciones, el cultivo *in vitro* de tejidos y la ingeniería genética.

2.3.1. Métodos de mejoramiento empleados.

En Cuba, los programas de mejoramiento del arroz, se han sustentado principalmente en las hibridaciones, mediante las cuales se han obtenido cultivares tales como 'J-104', seleccionado en Cuba a partir de líneas segregantes procedentes de cruces realizados en Perú, el cual ocupó durante muchos años la mayoría del área sembrada con el cultivo (IIArroz, 2001). Hasta 1997 fueron obtenidos dos cultivares de ciclo corto que llegaron a ser comerciales: 'Amistad'82', que dejó de sembrarse a partir de 1990 por problemas fitotécnicos y 'Perla de Cuba', altamente susceptible al complejo ácaro – hongo (*Stenotarsonemus spinki* Smiley – *Sarocladium oryzae*) (Suárez *et al.*, 1997).

A partir del año 2002 el cultivar 'INCA LP-5', obtenido de un cruce simple, es el que ocupa el mayor porcentaje de área sembrada en el país. Se caracteriza por sus hojas de color verde

que mantienen una senescencia lenta, muy vigoroso, de ciclo vegetativo corto, excelente rendimiento agrícola e industrial y resistente a Sogata (*Tagosodes oryzae* Muir) (Pérez *et al.*, 2000).

El rescate de embriones de cruces interés específicos constituye una técnica auxiliar que rompe las barreras de posfertilización que ocurren en estos cruces alejados y permite crear cultivares con tolerancia a las principales enfermedades del arroz y factores del medio ambiente, aprovechando los genes de resistencia que poseen las especies silvestres. Los cruzamientos con *Oryza glaberrima* Steudt, por ejemplo, aportan líneas con tolerancia a *P. grisea* (Pérez-Almeida, 2005).

El Centro Internacional de Agricultura Tropical de Colombia ha tenido buenos resultados con el uso de esta técnica, a partir de *Oryza nivara* Sharma y Shastry (Hernández, 2006). También el programa de mejoramiento del Instituto de Investigaciones del Arroz de Cuba cuenta con líneas avanzadas procedentes de cruces de *Oryza latifolia* Desv por *Oryza sativa* L.; estas líneas, en ensayos preliminares, mostraron resistencia a la Piriculariosis (Pérez *et al.*, 2002).

Por otra parte, la inducción de mutaciones es una herramienta muy valiosa cuando se desea mejorar uno o dos caracteres fácilmente identificables, en un cultivar bien adaptado. Su utilización ha permitido obtener nuevos cultivares de arroz, trigo, cebada, manzana, caña de azúcar, entre otros (FAO, 2006).

Trabajos desarrollados por el Instituto de Investigaciones del Arroz de Cuba utilizando neutrones rápidos y radiaciones gamma de Co⁶⁰ en el donante, el cultivar 'J-104', informaron como resultado cinco mutantes: 'IACuba 21', 'IACuba 22', 'IACuba 23', 'IACuba 27' e 'IACuba 28' (Suárez *et al.*, 2000). También, investigadores del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas obtuvieron mutantes de arroz (Suárez y González, 2004;

González *et al.*, 2009) y registraron el cultivar 'Gines' como el primero de ellos obtenido a partir del cultivo *in vitro* de semillas del cultivar de arroz 'J-104' irradiado con protones, el que supera al donante en su tolerancia a la salinidad, producción de granos enteros, capacidad de ahijamiento y menor ciclo vegetativo.

En lo referente al cultivo *in vitro* de tejidos, la variación somaclonal es un fenómeno originado por mutaciones puntuales, por la ocurrencia de arreglos cromosomales, metilación del ADN o inserciones de transposones (Jain, 2001). Existen dos maneras de aprovechar estas variaciones somaclonales, selección de la población regenerante a partir de cultivos celulares y selección de líneas celulares que resultan resistentes a algún estrés de tipo físico o químico. En arroz se ha usado, ésta última, para seleccionar materiales tolerantes a condiciones de alta salinidad, toxicidad por aluminio, y estrés por frío (Torrealba *et al.*, 2006).

En Cuba, González (1998), mediante el cultivo *in vitro* de semillas maduras del cultivar de arroz 'Amistad'82' en diferentes subcultivos y condiciones salinas, obtuvo un grupo de somaclones tolerantes a la salinidad y la sequía, sobresaliendo el cultivar 'INCA LP-7' por su alto rendimiento agrícola y excelente comportamiento frente al ataque de *Steneotarsonemus spinki* Smiley (ácaro blanco). Otros dos somaclones fueron obtenidos también por el Instituto de Investigaciones del Arroz de Cuba ('IACuba 25' e 'IACuba 26') (Fuentes *et al.*, 2003), el primero con excelente comportamiento en zonas afectadas por sales, pero con el inconveniente de su susceptibilidad al ataque del ácaro (*Steneotarsonemus spinki* Smiley).

2.4. Empleo del cultivo de anteras en el mejoramiento genético.

El cultivo de células aisladas de plantas, los conocimientos sobre reguladores de crecimiento vegetal y los medios de cultivo hicieron posible que el cultivo *in vitro* de anteras se integrara con éxito a los programas de mejoramiento. Su utilización ha permitido la liberación de cultivares de alto rendimiento, resistentes a plagas y mejor calidad de grano (Bishnoi *et al.*, 2000; INIA, 2006).

Una población de plantas dobles - haploides provenientes del cultivo de anteras de plantas F_2 , representa la variabilidad genética de la población F_2 , con la ventaja de que las plantas son genéticamente homocigóticas, por lo que se reduce el tiempo en obtener los cultivares; hay economía de recursos financieros y materiales, al no requerir grandes áreas de siembra, ni otros costos de producción; aumenta además, la eficiencia de la selección, tanto en caracteres cualitativos como cuantitativos y facilita la selección de los cultivares superiores (Jiang *et al.*, 2004; Pérez-Almeida, 2005; Ramakrishnan *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; MINAG-Perú, 2009; Purwoko *et al.*, 2010).

Entre las desventajas de esta técnica, se puede mencionar que la respuesta a su utilización muestra una alta dependencia del genotipo (Bishnoi *et al.*, 2000; Pérez-Almeida, 2005; Grewal *et al.*, 2006; Niroula y Bimb, 2009; Khatun *et al.*, 2010; Gueye y Ndir, 2010). En Cuba los cultivares comerciales de arroz son de tipo *índica*, conocidos por ser más recalcitrantes al cultivo de tejidos (Saharan *et al.*, 2004), ya que muestran necrosis temprana de las anteras, poca respuesta a la inducción de callos y un desarrollo pobre de estos (Dewi y Purwoko, 2008). El costo inicial del equipamiento de un laboratorio de cultivo de anteras puede ser además relativamente alto pero, a mediano plazo, esta

inversión se recupera al reducir en un 30% los costos de la obtención de los nuevos cultivares.

La utilización de esta técnica de mejoramiento ha aportado resultados en diferentes países; por ejemplo, Casale (2006) informó la obtención de cultivares adaptados a las condiciones de Venezuela a través del cultivo de anteras y embriones inmaduros. En Chile, las generaciones F_1 y F_2 procedentes de cruces triples mostraron alta esterilidad, mientras que por cultivo de anteras se obtuvieron 941 líneas R_2 , que fueron evaluadas y seleccionadas para tolerancia al frío, mejor calidad, precocidad y mayor rendimiento, lo que redujo considerablemente el tiempo de obtención de nuevas líneas (Lentini *et al.*, 2006). En Colombia, Borrero *et al.* (2011) obtuvieron líneas homocigóticas fértiles a partir de cruces interéspecíficos entre *Oryza sativa* L. y *Oryza barthii* Chev, así como entre *Oryza glaberrima* Steudt y *Oryza rufipogon* Griff, las que constituyen nuevas fuentes de resistencia a plagas.

2.4.1. Factores que influyen en la respuesta *in vitro* de las anteras.

Existen diferentes factores que influyen en la producción de plantas dobles - haploides derivadas del cultivo de anteras de arroz, como son, el genotipo, el albinismo, las condiciones ambientales, el estado fisiológico de la planta donante, el estado de desarrollo del polen al iniciarse el cultivo, el tratamiento de la antera antes del cultivo, la pared de la antera y el medio de cultivo (Mahmuda *et al.*, 2003; Chen y Qin, 2008).

El genotipo es el factor que más influye en la formación de callos, en la capacidad del callo de diferenciar plantas, en la proporción de plantas verdes y albinas y en la ploidía de las plantas regeneradas. Es posible producir un alto número de líneas isogénicas de muchos cultivares de arroz *japónica*, mientras que la producción de callos y regeneración de plantas

verdes de la mayoría de los cultivares de tipo *índica* es baja (Sangwan, 2004; Sarla y Mallikarjuna, 2005; Grewal *et al.*, 2006; Javed *et al.*, 2007; Silva y Ratnayake, 2009). En este sentido, existen evidencias de que la respuesta de los cultivares, a la inducción de callos y regeneración de plantas, es muy heredable y se controla por genes nucleares (Kwon *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que pudiera ser posible transferir dichos genes hacia líneas recalcitrantes a través de recombinación genética (Bagheri y Jelodar, 2008).

La producción de plantas albinas, según Chen *et al.* (1991), puede ser debida a la falta de expresión de los genes responsables del desarrollo normal de los cloroplastos y la síntesis de clorofila bajo las condiciones de cultivo *in vitro*. Su frecuencia aumenta con la edad del callo, la temperatura (>26 °C) de inducción y regeneración de las plantas, la clase y concentración de reguladores de crecimiento (2,4-D >2 mg/L), la concentración de sacarosa (> 6%) en el medio de inducción, la concentración de sales (< 0,4 mg equivalente de Fe⁺²) en el medio de cultivo, y el estado de desarrollo del polen durante el cultivo de las anteras (posterior al estado uninucleado tardío). De esta forma, la propia manipulación de estos factores puede también ayudar a minimizar la frecuencia de producción de albinos.

Caredda *et al.* (2004) señalaron que el albinismo es un fenómeno común en el cultivo de anteras de cereales, que no se inicia durante la regeneración de las plantas, sino en estados anteriores durante los procesos androgenéticos. Por su parte Ankele *et al.* (2005), consideran que la formación de la planta albina es un fenómeno complejo en el cual están involucrados los plastidios y factores nucleares o sus interacciones defectivas.

Otros factores, como las condiciones de crecimiento de las plantas donantes; dentro de ellas, el fotoperíodo, la intensidad de luz, la temperatura, la nutrición mineral, tratamientos

físicos y la aplicación de hormonas, también pueden influir en la respuesta de las microsporas al cultivo *in vitro* (Chen *et al.*, 1991).

Por su parte, el estado fisiológico de la planta donante justo en el momento en que se cosechan las panículas influye en los resultados obtenidos. Las anteras de las primeras inflorescencias, cosechadas en días soleados y entre las 8.00 y las 10.00 a.m. tienen una mayor capacidad de respuesta (Bishnoi *et al.*, 2000).

Las temperaturas óptimas para el crecimiento de las plantas y para que estas muestren una mejor respuesta al cultivo *in vitro* de anteras es 19/29 °C noche/día y temperaturas superiores a los 35°C tienden a influir en la generación de un mayor porcentaje de plantas albinas. En algunos casos la deficiencia de nitrógeno en las plantas donantes, al igual que la aplicación de gametocidas a las panículas en sus estados iniciales de desarrollo, incrementan la respuesta de las anteras al cultivo *in vitro* (Chen *et al.*, 1991).

Por otro lado, diferentes estudios indican que el estado de desarrollo del polen entre uninucleado medio y uninucleado tardío es el óptimo para asegurar una respuesta exitosa. Si la siembra de las anteras en el medio nutritivo se realiza en una etapa anterior o posterior, la producción de callos decrece notablemente (Yamagishi, 2002; Chang-Hyu *et al.*, 2002; Shahnewaz *et al.*, 2003).

Diversos ensayos sobre el tratamiento de la antera antes del cultivo han demostrado que la inducción óptima se consigue colocando las anteras, con microsporas en estado uninucleado medio, por siete días en oscuridad y entre 8-10°C, lo cual incrementa la formación de callos y la diferenciación de plantas verdes. Un tratamiento previo en frío por más de 14 días, reduce la capacidad morfogénica de los callos e incrementa la producción de plantas albinas. No existe un efecto significativo cuando el tratamiento es aplicado

después que las anteras son cultivadas en el medio de inducción (Tsay y Chen, 1984; Datta, 2001; Jain y Maluszynski, 2004; Bhojwani *et al.*, 2009; Herat *et al.*, 2009).

Según Suderland (1978), el tratamiento con frío en ausencia de luz reduce la actividad respiratoria de las anteras al disminuir el consumo de materiales y prolonga la actividad biológica del arqueosporio que alberga a los granos de polen, mantiene su viabilidad, evita la dehiscencia prematura de las anteras en el cultivo y retrasa la senescencia del polen.

Cuando los granos de polen son aislados para su cultivo *in vitro*, la formación de callos es menor que cuando se mantienen unidos a las anteras en el medio de cultivo por lo menos unos días antes de ser aislados. Igualmente, la inducción de callos y posterior regeneración de plantas es mayor, cuando la senescencia de las anteras ocurre hacia el final del período del cultivo (Tsay, 1982). Estos hallazgos son evidencias claras de la importancia que tienen las sustancias fisiológicamente activas contenidas en el tapete o pared de la antera, las cuales inducen la morfogénesis hasta que estas células son autónomas para proseguir el desarrollo esporofítico. En el caso de la senescencia prematura de las anteras, también es probable que las quinonas producidas sean tóxicas para las microsporas (Lentini *et al.*, 2006).

Aunque la iniciación de la división de las microsporas puede ser independiente de aditamentos nutricionales, estos son requeridos para las subsecuentes divisiones que conllevan a la formación de callos y la diferenciación de estas células en embriones y plantas. Normalmente se utilizan dos medios de cultivo, uno para la formación de callos a partir del polen inmaduro y otro para la regeneración de plántulas a partir de los callos, los que están constituidos por dos grandes grupos de sustancias, el primero o medio basal, formado por nutrimentos inorgánicos (macro y micro elementos), hidratos de carbono,

vitaminas y en algunos casos otros aditivos orgánicos; el segundo lo constituyen los reguladores de crecimiento de tipo hormonal. Varios laboratorios han tratado de optimizar la composición de los medios para el cultivo de anteras de arroz, pero las conclusiones difieren unas de otras, debido a la influencia que ejercen el genotipo, el estado de desarrollo del polen y el tratamiento previo en frío, dado a las anteras. Sin embargo, esto no disminuye la importancia que tiene la composición del medio de cultivo, ya que es común que para un mismo genotipo, la frecuencia de inducción varíe según la composición del medio (Lentini *et al.*, 2006; Talebi *et al.*, 2007; Herath *et al.*, 2007).

El crecimiento y la diferenciación de los callos está influido por las concentraciones de sales inorgánicas, especialmente las de amonio; es por esto que la relación entre la concentración de amonio (NH_4^+) y de nitrato (NO_3^-) es uno de los principales factores en la composición del medio. La formación del callo de microsporas de arroz y otros cereales es inhibida por las altas concentraciones de amonio presentes en el medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962). Basado en estas observaciones Chu *et al.* (1975) desarrollaron el medio básico N₆, el cual contiene aproximadamente la tercera parte de los niveles de amonio, calcio y cloruro, el triple de fosfato, la mitad del magnesio, una y media veces de potasio y el doble de sulfato con respecto al medio basal MS. Usualmente en el medio N₆ se adiciona ácido nicotínico, piridoxina, tiamina y glicina.

El medio N₆ ha sido ampliamente adoptado para el cultivo de anteras de arroz *japónica* (Bishnoi *et al.*, 2000; Chang-Hyu *et al.*, 2002). Tran y Young (2004) encontraron una eficiencia 1,5 veces mayor en la regeneración de plantas con la utilización del medio N₆, comparado con el medio MS. El tipo *índica*, sin embargo, tiene otros requerimientos nutricionales. Huang *et al.* (1981) encontraron que una modificación del medio N₆

(denominado He2), que contiene la mitad del nivel de NH_4^+ , dos veces la de PO_4^- y la quinta parte de Mg^{2+} , incrementa la frecuencia de inducción de callos y la regeneración de plantas verdes de cultivares *indica*, sugiriendo que este tipo de arroz es altamente susceptible al amonio y el magnesio. Lentini *et al.* (1995) utilizaron el medio He2, con una combinación hormonal diferente (lo denominaron N6m) y la inducción de callos y regeneración de plantas verdes de las *índicas* fue el doble que en el medio N6. Modificaciones subsiguientes del medio N6m, como usar 3134 mg.L^{-1} de KNO_3 , micronutrientes del MS y 2.5 mg.L^{-1} de vitaminas del N6; al que denominaron NL, incrementaron tres veces la inducción de callos y cinco veces la regeneración de plantas verdes, con respecto al N6m.

Para la diferenciación de plantas a partir de callos de anteras de arroz, el medio MS es el más utilizado. Los azúcares de este medio satisfacen los requerimientos de moléculas de carbono como fuente de energía. En general se requieren niveles más altos de sacarosa para la inducción que para la regeneración de plantas. La mayoría de los investigadores utilizan sacarosa al 3% en el medio de diferenciación, mientras que Chen *et al.* (1991) recomiendan concentraciones de 4% a 5%. Otros investigadores (Bishnoi *et al.*, 2000; Bidhan y Mandal, 2005; Datta, 2005; Bhojwani *et al.*, 2009) sustituyen la sacarosa por maltosa en el cultivo de anteras de arroz tipo indica y recomiendan una concentración del 6%, lo que ha permitido un significativo aumento de la eficiencia en la formación de callos.

Otros componentes del medio, de gran importancia en el cultivo de anteras de arroz, son las auxinas: ANA (ácido naftalenacético), 2,4 D (ácido diclorofenoxiacético), AIA (ácido indolacético), AIB (ácido indolbutírico), picloramo, dicamba, AFA (ácido fenilacético) y las citoquininas: BAP (6-benzilaminopurina), ZiP (N_6 -2-isopenteniladenina), kinetina (6-

furfurilamino purina), zeatina, thiadazuron. Las auxinas, en concentraciones medias y altas, actúan sinérgicamente con las citoquininas en concentraciones bajas para el desarrollo de callos, cuando se utilizan bajas concentraciones de auxinas se estimula el enraizamiento y las citoquininas en altas concentraciones favorecen el desarrollo de los brotes, tallos y hojas e inhiben el enraizamiento. Es muy importante realizar una combinación de auxinas y citoquininas en una proporción de uno: cuatro o de uno: dos para regenerar plantas enraizadas. El 2,4D como fuente de auxinas generalmente se utiliza para la inducción de callos, puesto que tiende a inhibir la organogénesis, a diferencia del ANA que además de favorecer la producción de callos no suprime la diferenciación posterior (Lentini *et al.*, 2006).

El regulador del crecimiento normalmente utilizado en el medio, para inducción de callos a partir de anteras de arroz, es el 2,4D ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) (Lentini *et al.*, 2006). Para cultivares del tipo *indica*, algunos autores sugieren concentraciones más bajas de 2,4D ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) combinadas con ANA ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$) y kinetina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (Shahnewaz *et al.*, 2003; Shahnewaz y Bari 2004), mientras que otros combinan el 2,4D ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) con AIA ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), kinetina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) y BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (Zaidi *et al.*, 2006). La respuesta de las anteras de un grupo grande de cultivares ha demostrado que el equilibrio auxina/citoquinina favorable es 2,4-D ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), picloramo ($0,07 \text{ mg.L}^{-1}$) y kinetina ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (Silva, 2010).

Por otro lado, Godoy *et al.* (2006) plantean que bioestimulantes tales como Biostan y Liplant, si bien no sustituyen al 2,4 D en la callogénesis *in vitro* del arroz, potencian su efecto inductor en este proceso.

Con relación a los reguladores del crecimiento utilizados en el medio de regeneración y sus efectos en la producción de plantas verdes, Bishnoi *et al.* (2000) y Talebi *et al.* (2007) sugieren la utilización de un medio complementado con ANA (0,5 mg.L⁻¹), BAP (1,0 mg.L⁻¹) y kinetina (1,0 mg.L⁻¹), mientras que Zaidi *et al.* (2006) proponen una combinación de AIA (1,0 mg.L⁻¹), kinetina (2,0 mg.L⁻¹) y BAP (2,0 mg.L⁻¹).

En cuanto al agente gelificante, la mayoría de los trabajos realizados utilizan medios de cultivo sólidos, sin embargo, Lentini *et al.* (2006) plantean que los medios líquidos favorecen la formación de callos y que los medios solidificados con agar aumentaron la necrosis de las anteras. Según Silva (2010) los medios de cultivo líquidos pueden proporcionar un mayor contacto de las anteras con los nutrientes y hormonas; así como dispersar, más rápidamente, las sustancias tóxicas que provocan la muerte de estas.

No obstante, la utilización de medios líquidos tiene la desventaja de que las anteras tienden a penetrar en el medio y rápidamente pierden la viabilidad, en este sentido, se han realizado estudios donde se adicionan al medio sustancias que permiten que las anteras floten y se mantengan viables (Silva, 2010).

El tipo de agente gelificante también influye en la regeneración de plantas, obteniéndose mejores resultados cuando se utiliza phytigel o gel-rite en comparación con agar (Lentini *et al.*, 2006).

2.5. Mejoramiento genético para la resistencia a *P. grisea*.

El manejo de la Piriculariosis, basado en cultivares resistentes, se ajusta al desarrollo de una agricultura ecológica que depende cada vez menos de los productos agroquímicos (Pantoja *et al.*, 2006). Para el desarrollo de resistencia durable al añublo es necesario como

estrategia, primero, la caracterización de la estructura genética de poblaciones de *P. grisea*, de la diversidad y frecuencia de los genes de avirulencia/virulencia del patógeno y su influencia sobre genes de resistencia conocidos, la identificación e incorporación de combinaciones de genes de resistencia en germoplasma de arroz y una vez incorporados, evaluar las poblaciones bajo inoculaciones controladas, en condiciones de campo y el uso de marcadores moleculares (Correa-Victoria y Prado, 2004).

Las técnicas de dactiloscopia del ADN para la caracterización del hongo *P. grisea* han permitido agrupar aislamientos individuales en linajes genéticamente relacionados en varios países: Estados Unidos, Filipinas, Colombia, Brasil, Argentina, Uruguay, Venezuela y Cuba, entre otros. La información generada puede ser usada para monitorear la enfermedad y conocer la dinámica y composición racial de la población, lo que unido al conocimiento del espectro de virulencia de los linajes genéticos hace posible la selección de genes de resistencia cuyas combinaciones son efectivas contra los linajes presentes dentro de la población en las principales áreas productoras de arroz (Levy *et al.*, 1991; Correa-Victoria y Zeigler, 1994; Zeigler *et al.*, 1995; Fuentes, 1998; Arnao *et al.*, 2003; Bonell *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2005; Pantoja *et al.*, 2006; Fuentes *et al.*, 2008; Livore, 2008).

Con relación a la evaluación de cultivares en condiciones de campo se hace necesario, en primer lugar, tener identificado el sitio "*hot spot*" donde se realizará la selección. Según Correa-Victoria y Zeigler (1994), un sitio será considerado más caliente o "*hot spot*" si existe una alta presión de la enfermedad y diversidad del patógeno asociada a condiciones ambientales favorables para su desarrollo; lo que permitirá la selección de líneas de arroz que combinen un gran número de genes de resistencia, aumentando las posibilidades de que esta sea más estable y duradera.

En Colombia fue seleccionada la Estación Experimental de "Santa Rosa" como el sitio de mayor presión de plagas predominantes en la región, lo cual ha aumentado la eficiencia en la selección de líneas resistentes a *P. grisea*, tanto en la hoja como en el cuello de la panícula (Guimarães y Ospina, 1992).

En Cuba, teniendo en cuenta que la localidad UEBA "Caribe", perteneciente al Complejo Agroindustrial Arrocerero "Los Palacios", presentó la diversidad genética más alta de las dos poblaciones del patógeno estudiadas por Fuentes (1998), este autor recomendó su utilización como sitio "*hot spot*" para todos los trabajos de mejoramiento genético del cultivo, que incluyan entre sus objetivos, desarrollar cultivares con resistencia a la Piriculariosis. Esta región, además, históricamente ha mostrado una alta incidencia de la enfermedad (MINAG, 2011).

Desde hace más de una década, el programa de mejoramiento genético del arroz utiliza esta localidad para la evaluación y selección de líneas cubanas con resistencia a *P. grisea* (Cárdenas *et al.*, 2000; 2002; 2005 a y b; 2007 a y b; 2010), pero a pesar de ello, la obtención de cultivares con resistencia estable y duradera se ha dificultado.

Paralelamente, el Centro Internacional de Agricultura Tropical desarrolló una nueva metodología de campo, validada en Cuba por Cárdenas *et al.*, 2000, la cual propone mantener la alta incidencia y uniformidad de la enfermedad durante todo el ciclo de vida del cultivo, para ello utiliza surcos esparcidores de esporas, compuestos por una mezcla de cultivares susceptibles que minimizan el posible escape a la infección.

Esta metodología orienta, además, la creación de condiciones favorables como alta fertilización nitrogenada y alta densidad de siembra y se evalúa el comportamiento ante la enfermedad en las hojas, durante la fase vegetativa de las plantas y en el cuello de la

panícula, en la fase reproductiva, de acuerdo con las escalas propuestas por el IRRI (2002); las cuales se basan en el tipo, número de lesiones, área foliar afectada y porcentaje de cuellos de las panículas afectados en cada línea o cultivar a evaluar.

En cuanto a la identificación e incorporación de combinaciones de genes de resistencia en germoplasma de arroz, Berrio *et al.* (2004), teniendo en cuenta la segregación para susceptibilidad en líneas derivadas de plantas resistentes a *P. grisea* que son heterocigotos para uno o más genes, plantean que tres o más genes dominantes deben combinarse en una condición homocigótica para conferir una resistencia durable.

Correa-Victoria y Delgado (2005) recomiendan realizar selecciones de plantas F₂ resistentes dentro de poblaciones segregantes y resistentes, utilizar al menos dos progenitores resistentes a *P. grisea* para aumentar el número de líneas con resistencia estable en cruces triples y evaluar la estabilidad de la resistencia de los progenitores potenciales antes de ser utilizados en un programa de mejoramiento. En este sentido Graterol *et al.*, (2006) proponen que la estrategia de selección puede ser masal, en pedigrí, o una combinación de ambas y debe realizarse en distintos ambientes.

Pérez-Almeida *et al.*, (2005), al comparar las reacciones a *P. grisea* en la hoja y en el cuello de la panícula en poblaciones obtenidas por hibridaciones y cultivo de anteras, concluyeron que este último método incrementa la eficiencia de la selección, debido a la mayor varianza aditiva, ausencia de dominancia, ausencia de variación intrafamiliar y competencia entre plantas; lo que facilita la identificación de cultivares superiores con respecto a la selección en generaciones tempranas de un programa de pedigrí y los valores de heredabilidad sugieren que el avance genético podría lograrse en pocas generaciones.

Prado *et al.* (1998) seleccionaron 24 líneas resistentes a *P. grisea* de la progenie del cruce de dos líneas isogénicas que poseen los genes de resistencia *Pi-1* y *Pi-2*, los que muestran incompatibilidad con los linajes genéticos del hongo. Este resultado sugiere la posibilidad de obtener líneas que excluyan toda la población del patógeno y presenten una resistencia durable, aunque se recomienda seguir evaluándolas para corroborar la estabilidad de la resistencia.

Jia *et al.* (2004), al evaluar la descendencia de un cruce entre un cultivar que posee el gen *Pi-ta* y otro que no lo posee, no encontraron el gen en los individuos susceptibles y sugieren que este actúa como un gen dominante. Un resultado similar fue obtenido por Persaud *et al.* (2007). En trabajos posteriores se encontró la presencia del gen *Pi-ta* en un grupo de cultivares estadounidenses, así como en el cultivar 'Tetep', de origen vietnamita (Jia, 2009), el que posee también los genes *Pi-1* y *Pi-kh* (Séré *et al.*, 2007). Por su parte al cultivar autóctono africano 'Moroberekan', de tipo *japónica*, se le atribuye su resistencia a la presencia de un grupo de genes mayores que están siendo identificados (Infoagro, 2005; McNally *et al.*, 2006). Se han obtenido líneas resistentes provenientes de cruces con el cultivar 'IR 759-54-2-2' (Hernández, 2006), pero en la literatura consultada no se identifica cuales genes posee, ni el mecanismo de resistencia que actúa.

Estudios realizados en CIAT han demostrado que la combinación de los genes de resistencia *Pi-1* (cromosoma 11), *Pi-2* (cromosoma 6), y el gen *Pi-33* (cromosoma 8) confieren resistencia a muchas poblaciones de *P. grisea* en América Latina (Livore, 2008 y Fuentes *et al.*, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El esquema de trabajo desarrollado (Figura 1) contempló la selección de progenitores a partir de la evaluación de cultivares comerciales y precomerciales en canteros de infección natural frente a la Piriculariosis y en diferentes zonas de producción arroceras. Se efectuaron hibridaciones entre los cultivares resistentes a la Piriculariosis y los cultivares de buen comportamiento agrícola seleccionados. Las anteras de las plantas F₂ fueron cultivadas *in vitro* para la formación de callos y regeneración de plantas. A la primera y segunda generación de plantas obtenidas *in vitro* se le evaluaron caracteres agronómicos y a la segunda generación, también, el comportamiento frente a la Piriculariosis en hoja y cuello de la panícula. Las líneas, que combinaron resistencia a la Piriculariosis y buenos caracteres agronómicos, fueron evaluadas en condiciones controladas frente a haplotipos agresivos aislados en Cuba y en condiciones de infección natural con alta presión del patógeno y, las que resultaron resistentes, fueron caracterizadas para caracteres morfoagronómicos.

3.1. Selección de progenitores por su resistencia a la Piriculariosis y comportamiento agronómico.

3.1.1. Evaluación de cultivares comerciales y precomerciales en canteros bajo infección natural de *P. grisea*.

Catorce cultivares de arroz de diversa procedencia (Tabla 1) fueron sembrados, en el mes de marzo, durante 10 años, en la Unidad Empresarial Base Agrícola "Caribe", perteneciente al Complejo Agroindustrial Arroceros "Los Palacios", al sur del Municipio de Consolación del Sur, en la provincia de Pinar del Río, donde la Piriculariosis es uno de los factores limitantes en la producción.

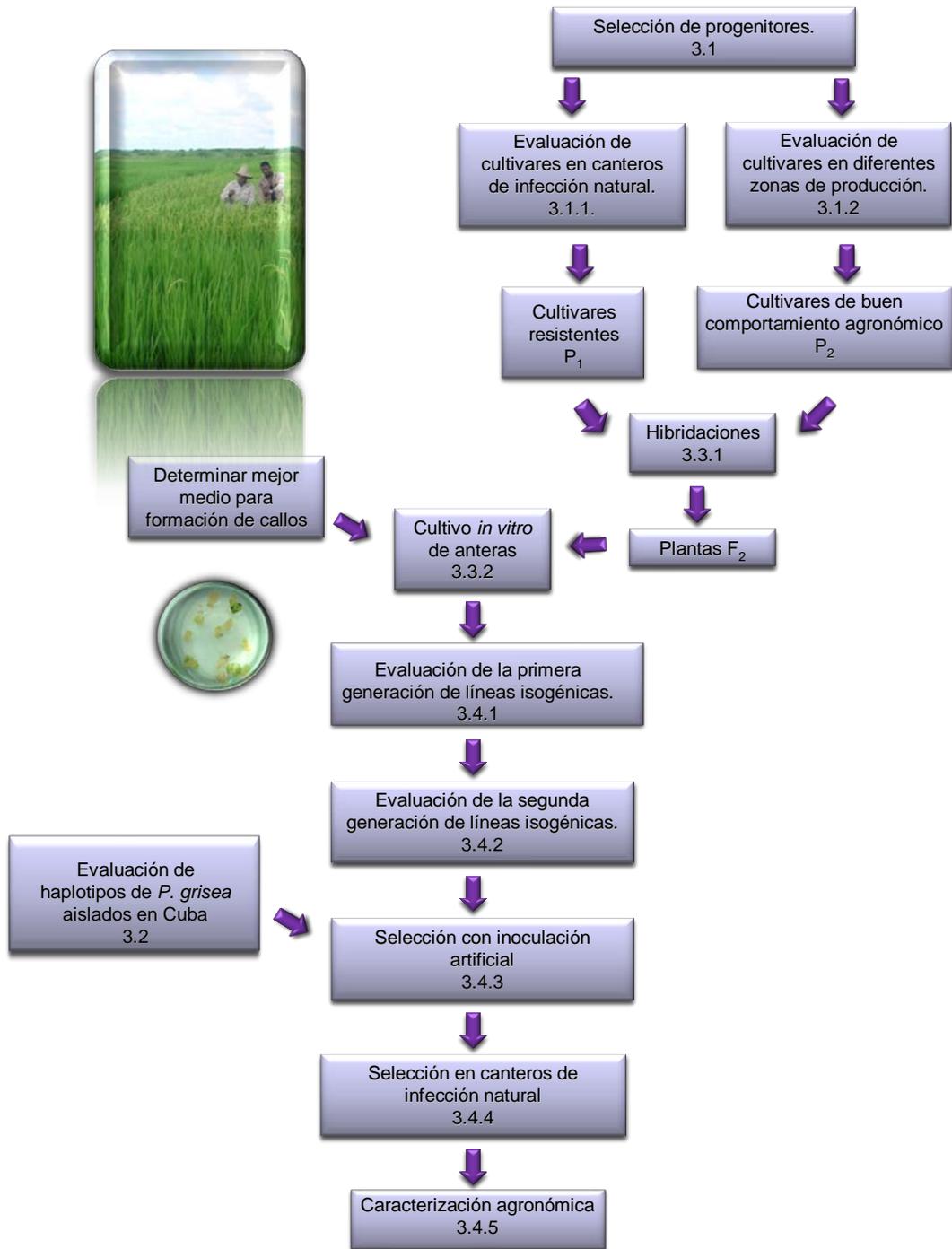


Figura 1. Esquema general del trabajo desarrollado para la obtención de cultivares de arroz resistentes a *P. grisea* y con buen comportamiento agronómico.

Se utilizó la metodología para las evaluaciones en campo, elaborada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical y validada en Cuba por Cárdenas *et al.* (2000), la cual

propone realizar los ensayos de selección para la resistencia a la enfermedad en un sitio “hot spot”, que presente una alta incidencia de la enfermedad, favorecida por condiciones ambientales y una alta diversidad del patógeno *P. grisea*.

Tabla 1. Cultivares evaluados en canteros bajo infección natural frente a *P. grisea* durante 10 años en la localidad "Caribe".

No	Cultivares	Progenitores	SubEspecie	Origen
1	Victoria de Girón	Cica 4 / Victoria	Índica	Cuba
2	6066	IR1529-430 / IR 759-54-2-2	Índica	Cuba
3	J-104	IR 4865-9 / IR 930-16	Índica	Perú
4	Amistad´82	IR 1529-430 / Vniir 3223	Índica	Cuba - URSS
5	CP ₁ C ₈	Cica 4 / IR 24	Índica	Cuba
6	2077	Cica 9 / BG 90 // Cica 7	Índica	Colombia
7	IR 880-C ₉	IR 8 // 81 B-25 / Dawn	Índica	Filipinas
8	IR 759-54-2-2	IR 8 / Peta 3 // Dawn	Índica	Filipinas
9	Perla de Cuba	Desconocido	Índica	Cuba
10	Moroberekan	Desconocido	Japónica	Guinea
11	Tetep	Desconocido	Índica	Viet Nam
12	IR 1529-430	Sigadis / TN 1 // IR 24	Índica	Filipinas
13	INCA LP-1	J-104 / Amistad´82	Índica	Cuba
14	INCA LP-6	2077 / CP ₁ C ₈	Índica	Cuba

Cada línea a evaluar frente a *P. grisea*, fue sembrada en un surco de dos metros con una densidad de 3g de semilla por metro lineal (200 kg.ha⁻¹) y cada 10 líneas se intercalaron dos surcos del cultivar susceptible 'J-104'. En forma perpendicular a las líneas se dispusieron surcos esparcidores de esporas, también con el cultivar 'J-104', que enmarcaron toda el área de evaluación. Se aplicaron altas dosis de urea (170 kg. ha⁻¹), cada 10 días, en los primeros 30 días de desarrollo del cultivo.

Las evaluaciones frente a *P. grisea* se realizaron en las hojas, durante la fase vegetativa de las plantas, entre 25 y 35 días después de la germinación, de acuerdo con la escala propuesta por el IRRI (2002), la cual considera los grados entre 0-3 como resistentes y entre 4-9 como susceptibles (Tabla 2).

Tabla 2. Escala de 9 grados para la evaluación de la Piriculariosis en el área foliar de cultivares de arroz (IRRI, 2002).

Grado	Síntomas de Piriculariosis
0	Ninguna lesión
1	Lesiones pardas pequeñas del tamaño de un alfiler o grandes sin centro esporulativo
2	Pequeñas lesiones redondeadas a ligeramente elongadas, manchas necróticas grises, cerca de 1-2 mm de diámetro con margen parduzco.
3	Lesiones tipo parecidas al grado 2, pero un número significativo de lesiones están sobre las hojas superiores
4	Lesiones típicamente susceptibles de 3 mm o más. Área foliar afectada menos del 4 %
5	Lesiones típicas. Área foliar afectada 4-10 %
6	Lesiones típicas. Área foliar afectada 11-25 %
7	Lesiones típicas. Área foliar afectada 26-50 %
8	Lesiones típicas. Área foliar afectada 51-71 %. Muchas hojas muertas
9	Más del 75 % de Área foliar afectada

A los datos obtenidos, por cultivar por año, se les determinó la mediana, valores máximo y mínimo y se calculó la distancia euclidiana de cada uno de los cultivares evaluados con relación a un cultivar ideal formado por plantas completamente sanas con valor 0 de la escala.

3.1.2. Evaluación de cultivares comerciales y precomerciales en diferentes zonas de producción arroceras de "Los Palacios", Pinar del Río.

Los experimentos fueron ubicados en tres Unidades Empresariales Base Agrícola (UEBA): "Caribe", "Agrícola Vueltabajo" y "López Peña", pertenecientes al Complejo Agroindustrial Arroceros "Los Palacios" y en la Unidad Científico Tecnológica de Base "Los Palacios" (UCTB LP), Pinar del Río, perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

En cada localidad se trasplantaron los 14 cultivares en estudio (Tabla 1), bajo aniego, en el mes de marzo, durante dos años, siguiendo un diseño de Bloques al azar con tres réplicas y parcelas de siete surcos de 5m de largo, con una distancia de 0,15 m entre surcos y entre

plantas. Las labores fitotécnicas se realizaron según el Instructivo Técnico para el Cultivo del Arroz (MINAG, 2000).

Las características de fertilidad química de los suelos, por localidad, se presentan en la Tabla 3 y la clasificación de todos ellos, según Hernández *et al.* (1999), fue Gley Nodular Ferruginoso petroférico éutrico con diferencias en textura y contenido de humus; o sea loam arenoso y poco humificado en "Caribe", loam y poco humificado en la UEBA "Agrícola Vueltabajo" y la UCTB "Los Palacios" y loam y medianamente humificado en la UEBA "López Peña" (Dirección Nacional de Suelos y Fertilizantes, 1990).

Tabla 3. Valores de la fertilidad química del suelo y pH en las cuatro localidades del estudio.

Localidades	UEBA	UCTB**	UEBA	
Indicadores	UEBA* "Caribe"	"Agrícola Vueltabajo"	"Los Palacios"	"López Peña"
Materia orgánica (%)	1,4	2,6	3,1	3,8
P ₂ O ₅ (mg.100 g de suelo ⁻¹)	8,6	15,2	12,3	15,1
K ₂ O (mg.100 g de suelo ⁻¹)	4,5	11,3	12,3	11,9
pH (en KCl y en H ₂ O)	4,7	5,1	6,3	5,4

*UEBA - Unidad Empresarial Base Agrícola, **UCTB - Unidad Científico Tecnológica de Base.

Los datos climatológicos de temperaturas máximas, temperaturas mínimas, temperatura media, precipitaciones y humedad relativa de la época en que fueron desarrollados los ensayos (Anexo 1) fueron obtenidos en la Estación Meteorológica Paso Real de San Diego en "Los Palacios" y procesados por el Centro Meteorológico Provincial del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA) en Pinar del Río.

Se calculó el rendimiento agrícola, en un área de 2,4 m² por parcela y la respuesta frente a la Piriculariosis, por infección natural en el campo; se evaluó en el cuello de la panícula en la fase reproductiva, de acuerdo con la escala propuesta por el IRRI (2002), la cual considera los grados entre 0-3 como resistentes y entre 5-9 como susceptibles (Tabla 4).

Los datos de porcentaje de cuellos afectados fueron transformados a $\arcsen \sqrt{\%}$.

Tabla 4. Escala de nueve grados para la evaluación de la Piriculariosis en el cuello de la panícula de cultivares de arroz (IRRI, 2002).

Grado	Incidencia
0	No-incidencia
1	Menos de 5 % de cuellos afectados
3	5-10 % de cuellos afectados
5	11-25 % de cuellos afectados
7	26-50 % de cuellos afectados
9	Mas de 50 % de cuellos afectados

A todos los datos obtenidos se le realizaron análisis de varianza para un arreglo trifactorial en bloques al azar (14 x 2 x 4), donde los factores fueron cultivares, años y localidades, se eliminó el efecto de las réplicas en las localidades y años y se ajustó un modelo AMMI Biplot a la matriz de interacciones, en la que cada fila correspondió a un cultivar y cada columna a las localidades-años (Varela, 2002).

3.2. Evaluación de haplotipos de *P. grisea* aislados en Cuba para su utilización en la selección de cultivares resistentes a la enfermedad.

Se reactivaron tres haplotipos de *P. grisea*, que se encontraban conservados en la micoteca del Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN) desde el año 1998, los que fueron aislados de plantas de arroz en dos zonas de producción (Tabla 5) y pertenecen a los dos linajes de mayor variabilidad según la clasificación efectuada por Fuentes (1998).

Tabla 5. Procedencia de los haplotipos de *P. grisea* aislados de diferentes variedades y dos zonas arroceras de Cuba (Fuentes, 1998).

Linaje	Haplotipo	Cultivar	Localidad de colecta
A	18	IR 837	"Los Palacios"
A	69	IACuba - 20	"Sur del Jíbaro"
B	6	IACuba - 25	"Los Palacios"

Pequeñas porciones de micelios de los haplotipos fueron sembradas en placas Petri que contenían Agar Agua (Tabla 6); después de 72 horas se realizaron cultivos monospóricos

en medio SA (salvado de arroz) y se incubaron durante siete días a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad. A partir de los cultivos puros, de los haplotipos en estudio, se tomaron discos de micelio de 5mm de diámetro y se sembraron separadamente en el medio de cultivo PDA, con pH 5,6 y elaborado con extracto de papa natural de la variedad 'Desiré', cosechada en el área central del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Tabla 6. Composición de los medios de cultivo empleados para el crecimiento y esporulación de los haplotipos de *P.grisea* evaluados.

Medios	Ingredientes	Cantidad (g.L ⁻¹)
Agar Agua SA	Agar	40.0
	Salvado de arroz	20.0
PDA	Sacarosa	5.0
	Agar	20.0
	Extracto de papa natural	4.0
	Dextrosa	20.0
	Agar	15.0

Para la evaluación de los haplotipos, se desinfectaron semillas del cultivar 'J-104', con hipoclorito de sodio al 1,5 % durante un minuto y enjuagadas varias veces con agua destilada, seguidamente se sembraron en macetas que contenían una mezcla de suelo Gley Nodular Ferruginoso petroférico (Hernández *et al.*, 1999) y cachaza curada, en proporción 3:1. El suelo fue previamente esterilizado durante una hora en autoclave a 121°C por tres días consecutivos.

La densidad de siembra fue de 20 semillas por maceta y se utilizaron cinco macetas (repeticiones) por cada haplotipo a evaluar. A los 21 días de germinadas las plantas se realizaron las inoculaciones artificiales, con un atomizador manual que contenía suspensiones de esporas del patógeno ajustadas a una concentración de 10^6 conidios por mililitro y una dosis de 2 ml por maceta (Guimarães *et al.*, 2005). Seguidamente se

propiciaron condiciones de alta humedad y temperatura favorables para el desarrollo de la enfermedad.

En 10 plantas por aislamiento se evaluó el período de incubación, el tamaño de las lesiones (en milímetros) y el área foliar afectada. Los datos de área foliar afectada fueron transformados a $\arcsen \sqrt{\%}$ y tanto esta como el tamaño de las lesiones se procesaron mediante Análisis de Varianza de Clasificación Simple y las medias se docimaron según la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad de error.

3.3. Método de mejoramiento empleado para la obtención de nuevas líneas.

3.3.1. Hibridaciones entre los cultivares seleccionados por su resistencia a la Piriculariosis y comportamiento agronómico.

Se realizaron cruzamientos entre los cultivares resistentes a la Piriculariosis y los cultivares de buen comportamiento agrícola seleccionados en los experimentos del epígrafe 3.2 (Tabla 7), atendiendo a un diseño genético estadístico Topcross, en el que cada cultivar de buen comportamiento agrícola fue empleado como progenitor femenino y masculino, con los cultivares resistentes. Para ello, se sembraron de forma escalonada en condiciones semicontroladas, atendiendo a su ciclo y, a los 30 días, fueron trasplantados al campo. Las labores fitotécnicas se realizaron según el Instructivo Técnico para el Cultivo del Arroz (MINAG, 2000).

Las panículas a utilizar como femeninas se tomaron cuando habían emergido de un 50 a 60% y con una aguja se extrajeron las anteras. La polinización se efectuó sacudiendo las panículas, que fueron colectadas con anterioridad para ser utilizadas como masculinas (panículas emergidas totalmente), sobre las panículas enmasculadas; esta operación se

realizó durante cinco días y posteriormente se cubrieron con un sobre de papel alba con el cruce y la fecha de emasculación anotadas.

Tabla 7. Hibridaciones realizadas con los progenitores seleccionados.

No	Cruces	No	Cruces
1	Amistad '82 / 2077	25	2077 / Amistad '82
2	Amistad '82 / IR 759-54-2-2	26	IR 759-54-2-2 / Amistad '82
3	Amistad '82 / Tetep	27	Tetep / Amistad '82
4	Amistad '82 / Moroberekan	28	Moroberekan / Amistad '82
5	INCA LP 1 / 2077	29	2077 / INCA LP 1
6	INCA LP 1 / IR 759-54-2-2	30	IR 759-54-2-2 / INCA LP 1
7	INCA LP 1 / Tetep	31	Tetep / INCA LP 1
8	INCA LP 1 / Moroberekan	32	Moroberekan / INCA LP 1
9	INCA LP 6 / 2077	33	2077 / INCA LP 6
10	INCA LP 6 / IR 759-54-2-2	34	IR 759-54-2-2 / INCA LP 6
11	INCA LP 6 / Tetep	35	Tetep / INCA LP 6
12	INCA LP 6 / Moroberekan	36	Moroberekan / INCA LP 6
13	6066 / 2077	37	2077 / 6066
14	6066 / IR 759-54-2-2	38	IR 759-54-2-2 / 6066
15	6066 / Tetep	39	Tetep / 6066
16	6066 / Moroberekan	40	Moroberekan / 6066
17	CP ₁ C ₈ / 2077	41	2077 / CP ₁ C ₈
18	CP ₁ C ₈ / IR 759-54-2-2	42	IR 759-54-2-2 / CP ₁ C ₈
19	CP ₁ C ₈ / Tetep	43	Tetep / CP ₁ C ₈
20	CP ₁ C ₈ / Moroberekan	44	Moroberekan / CP ₁ C ₈
21	IR 1529-430 / 2077	45	2077 / IR 1529-430
22	IR 1529-430 / IR 759-54-2-2	46	IR 759-54-2-2 / IR 1529-430
23	IR 1529-430 / Tetep	47	Tetep / IR 1529-430
24	IR 1529-430 / Moroberekan	48	Moroberekan / IR 1529-430

Las semillas obtenidas de los cruces, una vez maduras, fueron cosechadas; posteriormente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1,5 % durante un minuto y se enjuagaron varias veces con agua destilada. Las semillas desinfectadas se pregerminaron en placas Petri a temperatura de 30⁰C y alrededor de 10 días después de la germinación se sembraron en macetas que contenían una mezcla similar a la utilizada en el epígrafe anterior.

Treinta días después, se trasplantaron en campo a una distancia de 40 cm entre surcos y 30cm entre plantas, donde se aplicaron las labores fitotécnicas que recomienda el

Instructivo Técnico para el Cultivo del Arroz (MINAG, 2000). Una vez completado el ciclo biológico de las plantas F_1 de los cruces, fueron cosechadas sus semillas por planta, para su utilización posterior.

3.3.2. Cultivo *in vitro* de anteras de plantas F_2 , provenientes de cruces entre los progenitores seleccionados.

Las semillas F_2 se sembraron en canteros y treinta días después se trasplantaron a campo a una distancia de 40 cm entre surcos y 30 cm entre plantas. Las labores fitotécnicas se realizaron según el Instructivo Técnico para el Cultivo del Arroz (MINAG, 2000). De las mejores plantas F_2 por cada cruce, teniendo en cuenta el vigor y su estado fitosanitario, entre los 60 - 70 días de edad, se seleccionaron de dos a tres panículas, que poseían una distancia de 4 - 8 cm entre las aurículas de las dos últimas hojas, a las que se les conservó el entrenudo y la vaina de la hoja para protegerlas de la contaminación con patógenos del campo.

Evaluación de diferentes medios de cultivo para la formación de callos. En el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad Científico Tecnológica de Base "Los Palacios" se desinfectaron las panículas externamente con etanol 70% y se conservaron con su parte inferior sumergida en agua, protegidas con una bolsa plástica oscura y a temperatura de 8 a 10 °C durante siete – ocho días. Una vez transcurrido este tiempo, las panículas fueron desinfectadas durante tres minutos con hipoclorito de sodio al 1,5 % y Tween 80 como agente dispersante y se lavaron cuatro ó cinco veces con agua destilada estéril, posteriormente fueron sembradas *in vitro* según la metodología propuesta por Lentini *et al.* (1995).

Se evaluaron tres medios de cultivo líquidos (Anexo 2), para la inducción de callos: N₆₋₁, (Li, 1992) y N_{6-m} y NL (Lentini *et al.*, 1995), replicados tres veces y en cada réplica se sembraron 100 anteras. Después de la siembra, los frascos se mantuvieron en ausencia de luz por 30 a 60 días, hasta la formación de los microcallos. Se evaluó el número de anteras que formaron callos por frasco.

Los callos de 1–2 mm de diámetro fueron transferidos a frascos que contenían medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1mg.L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), 2mg.L⁻¹ de ácido indolacético (AIA), 4mg.L⁻¹ de 6- furfurilaminopurina (Kinetina), así como 30 g.L⁻¹ de sacarosa, solidificado con 7 g.L⁻¹ de agar y seguidamente incubados a 26±2⁰C con un fotoperíodo de 16 horas luz. Entre los 30 y 40 días, posteriores a la siembra, se evaluó la regeneración de plantas verdes y albinas.

El diseño estadístico empleado fue completamente aleatorizado, con tres repeticiones para la formación de callos y nueve para la regeneración de plantas. Se determinaron los intervalos de confianza para la formación de callos y regeneración de plantas verdes y albinas y las medias por cruce y medios evaluados, fueron procesadas mediante un Análisis de Componentes Principales. Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11,0 sobre Windows.

3.4. Evaluación y selección de líneas isogénicas que integren resistencia a la Piriculariosis con buenos caracteres agronómicos.

3.4.1. Evaluación de la primera generación de líneas isogénicas obtenidas *in vitro*.

Cuando las plantas alcanzaron suficiente desarrollo foliar y radical, se retiraron manualmente del frasco, sus raíces se lavaron con agua, con el fin de eliminar de ellas los residuos de callo y de medio de cultivo, se sumergieron en agua por varios días; luego se

trasplantaron a macetas, que contenían una mezcla similar a la utilizada en los Epígrafes 3.2, 3.3.1, donde permanecieron a temperatura ambiente y protegidas del sol. Después de 15 días, se pasaron a la luz directa y a las tres semanas se trasplantaron a campo, en la UCTB "Los Palacios". Las labores fitotécnicas se realizaron según el Instructivo Técnico para el Cultivo del Arroz (MINAG, 2000).

En el momento de la cosecha, las plantas fueron evaluadas morfológicamente para asociarlas de manera visual con su nivel de ploidía. Las plantas haploides son pequeñas, débiles, con problemas de crecimiento y estériles, las diploides son plantas fértiles con un desarrollo similar al de las plantas derivadas de semilla, mientras que las plantas poliploides muestran un mayor crecimiento, con estructuras florales más desarrolladas, granos con aristas largas, y parcialmente estériles (Lentini *et al.*, 2006).

Posteriormente, a 142 líneas isogénicas fértiles obtenidas (supuestamente diploides, según sus características morfológicas), provenientes de 14 cruces (Tabla 8), se les evaluó la altura final, el número de panículas por planta, la longitud de la panícula, el número de granos llenos por panícula, la masa de 1000 granos y el largo y ancho del grano.

Tabla 8. Número de líneas isogénicas evaluadas por cada cruce.

No	Cruce	Identificación	Líneas evaluadas
1	Amistad'82 / 2077	A/V	20
2	2077 / Amistad'82	V/A	17
3	Amistad'82 / IR 759-54-2-2	A/I	15
4	Moroberekan / Amistad'82	M/A	6
5	2077 / INCA LP-1	V/P1	9
6	INCA LP-1 / Tetep	P1/T	6
7	Tetep / INCA LP-1	T/P1	6
8	IR759-54-2-2 / INCA LP-6	I/P6	12
9	INCA LP-6 / Moroberekan	P6/M	10
10	Tetep / INCA LP-6	T/P6	6
11	IR75954-2-2 / 6066	I/S	16
12	6066 / IR759-54-2-2	S/I	8
13	2077 / CP ₁ C ₈	V/C	5
14	IR 1529-430 / IR 759-54-2-2	IR/I	6
TOTAL			142

A los datos obtenidos se les determinaron los valores máximo y mínimo, la media, el error estándar y coeficiente de variación para cada carácter evaluado. No se efectuó selección en esta primera generación.

3.4.2. Evaluación de la segunda generación de líneas isogénicas.

Las semillas obtenidas, de las plantas cosechadas de la primera generación de líneas isogénicas, fueron sembradas en campo, en la UCTB "Los Palacios", a chorrillo en surcos de 5m de largo, para realizar las pruebas de uniformidad. A cada línea (surco) se le evaluó el ciclo y en 1m lineal, el rendimiento agrícola y el número de panículas. La altura final fue medida a 20 plantas y, en 20 panículas tomadas al azar, se contaron los granos llenos por panícula, la masa de 1000 granos, la longitud de la panícula y el largo y ancho del grano. Con los datos obtenidos para el ciclo y la altura se determinaron los coeficientes de variación de cada línea y sus progenitores y las medias, de las líneas para cada carácter, fueron sometidas a Análisis Multivariado de Clasificación Automática (Conglomerados) (Varela, 1998).

Las evaluaciones frente a la Piriculariosis se realizaron bajo infección natural en campo, en las hojas, en la fase vegetativa y en el cuello de la panícula, en la fase reproductiva, de acuerdo con las escalas propuestas por el IRRI (2002) (Tablas 2 y 4). Con los datos obtenidos se realizó una distribución de frecuencias a las poblaciones procedentes de los cruces Amistad´82/ 2077, 2077/Amistad´82, Amistad´82/IR759-54-2-2 y Moroberekan/Amistad´82 y la prueba de ajuste de distribución normal según Kolmogorov-Smirnov. La disponibilidad de líneas del resto de las poblaciones fue menor, por lo que se consideró no utilizar los datos para este análisis.

Se realizó una selección simultánea sobre 2 caracteres, con criterios independientes: resistencia frente a la Piriculariosis (grados entre 0 y 3 de las escalas) por infección natural en campo y el rendimiento agrícola (superior a 6,5 t.ha⁻¹).

3.4.3. Selección de líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis en condiciones semicontroladas con inoculación artificial.

Para la realización del ensayo, se utilizaron 1,5 g de semillas sanas de las líneas isogénicas seleccionadas en el epígrafe 3.4.2, las que fueron sembradas en bandejas metálicas, replicadas dos veces, sobre papel de filtro estéril, distribuidas en surcos de 0,5 metros (200 kg.ha⁻¹). A los 21 días de germinadas, las plantas fueron inoculadas de forma independiente con los haplotipos 18, del Linaje A y 6, del Linaje B; del patógeno, siguiendo un procedimiento similar y concentración de conidios a los desarrollados en el Epígrafe 3.2. La dosis empleada fue de 5 ml por surco (Guimarães *et al.*, 2005). Se utilizaron, además, como patrones resistentes los cultivares '2077', 'IR 759-54-2-2', 'Moroberekan' y 'Tetep' y como susceptible el cultivar 'J-104'.

En 10 plantas por línea y haplotipo se evaluó el período de incubación del hongo, en días, el tamaño de las lesiones en mm y el porcentaje de área foliar afectada, en la fase vegetativa. Los datos de área foliar fueron transformados a $\arcsen \sqrt{\%}$ y tanto esta como el tamaño de las lesiones se procesaron mediante Análisis de Varianza de Clasificación Simple y las medias se docimaron según la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad de error.

Se realizó la selección de líneas isogénicas teniendo en cuenta la resistencia mostrada (grados entre 0 y 3) de acuerdo con la escala propuesta por el IRRI (2002), frente a los haplotipos de *P. grisea* empleados.

3.4.4. Selección de líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis en canteros bajo infección natural.

En la UEBA “Caribe”, localidad identificada en Cuba como “*hot spot*”, se sembraron durante cuatro años, las líneas isogénicas seleccionadas en el epígrafe 3.4.3 y como patrones resistentes y susceptible los mismos cultivares utilizados en dicho epígrafe. Se utilizó la metodología de campo propuesta por el Centro Internacional de Agricultura Tropical y validada en Cuba por Cárdenas *et al.*, (2000), que se detalla en el Epígrafe 3.1.1. Se estimó el porcentaje de área foliar afectada (% AFA) por la Piriculariosis en 10 plantas por línea, durante la fase vegetativa, entre 25 y 35 días después de la germinación y, en la fase reproductiva, se evaluaron los porcentajes de cuellos dañados.

Los datos fueron transformados a $\arcsen \sqrt{\%}$ y se procesaron mediante Análisis de Varianza de Clasificación Simple y las medias se docimaron según la Prueba de Tukey al 5% de probabilidad de error.

Se seleccionaron las líneas isogénicas por su resistencia a la Piriculariosis (grados entre 0 y 3), según las escalas propuestas por el IRRI (2002), en condiciones naturales de infección.

3.4.5. Caracterización de las líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis por su comportamiento agronómico.

Las semillas de las líneas isogénicas, seleccionadas en el epígrafe 3.4.4, fueron sembradas junto a sus progenitores de buenos caracteres agronómicos en la UCTB “Los Palacios”, en el campo de forma directa, a chorrillo, en parcelas de dos metros de largo por dos metros de ancho (4 m^2), a una distancia de 15 cm entre surcos y una densidad de 100 kg de semilla por hectárea.

Las labores fitotécnicas se realizaron según el Instructivo Técnico para el Cultivo del Arroz (MINAG, 2005). Se utilizó un diseño de Bloques al Azar con cuatro repeticiones.

Las líneas isogénicas fueron caracterizadas agronómicamente siguiendo la metodología elaborada por la Dirección de Certificación de Semillas que detalla el Formulario de Descripción para el Registro de Variedades comerciales de arroz (*Oryza sativa* L.) con la utilización de los siguientes descriptores: color del coleóptilo, longitud del mesocotilo (cm), longitud del hipocotilo (cm), hábito predominante de crecimiento, capacidad de ahijamiento, color de la lemma y la pálea, color del ápice de la lemma y la pálea, pubescencia de la lemma y la pálea, color de las glumas, color del estigma, ángulo de inserción de la hoja por debajo de la hoja bandera, ángulo de inserción de la hoja bandera, longitud de la hoja bandera (cm), ancho de la hoja bandera (cm), longitud de la hoja por debajo de la hoja bandera (cm), ancho de la hoja por debajo de la hoja bandera (cm), vellosidad de la lámina de la hoja, color de la lámina foliar, color de la lígula, forma de la lígula, longitud de la lígula (mm), resistencia de las aurículas al desprendimiento, color de las aurículas, color de la vaina de la hoja, color del nudo, color del entrenudo, color del anillo subnodal, color en la base del tallo, ciclo en días a la maduración, altura de la planta (cm), resistencia al acame, respuesta al fotoperíodo, tamaño de las aristas, color del grano apical de la panícula, color del ápice del grano apical de la panícula, densidad de la panícula, exserción de la panícula, granos vanos en el ápice de la panícula, fertilidad de la panícula, desgrane de la panícula, longitud de la panícula, largo del grano (mm), ancho del granos (mm), granos llenos por panícula, masa de 1000 granos (g), panículas por metro cuadrado, longevidad foliar predominante, rendimiento agrícola ($t \cdot ha^{-1}$) y rendimiento industrial (% de granos enteros) en muestras de 1 kg de arroz cáscara.

Para la evaluación de los atributos de color se utilizó la tabla de color propuesta por Muñoz *et al.*, (1996).

Se estimó el porcentaje de área foliar afectada (% AFA) por la Piriculariosis, durante la fase vegetativa y en la fase reproductiva, se evaluaron los porcentajes de cuellos dañados y ambos datos fueron transformados a $\arcsen \sqrt{\%}$.

Los datos obtenidos para el ciclo, los rendimientos agrícola e industrial, las panículas por metro cuadrado, los granos llenos por panícula y la masa de 1000 granos fueron procesados mediante análisis de varianza de clasificación doble y las medias comparadas mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad de error y posteriormente se realizó un análisis de correlación múltiple con todos los datos cuantitativos obtenidos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección de progenitores por su resistencia a la Piriculariosis y comportamiento agronómico.

4.1.1. Evaluación de cultivares comerciales y precomerciales en canteros bajo infección natural de *P. grisea*.

En la Tabla 9 aparecen los resultados obtenidos al evaluar la infección foliar provocada por el hongo *P. grisea* en condiciones de alta presión de la enfermedad; en ella se aprecia que los cultivares 'IR 759-54-2-2', 'Tetep', '2077' y 'Moroberekan', en ese mismo orden, resultaron ser los cultivares con las menores medianas, valores mínimo y máximo dentro del intervalo de resistencia y con la menor distancia (valores entre 5,20 y 10) al cultivar ideal, completamente sano.

Tabla 9. Comportamiento de los cultivares en canteros de infección natural frente a *P. grisea* durante los 10 años de estudio, en la localidad "Caribe".

No	Cultivares	Mediana*	Valor mínimo*	Valor máximo*	Distancia**
1	J-104 (PS)	6	3	9	24,78
2	2077	2	1	3	8,06
3	IR 759-54-2-2	1	1	2	5,20
4	Moroberekan	2	2	3	10,00
5	Tetep	2	1	2	6,48
6	Victoria de Girón	3	2	6	15,17
7	6066	4	2	7	19,60
8	Amistad´82	4	3	6	18,36
9	CP ₁ C ₈	4	3	6	18,41
10	IR 880	6	4	7	21,19
11	Perla de Cuba	4	2	5	15,10
12	IR 1529-430	4	2	7	19,00
13	INCA LP-1	2	1	4	10,10
14	INCA LP-6	4	3	4	14,80

*Mediana, valor mínimo y valor máximo de la escala empleada para la evaluación a la Piriculariosis.

**Distancia entre cada cultivar y un cultivar ideal formado por plantas completamente sanas con valor 0 de la escala.

PS- Patrón susceptible

Estos resultados sugirieron la utilización de dichos cultivares como progenitores, posibles

donadores de genes de resistencia a la Piriculariosis. Además, se conoce que 'Moroberekan' es un cultivar autóctono africano, de tipo *japónica*, con resistencia durable a la Piriculariosis y en la literatura se plantea que este comportamiento es debido a que posee genes mayores que le confieren resistencia. Ha sido utilizado en cruces con cultivares del tipo *índica*, los que han aportado un gran número de líneas resistentes (Infoagro, 2005 y McNally *et al.*, 2006).

Los cultivares 'IR 759-54-2-2' y 'Tetep', han sido recomendados como progenitores resistentes por los resultados obtenidos en programas de mejora desarrollados por el Instituto de Investigaciones de Granos de Cuba (Hernández, 2006) y el Centro Internacional de Agricultura Tropical de Colombia (Martínez, 2008). Con respecto al cultivar '2077' se debe destacar que en la literatura consultada no aparecen resultados relacionados con su utilización como progenitor en programas de mejoramiento del cultivo, ni su comportamiento frente a *P. grísea*.

Es importante resaltar los resultados mostrados por 'J-104', el cual se comportó como el más susceptible dentro del estudio, el más distante del cultivar ideal y con valores mínimo y máximo de tres y nueve, respectivamente, por lo que puede ser utilizado como patrón susceptible. Este resultado coincide con lo obtenido por Morejón *et al.* (2005) en evaluaciones realizadas en condiciones de producción.

Diversos trabajos realizados en Cuba, en diferentes cultivos (Estévez *et al.*, 2000 en papa; Ortiz *et al.*, 2003 en frijol; Morejón *et al.*, 2005 en el arroz), han demostrado la existencia de diferentes respuestas genotípicas a los ambientes; de ahí, la importancia de evaluar el comportamiento frente a la Piriculariosis, así como los caracteres agronómicos, en diferentes localidades para seleccionar como progenitores aquellos con una respuesta más

estable.

4.1.2. Evaluación de cultivares comerciales y precomerciales en diferentes zonas de producción arroceras de "Los Palacios", Pinar del Río.

Los resultados del análisis de varianza, de los catorce cultivares sembrados en diferentes localidades y años (Tabla 10), mostraron diferencias significativas entre las fuentes de variación cultivares, localidades, años y todas sus interacciones. La existencia de interacción significativa evidenció el comportamiento diferencial de los genotipos en las diferentes localidades-años y puso de manifiesto la gran influencia que el ambiente ejerce sobre el cultivo del arroz.

Tabla 10. Análisis factorial realizado al Rendimiento y comportamiento frente a la Piriculariosis en el cuello de la panícula, de los cultivares comerciales y precomerciales evaluados en cuatro zonas de producción arroceras.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	
		Rendimiento	Comportamiento frente a la Piriculariosis
Cultivares (A)	13	31,21*	1,31 *
Localidades (B)	3	48,61 *	1,60 *
Años(C)	1	2,45 *	0,05 *
A x B	39	1,76 *	0,06 *
A x C	13	1,12 *	0,05 *
B x C	3	25,29 *	0,74 *
A x B x C	39	1,28 *	0,05 *
Error	224	0,23	0,01
	X	5,46	0,49
	ESx	0,28	0,06

* significación $p < 0,05$

La interacción del genotipo con el ambiente en el cultivo del arroz, así como los métodos estadísticos de análisis de los parámetros de estabilidad, ha sido objeto de estudio de muchos investigadores. En este sentido González *et al.* (2003) señalaron, que los modelos AMMI permiten, a partir de un Biplot, representaciones simultáneas de individuos y variables que pueden ser años, localidades o ambas e identificar los cultivares más estables.

La representación gráfica del análisis Biplot (Figura 2) realizado al comportamiento de los cultivares, frente a la Piriculariosis, muestra que la mayoría de los cultivares se alejaron del centro del eje de coordenadas y su comportamiento fue inestable, debido a que interactuaron mucho con el ambiente; sólo 'Tetep', '2077', 'IR 759-54-2-2' y 'Moroberekan', en ese mismo orden, se presentaron más cercanos al eje, lo cual indica un comportamiento estable ante la enfermedad.

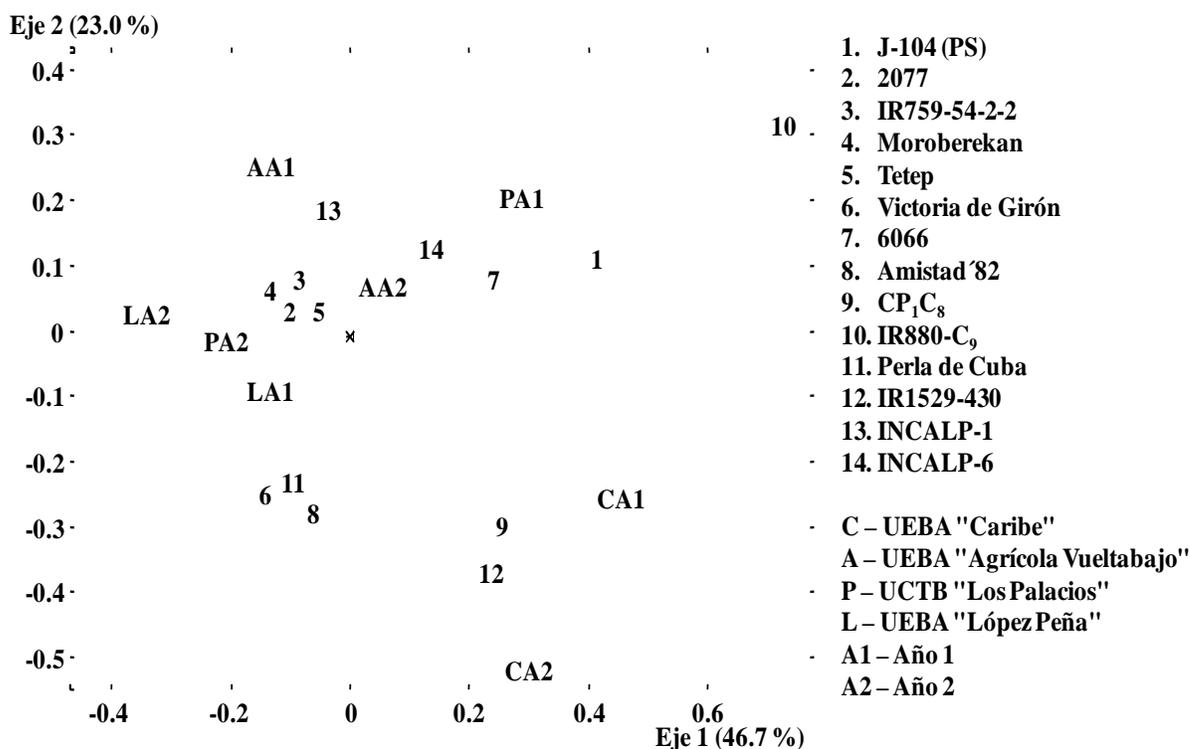


Figura 2. Representación gráfica del comportamiento de los cultivares y ambientes frente a la Piriculariosis, en cuatro zonas de producción arroceras, durante dos años.

Estos mismos cultivares, evaluados durante varios años en la UEBA "Caribe", mostraron resistencia a la infección provocada por el hongo en estado de plántula y como se aprecia en la Tabla 11, su resistencia a la enfermedad, en este caso evaluada en el cuello de la panícula, se mantuvo estable en los dos años y las cuatro localidades de este experimento.

Tabla 11. Comportamiento de los cultivares ante la Piriculariosis evaluada en el cuello de la panícula en cuatro zonas de producción arroceras y 2 años.

Cultivares	"Caribe"				"Agrícola Vueltabajo"				UCTB "Los Palacios"				"López Peña"			
	Año1		Año2		Año1		Año2		Año1		Año2		Año1		Año2	
	CA ¹	E ²	CA	E	CA	E	CA	E	CA	E	CA	E	CA	E	CA	E
J-104 (PS)	50	S	48	S	23	S	55	S	47	S	13	S	23	S	15	S
2077	7	R	5	R	0	R	8	R	0	R	0	R	0	R	0	R
IR 759-54-2-2	9	R	8	R	8	R	7	R	7	R	2	R	7	R	0	R
Moroberekan	7	R	5	R	0	R	8	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Tetep	9	R	8	R	8	R	6	R	6	R	2	R	6	R	0	R
Victoria de Girón	23	S	32	S	7	R	12	S	10	R	9	R	10	R	9	R
6066	15	S	43	S	10	R	23	S	43	S	9	R	13	S	12	S
Amistad '82	23	S	40	S	8	R	13	S	12	S	9	R	10	R	9	R
CP ₁ C ₈	40	S	55	S	15	S	40	S	32	S	12	S	23	S	10	R
IR880-C ₉	65	S	55	S	40	S	40	S	75	S	32	S	32	S	13	S
Perla de Cuba	32	S	32	S	8	R	13	S	10	R	9	R	10	R	9	R
IR1529-430	50	S	55	S	15	S	40	S	32	S	23	S	32	S	10	R
INCA LP-1	32	S	23	S	9	R	40	S	23	S	10	R	10	R	10	R
INCA LP-6	40	S	32	S	10	R	40	S	32	S	9	R	13	S	10	R

¹Porcentaje de cuellos afectados por la enfermedad, ²Evaluación según grado de la escala, R-Resistente, S-Susceptible, PS-Patrón susceptible.

Estos resultados confirman la posibilidad de utilizar a los cultivares '2077', 'Tetep', 'IR 759-54-2-2' y 'Moroberekan' en los programas de mejoramiento genético como posibles fuentes donadoras de genes de resistencia a la Piriculariosis.

Se observó además, en la Figura 2, que el eje1 contrapone los cultivares '2077', 'Tetep', 'IR 759-54-2-2' y 'Moroberekan' con los cultivares '6066', 'J-104', 'CP₁C₈', 'IR 880-C₉', 'IR 1529-430' e 'INCA LP-6'. Los primeros se caracterizan por presentar valores bajos (hasta 10%) de cuellos afectados por la Piriculariosis, mientras que el grupo contrapuesto presenta cuatro cultivares ('6066', 'CP₁C₈', 'IR 1529-430' e 'INCA LP-6') con valores bajos en algunos ambientes y dos ('J-104' e 'IR 880-C₉') con valores superiores a 10% en todos los ambientes.

Por otra parte, el eje dos muestra un comportamiento negativo (valores altos de cuellos afectados) de los cultivares 'CP₁C₈' e 'IR 1529-430' en los 2 años de la localidad "Caribe" y presentan una interacción positiva fundamentalmente (valores bajos de cuellos afectados)

en el primer año de la localidad UEBA "Agrícola Vueltabajo" y el segundo año de la UEBA "López Peña".

Con relación a los ambientes, la localidad UEBA "Caribe" en sus dos años de estudio se ubicó en ángulos opuestos a la mayoría de las localidades-años evaluadas. Según Yan *et al.* (2000), citados por Alejos *et al.* (2006); los ambientes que exhiben entre ellos un ángulo cercano a los 180⁰ son muy contrastantes.

Este comportamiento diferente, en la localidad UEBA "Caribe", resulta de utilidad para todos los trabajos de mejoramiento genético del cultivo del arroz, que incluyan entre sus objetivos, desarrollar cultivares con resistencia a la Piriculariosis. En este sentido, Zambrano *et al.* (2006) plantearon que para obtener cultivares con resistencia duradera a la enfermedad causada por el hongo *P. grisea* es importante tener identificado el sitio "*hot spot*" donde se realizará la selección.

Teniendo en cuenta que la localidad UEBA "Caribe" presentó la diversidad genética más alta de las dos poblaciones del patógeno estudiadas por Fuentes (1998), este autor recomendó su utilización como sitio "*hot spot*". Esta región, además, ha mostrado históricamente una alta incidencia de la enfermedad (MINAG, 2011) razones por las que desde hace más de una década, el programa de mejoramiento genético del arroz la utiliza para la evaluación y selección de líneas cubanas con resistencia a *P. grisea* (Cárdenas *et al.*, 2000; 2002; 2005 a y b; 2007a y b; 2010)

Por su parte, el comportamiento de los cultivares en la localidad UEBA "Caribe", pudiera estar relacionado, entre otros factores, con la baja fertilidad de sus suelos y las condiciones climáticas que caracterizan la época en que fueron desarrollados estos ensayos, los que de conjunto favorecen la existencia de alta presión de la enfermedad.

En general, los suelos de la provincia de Pinar del Río, llevan muchos años dedicados al cultivo del arroz, lo que provoca la degradación de sus propiedades por la influencia del fangueo, la inundación y el cambio de las condiciones de oxidación-reducción del mismo (Hernández y Moreno, 2010); así mismo, conlleva la pérdida de la fertilidad en cuanto al contenido de materia orgánica y fósforo, con la consecuente disminución de los rendimientos del cultivo y se favorece el ataque de plagas (MINAG, 2008). Estas consecuencias se aprecian de manera más marcada (Tabla 3) en los suelos de la localidad UEBA "Caribe".

Por otro lado, las condiciones climáticas, de la época en que se realizaron estos ensayos, fueron favorables para el desarrollo de la Piriculariosis, como se aprecia en el Anexo1; las temperaturas mínimas se mantuvieron alrededor de 20^oC y las máximas alrededor de 30^oC, mientras que la humedad relativa se mantuvo alta, con valores en su mayoría superiores a 70%. En este sentido, Pantoja *et al.* (1997) y Muñoz y Gamboa (1998), citados por Navas *et al.*, 2003, plantearon que amplios intervalos entre temperaturas diurnas y nocturnas y alta humedad relativa, son factores importantes que controlan el desarrollo de la Piriculariosis.

Por su parte, Cárdenas *et al.* (2010) encontraron correlaciones estadísticas significativas de valores similares de temperatura con la aparición y desarrollo de la Piriculariosis y según Cornide *et al.* (1994), citados por Álvarez *et al.* (2001) la temperatura es uno de los factores del clima más influyente en la variación de la resistencia de un cultivar y cambios bruscos pueden producir síntomas severos en cultivares de mediana resistencia.

La Figura 3 muestra la representación gráfica conjunta del Biplot (el cual en su primer eje explicó el 73,36 % de la variabilidad total) y el rendimiento promedio de los cultivares y ambientes estudiados. En ella se aprecia que un grupo de cultivares: 'Victoria de Girón',

'J-104', '2077', 'IR 880-C₉', 'IR 759-54-2-2', 'Perla de Cuba', 'Moroberekan' y 'Tetep', se alejan del centro y se agrupan con ambientes determinados, interactúan mucho con el ambiente (localidad x año) en que se sembraron.

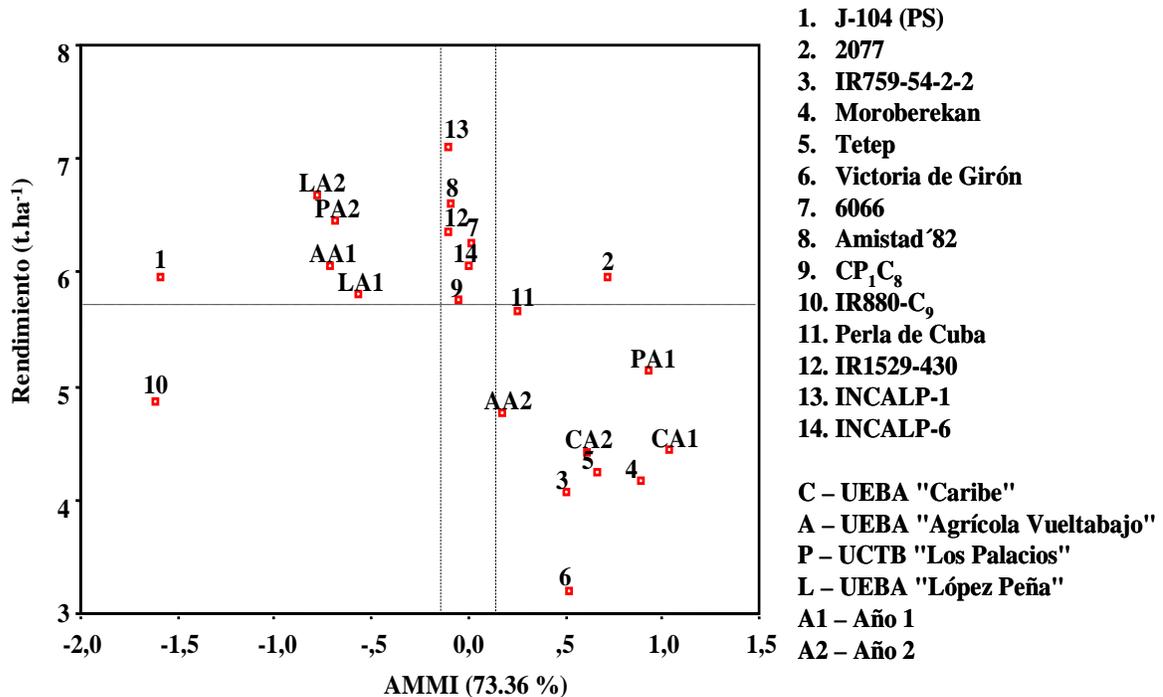


Figura 3. Representación gráfica de las medias del Rendimiento (t.ha⁻¹) y puntuaciones del primer eje principal del Biplot realizado a los cultivares y ambientes evaluados en cuatro zonas de producción arrocera y dos años.

Dentro de este grupo, que se aleja del centro, sobresalieron 'IR 880-C₉' y 'J-104', los que interactuaron favorablemente con la localidad UEBA "López Peña", en sus dos años, (LA1 y LA2), el primer año de la UEBA "Agrícola Vueltabajo" (AA1) y el segundo de la Unidad Científico Tecnológica de Base "Los Palacios" (PA2); pero sucede lo contrario con la localidad UEBA "Caribe" (CA1 y CA2) y los años restantes de las localidades UEBA "Agrícola Vueltabajo" y la Unidad Científico Tecnológica de Base "Los Palacios" (AA2 y PA1).

Los cultivares '6066', 'Amistad '82', 'CP₁C₈', 'IR 1529-430', 'INCA LP-1' e 'INCA LP-6', con los valores más cercanos a cero, fueron los más estables dentro del estudio y lograron un

rendimiento agrícola promedio superior a 5,8 t.ha⁻¹. Todos ellos pudieran utilizarse en los programas de mejoramiento para combinarlos con los cultivares resistentes a la Piriculariosis, por su estabilidad y valores altos de rendimiento.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de interacción significativa genotipo por localidad por año para el comportamiento de las variedades frente a la Piriculariosis y para el rendimiento. Se pudo constatar la utilidad del análisis Biplot para conocer la estabilidad de los cultivares de acuerdo con la proximidad al origen de coordenadas, así como los cultivares responsables de la interacción genotipo – ambiente significativa.

Fueron identificados cuatro cultivares: '2077', 'IR 759-54-2-2', 'Tetep' y 'Moroberekan' de comportamiento más estable por su resistencia a la Piriculariosis y seis: 'Amistad'82', 'INCA LP-1', 'INCA LP-6', '6066', 'CP₁C₈' e 'IR 1529-430' para el rendimiento agrícola, características por las que se seleccionaron como progenitores para los cruzamientos que constituyeron la base de partida para el programa de mejora que se expondrá en este documento.

4.2. Evaluación de haplotipos de *P. grisea* aislados en Cuba para su utilización en la selección de cultivares resistentes a la enfermedad.

Al evaluar el comportamiento del cultivar J-104 frente a haplotipos de *P. grisea* aislados en Cuba (Tabla 12), se observaron los primeros síntomas seis días después del contacto inicial del patógeno con la superficie de las hojas, para todos los haplotipos.

Las primeras manchas fueron pardas, como pequeños puntos café y, entre los 9 y 14 días, se observaron manchas en forma de diamante con el centro blanquecino y bordes amarillentos alrededor de la mancha (Figura 4). La descripción de los síntomas referidos en

este trabajo coincidió con los descritos por Fabregat (1988) y Rodríguez *et al.* (2007), estos últimos autores trabajando con este mismo cultivar (J-104).

Tabla 12. Comportamiento de plantas de arroz del cultivar J-104 frente a haplotipos de *P. grisea* aislados en Cuba.

Haplotipos	Período de incubación (días)	Tamaño de las lesiones (mm)	Área foliar afectada		Grado de la Escala
			Datos originales (%)	Datos transformados	
A 18	6	6,0 a	43,2	0,9 a	7
A 69	6	4,6 b	19,2	1,1 b	6
B 6	6	3,0 c	9,2	1,3 c	5
ESx		0,4*		0,1*	

Medias con letras en común por columna, no difieren significativamente para $p \leq 0,05$ según Prueba de Tukey.

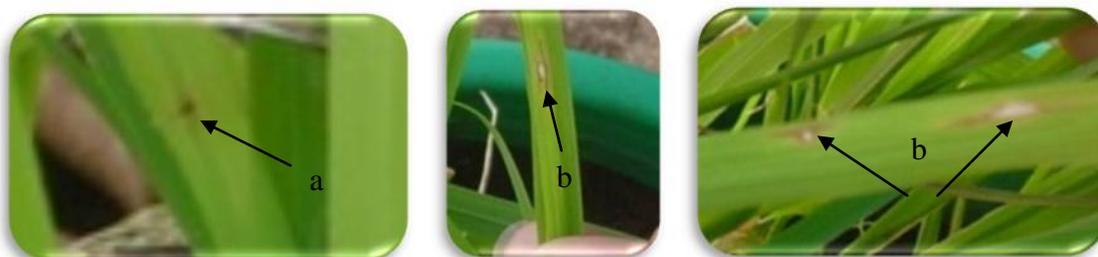


Figura 4. Síntomas de *P. grisea* en hojas del cultivar de arroz J-104. a- Pequeños puntos color café, b- Manchas en forma de diamante

Con relación al período de incubación, Fabregat (1988) encontró variaciones, de acuerdo al cultivar, entre siete y nueve días y Rodríguez *et al.* (2007), para el cultivar 'J-104' informaron un período de siete días, mientras que, a los 14 días se alcanzó el máximo desarrollo de las lesiones.

Al analizar el valor promedio del tamaño de las lesiones y el porcentaje de área foliar afectada, se observó que el cultivar 'J-104' fue clasificado como susceptible frente a todos los haplotipos, según la escala propuesta por el IRRI (2002). El haplotipo A 18 resultó ser más agresivo, ocasionó mayor porcentaje de área foliar afectada, manchas mayoritarias en

forma de huso o diamante y de mayor tamaño y los dos haplotipos agrupados en el linaje A fueron más agresivos que el perteneciente al linaje B.

La susceptibilidad del cultivar 'J-104' frente *P. grisea* ha sido corroborada por trabajos desarrollados en Cuba, tanto en producción, como en condiciones controladas (Morejón *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007).

Fuentes (1998), en los estudios realizados con la población del patógeno presente en los CAI Arroceros "Los Palacios" y "Sur del Jíbaro", los clasificó en cuatro linajes genéticos y destacó el linaje A, como el más ampliamente distribuido y según los resultados de este ensayo son también los más agresivos.

La utilización de estos haplotipos para la evaluación de cultivares de arroz, pudiera contribuir a la selección de genes de resistencia para las poblaciones patogénicas presentes en Cuba e incluso piramidar genes que confieran resistencia a diferentes linajes lo que permitirá lograr una resistencia más duradera frente al patógeno. Fueron seleccionados los haplotipos A 18 y B 6 para la evaluación de cultivares que se efectuará en el epígrafe 4.4.1 y de esta forma están representados dos linajes del patógeno, así como el linaje más ampliamente distribuido y agresivo.

4.3. Método de mejoramiento empleado para la obtención de nuevas líneas.

4.3.1. Hibridaciones entre los cultivares seleccionados por su resistencia a la Piriculariosis y buen comportamiento agronómico.

En la Tabla 13 se presentan los cruzamientos que lograron la formación de granos; en ella se aprecia que, solo el 50% de las 48 combinaciones realizadas formaron semillas, por lo que no se logró completar el diseño genético propuesto inicialmente.

Tabla 13. Cruzamientos directos y recíprocos entre cultivares resistentes a la Piriculariosis y cultivares de buen comportamiento agronómico, que lograron formación de granos.

Progenitor resistente como padre	Progenitor resistente como madre
1. Amistad'82 / 2077	12. 2077 / Amistad'82
2. Amistad'82 / IR 759-54-2-2	13. IR 759-54-2-2 / Amistad'82
3. Amistad'82 / Tetep	-
-	14. Moroberekan / Amistad'82
-	15. 2077 / INCA LP-1
4. INCA LP-1 / IR 759-54-2-2	-
5. INCA LP1 / Tetep	16. Tetep / INCA LP 1
6. INCA LP1 / Moroberekan	17. Moroberekan / INCA LP-1
-	18. IR 759-54-2-2 / INCA LP-6
7. INCA LP-6 / Tetep	19. Tetep / INCA LP-6
8. INCA LP-6 / Moroberekan	20. Moroberekan / INCA LP-6
9. 6066 / IR 759-54-2-2	21. IR 759-54-2-2 / 6066
-	22. Moroberekan / 6066
10. CP ₁ C ₈ / 2077	23. 2077 / CP ₁ C ₈
-	24. Tetep / CP ₁ C ₈
11. IR 1529-430 / IR 759-54-2-2	-

- Cruces recíprocos que no formaron semillas

Los cultivares 'Amistad'82', 'INCA LP-1' e 'INCA LP-6' lograron los mejores resultados como progenitores pues se logró obtener semilla con un 75, 75 y 63 % de efectividad, respectivamente, al parecer, poseen mejor habilidad combinatoria general para la formación de granos en cruces artificiales que el resto de los cultivares de buen comportamiento agronómico empleados.

Los progenitores resistentes lograron cantidades similares de combinaciones; 'IR759-54-2-2' (siete), 'Tetep' y 'Moroberekan' (seis) y '2077' (cinco), pero su efectividad fue específica para determinados cultivares, como, 'IR 759-54-2-2' que combinó mejor con 'Amistad'82' y '6066', mientras que 'Tetep' y 'Moroberekan' combinaron mejor con 'INCA LP-1' e 'INCA LP-6', y el cultivar '2077' combinó mejor con 'Amistad'82' y 'CP₁C₈'.

Al analizar la procedencia del cultivar 'INCA LP-1' (Tabla 1) se destaca que 'Amistad'82' es uno de sus progenitores, o sea, parte de la información genética que posee 'INCALP-1'

proviene de 'Amistad'82', razón por la cual se pueden presentar similitudes en el comportamiento de ambos, sin embargo 'IR 1529-430', uno de los progenitores de 'Amistad'82' formó semillas en una sola combinación.

En la Tabla 13 se aprecia, además, que algunas combinaciones lograron formar semillas sólo con uno de los progenitores utilizados como madre o padre, por ejemplo los cruces de 'Amistad'82' con 'Moroberekan' (cultivar del tipo *japónica*) y 'Tetep', solo tuvieron éxito cuando 'Moroberekan' fue utilizado como madre y 'Tetep' como padre. El hecho de planificar cruces y sus recíprocos, brindó la posibilidad de contar con semilla de un número mayor de combinaciones.

De los seis cultivares seleccionados como progenitores, por su buen comportamiento agronómico, tres de estos: '6066', 'CP₁C₈' e 'IR 1529-430', no lograron obtener semillas al combinarlos con los cultivares resistentes y, dentro de ellos destacó negativamente el cultivar 'IR 1529-430', del que sólo se obtuvo un cruzamiento. No obstante, se logró un amplio espectro de combinaciones de las que se puede esperar variabilidad, y dentro de esta, la obtención de recombinantes favorables para la selección de nuevos cultivares, según el objetivo planteado.

4.3.2. Cultivo *in vitro* de anteras de plantas F₂, provenientes de cruces entre los progenitores seleccionados.

Evaluación de medios de cultivo. El cultivo *in vitro* de anteras de las plantas F₂ provenientes de los cruces efectuados entre los cultivares resistentes a la Piriculariosis y cultivares de buen comportamiento agronómico ofreció una respuesta diferenciada, ya que no todos fueron capaces de formar callos y los que tuvieron éxito, no lo hicieron en igual

magnitud (Figura 5). La frecuencia de anteras que formaron callos osciló entre 0 y 55,3 %, dependiendo del genotipo y el medio de cultivo.

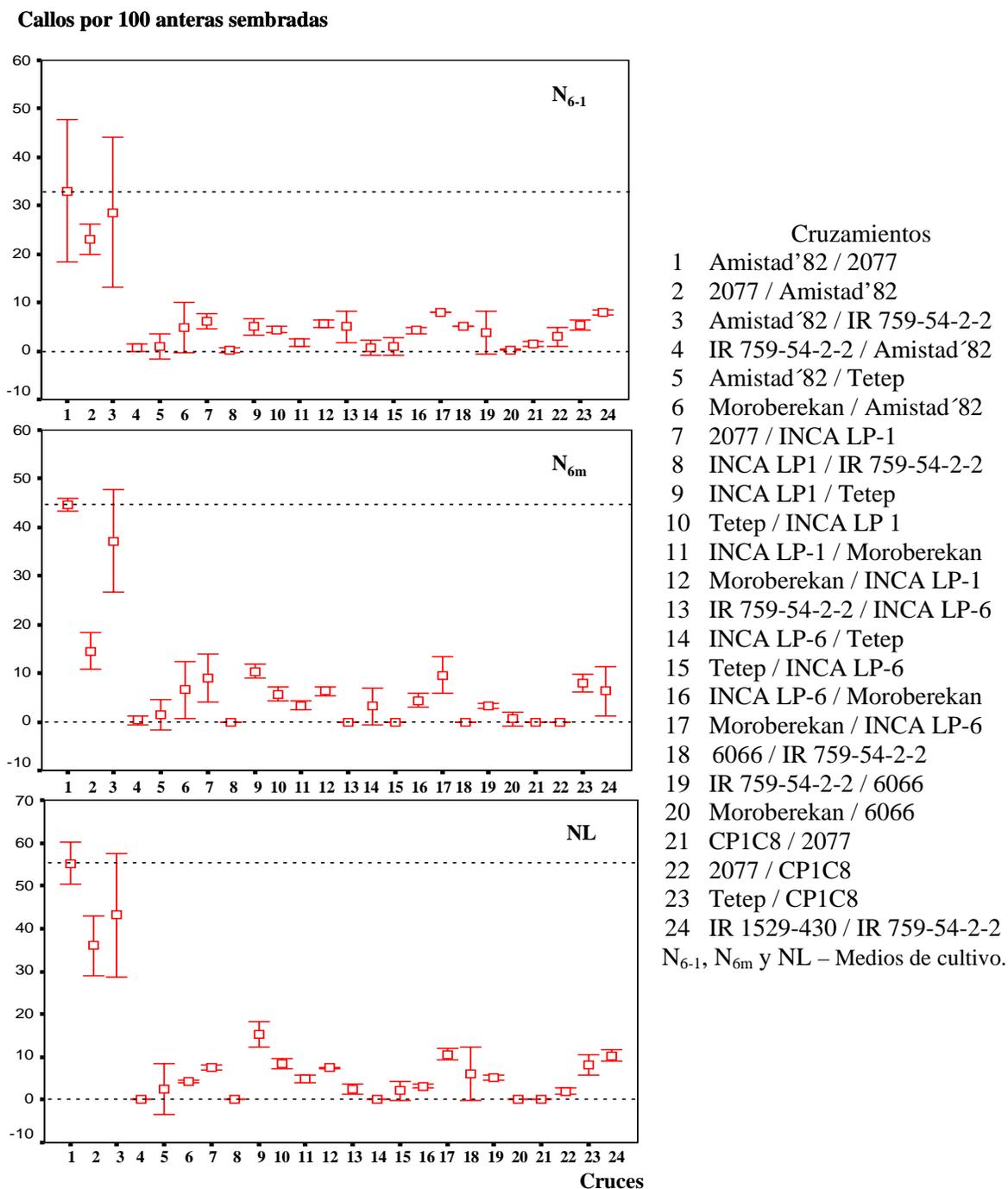


Figura 5. Formación de callos por cada 100 anteras sembradas, en tres medios de cultivo, provenientes de plantas F_2 de los cruces entre cultivares resistentes a la Piriculariosis y cultivares de buen comportamiento agronómico.

El valor máximo fue alcanzado por el cruce Amistad'82 / 2077 en el medio NL (55,3 callos por cada 100 anteras sembradas) sin diferencias con el cruce Amistad'82 / IR 759-54-2-2 (43,2 callos). En los otros dos medios evaluados se apreció similar comportamiento, aunque con valores más bajos. En estos cruces participó Amistad'82 como progenitor femenino; sin embargo otros cruces en los que interviene este cultivar (IR 759-54-2-2 / Amistad'82, Amistad'82 / Tetep y Moroberekan / Amistad'82), indistintamente de su utilización como hembra o macho, mostraron valores muy inferiores (entre 0 y 6,6%).

Al respecto, muchos autores han encontrado que tanto el medio de cultivo como el genotipo, son factores de gran importancia para la obtención de diploides a través del cultivo *in vitro* de anteras (Grewal *et al.*, 2006; Niroula y Bimb, 2009; Yaloujeh *et al.*, 2009; Khatun *et al.*, 2010; Gueye y Ndir, 2010).

Kwon *et al.* (2002) informaron que la respuesta de los cultivares a la inducción de callos y regeneración de plantas fue muy heredable y se controló por genes nucleares. Estos resultados sugieren que pudieran transferirse dichos genes, presentes en líneas que responden al cultivo de anteras, hacia líneas recalcitrantes a través de la recombinación genética (Bagheri y Jelodar, 2008).

En los resultados de este trabajo, para algunas combinaciones se apreció también, el efecto que pudieron tener los genes de herencia materna en la formación de callos, pues si bien el cruce Amistad'82 / IR 759-54-2-2 obtuvo valores altos en los tres medios de cultivo empleados; en otras combinaciones recíprocas, con la utilización del cultivar 'IR759-54-2-2' como progenitor femenino, no hubo prácticamente formación de callos, en ninguno de los tres medios evaluados.

Con la utilización del medio NL se lograron, en el 60% de los cruces, los valores más altos para la formación de callos. Si se analiza la composición de cada uno de estos medios se aprecia que en el medio NL (Anexo 3) fue en el único que se sustituyó la sacarosa por maltosa y se empleó el nitrato de plata.

En este sentido, Lentini *et al.* (2006), al reemplazar la sacarosa por maltosa obtuvieron incrementos significativos en la inducción de callos de cultivares tipo *índica* recalcitrantes y la producción de plantas verdes de estos callos se incrementó significativamente. Estos autores atribuyeron este efecto a que la sacarosa se hidroliza rápidamente en glucosa y fructosa, como resultado de la actividad de la enzima invertasa que se encuentra en las paredes de la antera, lo que provoca cambios en el potencial osmótico del medio y, por tanto, se acentúa el efecto inhibitorio de la fructosa sobre el desarrollo de embriones originados de microsporas.

Otros autores recomiendan también el empleo de maltosa en sustitución de sacarosa para el medio de inducción de callos, sobre todo, para la especie *índica* (Bishnoi *et al.*, 2000; Chen y Qin, 2008).

La utilización del nitrato de plata en el medio de inducción de callos reduce notablemente la senescencia de las anteras de arroz de tipo *índica* recalcitrantes, este resultado indica que el etileno acumulado en el frasco, donde fueron sembradas las anteras, pudiera inhibir la formación de callos, efecto que, probablemente, es revertido con la aplicación de este compuesto (Bishnoi *et al.*, 2000; Lentini *et al.*, 2006; Bhojwani *et al.*, 2009).

Se encontraron también diferencias en cuanto al tipo de plantas regeneradas (verdes o albinas) (Figura 6); el cruce INCA LP1 / IR 759-54-2-2 solamente formó plantas albinas (0,3 plantas por cada 100 anteras sembradas), mientras que otros regeneraron de ambos

tipos; en cambio, los cruces IR 759-54-2-2 / Amistad'82, 6066 / IR 759-54-2-2, Moroberekan / 6066 y IR 1529-430 / IR 759-54-2-2 solo formaron plantas verdes (0,3; 7,6; 0,7 y 5,2; respectivamente).

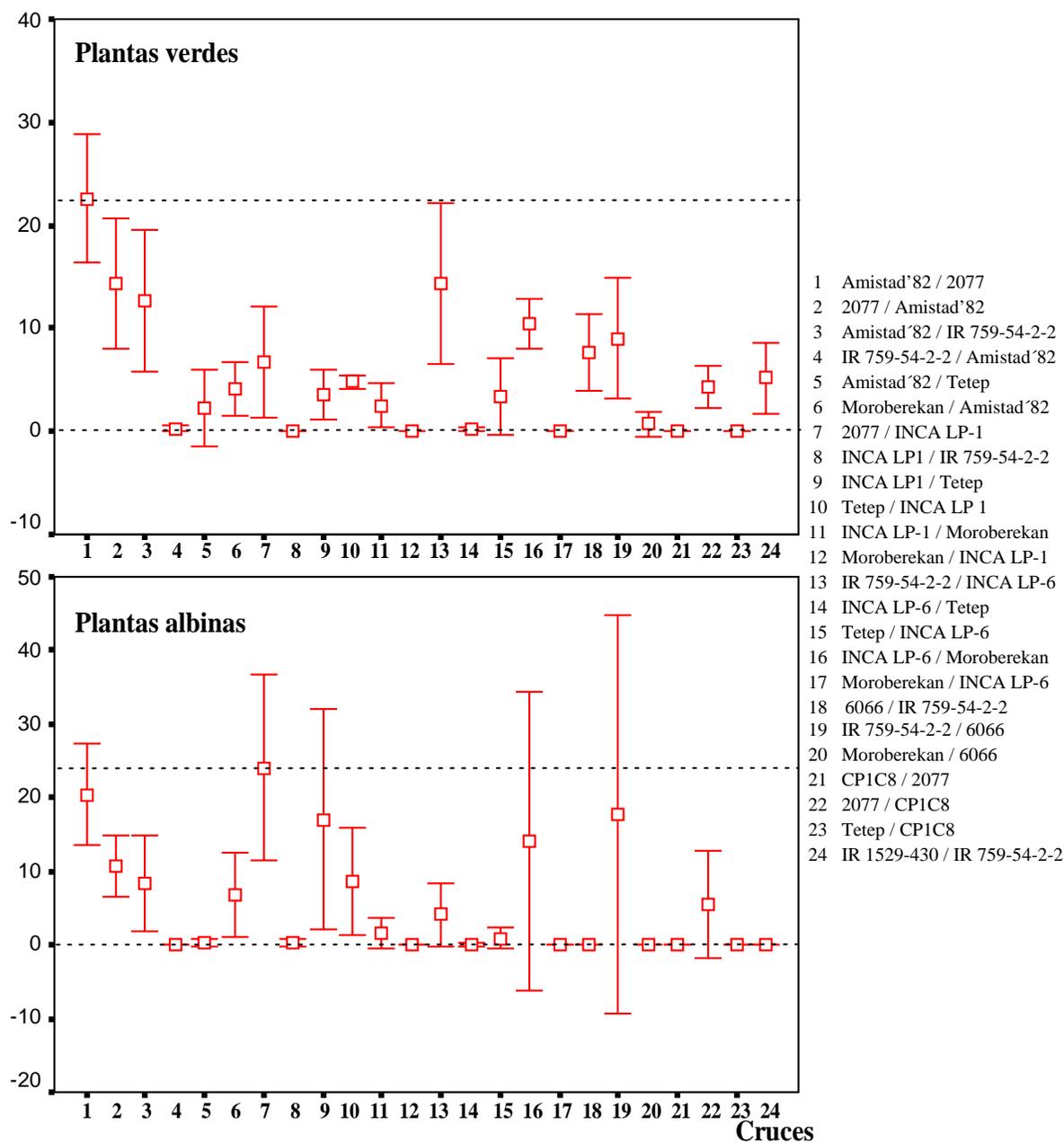


Figura 6. Regeneración de plantas verdes y albinas por cada 100 anteras sembradas provenientes de plantas F_2 de los cruces entre cultivares resistentes a la Piriculariosis y cultivares de buen comportamiento agronómico.

La mayor formación de plantas verdes (22,6 por 100 anteras sembradas) fue obtenida por el cruce Amistad'82 / 2077, sin diferencias con 2077 / Amistad'82, Amistad'82 / IR 759-54-2-2 e IR 759-54-2-2 / INCA LP-6 (14,4; 12,7 y 14,4 plantas por 100 anteras sembradas, respectivamente). En este sentido, los resultados encontrados por diversos autores son muy variables, por ejemplo, Asaduzzaman *et al.* (2003) obtuvieron regeneración de plantas verdes entre los 15 y 30 días después del cultivo y los valores más altos obtenidos fueron de 33,3 %; Shahnewaz *et al.* (2004) obtuvieron entre 57 y 75 plantas verdes por 100 callos, con sólo de uno a ocho callos por 100 anteras. En cambio, Bagheri y Jelodar (2008) obtuvieron 4 - 23 callos y 4 plantas por cada 100 anteras.

La producción de plantas albinas, carentes de clorofila, es un fenómeno común en el cultivo de anteras de cereales (Torp y Andersen, 2009). En arroz, varía con el genotipo; en algunos casos puede obtenerse una alta tasa de regeneración de plantas, pero el porcentaje de plantas albinas puede variar desde 10 % hasta 100 %. El albinismo es particularmente predominante en plantas derivadas de polen inmaduro de híbridos interéspecíficos o híbridos intraespecíficos entre las subespecies *japónica e indica* (Sangwan, 2004). Ankele *et al.* (2005) sugirieron que la formación de la planta albina es un fenómeno complejo, en el cual están envueltos los plastidios y factores nucleares o sus interacciones defectivas.

Al analizar los resultados del análisis de Componentes Principales realizado (Tabla 14), se apreció que las dos primeras componentes explicaron el 93% de la variación total. Los caracteres formación de callos en los tres medios evaluados (N_{6-1} , N_{6m} y NL), así como la regeneración de plantas verdes tuvieron una fuerte contribución a la formación de la primera componente, mientras que la regeneración de plantas albinas contribuyó con un valor más alto a la segunda componente.

Tabla 14. Valores propios y porcentaje de contribución y acumulado de las componentes 1 y 2 y sus correlaciones con las componentes originales.

	Componentes Principales	
	C ₁	C ₂
Valores propios	3,912	0,736
% Contribución total	78,240	14,729
% Acumulado		92,968
Callos medio N ₆₋₁	0,964	-0,242
Callos medio N _{6m}	0,937	-0,228
Callos medio NL	0,963	-0,232
Plantas verdes	0,865	0,227
Plantas albinas	0,656	0,722

La representación gráfica del comportamiento de los cruces, tomando en consideración estas dos componentes (Figura 7), presentó a las combinaciones Amistad'82 / 2077, 2077 / Amistad'82 y Amistad'82 / IR 759-54-2-2, ubicados en el cuadrante inferior derecho con la mejor respuesta a la utilización de la técnica de cultivo *in vitro*, ya que combinaron mayor formación de callos en los 3 medios (14,6 – 55,3 callos por cada 100 anteras sembradas) con mayor regeneración de plantas verdes (12,7 – 22,6 plantas verdes por cada 100 anteras sembradas) y menos plantas albinas por cada 100 anteras sembradas.

Javed *et al.* (2007) y Silva y Ratnayake (2009) encontraron que cultivares con una alta habilidad para formar callos también mostraron las mejores frecuencias de regeneración de plantas. Mientras que, Talebi *et al.* (2007) informaron casos en los que a pesar de presentar una gran habilidad para formar callos, la regeneración fue pobre, lo que estos autores atribuyeron al medio empleado para la inducción de callos, el cual puede influir en la capacidad posterior para regenerar plantas.

El genotipo, como es conocido, posee también un efecto significativo en la regeneración de plantas verdes; aún cuando es posible producir un alto número de líneas isogénicas de

muchos cultivares e híbridos de arroz de tipo *japónica*, la regeneración de plantas verdes de la mayoría de los cultivares del tipo *índica* es baja (Pérez-Almeida, 2005).

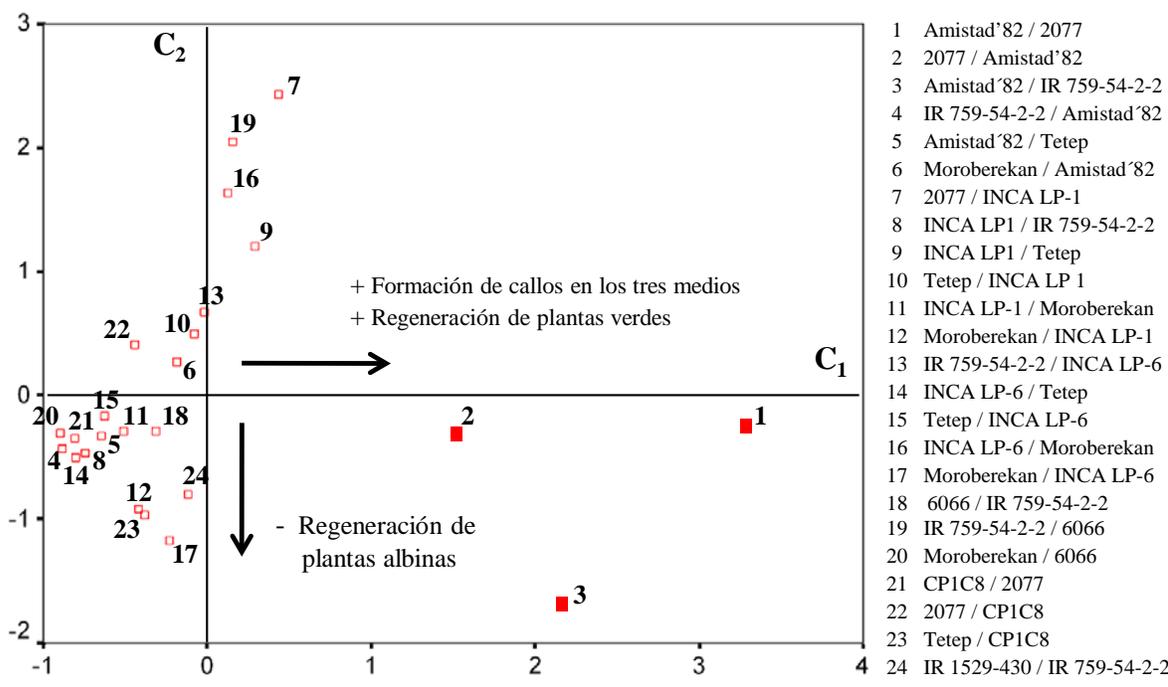


Figura 7. Representación gráfica del comportamiento de los cruces en cuanto a la formación de callos en los tres medios evaluados y la regeneración de plantas verdes según las componentes consideradas.

En tal sentido, Jain y Maluszynski (2004), plantearon que para obtener una buena respuesta del cultivo de anteras, es necesario trabajar con cruzamientos donde uno de los progenitores sea del tipo *japónica*, mientras que otros autores proponen, como una vía para mejorar la eficiencia del cultivo *in vitro* de anteras, la utilización de diferentes medios, teniendo en cuenta el tipo de arroz (*índica* o *japónica*) (Li, 1992; Bishnoi *et al.*, 2000; Bhojwani *et al.*, 2009; Tran y Voung, 2004; Chen y Qin, 2008).

En resumen, con la utilización del medio de cultivo NL se lograron, en el 60% de los cruces, los valores más altos para la formación de callos. Las combinaciones Amistad'82 / 2077, 2077 / Amistad'82 y Amistad / IR 759-54-2-2 mostraron la mejor respuesta a la utilización de la técnica del cultivo *in vitro* de anteras.

4.4. Evaluación y selección de líneas isogénicas que integren resistencia a la Piriculariosis con buenos caracteres agronómicos.

4.4.1. Evaluación de la primera generación de líneas isogénicas obtenidas *in vitro*.

La evaluación morfológica visual indicó la obtención de 142 líneas isogénicas fértiles con un desarrollo similar al de las plantas derivadas de semilla y líneas infértiles posiblemente haploides (Figura 8).



Figura 8. A- Panículas fértiles, similares a las diploides y B- infértiles, similares a las haploides, provenientes del cruce INCA LP-1 / Moroberekan.

Las líneas obtenidas de los cruces en los que participaron Amistad´82 e INCA LP-1, evaluadas en su primera generación, mostraron variabilidad (Tabla 15), lo que pudiera ser atribuido a las técnicas de mejoramiento empleadas, ya que esta población proveniente del cultivo de anteras de plantas F_2 , representa la variabilidad genética de la población F_2 .

En este sentido se destacaron las variables número de panículas por planta y granos llenos por panícula, con los coeficientes de variación más altos, mientras que los caracteres relacionados con el grano (largo, ancho y masa de 1000 de ellos) presentaron los coeficientes de variación más bajos.

Tabla 15. Variación observada en la primera generación de las líneas obtenidas de los cruces en los que participaron Amistad '82 e INCA LP-1.

Caracteres evaluados	Progenitores		N**	Min	Cruces*			CV
	Amistad '82	2077			Max	X	ESx	
Altura (cm)	83,4	73,0	20	80,3	92,3	86,8	0,75	3,88
Panículas por planta	20	12	20	13	22	17	0,47	12,15
Longitud de la panícula (cm)	25,0	19,4	20	18,7	21,8	20,5	0,17	3,74
Granos llenos por panícula	110	80	20	40	79	64	2,25	15,84
Masa de 1000 granos (g)	29,3	28,0	20	27,3	30,7	29,1	0,20	1,40
Largo del grano (mm)	10,2	10,2	20	9,8	10,9	10,3	0,06	2,45
Ancho del grano (mm)	2,5	2,4	20	2,4	2,6	2,5	0,01	1,83
	2077	Amistad '82			2077 / Amistad '82			
Altura (cm)	73,0	83,4	17	65,0	93,2	86,2	1,85	8,87
Panículas por planta	12	20	17	4	19	15	1,03	28,17
Longitud de la panícula (cm)	19,4	25,0	17	15,3	22,0	20,3	0,47	9,59
Granos llenos por panícula	80	110	17	38	101	64	3,73	23,99
Masa de 1000 granos (g)	28,0	29,3	17	26,0	31,3	29,0	0,31	4,38
Largo del grano (mm)	10,2	10,2	17	9,6	10,4	10,2	0,05	2,14
Ancho del grano (mm)	2,4	2,5	17	2,1	2,6	2,5	0,03	5,12
	Amistad '82	IR 759-54-2-2			Amistad '82 / IR 759-54-2-2			
Altura (cm)	83,4	73,0	15	80,9	94,6	86,5	1,09	4,89
Panículas por planta	20	15	15	14	19	16	0,33	8,00
Longitud de la panícula (cm)	25,0	15,5	15	19,6	21,9	21,0	0,17	3,15
Granos llenos por panícula	110	105	15	55	90	66	2,30	13,49
Masa de 1000 granos (g)	29,3	24,7	15	28,7	30,3	29,2	0,14	1,83
Largo del grano (mm)	10,2	9,6	15	9,8	10,5	10,2	0,05	1,85
Ancho del grano (mm)	2,5	2,1	15	2,5	2,6	2,5	0,01	1,47
	Moroberekan	Amistad '82			Moroberekan / Amistad '82			
Altura (cm)	125,0	83,4	6	65,0	89,0	73,0	3,58	12,00
Panículas por planta	7	20	6	4	8	6	0,76	31,03
Longitud de la panícula (cm)	22,6	25,0	6	15,3	23,6	16,8	1,36	19,89
Granos llenos por panícula	88	110	6	36	100	52	10,10	47,57
Masa de 1000 granos (g)	36,0	29,3	6	23,3	32,0	26,2	1,24	11,58
Largo del grano (mm)	10,6	10,2	6	9,6	10,6	9,8	0,16	3,96
Ancho del grano (mm)	2,9	2,5	6	2,1	2,6	2,3	0,08	8,59
	2077	INCA LP-1			2077 / INCA LP-1			
Altura (cm)	73,0	90,0	9	65,0	91,0	74,1	3,52	14,25
Panículas por planta	12	19	9	4	16	8	1,43	53,69
Longitud de la panícula (cm)	19,4	21,3	9	15,3	23,0	17,8	1,20	20,27
Granos llenos por panícula	80	108	9	36	118	59	9,99	50,78
Masa de 1000 granos (g)	28,0	29,0	9	23,3	32,9	27,6	1,02	11,06
Largo del grano (mm)	10,2	10,5	9	9,6	10,6	10,0	0,12	3,58
Ancho del grano (mm)	2,4	2,6	9	2,1	2,7	2,3	0,07	8,92
	INCA LP-1	Tetep			INCA LP-1 / Tetep			
Altura (cm)	90,0	120,0	6	65,0	89,0	82,5	3,81	11,31
Panículas por planta	19	10	6	5	12	10	1,10	26,83
Longitud de la panícula (cm)	21,3	15,5	6	15,3	23,0	21,3	1,20	13,83
Granos llenos por panícula	108	44	6	38	118	86	10,96	31,22
Masa de 1000 granos (g)	29,0	26,2	6	27,0	32,9	30,1	0,84	6,86
Largo del grano (mm)	10,5	9,6	6	9,8	10,6	10,3	0,12	2,75
Ancho del grano (mm)	2,6	2,1	6	2,3	2,6	2,5	0,05	5,12
	Tetep	INCA LP-1			Tetep / INCA LP-1			
Altura (cm)	120,0	90,0	6	65,0	73,0	67,7	1,69	6,10
Panículas por planta	10	19	6	4	8	6	0,67	27,39
Longitud de la panícula (cm)	15,5	21,3	6	15,3	15,5	15,4	0,04	0,67
Granos llenos por panícula	44	108	6	36	56	41	3,04	18,19
Masa de 1000 granos (g)	26,2	29,0	6	23,3	27,0	25,5	0,60	5,77
Largo del grano (mm)	9,6	10,5	6	9,6	9,8	9,7	0,04	1,07
Ancho del grano (mm)	2,1	2,6	6	2,1	2,3	2,2	0,04	4,69

*Resultados de las líneas por cruce **Número de líneas evaluadas por cruce

Este resultado indica que se pudieran esperar mayores avances por selección para el número de panículas por planta y granos llenos por panícula que para los caracteres

relacionados con el grano, los cuales son menos influenciados por el ambiente.

El resto de las líneas isogénicas evaluadas provenientes de los cruces con los progenitores 'INCA LP-6', '6066', 'IR 1529-430' y 'CP₁C₈' (Tabla 16), mostraron un comportamiento similar a las líneas anteriores. De manera general dentro de cada población, para todos los caracteres evaluados, se obtuvieron líneas que superaron a sus progenitores de buenos caracteres agronómicos y otras inferiores a la media de dicho progenitor; lo que constituye otra evidencia de la variabilidad existente en las mismas. Resultados similares fueron obtenidos por Mandal *et al.* (2000) al evaluar 180 líneas isogénicas obtenidas mediante el cultivo de anteras.

Roy y Mandal (2005) encontraron variaciones fenotípicas con relación al número de tallos por planta, la longitud media de la panícula, número de granos llenos y altura de la planta en la primera generación de líneas isogénicas de arroz, las que pudieron ser debidas a factores fisiológicos, químicos, componentes del medio de cultivo, condiciones biológicas del explante, recombinación somática y mutaciones, entre otras, que pudieron ocurrir con el cultivo de anteras. También señalaron a los caracteres panículas por planta, granos llenos por panícula y el rendimiento por planta, como los de más altos coeficientes de variación.

Por otro lado, las características del grano, según algunos autores, poseen una alta heredabilidad y pueden ser poco influenciadas por el ambiente. En este sentido, León y Carreres (2002) plantearon que las dimensiones del grano son atributos muy condicionados por la genética del cultivar, con escasa o nula influencia del ambiente.

En sus trabajos, Martínez *et al.* (2002) indicaron que el tamaño del grano es altamente heredable en la mayoría de los ambientes, características que se fijan excepcionalmente temprano en las generaciones segregantes (Pérez-Almeida y Montoya, 2009).

Tabla 16. Variación observada en la primera generación de las líneas obtenidas de los cruces en los que participaron INCA LP-6, 6066, IR 1529-430 y CP₁C₈.

Caracteres evaluados	Progenitores		N**	Cruces*				CV
	IR 759-54-2-2	INCA LP-6		Min	Max	X	ESx	
				IR 759-54-2-2 / INCA LP-6				
Altura (cm)	73,0	90,6	12	65,0	93,2	74,1	3,09	14,43
Panículas por planta	15	18	12	4	14	8	1,05	45,58
Longitud de la panícula (cm)	15,5	22,0	12	15,3	23,0	17,2	0,94	18,99
Granos llenos por panícula	105	102	12	36	107	58	7,58	45,25
Masa de 1000 granos (g)	24,7	28,0	12	23,3	32,8	26,9	0,94	12,11
Largo del grano (mm)	9,6	10,2	12	9,6	10,6	9,9	0,11	3,79
Ancho del grano (mm)	2,1	2,4	12	2,1	2,6	2,3	0,06	8,74
	INCA LP-6	Moroberekan		INCA LP-6 / Moroberekan				
Altura (cm)	90,6	125,0	10	65,0	95,1	85,1	2,95	10,95
Panículas por planta	18	7	10	11	17	14	0,58	13,06
Longitud de la panícula (cm)	22,0	22,6	10	15,3	22,6	20,8	0,91	13,79
Granos llenos por panícula	102	88	10	73	97	85	2,47	9,18
Masa de 1000 granos (g)	28,0	36,0	10	27,5	35,4	30,0	0,74	7,75
Largo del grano (mm)	10,2	10,6	10	9,6	10,5	10,2	0,09	2,88
Ancho del grano (mm)	2,4	2,9	10	2,1	2,7	2,5	0,06	7,57
	Tetep	INCA LP-6		Tetep / INCA LP-6				
Altura (cm)	120,0	90,6	6	65,0	89,0	78,7	4,00	12,45
Panículas por planta	10	18	6	4	13	9	1,75	47,53
Longitud de la panícula (cm)	15,5	22,0	6	15,3	22,6	18,5	1,38	18,23
Granos llenos por panícula	44	102	6	40	99	73	10,02	33,61
Masa de 1000 granos (g)	26,2	28,0	6	26,0	32,9	28,1	1,03	9,02
Largo del grano (mm)	9,6	10,2	6	9,6	10,6	10,1	0,16	3,85
Ancho del grano (mm)	2,1	2,4	6	2,1	2,6	2,4	0,08	8,02
	6066	IR 759-54-2-2		6066 / IR 759-54-2-2				
Altura (cm)	91,0	73,0	8	65,0	89,0	77,0	4,00	14,71
Panículas por planta	21	15	8	4	13	9	1,16	36,49
Longitud de la panícula (cm)	21,3	15,5	8	15,3	22,6	18,9	1,35	20,17
Granos llenos por panícula	112	105	8	38	118	71	11,74	46,77
Masa de 1000 granos (g)	29,0	24,7	8	23,3	32,9	27,9	1,27	12,86
Largo del grano (mm)	10,6	9,6	8	9,6	10,6	10,1	0,14	3,94
Ancho del grano (mm)	2,6	2,1	8	2,1	2,6	2,4	0,07	7,69
	IR 759-54-2-2	6066		IR 759-54-2-2 / 6066				
Altura (cm)	73,0	91,0	16	73,0	95,1	85,2	1,90	8,92
Panículas por planta	15	21	16	4	18	14	1,09	31,18
Longitud de la panícula (cm)	15,5	21,3	16	15,5	22,6	20,5	0,66	12,95
Granos llenos por panícula	105	112	16	40	162	78	7,59	38,90
Masa de 1000 granos (g)	24,7	29,0	16	25,0	32,9	28,7	0,51	7,05
Largo del grano (mm)	9,6	10,6	16	9,6	10,6	10,1	0,09	3,57
Ancho del grano (mm)	2,1	2,6	16	2,1	2,6	2,5	0,05	8,35
	2077	CP ₁ C ₈		2077 / CP ₁ C ₈				
Altura (cm)	73,0	83,1	5	65,0	73,0	69,8	1,96	6,28
Panículas por planta	12	11	5	4	14	7	1,93	61,78
Longitud de la panícula (cm)	19,4	20,9	5	15,3	15,5	15,4	0,05	0,71
Granos llenos por panícula	80	78	5	38	120	59	15,48	58,68
Masa de 1000 granos (g)	28,0	28,5	5	23,3	27,0	25,4	0,67	5,89
Largo del grano (mm)	10,2	10,1	5	9,6	9,8	9,7	0,05	1,13
Ancho del grano (mm)	2,4	2,5	5	2,1	2,3	2,2	0,05	4,93
	IR 1529-430	IR 759-54-2-2		IR1529-430 / IR759-54-2-2				
Altura (cm)	91,0	73,0	6	65,0	89,0	78,1	3,79	11,87
Panículas por planta	22	15	6	4	15	10	2,08	50,86
Longitud de la panícula (cm)	24,0	15,5	6	15,3	22,6	18,6	1,43	18,90
Granos llenos por panícula	95	105	6	38	99	63	11,34	44,08
Masa de 1000 granos (g)	32,0	24,7	6	23,3	32,9	27,4	1,44	12,83
Largo del grano (mm)	10,6	9,6	6	9,6	10,6	10,0	0,17	4,21
Ancho del grano (mm)	2,7	2,1	6	2,1	2,6	2,3	0,08	8,16

*Resultados de las líneas por cruce **Número de líneas evaluadas por cruce.

Al analizar los caracteres, panículas por planta, granos llenos por panícula y masa de 1000 granos, componentes importantes que determinan el rendimiento del cultivo, se apreciaron

los mejores resultados en panículas por planta para los cruces Amistad'82 / 2077, Amistad'82 / IR 759-54-2-2, 2077 / Amistad'82, INCA LP-6 / Moroberekan e IR 759-54-2-2 / 6066, con 17, 16, 15, 14 y 14 panículas, respectivamente. Los mayores valores de granos llenos por panícula (86 y 85) y masa de 1000 granos (30,1 y 30,0) fueron obtenidos por las líneas generadas de los cruces INCA LP-1 / Tetep e INCA LP-6 / Moroberekan, respectivamente.

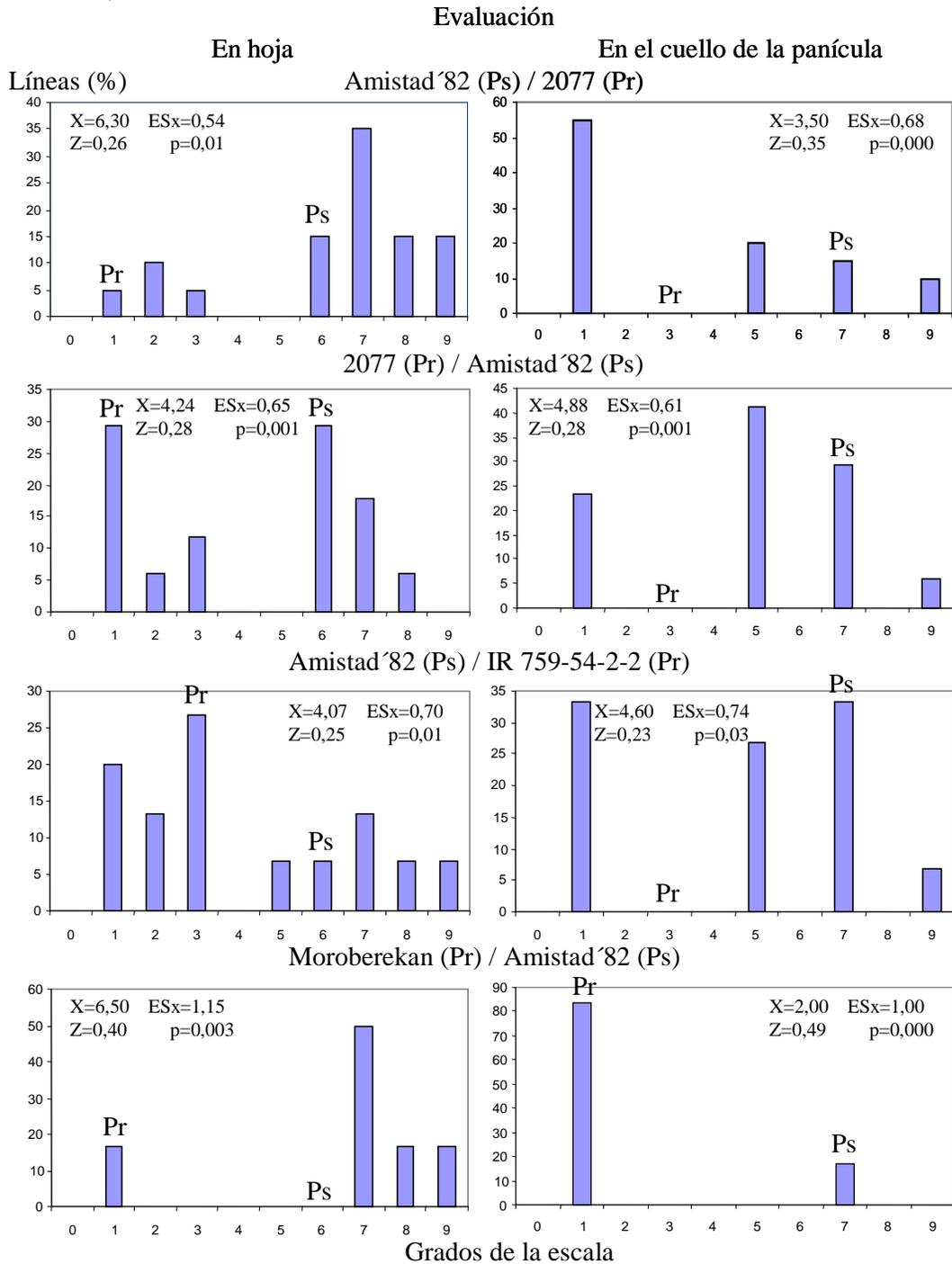
Según Lentini *et al.* (2006), al realizar la selección de las plantas regeneradas (R1), se debe tener en cuenta que éstas han pasado por diferentes situaciones de estrés en su desarrollo, lo que puede provocar que ciertas características fenotípicas, tales como altura, floración, macollamiento, fertilidad y centro blanco, puedan verse afectadas y no se expresen en forma normal. Por consiguiente, los datos que se tomen en las plantas regeneradas, en su primera generación, deben interpretarse con cuidado.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, a pesar de haber observado variabilidad en las líneas isogénicas para los caracteres evaluados, no se efectuó selección en la primera generación; no obstante, es de destacar que el cruce INCA LP-6 / Moroberekan, en esta primera generación, presentó valores altos para los caracteres panículas por planta, granos llenos por panícula y masa de 100 granos, los que son componentes importantes para la obtención de altos rendimientos.

4.4.2. Evaluación de la segunda generación de líneas isogénicas.

Comportamiento frente a la Piriculariosis. En la Figura 9 se presentan los resultados de la distribución de frecuencias realizadas a los datos del comportamiento frente a la Piriculariosis de las líneas obtenidas procedentes de cuatro poblaciones del progenitor comercial 'Amistad'82' (susceptible), combinado con tres progenitores resistentes

(Amistad'82 / 2077, 2077 / Amistad'82, Amistad'82 / IR759-54-2-2 y Moroberekan / Amistad'82).



Pr y Ps- Hacen referencia a la clase en que se ubicaron los progenitores resistente y susceptible, respectivamente.

Figura 9. Distribución de frecuencia de las líneas provenientes de cuatro cruzamientos, atendiendo a su evaluación frente a la Piriculariosis en hoja y cuello, según escalas de nueve grados (IRRI, 2002).

Cada clase se correspondió con el valor de la escala de nueve grados empleada para evaluar la respuesta a la enfermedad. El resto de las poblaciones mostraron un comportamiento similar en la distribución de frecuencias, pero la disponibilidad de líneas fue menor, por lo que se consideró no utilizarlas en este análisis.

Teniendo en cuenta que estas líneas fueron obtenidas a partir del cultivo de anteras de plantas F_2 , constituyen una representación de la segregación de dicha generación, de los cruces que les dieron origen, pudiéndose identificar los recombinantes que regeneraron y constituyeron la base genética para la selección de la resistencia a *P. grisea*.

En ninguno de los cruzamientos las poblaciones siguieron una distribución normal ($p < 0,05$), según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. No existió solapamiento en el comportamiento de los progenitores, pues se agruparon en clases diferentes y la población de líneas F_2 segregó, por su reacción frente a la Piriculariosis, con rangos comprendidos entre las clases uno y nueve, o sea que las líneas se comportaron desde resistentes hasta susceptibles, pero con ausencia de la clase cuatro y, en algunos casos, también estuvo ausente la clase cinco y otras clases intermedias.

De lo anterior se deduce que, dentro de la segregación obtenida en la mayoría de los cruces, no se obtuvieron líneas con una respuesta intermedia a la enfermedad, si se compara con la de los progenitores. El hecho de que no se obtuvieran líneas con un fenotipo intermedio, con respecto al de los progenitores, evidencia que ninguna de las líneas fue heterocigótica para el carácter, lo que está en correspondencia con el doblamiento cromosómico del polen haploide que ocurre mediante el cultivo *in vitro* de anteras, que hace posible la producción de líneas homocigóticas.

En los dos momentos evaluados se presentaron individuos de la progenie con grados susceptibles superiores a los obtenidos por los progenitores y también individuos que originaron clases de resistencia diferentes a la que corresponde al progenitor resistente. Esta aparición en la progenie, de clases nuevas, evidencia los resultados de la recombinación de genes presentes en los progenitores, que dieron lugar a fenotipos nuevos para este carácter o bien a variaciones genéticas que tuvieron su origen en el proceso del cultivo *in vitro*.

Por otra parte, obtener líneas con una expresión de la resistencia a la piriculariosis, igual o mayor que la del progenitor resistente, indica que en la expresión de la resistencia pudieron estar involucrados genes mayores de efecto aditivo, cuya acción fue incrementada, posiblemente por genes menores, también con efecto aditivo, explicándose así los mayores niveles de resistencia que tuvieron algunas de las líneas obtenidas.

En la evaluación de la resistencia a la Piriculariosis en hoja, las poblaciones presentaron una distribución de frecuencias mayor de líneas susceptibles, por ejemplo Amistad'82 / 2077 y Moroberekan / Amistad'82, o de similar proporción de líneas resistentes y susceptibles (2077 / Amistad'82 y Amistad'82 / IR 759-54-2-2), lo cual indica que, al parecer, no hay presencia de genes dominantes actuando en la herencia de este carácter.

Todo lo anterior evidencia que el método empleado para la obtención de líneas isogénicas, además de agilizar el proceso, elimina de la segregación aquellos genotipos en heterocigosis y por ello la selección por el fenotipo resistente se hace muy efectiva.

En la evaluación de la resistencia a la Piriculariosis en el cuello de la panícula, se aprecian también poblaciones que presentaron una distribución de frecuencias mayor de líneas susceptibles (2077 / Amistad'82 y Amistad'82 / IR 759-54-2-2), o de similar proporción de

líneas resistentes y susceptibles (Amistad'82 / 2077), pero apareció además, una población con mayor proporción de líneas resistentes (Moroberekan / Amistad'82).

El comportamiento diferente de las líneas, en los dos momentos evaluados, pudiera estar condicionado por la presencia en campo de diferentes haplotipos del hongo y/o deberse a que la resistencia a la enfermedad esté determinada por genes diferentes, de acuerdo a la edad de la planta y órgano que afecta (hoja o cuello de la panícula) y las condiciones climáticas que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad.

Al respecto, Berrio *et al.* (2004), teniendo en cuenta la segregación para susceptibilidad en líneas derivadas de plantas resistentes que son heterocigóticas para uno o más genes, proponen que tres o más genes dominantes deben combinarse en una condición homocigótica para conferir resistencia durable. Por su parte, Pérez-Almeida *et al.* (2005) plantearon que la resistencia a la Piriculariosis es un carácter de herencia compleja y se sugiere que están involucrados, al menos, tres genes mayores independientes en su control.

Jia *et al.* (2004), al evaluar la descendencia de un cruce entre el cultivar 'Katy', que posee el gen *Pi-ta* para resistencia a *P. grisea* y otro que no lo posee, no encontraron el gen en los individuos susceptibles y sugieren que este actúa como un gen dominante. En trabajos posteriores comentaron la presencia de este gen en un grupo de cultivares estadounidenses, así como en el cultivar 'Tetep' de origen vietnamita (Jia, 2009), el que posee también los genes *Pi-1* y *Pi-kh* (Séré *et al.*, 2007). Por su parte, la resistencia del cultivar 'Moroberekan' se le atribuye a la presencia de un grupo de genes mayores (Infoagro, 2005; McNally *et al.*, 2006) y se han obtenido líneas resistentes provenientes de cruces con el cultivar 'IR 759-54-2-2' (Hernández, 2006), pero en la literatura consultada no se define cuales genes posee ni el mecanismo de resistencia que actúa.

Livore (2008), sobre la base de los resultados de la caracterización de las poblaciones del hongo presentes en Uruguay, Brasil y Argentina, señaló que el alelo de resistencia del gen *Pi-ta*, presente en los cultivares 'Yashiro mochi' y 'K1', les confirió incompatibilidad con el linaje A y sólo la combinación de los genes *Pi1*, *Pi2* y *Pi33* otorgan una resistencia completa a todos los linajes presentes en la región.

Estudios realizados en el Centro Internacional de Agricultura Tropical de Colombia han demostrado que la combinación de los genes de resistencia *Pi-1* (cromosoma 11), *Pi-2* (cromosoma seis), y el gen *Pi-33* (cromosoma ocho) confieren resistencia a muchas poblaciones de *P. grisea* en América Latina (Livore, 2008 y Fuentes *et al.*, 2008).

El número total de líneas resistentes identificadas en la evaluación efectuada, tanto en hojas como en el cuello de la panícula, se presentan en la Tabla 17. Sólo la población proveniente del cruce Tetep / INCA LP-1, no aportó líneas resistentes en la evaluación efectuada a las hojas, en el estado de plántula, mientras que el resto de las poblaciones aportaron 91 líneas en total que mostraron resistencia a la enfermedad cuando esta fue evaluada en uno de los dos momentos.

Es importante señalar que la obtención de altos rendimientos de los cultivares de arroz está muy asociado con su resistencia a la Piriculariosis en ambos momentos, ya que una plantación que haya escapado a los daños ocasionados por esta enfermedad en su etapa de plántula, puede ser destruida totalmente si se presenta un ataque severo en el cuello de la panícula. En este sentido, Zambrano *et al.* (2006) plantearon que, cuando no hay destrucción total del cultivo, es bastante difícil hacer una estimación exacta de las pérdidas, pero se considera que éstas son proporcionales al porcentaje del área foliar o del cuello de la panícula afectados.

Tabla 17. Número de líneas resistentes identificadas en cada población, evaluadas bajo infección natural de *P. grisea*, en la UCTB "Los Palacios".

	Poblaciones	Resistentes sólo en		Resistentes en	Líneas
		Hoja	Cuello	Hoja y Cuello	
1	Amistad'82 / 2077	3	10	1	A/V-L4
2	2077 / Amistad'82	8	4	0	-
3	Amistad'82 / IR 759-54-2-2	7	3	2	A/I-L11 y A/I-L15
4	Moroberekan / Amistad'82	0	4	1	M/A-L6
5	2077 / INCA LP-1	1	2	0	-
6	INCA LP-1 / Tetep	2	1	1	P1/T-L6
7	Tetep / INCA LP-1	0	5	0	-
8	IR759-54-2-2 / INCA LP-6	3	6	0	-
9	INCA LP-6 / Moroberekan	4	3	1	P6/M-L10
10	Tetep / INCA LP-6	2	1	1	T/P6-L6
11	6066 / IR759-54-2-2	4	2	0	-
12	IR75954-2-2 / 6066	3	6	1	I/S-L16
13	2077 / CP ₁ C ₈	1	3	0	-
14	IR 1529-430 / IR 759-54-2-2	1	2	1	IR/I-L6
Total		39	52	9	

Nueve líneas ('A/V-L4', 'A/I-L11', 'A/I-L15', 'M/A-L6', 'P1/T-L6', 'P6/M-L10', 'T/P6-L6', 'I/S-L16' y 'IR/I-L6') mostraron resistencia a la Piriculariosis en la hoja y cuello de la panícula, cuatro de ellas tuvieron como progenitor resistente al cultivar 'IR 759-54-2-2'.

Pérez-Almeida *et al.* (2005), al comparar las reacciones frente a *P. grisea* en hoja y en el cuello de poblaciones de arroz desarrolladas por cultivo de anteras y pedigrí, concluyeron que el cultivo de anteras incrementó la eficiencia de la selección debido a la mayor varianza aditiva, ausencia de dominancia, ausencia de variación intrafamiliar y competencia entre plantas, facilitando la identificación de cultivares superiores con respecto a la selección en generaciones tempranas de un programa de pedigrí, y los valores de heredabilidad sugieren que el avance genético por selección podría lograrse en pocas generaciones.

Comportamiento agrícola. El análisis visual de las plantas (Figura 10) en su segunda generación, sembradas en condiciones de campo, puso de manifiesto una alta

homogeneidad fenotípica dentro de cada línea con relación a caracteres morfológicos, tales como altura, porte de la planta, color de las hojas, tipo de grano, ciclo, etc.



Figura 10. Segunda generación de las plantas obtenidas, sembradas en condiciones de campo.

Los coeficientes de variación correspondientes a la altura, longitud de la panícula, granos llenos, masa de mil granos y el largo y ancho de los granos (Tabla 18) fueron bajos para todas las líneas y alrededor del 90 % de ellas con valores similares a los obtenidos por los progenitores, lo que mostró la rápida fijación de los caracteres en las líneas obtenidas, al utilizar la técnica del cultivo de anteras.

Tabla 18. Coeficientes de variación, agrupados por clases, de las líneas (segunda generación) y sus progenitores para algunos caracteres cuantitativos evaluados.

CV (%) Clases	Altura		Longitud de la panícula			Granos llenos			Masa de mil granos			Largo del grano			Ancho del grano			
	L*	%	P	L	%	P	L	%	P	L	%	P	L	%	P	L	%	P
0 - 5	96		5	83		6	23		5	100		7	129	90,8	10	96		9
5,1-10	24		4	36		3	54		1	38	97,2	3	13			36	93,0	1
10,1-15	14	94,4	1	18	96,5	1	28		3	4						9		
15,1-20	7			4			23	90,1	1							1		
20,1-25	0			1			8											
25,1-30	1						6											
Total	142		10	142		10	142		10	142		10	142		10	142		10

* L- Líneas, %- Porcentaje de líneas con valores de coeficientes de variación similares a los progenitores P- Progenitores

Esta es una de las mayores ventajas de esta técnica, ya que para lograr la fijación de los caracteres es necesario alcanzar la homocigosis, que sin la utilización del cultivo *in vitro* de

anteras, hubiera necesitado un proceso de autofecundación continua hasta las generaciones F₇- F₈.

Sobre la base de la clasificación automática (conglomerados), se agruparon las líneas isogénicas en 10 clases (Tabla 19) y se destacó la clase cuatro con las 20 mejores líneas poseedoras de los valores más altos de rendimiento y sus principales componentes (panículas por metro cuadrado y granos llenos por panícula), que superaron la media del experimento y de los progenitores comerciales que las originaron, los que fueron ubicados en las clases dos ('INCA LP-6' y '6066'), cinco ('Amistad'82') y nueve ('INCA LP-1' e 'IR 1529-430').

Al analizar la procedencia de las líneas isogénicas ubicadas en esta clase se destacan 'A/V-L4', 'A/I-L11', 'A/I-L15', 'M/A-L6', 'P1/T-L6', 'P6/M-L10', 'T/P6-L6', 'I/S-L16' y 'IR/I-L6', las cuales mostraron resistencia a la Piriculariosis en la hoja y cuello de la panícula, evaluadas bajo infección natural en campo.

El mejoramiento tradicional ha jugado un papel importante en el incremento del rendimiento y la calidad de los cultivares de arroz en el mundo, mientras que la utilización de los métodos biotecnológicos puede asistir el desarrollo de cultivares con rendimiento más alto y resistencia a plagas y estrés abióticos, a la vez que acelera el proceso de obtención de nuevos cultivares debido a la producción rápida de líneas homocigóticas y, por consiguiente, la retención de alelos recesivos o mutaciones útiles. (Chen *et al.*, 2006; Silva, 2010).

Se caracteriza también la clase cuatro por la presencia de 13 líneas provenientes de cuatro cruces donde intervino el cultivar 'Amistad'82' (A/V, V/A, A/I y M/A) y otros cinco cruces INCA LP-1 / Tetep, INCA LP-6 / Moroberekan, Tetep / INCA LP-6, IR 759-54-2-2 / 6066

e IR 1529-430 / IR 759-54-2-2 (P1/T, P6/M, T/P6, I/S, IR/I) están representados también en esta clase, pero con sólo una o dos líneas cada uno.

Tabla 19. Valores medios de los caracteres evaluados en cada clase establecida sobre la base de la diversidad existente.

Clases	No. líneas	Rendimiento agrícola (t.ha ⁻¹)	Panículas por m ²	Granos llenos	Masa de mil granos (g)	Altura (cm)	Longitud		Ancho del grano (mm)
							Panícula (cm)	Grano (mm)	
1	24	5,7	539	69	29,0	86,0	20,7	10,2	2,5
2	20	4,9	325	67	27,3	82,8	19,3	10,1	2,4
3	11	3,8	233	81	29,5	92,5	22,8	10,3	2,5
4	20	7,1	577	95	28,9	88,1	21,0	10,2	2,5
5	15	5,6	594	59	29,6	86,4	20,8	10,3	2,5
6	11	5,7	497	69	29,0	88,2	21,0	10,2	2,5
7	11	2,6	266	52	25,8	73,7	17,6	9,9	2,4
8	11	2,3	180	46	27,0	69,7	16,0	9,8	2,3
9	7	6,2	411	81	29,4	88,5	22,5	10,5	2,6
10	22	2,2	141	55	26,7	78,4	16,9	9,7	2,2
X		4,6	376	67	28,2	83,4	19,9	10,1	2,4
Líneas por clase ¹									
1	A/V-L5 V/A-L5 P6/M-L7	A/V-L6 V/A-L8 P6/M-L9	A/V-L7 A/I-L3 I/S-L2	A/V-L10 A/I-L4 I/S-L5	A/V-L12 A/I-L6 S/I-L1	A/V-L14 A/I-L9 V/C-L1	A/V-L16 A/I-L10 P6/M-L8	A/V-L19 A/I-L13 I	A/V-L20 A/I-L14 I/S-L13 P6
2	A/V-L2 S/I-L2 S	I/P6-L5 S/I-L3 T	I/P6-L9 S/I-L7 T	P6/M-L3 V/P1-L3 I/S-L3	P6/M-L4 V/P1-L5 I/S-L4	P6/M-L5 IR/I-L4 I/S-L6	P6/M-L8 V/C-L5 I/S-L11	T/P6-L3 I I/S-L15	I/S-L13 P6 S/I-L4
3	A/I-L1 IR/I-L3	I/P6-L10 M	T/P6-L5	I/S-L3	I/S-L4	I/S-L6	I/S-L11	I/S-L15	S/I-L4
4	A/V-L4 A/I-L11 P1/T-L6	A/V-L9 A/I-L12 IR/I-L6	A/V-L13 A/I-L15	A/V-L18 M/A-L6	V/A-L1 P6/M-L10	V/A-L6 T/P6-L4	V/A-L11 T/P6-L6	V/A-L13 I/S-L16	V/A-L17 P1/T-L4
5	A/V-L1 A/I-L5	A/V-L11 A/I-L8	A/V-L15 P6/M-L1	V/A-L3 V/P1-L7	V/A-L4 P1/T-L5	V/A-L7 A	V/A-L10	V/A-L12	V/A-L14
6	A/V-L3 I/S-L9	A/V-L8 V/P1-L4	A/V-L17	V/A-L2	V/A-L9	A/I-L2	P6/M-L2	P6/M-L6	I/S-L1
7	M/A-L1 T/P1-L4	M/A-L3 IR/I-L1	I/P6-L1	I/P6-L3	I/P6-L12	I/S-L10	I/S-L12	V/P1-L8	T/P1-L2
8	V/A-L15 P1/T-L3	M/A-L2 V/C-L3	I/P6-L7	I/S-L14	S/I-L5	V/P1-L1	V/P1-L6	T/P1-L1	T/P1-L6
9	A/I-L7	P1/T-L1	P1/T-L2	IR	P1	C	V		
10	V/A-L16 T/P6-L2 IR/I-L2	M/A-L4 I/S-L7 IR/I-L5	M/A-L5 I/S-L8 V/C-L2	I/P6-L2 S/I-L6 V/C-L4	I/P6-L4 S/I-L8	I/P6-L6 S/I-L8 V/P1-L2	I/P6-L8 V/P1-L9	I/P6-L11 T/P1-L3	T/P6-L1 T/P1-L5

¹A- Amistad'82, P1- INCA LP-1, P6-INCA LP-6, S-6066, C-CP₁C₈, IR- IR 1529-430, V-2077, I- IR 759-54-2-2, M- Moroberekan, T- Tetep, A/V- Amistad'82 / 2077, V/A-2077 / Amistad'82, A/I- Amistad'82 / IR 759-54-2-2, M/A- Moroberekan / Amistad'82, V/P1-2077 / INCA LP-1, P1/T- INCA LP-1 / Tetep, T/P1- Tetep / INCA LP-1, I/P6- IR759-54-2-2 / INCA LP-6, P6/M- INCA LP-6 / Moroberekan, T/P6- Tetep / INCA LP-6, I/S-IR75954-2-2 / 6066, S/I-6066 / IR759-54-2-2, V/C-2077 / CP₁C₈, IR/I- IR 1529-430 / IR 759-54-2-2, L-#-Líneas isogénicas de cada cruce

Las líneas agrupadas en la clase nueve; tres líneas originadas de los cruces Amistad'82 / IR 759-54-2-2 e INCA LP-1/Tetep (A/I y P1/T) y los progenitores 'IR 1529-430', 'INCA LP-1', 'CP₁C₈' y '2077' (IR, P1, C y V), aunque con 0,9 t.ha⁻¹ menos; ocuparon el segundo lugar en cuanto al rendimiento, y presentaron los valores más altos para el largo y ancho de los

granos, caracteres que de manera indirecta determinan la masa de mil granos y por consiguiente el rendimiento.

En las clases tres, siete, ocho y diez se apreciaron los valores más bajos para la formación de panículas y en las clases siete, ocho y diez para los granos llenos por panícula, las que pueden ser las causas de los bajos rendimientos de los cultivares agrupados en estas clases, ya que es conocido, y muchos autores hacen referencia en sus resultados, a las correlaciones positivas existentes entre el rendimiento y dos componentes importantes como lo son las panículas por metro cuadrado y los granos llenos por panícula.

Al respecto, Díaz *et al.* (2003), en trabajos realizados con el cultivar 'IR 1529-430', encontraron altas correlaciones del rendimiento agrícola con las panículas por metro cuadrado y los granos llenos por panícula; mientras que Castillo *et al.* (2008), al evaluar el rendimiento y sus componentes en el cultivar de arroz IACuba 20, encontraron que el número de panículas por metro cuadrado fue el componente del rendimiento que mayor contribución directa ejerció sobre el rendimiento agrícola.

Los resultados de este trabajo han confirmado que, al parecer, no hay presencia de genes dominantes actuando en la herencia de la resistencia a la Piriculariosis y el comportamiento pudiera estar regido por la acción de genes mayores en homocigosis y de genes menores con efecto aditivo. Se logró la selección de nueve líneas isogénicas ('A/V-L4', 'A/I-L11', 'A/I-L15', 'M/A-L6', 'P1/T-L6', 'P6/M-L10', 'T/P6-L6', 'I/S-L16' y 'IR/I-L6') resistentes a *la* Piriculariosis y de buen comportamiento agronómico, las que constituyen la base para la obtención de nuevos cultivares.

4.4.3. Selección de líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis en condiciones semicontroladas con inoculación artificial.

Las líneas seleccionadas en campo, por presentar los mejores rendimientos y tolerancia a la Piriculariosis, cuando fueron evaluadas en condiciones semicontroladas, frente a los haplotipos A 18 y B6 seleccionados en el epígrafe 4.2., mostraron los primeros síntomas seis días después de la inoculación, al igual que en el ensayo de patogenicidad (Tabla 20).

Tabla 20. Comportamiento de las nuevas líneas obtenidas y los patrones (cultivares resistentes y susceptible) frente a los haplotipos A 18 y B 6 de *P. grisea*

Cultivares y líneas	A 18				B 6			
	Tamaño de las lesiones (mm)	Área foliar afectada		Grado de la Escala	Tamaño de las lesiones (mm)	Área foliar afectada		Grado de la Escala
		DO (%)	DT			DO (%)	DT	
A/V-L4	1,8 bc	1,2	1,48 a	3	1,1 bc	0,9	1,48 ab	2
A/I-L11	1,8 bc	0,7	1,50 a	2	1,0 bc	0,4	1,52 ab	2
A/I-L15	6,2 a	43,2	0,86 b	7	3,2 a	11,2	1,23 c	6
M/A-L6	1,9 bc	1,7	1,45 a	3	1,1 bc	0,9	1,49 ab	2
P1/T-L6	2,0 bc	1,9	1,45 a	3	1,3 bc	1,0	1,48 ab	2
P6/M-L10	1,9 bc	1,5	1,47 a	3	1,1 bc	0,9	1,49 ab	2
T/P6-L6	1,9 bc	2,8	1,43 a	3	1,4 bc	1,7	1,45 ab	2
I/S-L16	2,1 bc	1,7	1,46 a	3	1,4 bc	1,0	1,49 ab	2
IR/I-L6	6,0 a	32,0	0,98 b	7	3,5 a	10,0	1,26 c	5
IR 759-54-2-2 (R)	2,6 b	3,0	1,41 a	4	1,8 b	2,0	1,44 ab	3
Moroberekan (R)	1,7 bc	2,1	1,44 a	3	0,9 bc	1,3	1,46 ab	2
Tetep (R)	0,6 c	0,4	1,53 a	1	0,4 c	0,3	1,54 a	1
2077 (R)	1,7 bc	0,8	1,48 a	2	1,0 bc	0,5	1,51 ab	2
J-104 (S)	6,5 a	44,8	0,84 b	7	3,3 a	10,4	1,25 c	6
X	2,8	9,8	1,34		1,6	3,0	1,44	
ESx	0,4*		0,04*		0,3*		0,02*	

Medias con letras en común por columna, no difieren significativamente para $p \leq 0,05$ según Prueba de Tukey.

DO- Datos originales, DT- Datos transformados, A/V- Amistad '82 / 2077, A/I- Amistad '82 / IR 759-54-2-2, M/A- Moroberekan / Amistad '82, P1/T- INCA LP-1 / Tetep, P6/M- INCA LP-6 / Moroberekan, T/P6- Tetep / INCA LP-6, I/S-IR75954-2-2 / 6066, IR/I- IR 1529-430 / IR 759-54-2-2, R- Controles resistentes, C-Control susceptible.

Las primeras lesiones observadas fueron pardas como pequeños puntos café y, entre los nueve y 14 días, en forma de diamante, con el centro blanquecino y bordes amarillentos alrededor de la lesión. El haplotipo A 18, también en este caso, resultó ser más agresivo con mayor porcentaje de área foliar afectada y lesiones de mayor tamaño en el cultivar susceptible J-104.

Las líneas 'A/I-L15' e 'IR/I-L6', que en la evaluación efectuada en el epígrafe anterior (4.4.2) habían mostrado resistencia, se manifestaron susceptibles en este ensayo, con tamaño de las manchas mayores de 3 mm y porcentajes de área foliar afectada superiores al

10%, sin diferencias estadísticas significativas con el control susceptible 'J-104', lo que las ubicó en los grados entre cinco y siete de la escala. El resto de las líneas se mostró resistente, con valores similares a los patrones.

Fuentes (1998) encontró que en condiciones naturales, solo un cultivar cubano de los estudiados mostró resistencia intermedia al patógeno y del cultivar 'J-104' fue aislado el mayor número de haplotipos de la población del hongo, de ahí la importancia de obtener nuevas líneas que presenten resistencia al ataque del mismo.

Las líneas 'A/V-L4', 'A/I-L11', 'M/A-L6', 'P1/T-L6', 'P6/M-L10', 'T/P6-L6' y 'I/S-L16', que fueron seleccionadas como resistentes frente a los haplotipos evaluados, constituyen una importante base para la obtención de cultivares resistentes. Se hace necesario, también, comprobar su resistencia en condiciones de infección natural, ya que esto garantizaría el desarrollo de cultivares con resistencia duradera a la enfermedad causada por el hongo *P. grisea*.

Fabregat (1984) informó que la presencia de la enfermedad en las diferentes fenofases del cultivo está muy relacionada con la presencia de condiciones ambientales óptimas, pero su desarrollo depende de las características genéticas de los cultivares y de la variabilidad del patógeno; de ahí la necesidad de evaluar las líneas obtenidas en la época que mayores afectaciones provoca la enfermedad y en la localidad seleccionada en Cuba como "*hot spot*", la Unidad Empresarial Base Agrícola "Caribe", perteneciente al Complejo Agroindustrial Arrocerero "Los Palacios" (Cárdenas *et al.*, 2005a).

4.4.4. Selección de líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis en canteros bajo infección natural.

Las líneas seleccionadas anteriormente por la resistencia mostrada en condiciones semicontroladas con inoculación artificial, fueron evaluadas en canteros de infección natural en el sitio "*hot spot*" (Figura 11). Las líneas 'A/V-L4', 'A/I-L11' y 'P1/T-L6', mostraron afectaciones promedio de los cuatro años evaluados por debajo de 3 % y se clasificaron como resistentes sin diferencias significativas con los controles resistentes, en ninguno de los años, para el área foliar afectada.

En cuanto al daño en el cuello de la panícula, estas mismas líneas mostraron afectaciones promedio de los cuatro años evaluados por debajo de 10%, pero en este caso el comportamiento anual fue muy variable, apareciendo en el segundo y tercer año de evaluación las mayores afectaciones de la línea A/V-L4, que sobrepasaron el 10%, sin embargo no mostró afectación alguna, al igual que la línea A/I-L11, en el primero y cuarto año. De manera contrastante, la línea P1/T-L6 presentó mayores medias, para este carácter, durante el primero y cuarto año y menor afectación en el segundo y tercer año.

En general, todas las líneas evaluadas fueron resistentes a la Piriculariosis, para el área foliar, en los cuatro años del ensayo y no difirieron estadísticamente de los progenitores resistentes, excepto las líneas M/A-L6, P6/M-L10 e I/S-L16, en los dos primeros años.

No ocurrió igual para la evaluación de la resistencia en el cuello de la panícula, donde se identificaron líneas (A/V-L4, A/I-L11 y P1/T-L6) que superaron en la mayoría de las evaluaciones a los cultivares resistentes Moroberekan e IR 759-54-2-2 y dos líneas (P6/M-L10 y T/P6- L6) con alta susceptibilidad en todos los años evaluados.

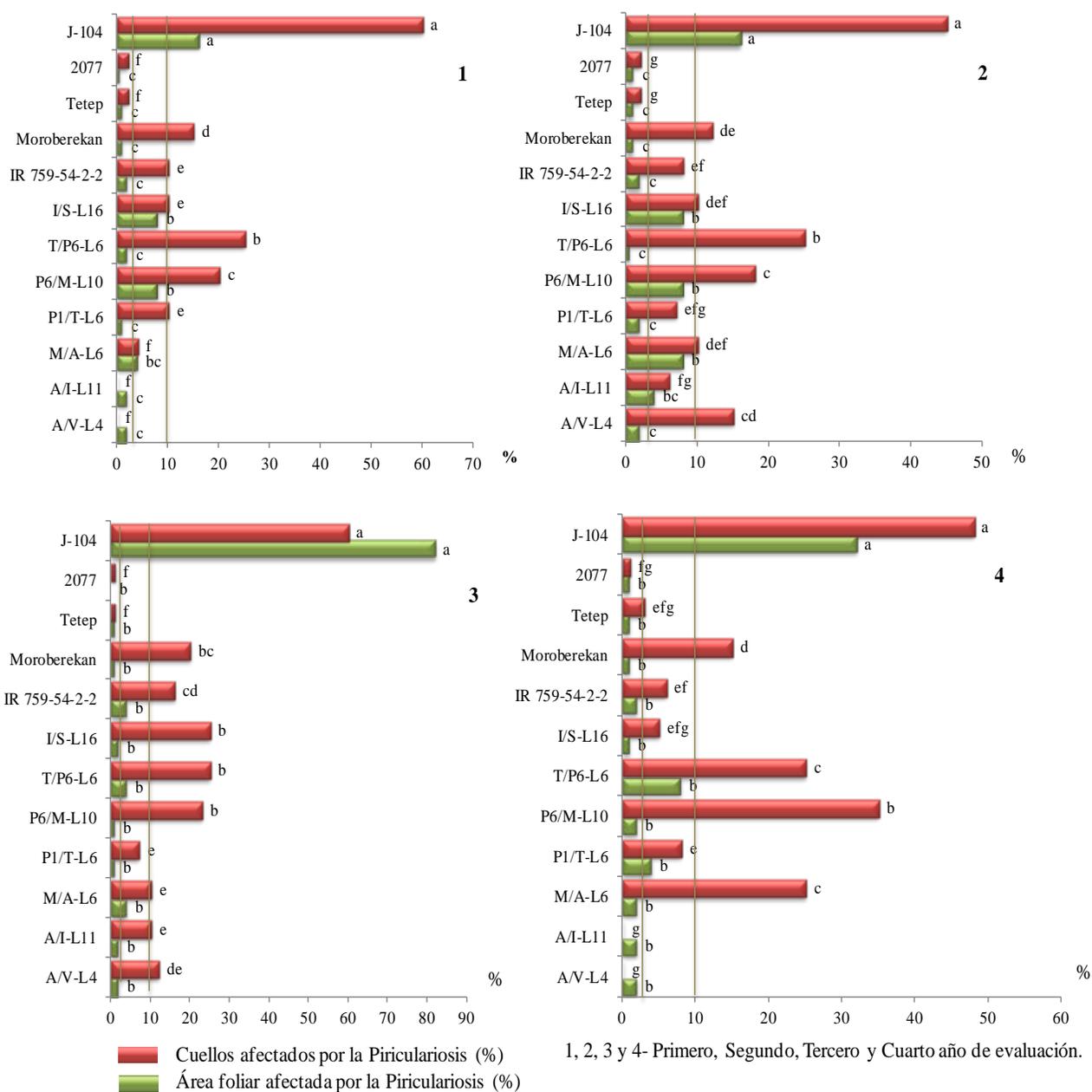


Figura 11. Porcentaje de Área foliar y cuellos afectados por la Piriculariosis en las líneas isogénicas obtenidas durante los 4 años evaluados bajo infección natural en la localidad "Caribe".

Si se analiza el comportamiento individual de todas las líneas ante la infección en la hoja y cuello de la panícula, en los cuatro años evaluados, se aprecia una reacción diferente de las mismas según los años y, dentro de un mismo año, no se apreció asociación entre el

comportamiento frente a la enfermedad en la evaluación efectuada en la hoja en la fase de plántula y en el cuello de la panícula, lo cual evidencia que la selección, en condiciones naturales, de materiales con adecuados niveles de resistencia en la hoja no asegura el mismo nivel de resistencia en el cuello de la panícula.

En esto influyen diversos factores: la existencia en la localidad de una alta diversidad genética del patógeno, que la resistencia pudiera ser controlada por diferentes genes para la hoja y el cuello de la panícula, así como las condiciones climáticas imperantes.

En este sentido, Cárdenas *et al.* (2007b), al valorar los resultados de un ensayo similar pero con cultivares y épocas diferentes, plantearon que la enfermedad no exhibe un patrón común en su expresión, lo que consideran está muy relacionado con las condiciones climáticas. Para el desarrollo de cualquier enfermedad debe coexistir un hospedante susceptible, el patógeno y las condiciones ambientales favorables, siendo éstas las que determinan el éxito de la relación patógeno-hospedero (Agrios, 2005).

La incidencia y severidad de la Piriculariosis están influenciadas por diversos factores, tales como la fertilización nitrogenada, la susceptibilidad de los materiales y el tipo de suelo, los cuales interactúan con los factores climáticos que condicionan el progreso de la enfermedad (Meneses *et al.* 2001).

El conocimiento de la dinámica poblacional del hongo y el desarrollo de estrategias de mejoramiento que incluyan la selección y evaluación de germoplasma de arroz en sitios y épocas donde exista alta variabilidad del mismo, así como una alta presión de inóculo, permiten implementar programas de mejoramiento para desarrollar una resistencia durable a la Piriculariosis.

En tal sentido, la selección de localidades y épocas de evaluación es un factor crítico en el cual hay que tomar en consideración las variantes climáticas imperantes (Navas *et al.*, 2003). La selección de la localidad "Caribe", para la evaluación de las líneas obtenidas, coincide con estos planteamientos y con los resultados hasta ahora discutidos.

Sin constituir una excepción en cuanto a la variabilidad del comportamiento observado, el cultivar 'J-104' mostró siempre los valores más altos de área foliar y cuello de la panícula afectados con diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de los cultivares.

Asimismo, se observaron en este cultivar lesiones típicas de la enfermedad y porcentajes de área foliar afectada, comprendidos entre los grados susceptibles seis-nueve de la escala, lo que pudiera ser considerado reiterativo en los experimentos realizados y muy similar al comportamiento de este cultivar en áreas de producción, considerada la principal causa de los bajos rendimientos, tanto de este cultivar como de los cultivares susceptibles que se siembran en producción en la localidad en estudio (UEBA "Caribe").

Con excepción del tercer año evaluado para el cultivar 'IR 759-54-2-2', el resto de los patrones resistentes presentaron afectaciones de área foliar por debajo de 3%, mientras que para la incidencia en el cuello, 'Moroberekan' e 'IR 759-54-2-2' superaron el 10%, límite considerado como resistente, de acuerdo con las escalas utilizadas (IRRI, 2002), en las cuatro evaluaciones, en el caso de 'Moroberekan' y en el tercer año 'IR 759-54-2-2'. Los otros dos cultivares resistentes, 'Tetep' y '2077', mostraron altos niveles de resistencia, tanto en el área foliar como en el cuello de la panícula.

En resumen, fueron seleccionadas las líneas 'A/V-L4', 'A/I-L11' y 'P1/T-L6', provenientes de los cruces Amistad'82 / 2077, Amistad'82 / IR 759-54-2-2 e INCA LP-1 / Tetep,

respectivamente, las que mantuvieron durante los cuatro años evaluados valores bajos, de porcentajes de área foliar y cuellos afectados, dentro de los grados cero y tres de las escalas utilizadas. Al parecer, los genes presentes en los progenitores '2077', 'IR 759-54-2-2' y 'Tetep' que les confieren resistencia frente a la Piriculariosis, evaluada en hoja en la fase vegetativa y en el cuello de la panícula en la fase de floración, fueron heredados por las líneas recombinantes, regeneradas a partir del cultivo de anteras de plantas F_2 , las que además han mostrado un comportamiento homogéneo entre plantas, característico del estado homocigótico.

La identificación de líneas homocigóticas resistentes a la Piriculariosis y de buen comportamiento agronómico, en sólo 10 meses contabilizados a partir de la siembra de la semilla F_2 (Figura 12) corroboró la eficiencia del método de mejora empleado en este trabajo, en relación con el método de selección por pedigrí, utilizado tradicionalmente en el cultivo del arroz en Cuba, con el cual esta misma estabilidad se logra generalmente sólo después de siete a ocho generaciones de autopolinización, que representan entre tres y seis años de trabajo, si se efectúan una o dos siembras anuales.

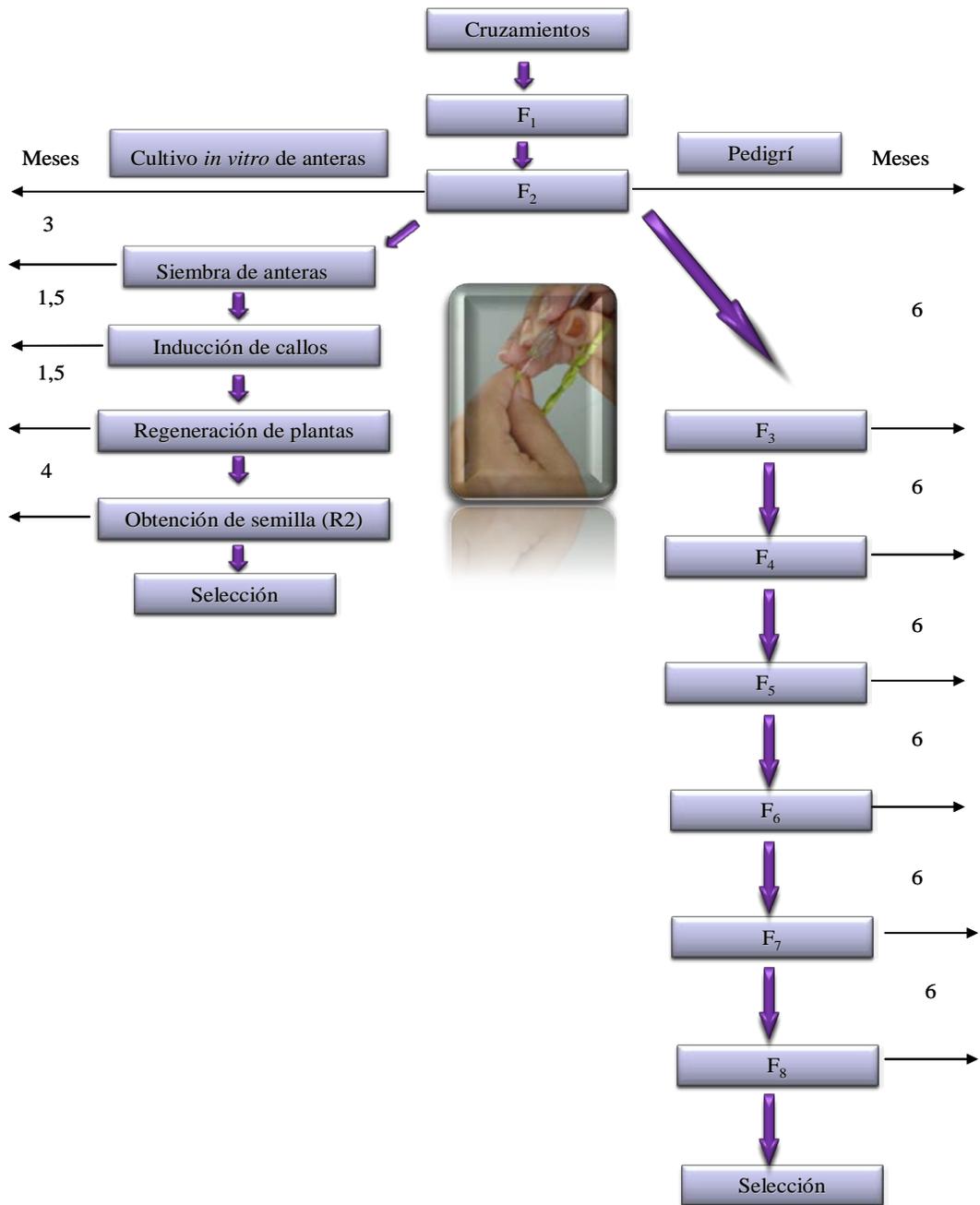


Figura 12. Diagrama comparativo en tiempo del método de mejora utilizado (cultivo *in vitro* de anteras) frente al pedigrí.

4.4.5. Caracterización de las líneas isogénicas resistentes a la Piriculariosis por su comportamiento agronómico.

Siguiendo la metodología que detalla el Formulario de Descripción de Cultivares, para el arroz (*Oryza sativa* L), fueron descritas las líneas 'A/V-L4', 'A/I-L11' y 'P1/T-L6' (Tabla 21)

que habían sido seleccionadas, previamente, por su resistencia a la Piriculariosis y comportamiento agronómico, así como sus progenitores de buenos caracteres agronómicos 'Amistad'82' e 'INCA LP-1'.

Tabla 21. Caracteres cualitativos evaluados a las líneas seleccionadas y sus progenitores comerciales, 'Amistad'82' e 'INCA LP-1'.

No.	Caracteres	Clasificación				
		A/V-L4	A/I-L11	Amistad'82	P1/T-L6	INCA LP-1
1	Color del coleóptilo	Verde claro	Verde claro	Verde claro	Verde claro	Verde claro
2	Hábito predominante de crecimiento	Erecto	Erecto	Erecto	Erecto	Intermedio
3	Capacidad de ahijamiento	Medio	Medio	Muy alto	Muy alto	Muy alto
4	Color de la lemma y la pálea	Paja	Paja	Paja	Paja	Paja
5	Color del ápice de la lemma y la pálea	Paja	Paja	Paja	Paja	Paja
6	Pubescencia de la lemma y la pálea	En el ápice	En el ápice	Parcial o total	En el ápice	En el ápice
7	Color de las glumas	Paja	Paja	Paja	Paja	Paja
8	Color del estigma	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino	Blanquecino
9	Angulo de inserción de la hoja por debajo de la hoja bandera	Erecta	Erecta	Erecta	Erecta	Erecta
10	Angulo de inserción de la Hoja Bandera	Erecto	Erecto	Semi erecto	Erecto	Erecto
11	Vellosidad de la lámina de la hoja	Intermedia	Intermedia	Intermedia	Intermedia	Intermedia
12	Color de la lámina foliar	Verde	Verde claro	Verde	Verde	Verde oscuro
13	Color de la lígula	Blanca	Blanca	Blanca	Blanca	Blanca
14	Forma de la lígula	Hendida	Hendida	Hendida	Hendida	Hendida
15	Resistencia de las aurículas al desprendimiento	Caedizas	Caedizas	Caedizas	Caedizas	Caedizas
16	Color de las aurículas	Verde claro	Verde claro	Verde claro	Verde claro	Verde claro
17	Color de la vaina de la hoja	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
18	Color del nudo	Amarillento	Amarillento	Verde Amarillento	Amarillento	Amarillento
19	Color del entrenudo	Verde claro	Verde claro	Verde claro	Verde claro	Verde claro
20	Color del anillo subnodal	Verde claro	Verde claro	Verde claro	Verde claro	Verde claro
21	Color en la base del tallo	Crema	Verde claro	Blanquecino	Crema	Verde Amarillento
22	Resistencia al acame	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
23	Respuesta al fotoperíodo	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible	Insensible
24	Tamaño de las aristas	Ausente	Ausente	Cortas	Ausente	Cortas
25	Color del grano apical de la panícula	Paja	Paja	Paja	Paja	Paja
26	Color del ápice del grano apical de la panícula	Paja	Paja	Paja	Paja	Paja
27	Densidad de la panícula	Compacta	Compacta	Intermedia	Compacta	Intermedia
28	Exserción de la panícula	Bien emergida	Bien emergida	Emergida	Bien emergida	Bien emergida
29	Granos vanos en el ápice de la panícula	1	1	1	1	0
30	Fertilidad de la panícula	Muy fértil	Muy fértil	Muy fértil	Muy fértil	Muy fértil
31	Desgrane de la panícula	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente
32	Longevidad foliar predominante	Tardía	Tardía	Tardía	Tardía	Tardía

Con respecto a los caracteres cualitativos evaluados, se pudo apreciar que nueve de ellos permitieron diferenciar las líneas de los progenitores de buen comportamiento agronómico que las originaron. Dentro de ellos se destacó la ausencia de aristas en las líneas, que si bien, las que presentan los cultivares 'Amistad'82' e 'INCA LP-1', son cortas, su presencia

cuando son largas y en las mayoría de los granos, se considera una característica indeseable por los efectos que provoca en el proceso industrial.

También, las líneas poseen panículas compactas, que es una medida indirecta de la cantidad de granos llenos y del rendimiento, así como panículas bien emergidas, característica que permite evitar la acumulación de humedad en el cuello, lo que puede ser favorable para la aparición y desarrollo de enfermedades.

El color verde claro de la hoja y la base del tallo distinguieron a la línea 'A/I-L11' de los progenitores 'Amistad'82' e 'INCA LP-1' y de las líneas 'A/V-L4' y 'P1/T-L6' y la capacidad de ahijamiento muy alto transmitido por el progenitor 'INCA LP-1' a la línea 'P1/T-L6' lo distinguió de las líneas 'A/V-L4' y 'A/I-L11'.

En resumen, los procesos de recombinación y cultivo *in vitro* ocasionaron diferencias favorables en las líneas para algunos caracteres cualitativos evaluados, presentes en los progenitores 'Amistad'82' e 'INCA LP-1' y 23 caracteres fueron comunes para las líneas y sus progenitores de buenos caracteres agronómicos.

Montoya *et al.* (2007), al caracterizar 13 cultivares de arroz venezolanos, encontraron que 13 caracteres cualitativos no permitieron la diferenciación entre ellos, lo que atribuyen al hecho de que la base genética de los mismos es estrecha. En este sentido, Fuentes *et al.* (2005), al analizar la diversidad genética de cultivares de arroz cubanos, basados en caracteres morfológicos, su genealogía y polimorfismo de ADN, enfatizaron en la necesidad de diversificar los progenitores en los programas de mejoramiento con el objetivo de ampliar la base genética del cultivo.

En la Tabla 22, se muestra la asociación entre los caracteres cuantitativos evaluados. En ella se aprecia correlación positiva y significativa entre el rendimiento y las panículas por

metro cuadrado y el rendimiento y los granos llenos por panícula. Estos componentes, por la influencia que ejercen sobre el rendimiento, son considerados por muchos autores, como marcadores para la selección, en generaciones tempranas, de cultivares de alto rendimiento (Rasheed *et al.*, 2002; Wattoo *et al.*, 2010).

Tabla 22. Matriz de correlaciones fenotípicas de los caracteres cuantitativos evaluados a las líneas a y sus progenitores comerciales, 'Amistad'82' e 'INCA LP-1'.

	RI*	PM	GLI	PG	C	Alt	LP	LG	AG	Lhb	Ahb	LH	AH	Lig	Me	Hp	AFA	CA	
RA	0,24	0,89*	0,90*	0,49	-0,06	0,77	0,70	-0,27	0,00	-0,03	-0,24	-0,50	0,02	-0,03	-0,45	0,52	-0,96*	-0,97**	
RI		0,63	0,59	-0,06	-0,82	0,24	0,34	-0,31	0,12	0,60	0,81	0,28	0,37	-0,23	-0,14	0,07	-0,01	-0,38	
PM			0,98**	0,23	-0,40	0,61	0,62	-0,49	0,11	0,15	0,16	-0,38	0,13	-0,27	-0,42	0,31	-0,74	-0,95*	
GLI				0,32	-0,26	0,66	0,56	-0,37	0,27	0,07	0,20	-0,32	0,31	-0,25	-0,24	0,33	-0,73	-0,91*	
PG					0,14	0,90*	0,69	0,70	-0,19	0,35	-0,14	0,33	0,33	0,78	-0,02	0,92*	-0,57	-0,30	
C						-0,14	-0,47	0,32	0,43	-0,81	-0,53	-0,25	0,15	-0,01	0,53	-0,16	-0,03	0,25	
Alt							0,89*	0,33	-0,22	0,42	-0,07	0,11	0,24	0,56	-0,29	0,92*	-0,78	-0,66	
LP								0,11	-0,58	0,63	-0,12	0,02	-0,14	0,55	-0,67	0,89*	-0,75	-0,69	
LG									-0,09	0,28	0,04	0,74	0,43	0,82	0,45	0,53	0,17	0,48	
AG											-0,57	0,42	-0,03	0,74	-0,60	0,79	-0,51	0,21	
Lhb												0,45	0,64	0,03	0,57	-0,36	0,58	0,03	
Ahb													0,64	0,69	-0,20	0,42	-0,18	0,48	
LH														0,55	0,56	0,45	0,27	0,53	
AH															-0,01	0,78	0,05	0,18	
Lig																-0,13	0,83	-0,15	
Me																	-0,37	0,56	
Hp																		-0,63	
AFA																			0,90*

RA*- Rendimiento agrícola (t.ha⁻¹), RI- Rendimiento industrial (% granos entero), PM- Panículas por metro cuadrado, GLI-Granos llenos por panícula, PG-Masa de 1000 granos (g), C-Ciclo (días), Alt-Altura de la planta (cm), LP-Longitud de la panícula (cm), LG-Largo del grano (mm), AG-Ancho del granos (mm), Lhb-Longitud de la hoja bandera (cm), Ahb-Ancho de la hoja bandera (cm), LH-Longitud de la hoja por debajo de la hoja bandera (cm), AH-Ancho de la hoja por debajo de la hoja bandera (cm), Lig-Longitud de la lígula (mm), Me-Longitud del Mesocotilo (cm), Hp-Longitud del Hipocotilo (cm), AFA-Área foliar afectada por la Piriculariosis, CA- Porcentaje de panículas dañadas en el cuello por la Piriculariosis.

Correlaciones significativas a partir de 0,87 para p< 0,05 y 0,95 para p< 0,01

La duración del ciclo no presentó correlación con el rendimiento, a diferencia de otros autores que refieren una correlación alta y positiva (Surek y Beser, 2003). Un ciclo más largo permite a la planta utilizar más el nitrógeno, mayor acumulación de materia seca y, generalmente, rendimientos más altos, de ahí que los cultivares que han predominado en Cuba sean de ciclo medio. Sin embargo, el desarrollo de germoplasma precoz es uno de los objetivos fundamentales de los programas de mejoramiento, por las ventajas que estos cultivares representan al aprovechar mejor el calendario de siembra, emplear menos fertilizantes y consumir menos agua.

Otros caracteres, como la altura y la longitud de la hoja bandera, no presentaron correlación con el rendimiento, a diferencia de los resultados mostrados por Wattoo *et al.* (2010), quienes encontraron correlaciones positivas y altamente significativas. Se apreciaron correlaciones positivas y significativas entre la longitud del hipocotilo y la masa de 1000 granos, la altura de la planta y la longitud de la panícula. No aparecen en la literatura consultada referencias al respecto, pero sería conveniente repetir esta evaluación con un número mayor de cultivares, ya que la longitud del hipocotilo puede constituir un marcador de selección en épocas tempranas, de estos importantes componentes del rendimiento.

Las afectaciones provocadas por la Piriculariosis, tanto en hojas como en el cuello de la panícula, se correlacionaron positivamente entre ellas y de forma negativa con el rendimiento agrícola, mientras que los porcentajes de cuellos afectados se asociaron con dos de sus componentes importantes, las panículas por metro cuadrado y los granos llenos por panícula, estos resultados evidencian la importancia del mejoramiento genético del cultivo dirigido a la obtención de cultivares resistentes a la enfermedad, ya que cultivares susceptibles, sembrados en condiciones favorables para el desarrollo del hongo, pueden ser totalmente destruidos en la fase vegetativa o en la reproductiva.

Según Zambrano *et al.* (2006), las manchas típicas en las hojas de la planta de arroz, pueden unirse dependiendo de las condiciones ambientales y de la susceptibilidad del cultivar y producir la reducción del área fotosintética, mientras que en el cuello de la panícula, la colonización del hongo inhibe el flujo de fotosintetizados hacia los granos en formación, originando panículas vacías y la caída de las mismas, lo que en ambos casos provoca pérdidas importantes del rendimiento.

En el análisis de varianza efectuado a los caracteres agronómicos de mayor importancia (Tabla 23), se destacó la línea 'A/I-L11', que combinó los más altos rendimientos agrícola e industrial, sin diferencias significativas con las líneas 'A/V-L4' y 'P1/T-L6', y superiores todas al cultivar 'Amistad'82', para el rendimiento agrícola. Para el rendimiento industrial, la línea A/I-L11 fue superior y diferente estadísticamente del resto.

Tabla 23. Comportamiento de algunos caracteres cuantitativos evaluados a las líneas seleccionadas y sus progenitores comerciales, 'Amistad'82' e 'INCA LP-1'.

Cultivares	Ciclo (días)	Rendimiento Agrícola (t.ha ⁻¹)	Panículas por m ²	Granos llenos por panícula	Masa de 1000 granos (g)	Rendimiento Industrial (% granos enteros)
A/V-L4	127 b	7,5 ab	474 ab	105 b	28,5 ab	57,5 b
A/I-L11	128 b	8,1 a	505 a	143 a	29,0 ab	59,6 a
P1/T-L6	127 b	7,5 ab	467 abc	108 b	30,1 a	58,1 b
Amistad'82	127 b	5,1 c	425 c	71 d	28,3 b	58,2 b
INCA LP-1	142 a	6,8 b	436 bc	88 c	29,2 ab	55,5 c
X	130	7	461	103	29	57,8
Esx	1,53*	0,23*	9,9*	2,36*	0,37*	0,26*

Medias con letras en común por columna, no difieren significativamente para $p \leq 0,05$ según Prueba de Tukey.

Según Montoya *et al.* (2007), los parámetros cuantitativos relacionados con calidad molinera, aspecto del grano y componentes del rendimiento fueron las características morfológicas que permitieron una mejor caracterización de los cultivares.

Los componentes del rendimiento, panículas por metro cuadrado y granos llenos por panículas, fueron superiores para la línea 'A/I-L11', lo cual evidencia que el rendimiento está asociado con la producción de granos que se obtiene, no solamente por un incremento en las panículas por metro cuadrado; también deben ser considerados los granos llenos presentes en estas panículas. La mayor masa de los granos fue obtenida por la línea 'P1/T-L6', sin diferencias significativas con las líneas 'A/I-L11', A/V-L4 y el cultivar 'INCA LP-1'. Todas las líneas, a pesar de mostrar un ciclo corto, fueron capaces de formar un número elevado de hijos fértiles, que le permitieron, junto con la contribución de los componentes

granos llenos por panícula y masa de 1000 granos, obtener los más altos rendimientos, superiores incluso al cultivar 'INCA LP-1', de ciclo medio.

Sobre la base de los ensayos realizados se pudo conformar el procedimiento metodológico que refleja la Figura 13.

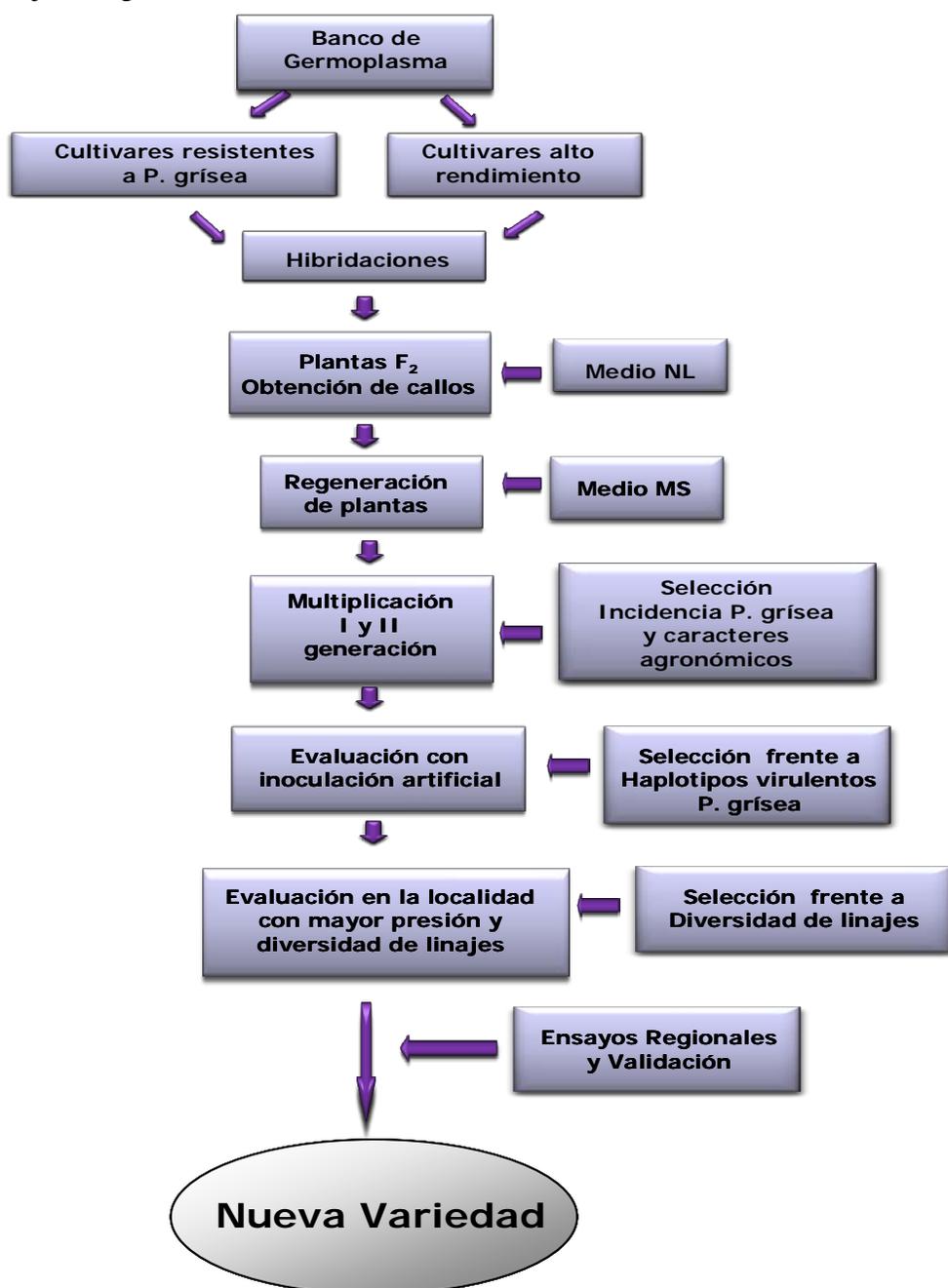


Figura 13. Procedimiento metodológico para la obtención de cultivares de arroz resistentes a *P. grisea* con buenos caracteres agronómicos.

Este procedimiento incluyó la selección de progenitores en canteros de infección natural frente a la Piriculariosis, en la localidad "Caribe" (Anexo 3), y la identificación de cultivares de alto potencial productivo, para el desarrollo del programa de cruzamientos, seguido del cultivo *in vitro* de las anteras de las plantas F₂ y posterior selección de las líneas obtenidas; que comenzó en campo, teniendo en cuenta el potencial productivo y la resistencia al patógeno; a continuación, con inoculación artificial de haplotipos virulentos identificados en Cuba y finalmente la evaluación frente a toda la variabilidad de *P. grisea* existente en la localidad "Caribe".

La utilización de este procedimiento metodológico permitió la obtención de las líneas 'A/I-L11', 'A/V-L4' y 'P1/T-L6' que integraron resistencia a *P. grisea* con buenos caracteres agronómicos.

Todas ellas fueron incluidas en las Ferias de Biodiversidad desarrolladas a través de programas de Fitomejoramiento participativo en "Los Palacios", "Bahía Honda" y "Mantua", municipios de la provincia Pinar del Río, en "Florida", provincia Camagüey y el municipio especial de la "Isla de la Juventud", para facilitar su difusión a los productores, resultando con una mayor aceptación la línea A/I-L11, la que se inscribió en el Registro Comercial de variedades cubanas, con el nombre de Anays LP-14, y en la actualidad se siembra en las Fincas de semilla para su extensión a la producción arrocera.

V. CONCLUSIONES

1. Fueron identificados como progenitores, para el programa de mejora desarrollado, cuatro cultivares resistentes a *P. grisea* ('2077', 'IR 759-54-2-2', 'Tetep' y 'Moroberekan') y seis de buen comportamiento agronómico ('Amistad'82', 'INCA LP-1', 'INCA LP-6', '6066', 'CP₁C₈' e 'IR 1529-430'), los que mantuvieron estabilidad en los ambientes ensayados.
2. El genotipo y el medio de cultivo empleado fueron determinantes para el éxito del cultivo *in vitro* de anteras de plantas en generación F₂. El medio de cultivo NL produjo una mayor formación de callos y las combinaciones Amistad'82 / 2077, 2077 / Amistad'82 y Amistad / IR 759-54-2-2 tuvieron la mejor respuesta.
3. En la segunda generación, bajo infección natural de *P. grisea* en campo, se identificaron nueve líneas ('A/V-L4', 'A/I-L11', 'A/I-L15', 'M/A-L6', 'P1/T-L6', 'P6/M-L10', 'T/P6-L6', 'I/S-L16' y 'IR/I-L6') que combinaron resistencia al patógeno y altos rendimientos. Siete de ellas ('A/V-L4', 'A/I-L11', 'M/A-L6', 'P1/T-L6', 'P6/M-L10', 'T/P6-L6' y 'I/S-L16') mostraron también resistencia cuando fueron inoculadas con aislamientos de haplotipos cubanos del patógeno.
4. Las líneas A/V-L4', 'A/I-L11' y 'P1/T-L6' provenientes de los cruces Amistad'82 / 2077, Amistad'82 / IR 759-54-2-2 e INCA LP1 / Tetep mostraron resistencia en campo frente

a toda la variabilidad de *P. grisea* existente en "Caribe", localidad que se ratificó como ideal para la evaluación de la enfermedad en Cuba.

5. El procedimiento metodológico propuesto acortó el ciclo de mejora, en relación con el método tradicional de cruzamientos, creó variabilidad y logró una rápida fijación de los caracteres mediante la utilización del cultivo in vitro de anteras de plantas F₂, así como una adecuada selección de las líneas por su resistencia a *P. grisea* y principales caracteres agronómicos; una de las cuales ('Anays LP-14') fue inscrita en el Registro Comercial de Variedades Cubanas.

VI. RECOMENDACIONES

1. Emplear los cultivares '2077', 'IR 759-54-2-2', 'Tetep' y 'Moroberekan' como progenitores en los programas de mejoramiento genético del arroz para la resistencia a *P. grisea*.
2. Realizar estudios encaminados a determinar los factores edafoclimáticos que favorecen la alta incidencia de *P. grisea* en la localidad "Caribe".
3. Incluir las líneas 'A/V-L4' y 'P1/T-L6' en ensayos de validación y generalizar la línea 'A/I-L11' registrada como 'Anays LP-14' en diferentes zonas productoras de arroz.
4. Proponer el empleo del procedimiento metodológico establecido para la obtención de cultivares que combinen resistencia a *P. grisea* con buenos caracteres agronómicos.
5. Realizar estudios con las líneas resistentes a *P. grisea* para identificar posibles marcadores moleculares para la selección.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acevedo, M., Castrillo, W. y Belmonte, U. 2006. *Origen, evolución y diversidad del arroz*. Agronomía Tropical. vol.56, no.2, p.151-170.
2. Acevedo, M., Torres, E., Moreno, O., et al. 2007. *Base genética de los cultivares de arroz de riego liberados en Venezuela*. Agronomía Tropical vol.57, no.3, p.197- 204.
3. Agrios, G.N. 2005. *Fitopatología*. 2 ed. México, D. F.: Limada Noriega Editores.
4. Alejos, G., Monasterio, P. y Rea, R. 2006. *Análisis de la interacción genotipo – ambiente para rendimiento de maíz en la región maicera del estado Yaracuy, Venezuela*. Agronomía Tropical vol.56, no.3, p.10.
5. Alvarado, J.R. 2007. *Mejoramiento Tradicional en arroz* [en línea] En: Curso Internacional de Mejoramiento Genético de Arroz (2007, 2007, ene. 15-25: Chillán). CIRAD; FAO; CIAT. [Consultado:28 Diciembre 2007] Disponible en:<http://agr.unne.edu.ar/fao/chile-ppt/3-Fitomejoramiento%20arroz%20%20Roberto%20Alvarado.pdf>
6. Alvarez, E., Zamora, N.I. y Jiménez, M. 2001. *Comportamiento de variedades de arroz frente a Pyricularia grisea (sacc.) en la provincia Granma*. Revista Protección Vegetal. vol., no.1, p.40-43.
7. Alvarez, R.M., Pérez, M., Reyes, E., et al. 2008. *Evaluación comparativa de híbridos y variedades de arroz en los llanos centroccidentales de Venezuela*. Agronomía Tropical. vol.58, no.2, p.101-110.
8. Alves, K.J. y Fernandes, J.M. 2006. *Influência da temperatura e da umidade relativa do ar na esporulação de Magnaporthe grisea em Trigo*. Fitopatologia Brasileira. vol.31, p.579-584.
9. Anjos, L.M., Santos, G.R., Dias-Neto, J.J., et al. 2009. *Identification of physiological races of Magnaporthe grisea in areas of rice irrigated in the State of Tocantins*. Tropical Plant Pathology. vol.34, no.3, p.80.
10. Ankele, E., Heberle-Bors, E., Pfosser, M., et al. 2005. *Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals*. Acta Physiologiae Plantarum. vol.27, no.4B, p.651-664.
11. Arnao, E., Vegas, A., Gutiérrez, Z., et al. 2003. *Estandarización de la técnica de PCR para la caracterización genética en una población venezolana de Pyricularia grisea*. Fitopatol. Venez. . vol.16, no.1, p.3-7. ISSN: 0798-0035
12. Asaduzzaman, M., Bari, M.A., Rahman, M.H., Khatun, N., Islam, M.A. and Rahman, M. 2003. *In Vitro plant regeneration through anther culture of five rice varieties*. Journal of Biological Sciences. vol.3, no.2, p.167-171.
13. Bagheri, N. and Jelodar, N. B. 2008. *Combining ability and heritability of callus induction and green plant regeneration in rice anther culture*. Biotechnology, vol.7, no.2, p. 287-292.
14. Barbosa, M. 1987. *Nutricao e adubacao do arroz (Sequeiro e Irrigado)*. Boletim Técnico Associacao Brasileira para pesquisa da Potasa e do Fosfato. no.9, p.30-34.
15. Berrio, L.E., Jennings, P.R., Torres, E. y Cruz, M. 2004. *Perspectiva del programa de Mejoramiento Varietal del FLAR para la zona tropical*. Foro Arroceros Latinoamericano. vol.10, no.2, p.18-22.
16. Bhojwani, S., Pande, H. and Raina, A. 2009. *Factors Affecting Androgenesis in Indica Rice*. [online]. Delhi: University of Delhi, Department of Botany. [Consultado: mayo 2009] Disponible en: http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2003/1238/pdf/Festschrift_Neumann_06.pdf
17. Bidhan, R. and Mandal, A.B. 2005. *Anther culture response in indica rice and variations in major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local*. African Journal of Biotechnology vol.4, no.3, p.235-240.

18. Bishnoi, U., Jain, R.K., Rohilla, J.S., Chowdhury, V.K., Gupta, K.R. and Chowdhury, J.B. 2000. *Anther culture of recalcitrant indica - Basmati rice hybrids Anther culture of indica rice hybrids*. Euphytica. vol.114, p.93-101.
19. Boller, T and He S. 2009. *Effectors in microbial pathogens pattern recognition receptors in plants and innate immunity in plants: An arms race between*. Science vol.324, p. 742-744.
20. Bonell, M.L., Livore, A.B., Dezar, C.A., Plata, M.I. y Gutierrez, S. 2005. *Avances en Mejoramiento genético de arroz por resistencia a Pyricularia grisea*. [en línea] En: International Temperate Rice Conference. (III: 2003, Mar 10-13: Punta del Este). [Consultado:15 Junio 2005] Disponible en:<http://www.inta.gov.ar/concordia/info/documentos/Agricultura/R-Mej-genetico-arroz.htm>
21. Borrero, J., Martínez, C.P. y Bruzzone, C. 2011. *Introgresión del Nuevo Tipo de Planta desarrollado en el IRRI en los Acervos genéticos de América latina y el Caribe* [en línea]. CIAT (Ed.). 57-58 p. [Consultado: 20 Enero 2011] Disponible en: http://webapp.ciat.cgiar.org/riceweb/esp/pdf/resultado_1.pdf
22. Cárdenas, R.M., Cordero, V., Pérez, N., Cristo, E. y Gell, I. 2000. *Utilización de una nueva metodología para la evaluación de arroz ante la infección producida por el hongo Pyricularia grisea*. Cultivos Tropicales. vol.21, no.1, p.63-66.
23. Cárdenas, R.M., Cristo, E. y Pérez, N. 2002. *Variedades cubanas de arroz (Oryza sativa Lin.) promisorias para la provincia de Pinar del Río tolerantes al tizón de la hoja (Pyricularia grisea)*. Cultivos Tropicales. vol.23, no.1, p.53-56.
24. Cárdenas, R.M., Cristo, E., Pérez, N., González, M.C. y Fabré, L. 2007a. *Monitoreo de la Piriculariosis (Pyricularia grisea Sacc.) en el cultivo del arroz (Oryza sativa Lin.)*. Fitosanidad. vol.11, no.1, p. 41-42.
25. Cárdenas, R.M., Mesa, S., Polón, R., Pérez, N., Cristo, E., Fabré, L. y Hernández, J.J. 2010. *Relación entre la incidencia de la piriculariosis (Pyricularia grisea Sacc.) del arroz (Oryza sativa Lin.) y diferentes variables climáticas en el Complejo Agroindustrial Arroceros Los Palacios*. Cultivos Tropicales. vol.31, no.1, p.14-18.
26. Cárdenas, R.M., Pérez, N., Cristo, E., González, M.C. y Fabré, L. 2005a. *Estudio sobre el comportamiento de líneas y variedades de arroz (Oryza sativa) ante la infección por el hongo Pyricularia grisea*. Cultivos Tropicales. vol.26, no.4, p.83-87.
27. Cárdenas, R.M., Pérez, N., Cristo, E. y González, M.C. 2005b. *Evaluación del vaneo de los granos en genotipos de arroz (Oryza sativa Lin.) sembrados en camas de infección*. Revista Protección Vegetal. vol.20, no.3, p.179-184.
28. Cárdenas, R.M., Pérez, N., Cristo, E. y Fabré, L. 2007b. *Análisis comparativo del comportamiento de líneas y variedades de arroz (Oryza sativa lin.) ante Pyricularia grisea Sacc. en dos épocas*. Cultivos Tropicales. vol.28, no.2, p.45-50.
29. Caredda, S., Devaux, P., Sangwan, R.S. and Clément, C. 2004. *Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. vol.76, no.1, p.35-43.
30. Carreres, R.M. y León, J.L. 1999. *Calidad del arroz*. Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura. no.209. ISSN: 0211-2728.
31. Casale, I. 2006. *Laboratorio de Mejoramiento de Plantas*. [en línea]. Caracas: Instituto de Zoología Tropical. Facultad de Ciencias. [Consultado: 10 Enero 2006] Disponible en: <http://www.ciens.ucv.ve/instzool/PropPlan.html>
32. Castaño, J. 1985. *Principales enfermedades del arroz y su control en América Latina* En: Tascon, E. and García, D.E. (Eds.). *Arroz, Investigación y Producción*. Cali: CIAT. p. 567.

33. Castejón-Muñoz, M. 2008. *The effect of temperature and relative humidity on the airborne concentration of Pyricularia oryzae spores and the development of rice blast in southern Spain*. Spanish Journal of Agricultural Research. vol.6, no.1, p.61-69.
34. Castejón-Muñoz, M., Lara-Álvarez, I. and Aguilar, M. 2007. *Resistance of rice cultivars to Pyricularia oryzae in Southern Spain*. Spanish Journal of Agricultural Research. vol.5, no.1, p.59-66.
35. Castillo, A., Rodríguez, S., González, A. y Peña, R. 2008. *Fertilización nitrogenada y la densidad de población en el rendimiento y sus componentes en la variedad de arroz (Oryza sativa L.) IIA Cuba-20 en siembras de primavera*. [CD-Rom] En: Encuentro Internacional del Arroz. (IV: 2008, 2-6 jun.: La Habana). Palacio de las Convenciones. ISBN: ISBN: 978-959-282-076-0.
36. Chang-Hyu, B., Young-Ill, L., Yong-Pyo, L., Yong-Won, S., Do-Jin, L., Deuk-Chun, Y. and Hyo-Yeon, L. 2002. *Selection of herbicide tolerant cell lines from γ -ray-irradiated cell cultures in rice (Oryza sativa L. cv. Ilpumbyeo)*. Journal of Plant Biotechnology. vol.4, no.3, p.123-127.
37. Chaudhary, R.C., Nanda, J.S. y Tran, D.V. 2005. *Guía para identificar las limitaciones de campo en la producción de arroz* [en línea]. FAO. Comisión Internacional del Arroz. ISBN: 92-5-304684-8 [Consultado: 10 Septiembre 2005] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/y2778s/y2778s00.HTM>
38. Chen, C.C., Tsay, H.S. and Huang, C.R. 1991. *Factors affecting androgenesis in rice (Oryza sativa L.)*. En: Bajaj, Y.P.S. (Ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. p. 193-215.
39. Chen, C., Xiao, H., Zhang, W., Wang, A., Xia, Z., Li, X., Zhai, W., Cheng, Z. and Zhu, L. 2006. *Adapting rice anther culture to gene transformation and RNA interference*. Sci China C Life Sci. vol.49, no.5, p.414-428.
40. Chen, H. and Qin, R. 2008. *Analysis of different effectors enhancing the anther culture ability of autotetraploid japonica rice*. Journal of Agricultural Science and technology. vol.10, no.3, p.90-96.
41. Chu, C., Wang, C., Sun, C., Chen, H., Yin, K., Chic, Y. and Bi, F.Y. 1975. *Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments*. Scientia Sirica. vol.18, p.659-668.
42. CIAT. 2006. *Arroz mejorado*. [en línea]. Cali: CIAT. [Consultado: 20 Junio 2005] Disponible en: http://webapp.ciat.cgiar.org/improved_germplasm/germoplasma/arroz.htm
43. Cordero, V. y Rivero, L.E. 2001. *Principales enfermedades fungosas que inciden en el cultivo del arroz en Cuba*. La Habana: Instituto de Investigaciones del Arroz. 32 p.
44. Correa-Victoria, F.J. y Delgado, D. 2005. *Asociación entre la selección en generaciones tempranas y estabilidad de la resistencia a Pyricularia grisea*. En: Congreso de la Asociación Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de cultivos. (IX: 2005, Mayo 11-13: Palmira, Colombia). Cali: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA).
45. Correa-Victoria, F.J., Guimarães, E.P. y Martínez, C.P. 1997. *Caracterización de la estructura genética y la virulencia de Pyricularia grisea para desarrollar variedades resistentes al añublo del arroz*. En: Guimarães, E.P. (Ed.). Selección Recurrente en Arroz Cali: EMBRAPA, CIRAD, CIAT, Fundación Polar. p. 203-215. Publicación CIAT No.267 ISBN: 958-9439-56-X
46. Correa-Victoria, F.J. y Prado, G. 2004. *Estrategias para el desarrollo de resistencia durable del añublo*. En: REDBIO (2004). Cali: Centro Internacional de Agricultura tropical (CIAT).

47. Correa-Victoria, F.J. and Zeigler R.S. 1994. *Pathogenic variability in Pyricularia grisea at a rice blast "hot spot" breeding site in Eastern Colombia*. Plant Diseases 77: 1029-1035.
48. Correa-Victoria, F.J., Zeigler, R.S. and Levy, M. 1994. *Virulence characteristics of genetic families of Pyricularia grisea in Colombia*. En: Zeigler, R.S., Leong, S.A. and Teng, P.S. (Eds.). Rice blast disease. Wallingford: CAB International. p. 211-229. ISBN: 0 85198 935 7.
49. Datta, S.K. 2001. *Androgenesis in cereals*. En: Bhojwani, S.S. and Soh, W.Y. (Ed.). Current Trends in Embryology of Angiosperms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 471-488. ISBN: 0-7923-6888-6
50. Datta, S.K. 2005. *Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in cropimprovement*. Current Science, vol.89, no.11, p.1870-1878.
51. Dewi, I.S. and Purwoko, B.S. 2008. *Role of polyamines in inhibition of ethylene biosynthesis and their effects on rice anther culture development*. Indonesian Journal of Agricultural Science, vol.9, no.2, p. 60-67.
52. De Wit P.J. 1992. *Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and application of avirulence genes in control of plant pathogens*. Annu. Rey. Phytopathol, vol.30, p. 391-418.
53. Deus, J.E. 1995. *El diminuto grano sigue todavía un largo camino hacia la variedad perfecta*. Ciencia, Innovación y Desarrollo. vol.1, no.2, p.6-8.
54. Devulapalle, K.S. and Suryanarayanan, S. 1995. *Cross-incompatibility among Indian Isolates of Pyricularia grisea*. Plant Disease. vol.79, p.779-781.
55. Díaz, S., Morejón, R. and Núñez, M. 2003. *Effects of Biobras-16 on rice (Oryza sativa L.) yield and others characters*. Cultivos Tropicales. vol.24, no.2, p.35-40.
56. Dirección Nacional de Suelos y Fertilizantes. 1990. *Mapa Nacional de Suelos, escala 1:25000*. Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba.
57. Espriella, J.J., Hoyos, B., Montoya, R. y Sierra, J. 2001. *Incidencia de la radiación solar y la temperatura en 4 variedades de arroz*. Arroz. vol.50, no.433, p.30-35.
58. Estévez, A., González, M.E., Castillo, J. y Ortiz, U. 2000. *Estudio de interacción genotipo-ambiente en clones cubanos de papa (Solanum tuberosum)*. Cultivos Tropicales. vol.21, no.2, p.59-63.
59. Fabregat, M. 1984. *Aspectos bioecológicos y control de Pyricularia oryzae Cav. en el arroz* [Tesis de Doctorado]. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana, Facultad de Agronomía. 105 p.
60. Fabregat, M. 1988. *Consideraciones sobre la piriculariosis del arroz (Pyricularia oryzae) con referencia a Cuba*. La Habana: ISCAH. 40 p.
61. FAO. 2006. *El Estado Mundial de la Agricultura 2003-04. La Biotecnología Agrícola: ¿una respuesta a las necesidades de los pobres?* [en línea]. Roma: FAO. ISBN: 92-5-305079-9 [Consultado: 6 Diciembre 2006] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/y5160s/y5160s00.HTM>
62. Franco, M.A. y Galindo-Castro, I. 2009. *¿De qué nos sirven los microarreglos en la identificación de genes de resistencia? Ejemplo Arroz –Pyricularia grisea*. Fitopatología Venezolana. vol.22, no.2, p.86.
63. Fuentes, J.L. 1998. *Estructura y diversidad genética de poblaciones cubanas del hongo Pyricularia grisea* [Tesis de Maestría]. Centro de Aplicación Tecnológica y Desarrollo Nuclear (CEADEN). 64 p.
64. Fuentes, J.L., Cornide, M.T., Alvarez, A., Suarez, E. and Borges, E. 2005. *Genetic diversity analysis of rice varieties (Oryza sativa L.) based on morphological, pedigree and DNA polymorphism data*. Plant Genetic Resources. vol.3, no.3, p.353–359.

65. Fuentes, J.L., Correa-Victoria, F.J., Escobar, F., Prado, G., Aricapa, G., Duque, M.C. and Tohme, J. 2008. *Identification of microsatellite markers linked to the blast resistance gene Pi-1(t) in rice*. Euphytica. vol.160, no.3, p.295-304.
66. Fuentes, J.L., Ramírez, I., Arteche, J., Deus, J.E., Suárez, E., Alonso, R., Puldón, V., Gómez, P.J. and Cornide, M.T. 2003. *Genetic base of Cuban rice varieties released between 1972 and 1993*. Cultivos Tropicales. vol. 24, no.2, p.55-61.
67. Galbieri, R. y Urashima, A. S. 2008. *Caracterização, compatibilidade e ocorrência de reprodução sexual entre isolados de Pyricularia grisea de diferentes hospedeiros*. Summa Phytopathologica. Botucatu, vol.34, no.1, p. 22-28.
68. Godoy, L., Héctor, E., Valera, E. y Torres, A. 2006. *Callogénesis y regeneración in vitro de arroz con los bioestimulantes cubanos Biostan y Liplant*. Cultivos Tropicales. vol.27, no.3, p.31-36.
69. González, M.C. 1998. *Uso de la variación somaclonal en el mejoramiento genético para la tolerancia a la salinidad en el cultivo del arroz (Oryza sativa L.)* [Tesis de Doctorado]. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Depto. de Genética y Mejoramiento de las Plantas. 100 p.
70. González, M. C., Pérez, N. y Cristo, E. 2009. *Gines: primer mutante de arroz obtenido a partir de la irradiación con protones*. Cultivos Tropicales. vol.30, no.3, p.59.
71. González, M. E., Estévez, A., Castillo, J. G., Salomón, J. L., Varela, M., Ortiz, U. y Ortiz, E. 2003. *Análisis de la estabilidad genotípica en el cultivo de la papa (Solanum tuberosum L.) mediante las representaciones Biplots*. Cultivos Tropicales vol.24, no.1, p. 81-84.
72. Graterol, M., Eduardo, J., Guimarães, E.P., Borges, F. y Orangel, L. 2006. *Evaluación de estrategias de selección para resistencia a Pyricularia grisea en arroz*. [en línea]. Revista Investigación Agrícola. [Consultado: 10 Enero 2006] Disponible en: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/danac/vol4/egraterol.htm>
73. Grewal, D., Gill, R. and Gosal, S. 2006. *Role of cysteine in enhancing androgenesis and regeneration of indica rice (Oryza sativa L.)*. Plant Growth Regul. vol. 49, p.43-47.
74. Gueye, T. and Ndir, K. 2010. *In vitro production of double haploid plants from two rice species (Oryza sativa L. and Oryza glaberrima Steudt.) for the rapid development of new breeding material*. Scientific Research and Essays. vol.5, no.7, p.709-713.
75. Guimarães, E.P. y Ospina-Rey, Y. 1992. *Evaluación del progreso en la selección de líneas resistentes al añublo del arroz (Pyricularia oryzae Cav.) en viveros internacionales*. Fitopatología Venezolana. vol.5, no.2, p.37-38.
76. Guimarães, E.P., Ospina, R. y Correa-Victoria, F. 2005. *Empleo del concepto de linajes de Pyricularia grisea para escoger germoplasma de arroz resistente*. [en línea]. Revista Fitopatología Venezolana [Consulta: 15 Junio 2005]. Disponible en: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/v091/091f0001.htm1>.
77. He, P, Shan L and Sheen J. 2007. *Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern triggered immunity in plant-microbe interactions*. Cellular Microorganismology vol.9, p. 1385-1396.
78. Herath, H. M., Bandara, D.C. and Samarajeewa, P.K. 2007. *Effect of culture media for anther culture of indica rice varieties and hybrids of indica and japonica*. Tropical Agricultural Research & Extension, vol.10, p. 17-22.
79. Herath, H. M., Bandara, D. C., Samarajeewa, P. K. and Wijesundara, D. S. 2009. *Effect of low temperature pre-treatment on anther culture in selected indica, japonica rice varieties and their inter sub-specific hybrids*. Cey. Journal Science (Bio. Sci.) vol.38, no.1, p. 11-16.
80. Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D. y Rivero, L.1999. *Nueva Versión de clasificación genética de los suelos de Cuba*. La Habana: AGRINFOR. 64 p.

81. Hernández, A. y Moreno, I. 2010. *Características y clasificación de los suelos cultivados de arroz en La Palma, Pinar del Río*. Cultivos Tropicales. vol.31, no.2, p.37-47.
82. Hernández, J. 2006. *Mejoramiento para resistencia a plagas con énfasis en Tagosodes orizicolus, Piricularia grisea y Stenotarsonemus spinki* En: Curso de Capacitación en Mejoramiento Genético en Arroz (2006, 30 oct - 10 nov: Sancti Spíritus). Proyecto Regional FAO TCP/RLA 3102.
83. Huang, H.S., Ling, T.H., Tseng, P.L., Shien, Y. and Shi, P. 1981. *Studies on medium component in anther culture of Oryza sativa subsp hsien by mathematical methods*. Plant Tissue Culture, Proceedings of the Beijing Symposium. London: Pitman Publishing Ltd. p. 244-246. ISBN: 0-273-08488-7.
84. IIArroz.2001. *Política varietal para el cultivo del arroz. Anexos al Instructivo Técnico del Arroz*. La Habana: Instituto de Investigaciones del Arroz (IIA). 17 p.
85. Infoagro. 2005. *La Piricularia del arroz*. [en línea]. Universidad Nacional del Nordeste. [Consultado: 15 Junio 2005] Disponible en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/arroz.htm>
86. INIA. 2006. *Aplicaciones del cultivo de tejidos al mejoramiento genético*. [en línea]. INIA. Laboratorio de cultivo de tejidos. [Consultado: 10 Enero 2006] Disponible en: <http://www.inia.org.uy/investigacion/biotecnologia/cultivos.htm>
87. IRRI.2002. *Standard Evaluation System for Rice*. Filipinas: International Rice Research Institute (IRRI). 56 p.
88. Jain, S.M. 2001. *Tissue culture-derived variation in crop improvement*. Euphytica. vol.118, no.2, p.153-166.
89. Jain, S.M. and Maluszynski, M. 2004. *Induced mutations and biotechnology in improving crops*. En: Mujib, A., Cho, M.J., Predieri, S. and Banerjee, S. (Eds.). *In vitro application in crop improvement*. Science Publishers. p. 170-202. ISBN: 978-1-57808-300-8.
90. Javed, M.A., Ishii, T., Kamijima, O. and Misoo, S. 2007. *The role of alternating culture temperatures and maltose in enhancing the anther culture efficiency of salt tolerant inidca rice (Oryza sativa L.) cultivars, Pokkali and Nona Bokra*. Plant Biotechnology. vol.24, p.283-287.
91. Jia, Y., Wang, Z., Fjellstrom, R.G., Moldenhauer, K.A.K., Azam, M.A., Correll, J., Lee, F.N., Xia, Y. and Rutger, J.N. 2004. *Rice Pi-ta gene confers resistance to the major pathotypes of the rice blast fungus in the United States*. Phytopathology. vol.94, no.3, p.296-301.
92. Jia, Y. 2009. *Artificial introgression of a large chromosome fragment around the rice blast resistance gene Pi-ta in backcross progeny and several elite rice cultivars*. Heredity. vol.103, p.333-339.
93. Jiang, J., Gibbons, J.W., Moldenhauer, K.A.K., Johnson, V.A. and Lee, F.N. 2004. *The Use of Anther Culture for Rice Variety Development in Arkansas*. In: B.R. Wells. (Ed.) *Rice Research Studies 2003*. University of Arkansas. no.517, p.49-57.
94. Jones, J.D. and Dang J.L. 2006. *The plant immune system*. Nature vol.444, p. 323-329.
95. Khatun, R., Islam, S.M. and Bari, M.A. 2010. *Studies on plant regeneration efficiency through in vitro micropropagation and anther culture of twenty five rice cultivars in Bangladesh*. Journal of Applied Sciences Research. vol.6, no.11, p.1705-1711.
96. Kim, C.H. 1987. *Effect of soil moisture on the pre-penetration activity of Pyricularia oryzae Cav. on rice leaf epidermis*. Korean Journal of Plant Pathology. vol.3, no.2, p.100-107.
97. Kim, C.K., Min, H.S. and Yoshinok, R. 1989. *Epidemiological studies of rice blast diseases caused by Pyricularia oryzae Cavara. IV. Conidia release under rainy conditions*. Korean Journal of Plant Pathology. vol. 5, no.1, p.60-64.
98. Koh, Y.J., Hwang, B.K. and Chung, H.S. 1987. *Adult-plant resistance of rice to leaf blast*. Phytopathology. vol.77, no.2, p.232-236.

99. Kwon, Y.S., Kim, K.M., Eun, M.Y. and Sohn, J.K. 2002. *QTL mapping and associated marker selection for the efficacy of green plant regeneration in anther culture*. Plant Breeding. vol.121, p.10-16.
100. Lentini, Z., Martínez, C. y Roca, W.M. 2006. *Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma*. [en línea]. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. ISBN 958-9439-92-6 [Consultado: 14 febrero 2006 Disponible en: http://www.ciat.cgiar.org/ourprograms/Documents/cultivo_anteras.pdf
101. Lentini, Z., Reyes, P., Martínez, C.P., Núñez, V.M. y Roca, W.M.1995. *Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras. Aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas latinoamericanos y el Caribe* Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 79 p.
102. León, J.L. y Carreres, R. 2002. *Calidad del arroz: criterios para una adecuada valoración*. Vida Rural. vol.145, p.38-40.
103. Levy, M.; Correa-Victoria, F.J.; Zeigler, R.S.; Xu, S. and Hamer, J.E. 1993. *Genetic diversity of rice blast fungus in a disease nursery in Colombia*. Phytopathology. vol.83, no.12, p. 1427-1433.
104. Levy, M.; Romao, J.; Marchetti, M.A. and Hamer, J.E. 1991. *DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus*. Plant cell. vol.3, p. 95-102.
105. Li, M. F. 1992. *Anther culture breeding of rice at the Chinese Academy of Agricultural Sciences*. In: Z. Kangle and T. Murashige (Ed.). *Anther culture for Rice Breeders*, CNNRI, Hangzhou, China, p. 75-86.
106. Livore, A. 2008. *Desarrollo de una estrategia para la obtención de resistencia durable a Pyricularia grisea en Arroz en el Cono Sur*. [en línea]. Informe técnico final – Proyecto FONTAGRO - convenio iica/bid ftg/rf-99-02-rg, INTA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) [Consulta: 15 Junio 2008]. Disponible en: <http://www.procisur.org.uy/online/DOCS/pyricularia22.pdf>
107. Mackill A. O. 1986. *New hosts of Pyricularia oryzae*. Plant Disease, vol.70, p.125-127.
108. Mahmuda, M., Hazrat, M. and Desamero, N. 2003. *Effect of genotype and culture media on callus formation and plant regeneration from mature seed scutella culture in rice*. Plant Tissue Culture, vol.13, no.2, p. 99-107.
109. Mandal, A.B., Sheeja, T. E. and Roy, B. 2000. *Assessment of androclonal variation in indica rice PTB28*. Indian Journal Exp. Bio, vol.38, p. 1054- 1057.
110. Manry J., Correa-Victoria, F., Hamer, J. and Levy, M. 2000. *Population structure and virulence diversity of the rice blast fungus in Colombia*. [en línea]. IRRI, Los Baños, Laguna (Philippines) [Consulta: 20 febrero 2000]. Disponible en: http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1995/PH/PH_95014.xml;PH9510785
111. Martínez, C. P. 2008. *Diferentes alternativas seguidas en la obtención de variedades de arroz resistentes a piricularia (Pyricularia oryzae Cav.)* [en línea]. Revista ICA, Colombia, [Consulta: 20 Julio 2008]. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin>
112. Martínez, C.P., Carabali, S.; Duque, M.C. y Silva, J. 2002. *Progreso genético para calidad de grano de arroz (Oryza sativa) mediante selección recurrente*. En: Guimarães E.P. (Ed.). *Mejoramiento poblacional, una alternativa para explorar los recursos genéticos del arroz en América Latina*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 296-317.
113. McNally, K. et al. 2006. *Sequencing multiple and diverse rice varieties. Connecting whole-genome variation with phenotypes*. Plant Physiology, vol.141, p. 26-31.
114. Méndez, P. 2011. *Arroz: ¿estabilidad o nueva alza de los precios mundiales?* [en línea]. Informativo mensual del mercado mundial del arroz, (84) Febrero 2011. Infoarroz, Centro

- de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD) [Consulta: 16 Junio 2011]. Disponible en: www.infoarroz.org
115. Meneses, R., Gutiérrez, A., García, A., Antigua, G., Gómez, J., Correa-Victoria, F. y Calvert, L. 2001. *Principales enfermedades del cultivo del arroz. Pyricularia grisea*. En: Instituto de Investigaciones del Arroz (IIA) de Cuba, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), de Colombia y Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR) (Ed.), Guía para el trabajo de campo en el manejo integrado de plagas del arroz, p. 46-48.
 116. MINAG. 2000. *Instructivos Técnicos para el cultivo del arroz*. Instituto de Investigaciones del Arroz. La Habana, 50p.
 117. MINAG. 2005. *Instructivos Técnicos para el cultivo del arroz*. Instituto de Investigaciones del Arroz. La Habana, 113p.
 118. MINAG. 2008. *Instructivos Técnicos para el cultivo del arroz*. Instituto de Investigaciones del Arroz. La Habana, 115p.
 119. MINAG. 2011. *Modificaciones al Instructivo Técnico para el cultivo del arroz*. Instituto de Investigaciones de Granos. La Habana, 30p.
 120. MINAG-Perú. 2009. *Arroz. Producción Mundial*. [en línea]. Portal Agrario. Cultivos de importancia nacional. [Consulta: 10 Enero 2009]. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/arroz/produccion.html>
 121. Montoya, M.; Rodríguez, N.; Pérez-Almeida, I.; Cova, J. y Alemán L. 2007. *Caracterización morfológica de 13 variedades de arroz venezolanas*. *Agronomía tropical* vol.57, no.4, p. 299-311.
 122. Morejón, R., Hernández, J.J. y Díaz, S. 2005. *Comportamiento de variedades comerciales de arroz (Oryza sativa) en cuatro Granjas del Complejo Agroindustrial Arrocero Los Palacios*. *Cultivos tropicales* vol.26, no.4, p. 77-81.
 123. Muñoz, G., Giraldo, G. y Fernández, J. 1996. *Descriptores varietales: arroz, frijol, maíz, sorgo*. En: Centro Internacional de Agricultura Tropical (Eds.). p. 169-174. ISBN: 958-9183-27-1.
 124. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. *Physiologia Plantarum* (Copenhagen) vol.15, no.3, p. 473-479.
 125. Navas, M., Gamboa, C., Torres, O., Salazar, M., Marín, C., Crespo, J. y Gutiérrez, R. 2003. *Estimación de la época de mayor presión de inóculo de Pyricularia grisea Sacc en el campo experimental del centro de investigaciones agropecuarias del estado Barinas, Venezuela*. *Investigación Agrícola* no.8, p. 9.
 126. Niroula, R.K and Bimb, H.P. 2009. *Effect of genotype and callus induction medium on green plant regeneration from anther of Nepalese rice cultivars*. *Asian Journal of Plant Sciences*, vol.8, no.5, p. 368-374.
 127. Ojito-Ramos, K. y Portal, O. 2010. *Introducción al sistema inmune en plantas*. *Biotecnología Vegetal*, vol.10, no.1, p. 3 - 19.
 128. Ortiz, R.; Ponce, M.; Ríos, H.; Verde, G.; Acosta, R.; Miranda, S.; Marín, L.; Moreno, I.; Martínez, M.; de la Fé, C y Varela, M. 2003. *Efectividad de la experimentación campesina en la microlocalización de variedades de frijol y la evaluación de la interacción genotipo-ambiente*. *Cultivos Tropicales*, vol.24, no.4, p. 107-113.
 129. Ou, S.H. 1972. *Rice Diseases*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 368 p. ISBN 0851982174.
 130. Pantoja, A.; Fischer, A.; Correa-Victoria, F.; Sanint, L. R. y Ramírez, A. 2006. *MIP en arroz: manejo integrado de plagas; artrópodos, enfermedades y malezas*. [en línea]. Publicación CIAT No 292, p:123-144 ISBN 958-9439-58-6. [Consulta: 10 Enero 2006]. Disponible en: <http://webapp.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/contents.pdf>
 131. Pérez, A. 2002. *La interacción tomate-Cladosporium fulvum: Un modelo experimental para el estudio de interacciones patógeno-planta (I)*. En: Encuentros en la biología. [en línea].

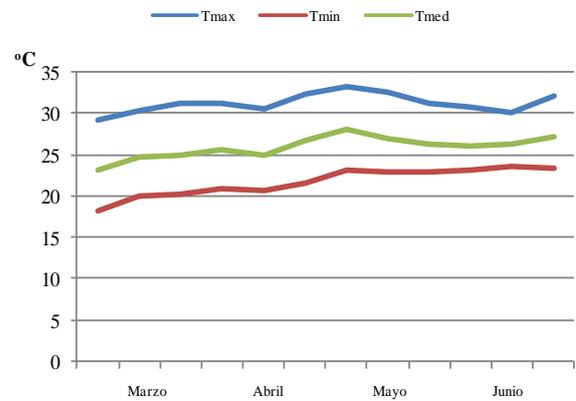
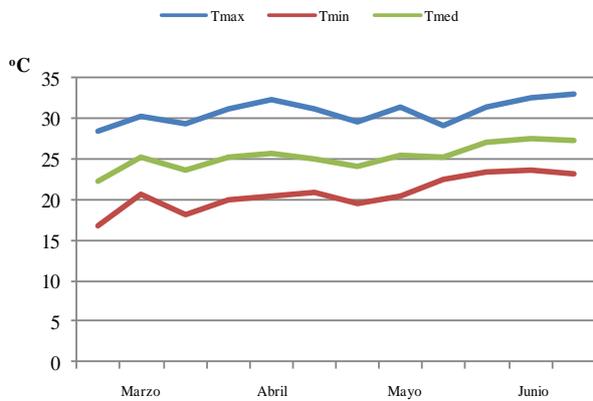
- Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, España [Consulta: 20 Diciembre 2002]. Disponible en <http://www.encuentros.uma.es/>
132. Pérez, A. V.; Morales, L. y Verdes G. 2002. *Resultados obtenidos con la técnica de rescate de embrión entre las especies O. sativa (2N) y O. latifolia (4N) en el IIA, Cuba*. En: Encuentro Internacional del Arroz, (II: 2003, Junio: Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba) p. 67 -70.
 133. Pérez, N., González, M. C. y Castro, R. I. 2000. *Nueva variedad de arroz de ciclo corto: INCA LP-5*. Cultivos Tropicales, vol.21, no.4, p. 55.
 134. Pérez-Almeida, I. 2005. *Aplicaciones Biotecnológicas en el Mejoramiento del Arroz*. [en línea]. Revista Digital CENIAP HOY del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela, [Consulta: 31/10/2005]. Disponible en: http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/perez_almeida_i/art/perez_almeida_i.htm
 135. Pérez-Almeida, I.; Lentini, Z. y Guimarães, E.P. 2005. *El cultivo de anteras en el desarrollo de germoplasma resistente al añublo del arroz (Pyricularia grisea)*. [en línea]. Fitopatología Venezolana [Consulta: 31/10/2005]. Disponible en: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fitopato/v081/v081f030.htm>
 136. Pérez-Almeida, I. y Montoya, M. A. 2009. *Calidad del grano y variabilidad genética de variedades y líneas de arroz del Instituto nacional de investigaciones agrícolas (INIA)*. Agronomía Tropical, vol.59, no.4, p. 445-456. ISSN 0002-192X.
 137. Persaud, M., Kumar, A., Sengar, R.B., Sao, A., Dantre, R.K. and Shrivastava, M.N. 2007. *Genetic analysis of blast (Pyricularia grisea Sacc.) resistance in rice (Oryza sativa L.)*. J. Boil. Sci., vol.7, p. 215-217.
 138. Piñeiro, F. y García, J. 2000. *La sanidad vegetal en el arrozal valenciano*. Enfermedades. Vida Rural. 2000, no.108.
 139. Prabhu, A. S. y Filippi, M. C. 2006. *Brusone em arroz: Controle genético, progresso e perspectivas*. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 388p.
 140. Prado, G. A., et al. 1998. *Hipótesis de la exclusión de linajes: una alternativa para el desarrollo de cultivares de arroz con resistencia durable a Pyricularia grisea Sacc en Colombia*. En: Encuentro Internacional de Arroz. (I: 1998, Junio, La Habana, Cuba). p. 64-65.
 141. Purwoko, B. S., Dewi, I. S. and Khumaida, N. 2010. *Rice Anther Culture to Obtain Doubled-Haploids with Multiple Tolerances*. Asia Pacific Journal Molecular Biology Biotechnology, vol.18, no.1, p. 55-57.
 142. Ramakrishnan, S. H., Saravanan, S. Anandakumar, C. R. and Kannanbapu, J. R. 2005. *In vitro androgénesis in rice (Oryza sativa L.)*. Asian Journal of Plant Sciences, vol.4, no.6, p. 600-602.
 143. Rangel, P. H. N.; Soares, D. M.; Morais, O. P.; Cutrim, V. A.; Diniz, J.A. and Fonseca, J. R. 2006. *BRS Alvorada and BRSGO Guará - Irrigated Rice Cultivars for the States Goiás and Tocantins*. Crop Breeding and Applied Biotechnology, vol.6, p. 319-322.
 144. Rasheed, S.M.; Sadaqat, H.A. and Babar, M. 2002. *Correlation and path coefficient analysis for yield and its components in rice (Oryza sativa L.)*. Asian Journal Plant Science, vol.1, p. 241-245.
 145. Rodríguez, A.T. 2003. *Efectos de derivados de quitina en la inducción de mecanismos defensivos y en la protección del cultivo del arroz (Oryza sativa L.) contra Pyricularia grisea Sacc.* [Tesis de Maestría]. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 47p.
 146. Rodríguez, A.T. Ramírez M.A., Cárdenas R. M., Hernández A., Velásquez M.G. and Bautista S. 2007. *Induction of defence response of Oryza sativa L. against Pyricularia grisea (Cooke) Sacc. by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan*. Pesticide Biochemistry and Physiology, vol.89, p. 206-215.
 147. Roy B. and Mandal, A.B. 2005. *Anther culture response in indica rice and variations in*

- major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local.* African Journal of Biotechnology, vol.4, no.3, p. 235-240.
148. Saharan, V.; Yadav, R. C.; Yadav, N. R.; Chapagain, B. P. 2004. *High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (Oryza sativa L.)*. African Journal of Biotechnology, vol.3, no.5, p. 256-259.
 149. Sangwan, R. S. 2004. *Haploid plants from pollen grains: advances and potential in plant breeding*. In: Institute of Crop Science (Ed.). International Training Course on Application of Induced Mutations & Biotechnology for Crop Salt Tolerance Improvement. (2004, 2 – 6 Aug: Beijing).
 150. Santos, G. R.; Korndörfer, G. H. y Prabhu, A. S. 2003. *Eficiência do silício combinado com nitrogênio e tratamento de sementes no controle de doenças do arroz irrigado por inundação*. Bioscience Journal, vol.19, p. 43-49.
 151. Sarla, N. and Mallikarjuna, B. P. 2005. *Oryza glaberrima: a source for the improvement of Oryza sativa*. Current Science, vol.89, no.6, p. 955 – 963.
 152. Séré, Y.; Onasanya, A.; Afolabi, A.; Mignouna, H. D. and Akator, K. 2007. *Genetic diversity of the blast fungus, Magnaporthe grisea (Hebert) Barr, in Burkina Faso*. African Journal of Biotechnology, vol.6, no.22, p. 2568-2577.
 153. Shahnewaz, S., Bari, M.A., Siddique, N.A., Khatun, N., Rahman, M.H. and Haque, M.E. 2003. *Induction of haploid rice plants through in vitro anther culture*. Pakistan Journal of Biological Sciences, vol.6, no.14, p. 1250-1252.
 154. Shahnewaz, S. and Bari, M.A. 2004. *Effect of concentration of sucrose on the frequency of callus induction and plant regeneration in anther culture of rice (Oryza sativa L.)*. Plant Tissue Culture, vol.14, no.1, p.37–43.
 155. Shahnewaz, S., Bari, M.A., Siddique, N.A., and Rahman, M.H. 2004. *Effects of genotype on induction of callus and plant regeneration potential in vitro anther culture of rice (Oryza sativa L.)*. Pakistan Journal of Biological Sciences, vol.7, no.2, p. 235-237.
 156. Silva, T.D. 2010. *Indica rice anther culture: can the impasse be surpassed?* Plant Cell Tissue Organ Culture, vol.100, p. 1–11.
 157. Silva, T.D. and Ratnayake, W.J. 2009. *Anther culture potential of indica rice varieties, kurulu thuda and Bg 250*. Tropical Agricultural Research & Extension, vol.12, no.2, p. 53-56.
 158. Suárez, E.; Deus, J. E.; Pérez, R.; Alfonso, R.; Hernández, R.; Avila, J.; Hernández, J. L.; Puldón, V.; Duany, A.; Reinoso, J.; Mesa, H. y Rodríguez, S. 2000. *Mejoramiento genético del arroz (Oryza sativa L.) mediante inducción de mutaciones*. Revista Cubana del arroz, vol.2, no.3, ISSN: 1607-6273.
 159. Suárez, E., Pérez, R.; Alfonso, R.; Mesa, H.; Deus, J. E.; Cruz, F.; Peña, R.; Hernández, J. L.; Leyva, B.; Sánchez, S. y Suárez, D. 1997. *Nuevas variedades de ciclo corto en Cuba*. Arroz en las Américas, vol.18, no.1, p. 2.
 160. Suárez, L. y González, M. C. 2004. *Evaluación en estadios tempranos de un grupo de mutantes de arroz (Oryza sativa L.) en condiciones salinas, utilizando marcadores morfoagronómicos*. Cultivos Tropicales, vol.25, no.1, p. 27-31.
 161. Suderland, N. 1978. *Strategies in the improvement of yields in anther culture*. In: Plant Tissue Culture Symposium. (1978, Beijing), p. 65-86.
 162. Surek, H. and Beser, N. 2003. *Correlation and path coefficient analysis for some yield-related traits in rice (Oryza sativa L.) under thrace conditions*. Turk. Journal Agric., vol. 27, p. 77-83.
 163. Talebi R, Rahemi MR, Arefi H, Nourozi M and Bagheri N. 2007. *In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (Oryza sativa L.) cultivars*. Pakistan Journal of Biological Sciences, vol.10, no.12, p. 2056–2060.
 164. Torp, A.M. and Andersen, S.B. 2009. *Albinism in Microspore Culture*. En: A. Touraev et al. (Eds.) Advances in Haploid Production in Higher Plants, Denmark, p. 155-160.

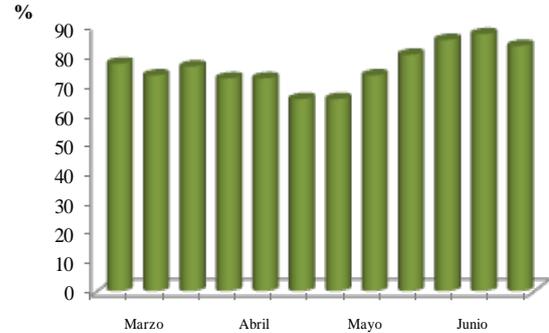
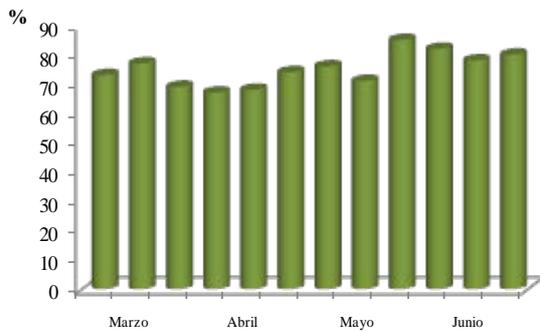
165. Torrealba, G., Salazar, E., Alvarez, R., Torres, E., Lentini, Z., Gibbons, J., Gonzalez, D., y Mora, A. 2006. *Variación somaclonal en seis genotipos de arroz*. *Agronomía Tropical*, vol.56, no.4, p. 585-591. ISSN 0002-192X.
166. Tran, D.G. and Vuong, D. T. 2004. *Anther culture from crosses between IR64 and new plant type cultivars*. *Omonrice*, vol. 12, p. 27-32.
167. Tsay, H.S. 1982. *Autotoxicity in tobacco and rice anther culture*. In: C.H. Chou and G.R. Walter (Ed.) *Allelochemicals and pheromones*. Acad. Sin. Taipei, Taiwan, ROC, p. 283-292.
168. Tsay, H.S. and Chen, L.J. 1984. *The effects of cold shock and liquid medium on callus formation in rice anther culture*. *J. Agric. Res China*, 33. 24-29.
169. Varela, M. 1998. *Análisis multivariado de datos. Aplicación a las ciencias agrícolas*. La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 56p.
170. Varela, M. 2002. *Los métodos Biplots como herramientas de un análisis de interacción de orden superior en un Modelo Lineal / Bilineal*. [Tesis de Doctorado].Universidad de Salamanca, 100p.
171. Wattoo, J.I.; Khan, A.S.; Ali, Z.; Babar, M.; Naeem, M.; Aman ullah, M. and Hussain, N. 2010. *Study of correlation among yield related traits and path coefficient analysis in rice (Oryza sativa L.)*. *African Journal of Biotechnology*, vol.9, no.46, p. 7853-7856.
172. Yalouje, A., Solooki, M. Jauhar, A., Ebadi, A. A. and Torabi A. 2009. *The influence of genotype and induction medium on efficiency of anther culture of hetrotic indica x indica rice hybrids*. *Journal Science & Technology Agric & Natur. Resour.*, vol.11, no.47 A, p. 217- 221.
173. Yamagishi, A. 2002. *Gametoclonal variation in anther culture-derived rice plants. II. Segregation of mutated plants at the first progeny generation*. *Genetics Breeding Journal*, vol.56, no.4, p. 303 – 308.
174. Yamazaki, A. 2001. *A message to our friends in the world: Use of high pressure for food processing in the 21st Century*. *Farming Japan*, vol.35, no.2, p. 5-9.
175. Zaidi, M. A., Narayanan, M., Sardana, R., Taga, I., Postel, S., Johns, R., McNulty, M., Mottiar, Y., Mao, J., Loit, E. and Altosaar, I. 2006. *Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes*. *Agronomy Research*, vol.4, no.2, p. 563–575.
176. Zambrano, A.; Vegas, A., Cardona, R., Gutiérrez, Z. y Demey, J. R. 2006. *Estructura genética y diversidad de linajes de Pyricularia grisea en la zona arrocera venezolana*. *Interciencia*, vol.31, no.1, p. 62-66.
177. Zeigler R.S., Cuoc, L.X., Scott, M.A., Chen, D.H., Valent, B. and Nelson, R.J. 1995. *The Relationship Between Lineage and Virulence in Pyricularia grisea in the Philippines*. *Phytopathology*, vol.85, p. 443-451.
178. Zipfel, C. 2008. *Pattern-recognition receptors in plant innate immunity*. *Current Opinion in Immunology*, vol.20, no.2, p. 10-16.

VIII. ANEXOS

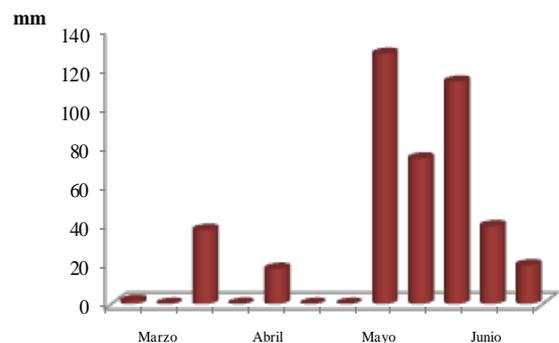
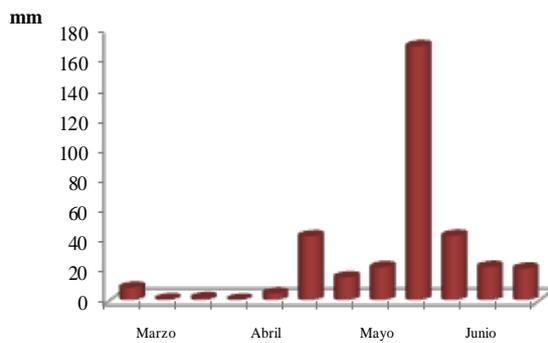
Anexo 1. Condiciones climáticas para los meses en que se desarrolló el estudio durante dos años.



Temperatura máxima (Tmax), temperatura mínima (Tmin) y temperatura media (Tmed) (°C)



Humedad relativa (%)



Precipitaciones (mm)

Anexo 2. Composición de los medios de cultivo utilizados para la inducción de callos a partir de anteras.

Medios	Composición (mg.L ⁻¹)		
	N ₆₋₁	N _{6m}	NL
(NH ₄) ₂ SO ₄	463,0	231.5	231.5
KNO ₃	2830,0	2830,0	3134,0
KH ₂ PO ₄	400,0	540,0	540,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	185,0	3.7	185,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	166,0	166,0	150,0
H ₃ BO ₃	1,6	1.6	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	4,0	4.4	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,5	1.5	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25		0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25		0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25		0,025
KI	0,8	0.83	0.83
Na ₂ EDTA	37,3	37.3	37.3
Fe SO ₄ .7H ₂ O	27,8	27.8	27.8
Mioinositol	1,0		
Tiamina	0,1	1,0	2.5
Acido nicotínico	0,5	0.5	2.5
Piridoxina	0,5	0.5	2.5
Glicina	2,0	2,0	2.5
2,4 D	2,0	2,0	2,0
Picloramo		0.07	0.07
ANA	1,5		
Kinetina	1,0	0.5	0.5
Lactoalbumina hidrolizada	500,0		
AgNO ₃			10,0
Sacarosa (g/L)	50,0	50,0	
Maltosa (g/L)			50,0

Anexo 3. Procedimiento metodológico para la obtención de cultivares de arroz resistentes a *P. grisea* y de buen comportamiento agronómico.

1. Selección de progenitores.

1.1 Selección de progenitores resistentes a la Piriculariosis, que muestren evaluaciones con grados entre 0-3 de la escala propuesta por el IRRI (2002), en canteros de infección natural en la localidad "Caribe" y mediante la utilización de la metodología validada en Cuba por Cárdenas *et al.* (2000).

1.2 Identificación de cultivares de alto potencial productivo.

2. Desarrollo del Programa de cruzamientos entre los cultivares resistentes y cultivares de alto potencial productivo, de acuerdo a un diseño genético estadístico.

3. Cultivo *in vitro* de anteras de las plantas F₂ provenientes de los cruces realizados.

3.1 . Selección de las plantas donantes teniendo en cuenta el vigor y su estado fitosanitario.

3.2 Selección de medios de cultivo eficientes para la formación de callos y regeneración de plantas verdes.

4. Selección de cultivares resistentes al patógeno y de buen comportamiento agronómico.

4.1 Selección simultánea sobre 2 caracteres, con criterios independientes: resistencia de los cultivares frente a la Piriculariosis por infección natural en campo y el potencial productivo.

4.2 Selección en condiciones semicontroladas con inoculación artificial de haplotipos virulentos identificados en Cuba.

4.3 Evaluación en la localidad "Caribe", frente a toda la variabilidad de *P. grisea* existente.