

# Inducción de mutaciones y biotecnología vegetal para la producción de cultivos resistentes a condiciones de estrés y con mayor rendimiento

## Induction of mutations and plant biotechnology to produce stress-resistant crops with higher yields

Frank Carlos Barrientos-Alfaro<sup>1</sup>, Jason Pérez<sup>2</sup>,  
Alejandro Hernández-Soto<sup>3</sup>

Barrientos-Alfaro, F.C; Pérez, J; Hernández-Soto, A. Inducción de mutaciones y biotecnología vegetal para la producción de cultivos resistentes a condiciones de estrés y con mayor rendimiento. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 143-157.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7619>

1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [frankca37@gmail.com](mailto:frankca37@gmail.com)

 <https://orcid.org/0000-0001-8961-4110>

2 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [jasperez@itcr.ac.cr](mailto:jasperez@itcr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0002-8267-4978>

3 Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

 [alhernandez@itcr.ac.cr](mailto:alhernandez@itcr.ac.cr)

 <https://orcid.org/0000-0001-9435-5117>



## Palabras clave

Producción agrícola; genética agrícola; desarrollo sostenible; mutación; energía atómica.

## Resumen

Las mutaciones y la variabilidad genética causada por estas desempeñan un rol fundamental en el mejoramiento genético de las plantas. La inducción de mutaciones o mutagénesis representa una opción rápida y efectiva para el desarrollo de nuevas variedades que conservan los niveles óptimos de productividad en entornos desafiantes para la agricultura. La inducción de mutaciones puede ser llevada a cabo mediante el uso de agentes físicos, agentes químicos o herramientas de edición génica. El empleo conjunto de la mutagénesis con técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos permite establecer estrategias de selección eficientes y rentables. El presente artículo ofrece una breve recopilación sobre la inducción de mutaciones, las técnicas más empleadas para dicho fin y algunas mejoras obtenidas en diferentes cultivos, con relación al estrés biótico, al estrés abiótico y al rendimiento productivo. Finalmente, se examina el panorama histórico del mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones en Costa Rica; específicamente, en los cultivos de mayor relevancia económica y social para el país.

## Keywords

Agricultural production; agricultural genetics; sustainable development; mutation; atomic energy.

## Abstract

Mutations and the genetic variability caused by them play a fundamental role in the genetic improvement of plants. Mutation induction or mutagenesis represents a rapid and effective option for the development of new varieties that maintain optimal productivity levels in challenging agricultural environments. Mutation induction can be carried out using physical agents, chemical agents, or gene editing tools. The combined use of mutagenesis with *in vitro* tissue culture techniques allows for the establishment of efficient and cost-effective selection strategies. This article provides a brief overview of mutation induction, the most commonly used techniques for this purpose, and some improvements achieved in various crops in relation to biotic stress, abiotic stress, and productive yield. Finally, it examines the historical landscape of genetic improvement through mutation induction in Costa Rica, specifically in the crops of greatest economic and social relevance to the country.

## Introducción

El mejoramiento de cultivos se basa en la variabilidad genética de las plantas [1]. Las mutaciones son la mayor fuente de esta variabilidad, que es posteriormente amplificada por recombinación genética de cromosomas homólogos durante la meiosis [2]. El término “mutación” fue acuñado a finales del siglo XIX por Hugo de Vries en referencia a cambios o “saltos” en características que llevan al desarrollo de variaciones y de nuevas especies, como resultado de redescubrir las leyes de la herencia mendeliana [3], [4]. El principio de la mutación se encuentra en producir cambios en el material genético [5].

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una biomolécula cuya estabilidad le permite almacenar la información genética en diferentes organismos [6], [7]. El ADN no sólo es fundamental en los procesos de herencia genética [6], sino que también está sujeto a lesiones producto de la división celular y de factores exógenos como la luz ultravioleta, radicales libres de oxígeno y exposición a radiaciones y químicos [8]. Si estas lesiones no son reparadas correctamente se

puede generar la aparición de mutaciones [8]. Las mutaciones son cambios en la secuencia de ADN de un organismo [9], que pueden darse en tres niveles distintos: molecular, cromosómico y genómico. Lo anterior corresponde a afectar genes, segmentos del cromosoma y el número de juegos cromosómicos, respectivamente [5]. Estas mutaciones pueden ser aprovechadas para la inducción de variabilidad genética en plantas y, por ende, en programas de mejoramiento vegetal [10].

La inducción artificial de mutaciones (mutagénesis) representa una opción rápida y efectiva para el desarrollo de programas de fitomejoramiento [11], [12]. Las técnicas de mutagénesis permiten obtener características de interés agronómico y económico en las plantas, tal como mejor rendimiento, mayor diversidad genética, y tolerancia a estrés biótico y abiótico [13]. La inducción de mutaciones puede realizarse, en condiciones *in vitro* o *in vivo*, mediante la exposición a agentes genotóxicos, la inserción de fragmentos de ADN, o el empleo de herramientas de edición génica [2].

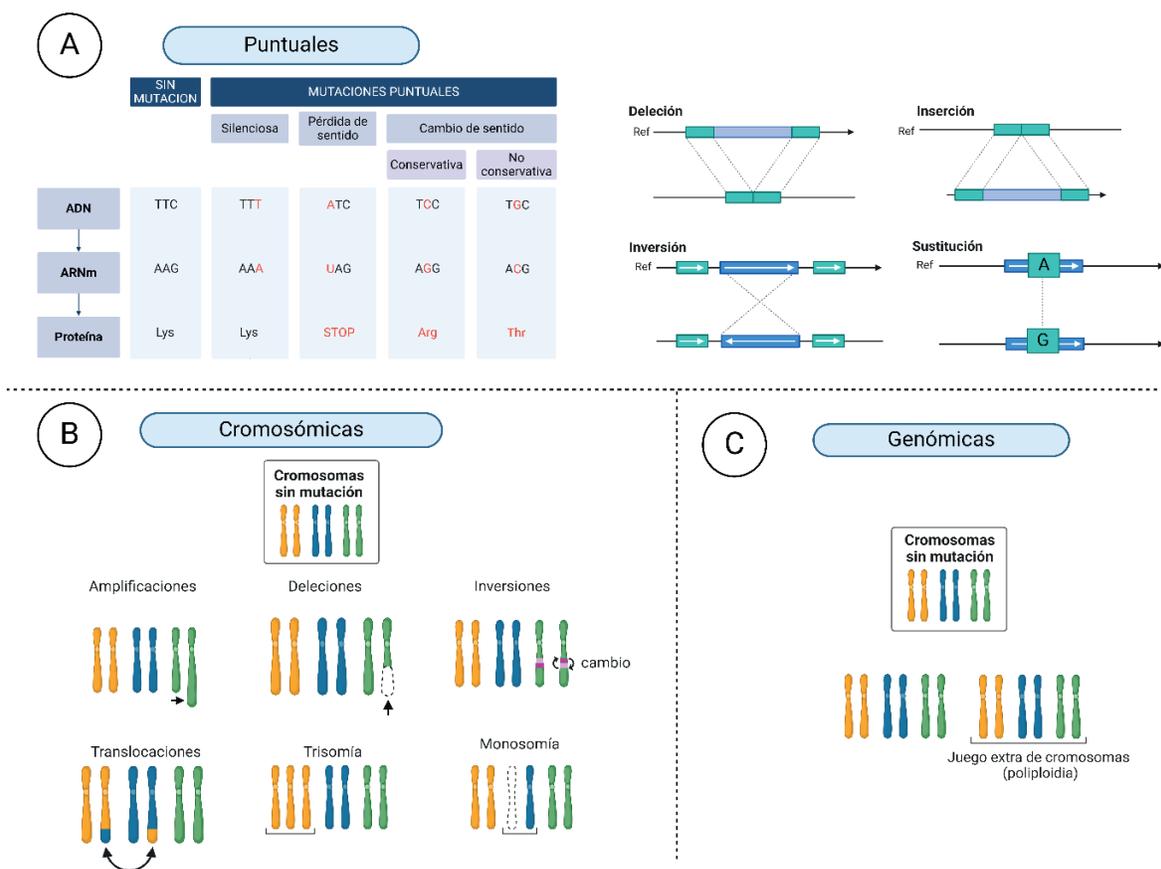
Actualmente, la mayoría de las variedades mutantes de plantas que se utilizan en agricultura son producidas mediante la inducción de mutaciones por métodos físicos, particularmente por radiación gamma, cuya fuente es usualmente el cobalto radiactivo ( $^{60}\text{Co}$ ) o Cesio ( $^{137}\text{Cs}$ ) [14], [15]. La preferencia de este sistema para el mejoramiento por inducción de mutaciones se debe a su habilidad para penetrar el tejido y la simplicidad de la metodología de irradiación [16]. En contraste, el uso de mutágenos químicos requiere de incubaciones y exposiciones, con especial cuidado de los reactivos y desechos, y el control del efecto residual en los tejidos tratados [17], [18].

En Costa Rica, existen múltiples investigaciones relacionadas al empleo de la mutagénesis para el desarrollo de variedades con nuevas características. El Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), la Universidad de Costa Rica (UCR) y la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) encabezan dichas investigaciones [19], [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28]. Adicionalmente, en la base de datos de variedades mutantes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) se reporta que en Costa Rica se han desarrollado nuevas variedades de arroz (*Oryza sativa* L.), de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y de chícharos (*Vigna unguiculata* Walp.), mediante la inducción de mutaciones [29], [30], [31], [32].

## Mutaciones

Las mutaciones son descritas como cambios estables en la secuencia de ADN de determinado locus en un organismo [9], [18]. Estas pueden ocurrir de forma simultánea durante la división celular; o bien, por la exposición a agentes externos como mutágenos o infecciones virales [5], [9]. Shelake *et al.* [16] señalan a las mutaciones como la base de la variabilidad genética y de la evolución y diferenciación entre organismos.

Las mutaciones pueden presentar sus efectos a nivel molecular de forma puntual, a nivel cromosómico, o a nivel genómico (Figura 1). Las mutaciones génicas o puntuales afectan la composición química de los genes o de las regiones intergénicas; específicamente, modificando una o pocas de las bases nitrogenadas que los conforman [5]. Las mutaciones puntuales incluyen las inserciones, las deleciones y las sustituciones [5], [16]. Por su parte, las mutaciones cromosómicas cambian la estructura de los cromosomas, pudiendo ocurrir duplicaciones, translocaciones, o la inversión de regiones completas del cromosoma, entre otras alteraciones, y aneuploidías ( $2n \pm$  cromosoma) [5], [16]. Finalmente, las mutaciones genómicas conllevan a alteraciones en el número de juegos cromosómicos, produciendo poliploidías [5], [16].



**Figura 1.** Representación gráfica de tipos de mutaciones: Puntuales (A), cromosómicas (B) y genómicas (C) (Elaborado en BioRender.com).

Las mutaciones desempeñan un papel clave en términos evolutivos debido a que permiten el desarrollo de características nuevas en los cultivos [18], [33]. A pesar de lo anterior, las mutaciones espontáneas son poco frecuentes en la naturaleza, por lo que la búsqueda de metodologías para acelerar dicho proceso es uno de los problemas clave en el desarrollo de nuevas variedades [33].

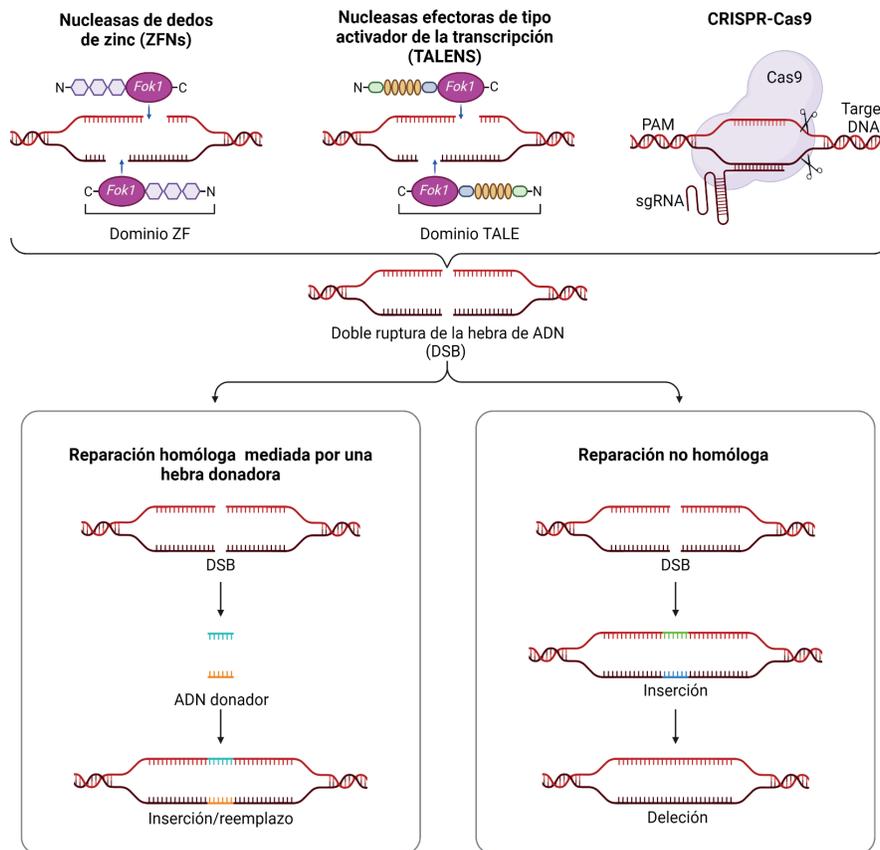
## Mutagénesis

La mutagénesis consiste en la exposición de material biológico a agentes mutagénicos con el fin de incrementar, de forma artificial, la tasa de mutaciones respecto a la frecuencia de mutaciones espontáneas en condiciones naturales [34], [35]. De esta manera, la mutagénesis permite incrementar la variabilidad genética en plantas para obtener características de interés en la producción agrícola [36]. La eficiencia de la inducción de mutaciones depende de factores como el tipo de mutágeno, el explante vegetal, la duración de la exposición y la concentración utilizada [34].

Los agentes mutagénicos empleados pueden ser clasificados como agentes físicos, agentes químicos y herramientas de edición génica, tal como plantean Bhoi *et al.* [13]. La mutagénesis física emplea, mayoritariamente, radiaciones de carácter ionizante, por ejemplo, los rayos gamma y la radiación de neutrones rápidos [13], [35]. Dichas radiaciones producen gran cantidad de radicales libres que interactúan con el ADN, causando pérdidas de nucleótidos y

deleciones cromosómicas [13]. Asimismo, las radiaciones ionizantes pueden generar cambios en la estructura del ADN debido a la ionización directa o a la ruptura de enlaces [37]. En la mutagénesis química se emplean agentes mutágenos como azida de sodio, etilmetanosulfonato (EMS) y 1-metil-1-nitrosourea (MNU), entre muchos otros [13], [35]. Los mutágenos químicos inducen cambios en el ADN mediante procesos como la clastogénesis, la aneugénesis y el daño oxidativo [38]. Es importante señalar que la inducción de mutaciones mediante estos dos métodos no es posible dirigirla hacia determinado gen o región del material genético [13].

Las técnicas de edición génica utilizando herramientas moleculares tales como las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs), las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs) y las secuencias de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés) asociadas a endonucleasas tipo Cas permiten inducir mutaciones en sitios y genes específicos (Figura 2) [13]. Estas herramientas emplean nucleasas dirigidas para generar cortes en un sitio específico en una o las dos hebras de la molécula de ADN [2], [13]. De acuerdo con Holme *et al.* [39] y Kashtwari *et al.* [34], el empleo de estos sistemas para la inducción de mutaciones resulta ser eficiente y preciso.



**Figura 2.** Representación de nucleasas más comunes usadas para la inducción de mutaciones dirigidas: nucleasas con dedos de zinc (ZNFs), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALENs) y CRISPR-Cas9. Nótese que la doble ruptura (DSB) de la hebra de ADN puede resultar en los mecanismos de reparación mediados por recombinación homóloga o no homóloga. En la primera se requiere de una hebra donadora y el resultado final es una inserción o reemplazo; mientras que, en la segunda el resultado final es mayoritariamente una inserción o una deleción (Elaborado en BioRender.com).

## Aplicaciones de la mutagénesis utilizando cultivo de tejidos

El mejoramiento genético por inducción de mutaciones ha permitido la producción de miles de variedades de cultivos. La mutagénesis inducida ha sido utilizada para producir altos rendimientos, mayor calidad de cosechas, resistencia a plagas y enfermedades y tolerancia al estrés [40]. La inducción de las mutaciones debe apoyarse en estrategias de selección eficientes y rentables, para lo cual el cultivo de tejidos representa un apoyo vital a esta metodología de mejoramiento genético [41]. Esta técnica permite la identificación de las características de interés controlando las condiciones de cultivo, y manteniendo miles de individuos en un espacio reducido, condiciones controladas, independencia de condiciones climáticas que son requeridas y menor inversión de mano de obra; adicionalmente, los terrenos, insumos y mano de obra que se utilizarían en el mejoramiento, pueden liberarse para la producción de alimentos [41]. A continuación, se mencionan algunas aplicaciones de la inducción de mutaciones utilizando protocolos de cultivo de tejidos.

## Producción de cultivos resistentes al estrés biótico

Los factores bióticos tienen influencia sobre el comportamiento de las plantas [13]. Múltiples organismos como insectos, bacterias, nemátodos, hongos y virus pueden impactar negativamente el rendimiento de los cultivos [13], [42], [43]. Mediante la inducción de mutaciones, las proteínas receptoras de moléculas que median la interacción planta-patógeno pueden ser modificadas con el fin de conferir resistencia o tolerancia a estos [44]. En la última década, se han desarrollado múltiples investigaciones para obtener plantas tolerantes o resistentes al estrés biótico, tales como las que se recopilan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Ejemplos de producción de cultivos resistentes al estrés biótico mediante inducción de mutaciones.

Especie	Agente mutagénico utilizado	Tolerancia o resistencia inducida	Fuente
<i>Saccharum officinarum</i>	Radiación gamma	<i>Colletotrichum falcatum</i>	[45]
<i>Citrus x sinensis</i>	Etilmetanosulfonato	<i>Xanthomonas citri</i>	[46]
<i>Solanum melongena</i>	Etilmetanosulfonato	<i>Leucinodes orbonalis</i>	[47]
<i>Citrus x sinensis</i>	CRISPR/Cas	<i>Xanthomonas citri</i>	[48]
<i>Triticum aestivum</i>	CRISPR/Cas	<i>Blumeria graminis</i>	[49]
<i>Oryza sativa</i>	CRISPR/Cas	<i>Xanthomonas oryzae</i>	[50]
<i>Solanum lycopersicum</i>	CRISPR/Cas	<i>Phelipanche aegyptiaca</i> y <i>Orobanche</i> spp.	[51]
<i>Solanum lycopersicum</i>	CRISPR/Cas	<i>Oidium neolycopersici</i>	[52]

## Producción de cultivos resistentes al estrés abiótico

La producción mundial de alimentos ha enfrentado una serie de retos en los últimos años, dentro de los que destacan fenómenos antropogénicos como la contaminación y el cambio climático [33]. Consecuentemente, las lluvias excesivas, las temperaturas extremas, el agotamiento del suelo y de los recursos hídricos y otras situaciones han conducido a una reducción significativa en la producción agrícola [53], [54]. Investigadores como Raina *et al.* [53] y Rai *et al.* [55] señalan que dichos retos pueden enfrentarse mediante la obtención de nuevos alelos gracias al uso de técnicas biotecnológicas de fitomejoramiento como la mutagénesis. Las investigaciones realizadas en diversos cultivos con el objetivo de conferirles tolerancia o resistencia a factores causantes de estrés abiótico en las plantas han permitido generar variedades resistentes a salinidad, herbicidas y sequías (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Ejemplos de producción de cultivos resistentes al estrés abiótico mediante inducción de mutaciones.

Especie	Agente mutagénico utilizado	Tolerancia o resistencia inducida	Fuente
<i>Oryza sativa</i> cv. Nagina 22	Etilmetanosulfonato	Salinidad	[56]
<i>Triticum aestevium</i>	Etilmetanosulfonato	Herbicida	[57]
<i>Triticum aestevium</i>	Etilmetanosulfonato	Salinidad	[58]
<i>Oryza sativa</i>	Radiación gamma	Salinidad y sequía	[25]
<i>Oryza sativa</i>	Radiación gamma	Herbicida	[27]
<i>Saccharum</i> sp.	Radiación gamma	Salinidad	[59]
<i>Saccharum officinarum</i>	Radiación gamma	Salinidad	[60]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CRISPR/Cas9	Sequía	[61]

### Producción de cultivos con mayor rendimiento

Teshome *et al.* [62] señalan que la exposición de las plantas a agentes causantes de estrés biótico o abiótico puede reducir considerablemente el desempeño de estas. Animasaun y Oguntoyey [40] señalan la mutagénesis como una herramienta clave para el desarrollo de variedades con mayores rendimientos productivos. Diversos estudios han empleado diferentes agentes mutagénicos para incrementar dicho parámetro en cereales como *Triticum aestivum* (trigo) y *Oryza sativa* (arroz) [63], [64]. En el Cuadro 3 se detalla información referente a algunas investigaciones realizadas con dicho propósito durante la última década.

**Cuadro 3.** Utilización de mutágenos para incrementar la productividad en cultivos de interés agrícola.

Especie	Agente mutagénico utilizado	Características mejoradas	Fuente
<i>Triticum aestivum</i>	Etilmetanosulfonato	Se obtuvieron 16 líneas con mutaciones en el gen <i>Rht-1</i> , asociado a un incremento significativo en la productividad de la planta.	[63]
<i>Sesamum indicum</i>	Etilmetanosulfonato	El número de semillas incrementó significativamente en las plantas regeneradas a partir de las semillas expuestas a 1% de EMS durante 4 h.	[65]
<i>Saccharum</i> spp.	Radiación gamma	Se obtuvieron 38 líneas mutantes con un incremento significativo en el número de tallos aptos para su procesamiento y en los grados Brix.	[66]
<i>Saccharum officinarum</i>	Radiación gamma	Cuatro líneas presentaron mayor concentración de azúcares (° Brix) a los 10 meses respecto a los cultivares Co86032, CoM0265 y Co740.	[60]
<i>Oryza sativa</i>	CRISPR/Cas	Se obtuvieron 7 líneas mutantes con mayor rendimiento por hectárea respecto al cultivar base, gracias a la edición de los genes <i>Gn1a</i> y <i>DEP1</i> .	[64]

### Producción de mutantes de importancia agrícola en Costa Rica

Durante la segunda mitad del siglo XX, en Costa Rica se obtuvieron cuatro nuevas variedades de plantas de interés agrícola y comercial producto de la inducción de mutaciones, tal como se muestra en la base de datos de variedades mutantes de la FAO y del OIEA [29], [30], [31], [32]. La variedad de frijol (*Phaseolus vulgaris*) NEP-2 fue registrada en 1975 tras su desarrollo

mediante el uso de EMS como agente mutagénico [29]. Una de las principales características de esta variedad de frijol es su resistencia a enfermedades [29]. En 1986, se registró la variedad Uneca-Gama de chícharo (*Vigna unguiculata*), producto de la exposición de semillas a 100 Gy de radiación gamma [31]. Esta nueva variedad se caracterizó por poseer un mayor rendimiento productivo respecto al material parental [31].

Las variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) UNP 9027 y Camago-8 fueron registradas en 1994 y 1996, respectivamente; esta última fue desarrollada por investigadores de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA) de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) [30], [32]. Estas se produjeron mediante la exposición de semillas a rayos gamma, a 200 y 250 Gy, respectivamente [30], [32]. Ambas variedades se caracterizan por su resistencia a *Pyricularia oryzae*, agente causal del tizón del arroz; mientras que, la variedad Camago-8 también presenta resistencia a diferentes virosis [30], [32]. Adicionalmente, en la UNA se han desarrollado mutantes de frijol (*P. vulgaris*) con mayor tamaño de semilla y tolerante a bajas temperaturas; banano (*Musa* spp.) con resistencia parcial a *Mycosphaerella fijiensis*; y, ñame (*Dioscorea alata*) resistente a *Colletotrichum gloeosporioides* [67].

En el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica (UCR) se han desarrollado diversos proyectos para el mejoramiento genético de plantas mediante la inducción de mutaciones [19], [20], [21], [22]. Dentro de estas, destacan la soya (*Glycine max*) y el arroz (*O. sativa*) [19], [20], [21], [22]. En el caso del arroz, se han empleado mutágenos de naturaleza química como el EMS y azida de sodio [19]. Adicionalmente, se han ejecutado proyectos en especies ornamentales como la heliconia (*Heliconia* sp.) y la cala (*Zantedeschia aethiopica*) [19], [20], [21], [22].

La UCR en conjunto con el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) han ejecutado diferentes proyectos relacionados al mejoramiento genético del café (*Coffea arabica*) mediante procesos de mutagénesis química [24], [28]. Bolívar-González *et al.* [24] expusieron suspensiones celulares embriogénicas de dicha planta a diferentes concentraciones de EMS y azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ). Las suspensiones mutagenizadas y las plántulas regeneradas posteriormente a partir de estas fueron cultivadas en medios con diferentes concentraciones de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) [24]. Esto se realizó con el fin de seleccionar plantas de *C. arabica* tolerantes a condiciones de alta salinidad [24].

El interés por el mejoramiento genético del café radica en que es un cultivo con baja diversidad genética y reproducción autógena, por lo que las variedades de interés productivo presentan alta susceptibilidad a factores bióticos y abióticos. Gatica-Arias *et al.* [26] evaluaron el efecto de tres agentes mutagénicos ( $\text{NaN}_3$ , EMS y rayos gamma) en la sobrevivencia de embriones cigóticos de café, permitiendo optimizar los protocolos para la inducción de mutaciones en este material. Por otra parte, Rojas-Chacón *et al.* [28] expusieron semillas de *C. arabica* a 50 mM de azida de sodio por 8 h. Posterior a este tratamiento, dichos autores evaluaron el efecto de este mutágeno sobre diferentes características en las plántulas regeneradas a partir de semillas tratadas.

Adicionalmente, investigadores de la Universidad de Costa Rica han desarrollado proyectos para obtener plantas de frijol resistentes a *Rhizoctonia solani* [23]. En la investigación, se irradiaron ejes embrionarios desde 0 a 100 Gy, y determinaron que la dosis de 20 Gy fue la adecuada para inducir las mutaciones de interés [23]. Posteriormente, realizaron la selección de líneas promisorias utilizando concentraciones crecientes de filtrado de *Rhizoctonia solani* [23].

Múltiples investigaciones lideradas por el ITCR, en colaboración con la UCR, han empleado radiación gamma para el desarrollo de nuevas variedades de arroz (*O. sativa*) [25], [27]. Abdelnour-Esquivel *et al.* [25] expusieron callos embriogénicos de arroz a 80 Gy de radiación

gamma. Este tratamiento se realizó con el fin de obtener plantas tolerantes a condiciones de sequía y salinidad [25]. Producto de dicha investigación, se obtuvieron 60 mutantes tolerantes a condiciones de sequía, 58 líneas tolerantes a condiciones de salinidad y 15 líneas tolerantes a ambas condiciones de forma simultánea [25].

En 2022, Hernández-Soto *et al.* [27] irradiaron semillas de arroz con dosis dentro del rango 50-350 Gy. A partir de semillas irradiadas se indujo la formación de callo embriogénico y posteriormente, la regeneración de plántulas mutantes [27]. Estos mutantes fueron cultivados en concentraciones crecientes de fluazifop-*p*-butil, donde se identificaron 31 líneas mutantes con tolerancia putativa a dicha molécula herbicida [27].

Los proyectos para la producción de mutantes de interés agrícola en Costa Rica en el ITCR han sido desarrollados principalmente por el Laboratorio de Crioconservación del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), el Laboratorio de Radiación Gamma del Centro de Investigación y Extensión en Materiales del TEC (CIEMTEC) y el Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo (CIDASTH). Estos proyectos han sido financiados gracias a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR (VIE), convocatorias realizadas por el Consejo Nacional de Rectores (CONARE), la Sociedad Alemana de Investigación (DFG, por sus siglas en alemán) y el sector productivo representado por organizaciones de productores de caña de azúcar a través de la Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA) y productores arroceros, así como colaboraciones con colegas de la UCR y UNA (Cuadro 4).

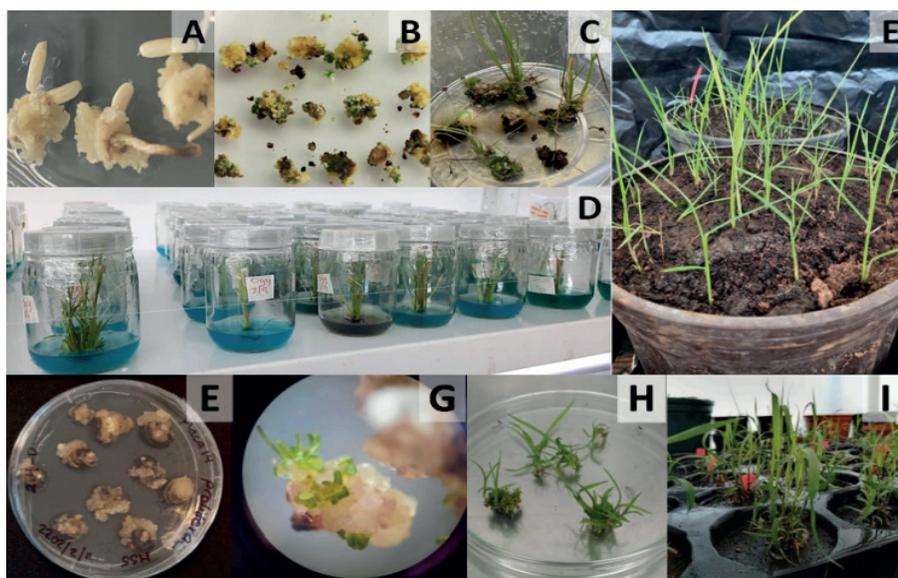
**Cuadro 4.** Hoja de ruta de proyectos de investigación relacionados con la producción de mutantes en cultivos de interés agrícola del Laboratorio de Crioconservación del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Línea de investigación: Producción de líneas mutantes de plantas de interés agrícola para contribuir con el desarrollo del sector agroproductivo en zonas rurales.			
Objetivo a largo plazo: Desarrollar nuevas variedades vegetales mejoradas por su adaptación a condiciones de cambio climático y mayor productividad.			
Fase	Financiamiento	Período	Proyecto de investigación
I (3 años)	FEES-CONARE y ITCR-VIE	2016-2018	Generación de variabilidad genética en el arroz: una alternativa para enfrentar el cambio climático y favorecer la seguridad alimentaria en Costa Rica.
II (3 años)	ITCR-VIE y productores de arroz	2020-2022	Producción de mutantes de arroz ( <i>Oryza sativa</i> ) tolerantes a herbicidas utilizando rayos gamma para contribuir con el manejo sostenible del cultivo.
III (3 años)	ITCR-VIE y LAICA	2022-2025	Desarrollo de líneas de caña de azúcar ( <i>Saccharum officinarum</i> ) producidas por mutagénesis radioinducida para una agricultura más resiliente y productiva.
IV (3 años)	ITCR-VIE, CONARE y DFG	2024-2026	New Plant Breeding Technologies (NPBTs) strengthening research capacities between Costa Rica and Germany using rice as a model.
			Producción de líneas mutantes de arroz tolerantes a suelos ácidos para contribuir con la productividad agrícola nacional.
V (3 años)	Por solicitar	2025-2027	Inducción de variabilidad genética en caña de azúcar para la obtención de cultivos resilientes a sequía y el favorecimiento de la productividad en zonas marginales dependientes de las lluvias.
VI (3 años)	Por solicitar	2027-2029	Evaluación de la metodología DUS (Distinción, Uniformidad y Estabilidad) en mutantes resistentes a acidez y herbicidas.

Actualmente, en el CIB se continúa con el desarrollo de proyectos de mejoramiento genético vía mutagénesis radioinducida en plantas de la familia *Poaceae*. Tanto en arroz (*O. sativa*), como en caña de azúcar (*Saccharum* sp.), se trabaja en la obtención de líneas mutantes tolerantes a las altas concentraciones de aluminio ( $Al^{3+}$ ) en suelos ácidos (Cuadro 4). Además, en caña de azúcar (*Saccharum* sp.) se desea obtener nuevas variedades cuya tasa de floración sea inferior a la del material parental, o bien, nula, característica con la que se busca aumentar el rendimiento productivo.

Adicionalmente, en el CIB se ha realizado edición genómica como parte del proyecto del Espacio de Estudios Avanzados de la Universidad de Costa Rica (UCREA; Proyecto 801-B7-294) para la edición del genoma de arroz y del proyecto “New Plant Breeding Technologies (NPBTs) strengthening research capacities between Costa Rica and Germany using rice as a model” financiado por CONARE y la DFG de Alemania (Cuadro 4) [68], [69], [70], [71]. Adicionalmente, también se ha realizado producción científica relacionada con la edición de genomas en levaduras [71], arroz [72], [73], [74] y café [75]; tesis de posgrado [76], [77]; y, en colaboración con el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), tres cursos prácticos sobre edición génica (2021, 2022 y 2024). Por otra parte, también se han realizado trabajos sobre la percepción de la población costarricense respecto a dichas tecnologías [68], [69].

Las metodologías desarrolladas en el CIB han permitido la producción de plantas a partir de tejidos irradiados. Estas plantas han sido seleccionadas utilizando la técnica de cultivo de tejidos por la simplicidad con la que se puede modificar las condiciones *in vitro*. Además, en un espacio reducido se pueden evaluar miles de mutantes de forma simultánea, lo que reduce el tiempo y costo en los programas de mejora. De esta forma, es posible obtener una segunda generación de plantas mutantes (M2) en invernadero a partir de una primera generación mutante con dos ciclos de multiplicación (M1V2) seleccionada en condiciones *in vitro* en menos de un año (Figura 3).



**Figura 3.** Etapas para la inducción de mutaciones en arroz (*O. sativa*) y caña de azúcar (*Saccharum* sp.) utilizando cultivo de tejidos e irradiación gamma en el Laboratorio de Criopreservación del Centro de Investigación en Biotecnología del ITCR: Inducción de callos embriogénicos de arroz a partir de semilla (A), callos embriogénicos de arroz irradiados a 60 Gy (B), plantas de arroz regeneradas a partir de callos embriogénicos irradiados (C), población M1V2 de arroz (D), plantas de arroz de la población M2 desarrollándose en invernadero (E), inducción de callo embriogénico de caña de azúcar (F), callos embriogénicos de caña de azúcar irradiados tras 1 semana en medio de regeneración (G), plántulas mutantes de caña de azúcar regeneradas a partir de callos embriogénicos irradiados tras 4 semanas en medio de regeneración (H) y plantas de caña de azúcar tras 4 semanas de cultivo en condiciones de invernadero (I).

En el cultivo de arroz son requeridas aproximadamente 2 semanas en la etapa de inducción de callo embriogénico (Figura 3A), 4 semanas evaluando la regeneración de los callos después de la irradiación (Figura 3B), 8 semanas obteniendo plantas a partir de callos irradiados (Figura 3C), 2 a 3 semanas estableciendo la primera generación mutante (M1) *in vitro* (Figura 3D) y entre 5 a 6 meses obteniendo la población de semilla M2 a partir de plantas M1 aclimatadas en invernadero y 2 a 3 semanas adicionales obteniendo plántulas M2 a partir de semilla (Figura 3E).

Por su parte, en caña de azúcar se requieren, aproximadamente, 10 semanas para la obtención de callo embriogénico (Figura 3F), 4 semanas para obtener plantas a partir de los tejidos embriogénicos irradiados (Figuras 3G y 3H) y posteriormente, cada línea mutante es micropropagada cada 6 semanas. Asimismo, transcurrido dicho período, las vitroplantas pueden ser cultivadas en condiciones de invernadero (Figura 3I).

## Conclusiones

Gracias a la emergencia de diferentes tecnologías (radiaciones ionizantes, herramientas de edición génica y otras) ha sido posible modificar artificialmente el material genético de plantas de gran relevancia agrícola. Este aumento en la variabilidad genética de plantas de gran relevancia agrícola mediante la inducción artificial de mutaciones (mutagénesis) ha permitido desarrollar materiales vegetales aptos para su cultivo ante condiciones agrícolas marginales, y a su vez, garantizando un rendimiento productivo óptimo. En Costa Rica, el avance de las investigaciones en producción de mutantes de interés agrícola ha permitido el desarrollo de protocolos y metodologías afinadas, la adquisición de equipo e infraestructura, la producción de conocimiento, la formación de capital humano, la generación de líneas mutantes que actualmente se encuentran en evaluación, y diferentes publicaciones científicas. Por otra parte, estas estrategias benefician a los productores agrícolas del país, contribuyendo a que su actividad económica siga siendo rentable, y a que Costa Rica, como país, pueda acercarse cada vez más al ansiado autoabastecimiento y mejorar la seguridad alimentaria en la población nacional.

## Agradecimientos

Este artículo es posible gracias a los proyectos “Producción de líneas mutantes de arroz tolerantes a suelos ácidos para contribuir con la productividad agrícola nacional” (CF 1510194), adscrito a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR); y “New Plant Breeding Technologies (NPBTs) strengthening research capacities between Costa Rica and Germany using rice as model” (111-C3-655), adscrito a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), al Consejo Nacional de Rectores (CONARE), y a la Sociedad Alemana de Investigación (DFG, por sus siglas en alemán).

## Referencias

- [1] N. Hasan, S. Choudhary, N. Naaz, N. Sharma, R. A. Laskar, “Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes”, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 19, no. 1, pp. 1-26, 2021. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00231-1>
- [2] V. E. Viana, C. Pegoraro, C. Busanello, A. C. De Oliveira, “Mutagenesis in rice: The basis for breeding a new super plant”, *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, no. 1326, pp. 1-28, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01326>
- [3] Y. Oladosu *et al.*, “Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: A review”, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 30, no. 1, pp. 1-16, 2016. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1087333>



- [4] A. Berry, J. Browne, "Mendel and Darwin", *PNAS*, vol. 119, no. 30, pp. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122144119>
- [5] J. J. García Villarroel, "Impacto de las mutaciones en la salud humana: Una revisión actualizada", *Revista Orbis Tertius UPAL*, vol. 7, no. 14, pp. 127-152, 2023. <https://doi.org/10.59748/ot.v7i14.140>
- [6] W. Ma, Y. Zhan, Y. Zhang, C. Mao, X. Xie, Y. Lin, "The biological applications of DNA nanomaterials: Current challenges and future directions", *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 6, no. 351, pp. 1-28, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00727-9>
- [7] J. Vijg, "From DNA damage to mutations: All roads lead to aging", *Ageing Research Reviews*, vol. 68, no. 101316, pp. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101316>
- [8] A. Carusillo, C. Mussolino, "DNA damage: From threat to treatment", *Cells*, vol. 9, no. 7, pp. 1-20, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9071665>
- [9] A. Livnat, A. C. Love, "Mutation and evolution: Conceptual possibilities", *BioEssays*, vol. 46, no. 2, pp. 1-12, 2024. <https://doi.org/10.1002/bies.202300025>
- [10] S. Ahmar *et al.*, "Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: Recent advances and future outlook", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 7, pp. 1-24, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21072590>
- [11] J. Chaudhary *et al.*, "Mutation breeding in tomato: Advances, applicability and challenges", *Plants*, vol. 5, no. 8, pp. 1-17, 2019. <https://doi.org/10.3390/plants8050128>
- [12] M. de la L. Riviello-Flores *et al.*, "Use of gamma radiation for the genetic improvement of underutilized plant varieties", *Plants*, vol. 11, no. 9, pp. 1-19, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11091161>
- [13] A. Bhoi, B. Yadu, J. Chandra, S. Keshavkant, "Mutagenesis: A coherent technique to develop biotic stress resistant plants", *Plant Stress*, vol. 3, no. 100053, pp. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100053>
- [14] F. Li, A. Shimizu, T. Nishio, N. Tsutsumi, H. Kato, "Comparison and characterization of mutations induced by gamma-ray and carbon-ion radiation in rice (*Oryza sativa* L.) using whole genome resequencing", *G3 Genes|Genomes|Genetics*, vol. 9, no. 11, pp. 3743-3751, 2019. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400555>
- [15] G. Yang *et al.*, "Genome-wide comparisons of mutations induced by carbon-ion beam and gamma-rays irradiation in rice via resequencing multiple mutants", *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, no. 1514, pp. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01514>
- [16] R. M. Shelake, D. Pramanik, J. -Y. Kim, "Evolution of plant mutagenesis tools: A shifting paradigm from random to targeted genome editing", *Plant Biotechnology*, vol. 13, pp. 423-445, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00562-z>
- [17] Q. M. M. Hossen *et al.*, "Development of early flowering, short life-spanned jute (*Corchorus* spp.) mutant via ethyl methane sulfonate mutagenesis", *Journal of Crop Science and Biotechnology*, vol. 25, pp. 489-500, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12892-022-00146-4>
- [18] A. C. Udage, "Introduction to plant mutation breeding: Different approaches and mutagenic agents", *The Journal of Agricultural Sciences - Sri Lanka*, vol. 16, no. 3, pp. 466-483, 2021. <https://doi.org/10.4038/jas.v16i03.9472>
- [19] Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, "Informe de Labores 2014-2015", Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, 2015. <https://cigras.ucr.ac.cr/documentos/category/21-informe-2014-2015>
- [20] Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, "Informe de Labores 2016", Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, 2016. <https://cigras.ucr.ac.cr/documentos/category/22-informe-2016>
- [21] Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, "Informe de Labores 2017", Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, 2017. <https://cigras.ucr.ac.cr/documentos/category/23-informe-2017>
- [22] Centro para Investigaciones en Granos y Semillas, "Informe de Labores 2018", Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, 2018. <https://cigras.ucr.ac.cr/documentos/category/24-informe-2018>
- [23] L. Y. Solís-Ramos *et al.*, "Effect of gamma irradiation and selection with fungus filtrate (*Rhizoctonia solani* Kuhn) on the *in vitro* culture of common bean (*Phaseolus vulgaris*)", *American Journal of Plant Sciences*, vol. 6, no. 16, pp. 2672-2685, 2015. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.616269>
- [24] A. Bolívar-González, M. Valdez-Melara, A. Gatica-Arias, "Responses of Arabica coffee (*Coffea arabica* L. var. Catuai) cell suspensions to chemically induced mutagenesis and salinity stress under *in vitro* culture conditions", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 54, pp. 576-589, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9918-x>

- [25] A. Abdelnour-Esquivel, J. Pérez, M. Rojas, W. Vargas, A. Gatica-Arias, "Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 56, pp. 88-97, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10015-5>
- [26] A. Gatica-Arias, J. Rodríguez-Matamoros, A. Abdelnour-Esquivel, M. Valdez-Melara, "Determination of the optimal conditions for mutagenesis induction in a commercial Arabica coffee variety" en *Mutation Breeding, Genetic Diversity and Crop Adaptation to Climate Change*, S. Sivasankar, N. Ellis, L. Jankuloski, I. Ingelbrecht, Eds. Wallingford, CABI, 2021, pp. 213-233. <https://doi.org/10.1079/9781789249095.0034>
- [27] A. Hernández-Soto *et al.*, "Tolerance to aryloxy-phenoxy-propionate (APP) as a model for Lazarroz FL rice in vitro gamma irradiation variability selection", *bioRxiv*, pp. 1-12, 2022. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1950230/v2>
- [28] J. A. Rojas-Chacón, F. Echeverría-Beirute, B. J. Till, A. Gatica-Arias, "Enhancing coffee diversity: Insights into the impact of sodium azide mutagenesis on quantitative and qualitative traits in *Coffea arabica* L.", *Scientia Horticulturae*, vol. 330, no. 113043, pp. 1-9, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113043>
- [29] International Atomic Energy Agency, "Mutant Variety Search - NEP-2", 2022. [Online]. Disponible en: <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Search.aspx?MVID=1550> [Consultado: 28-abr-2024]
- [30] International Atomic Energy Agency, "Mutant Variety Search - UNP 9027", 2022. [Online]. Disponible en: <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Search.aspx?MVID=905> [Consultado: 28-abr-2024]
- [31] International Atomic Energy Agency, "Mutant Variety Search - Uneca-Gama", 2022. [Online]. Disponible en: <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Search.aspx?MVID=1549> [Consultado: 28-abr-2024]
- [32] International Atomic Energy Agency, "Mutant Variety Search - Camago-8", 2022. [Online]. Disponible en: <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Search.aspx?MVID=904> [Consultado: 28-abr-2024]
- [33] L. Ma, F. Kong, K. Sun, T. Wang, T. Guo, "From classical radiation to modern radiation: Past, present, and future of radiation mutation breeding", *Frontiers in Public Health*, vol. 9, no. 768071, pp. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.768071>
- [34] M. Kashtwari *et al.*, "Random mutagenesis in vegetatively propagated crops: Opportunities, challenges and genome editing prospects", *Molecular Biology Reports*, vol. 49, pp. 5729-5749, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06650-0>
- [35] H. Singh, A. Khar, P. Verma, "Induced mutagenesis for genetic improvement of *Allium* genetic resources: A comprehensive review", *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 68, pp. 2669-2690, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01210-8>
- [36] C. Jung, B. Till, "Mutagenesis and genome editing in crop improvement: Perspectives for the global regulatory landscape", *Trends in Plant Science*, vol. 26, no. 12, pp. 1258-1269, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.08.002>
- [37] K. A. Omar, K. Hasnaoui, A. de la Lande, "First-principles simulations of biological molecules subjected to ionizing radiation", *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 72, pp. 445-465, 2021. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-101419-013639>
- [38] B. B. Gollapudi, A. L. Williams, J. S. Bus, "A review of the genotoxicity of the industrial chemical cume-ne", *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, vol. 787, no. 108364, pp. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108364>
- [39] I. B. Holme, P. L. Gregersen, H. Brinch-Pedersen, "Induced genetic variation in crop plants by random or targeted mutagenesis: Convergence and differences", *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, no. 1468, pp. 1-9, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01468>
- [40] D. A. Animasaun, E. O. Oguntoye, "Mutagenesis in crop improvement: Methods and applications", *Journal of Crop Improvement*, vol. 38, no. 3, pp. 1-23, 2024. <https://doi.org/10.1080/15427528.2024.2336257>
- [41] J. Pérez, A. Hernández-Soto, A. Abdelnour-Esquivel, W. Vargas-Segura, W. Watson-Guido, A. Gatica-Arias, "In vitro gamma mutagenesis techniques in rice (*Oryza sativa* L. var. Lazarroz FL)" en *Plant Functional Genomics: Methods and Protocols*, vol. 2, F. Maghuly, Ed. Nueva York: Humana Press, 2024, pp. 243-255. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3782-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3782-1_14)
- [42] M. Ahmad, Q. Ali, M. M. Hafeez, A. Malik, "Improvement for biotic and abiotic stress tolerance in crop plants", *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, vol. 2021, no. 1, pp. 1-9, 2021. <https://doi.org/10.54112/bcsrj.v2021i1.50>
- [43] A. Hernández-Soto, F. Echeverría-Beirute, A. Abdelnour-Esquivel, M. Valdez-Melara, J. Boch, A. Gatica-Arias, "Rice breeding in the new era: Comparison of useful agronomic traits," *Current Plant Biology*, vol. 27, no. 100211, pp. 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100211>



- [44] S. Tyagi *et al.*, "Genome editing for resistance to insect pests: An emerging tool for crop improvement", *ACS Omega*, vol. 5, no. 33, pp. 20674-20683, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01435>
- [45] M. Kaur, K. S. Thind, G. S. Sanghera, R. Kumar, L. Kashyap, "Gamma rays induced variability for economic traits, quality and red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* spp.), *International Journal of Science, Environment and Technology*, vol. 5, no. 2, pp. 355-365, 2016. <https://www.ijset.net/journal/868.pdf>
- [46] H. Ge *et al.*, "Production of sweet orange somaclones tolerant to citrus canker disease by *in vitro* mutagenesis with EMS", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 123, pp. 29-38, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0810-7>
- [47] M. A. Islam, M. M. B. M. Uddin, M. G. Rasul, M. A. H. Swapon, M. Ahmed, M. Hasan, "*In vitro* screening and field performance of EMS-treated eggplants for the selection of shoot and fruit borer-resistant plants", *Agronomy*, vol. 12, no. 8, pp. 1-14, 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081832>
- [48] A. Peng *et al.*, "Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus", *Plant Biotechnology Journal*, vol. 15, no. 12, pp. 1509-1519, 2017. <https://doi.org/10.1111/pbi.12733>
- [49] Y. Zhang *et al.*, "Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat", *The Plant Journal*, vol. 91, no. 4, pp. 714-724, 2017. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>
- [50] R. Oliva *et al.*, "Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing", *Nature Biotechnology*, vol. 37, pp. 1344-1350, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0267-z>
- [51] V. K. Bari *et al.*, "CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 in tomato provides resistance against the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*", *Scientific Reports*, vol. 9, no. 11438, pp. 1-12, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47893-z>
- [52] V. Nekrasov, C. Wang, J. Win, C. Lanz, D. Weigel, S. Kamoun, "Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion", *Scientific Reports*, vol. 7, no. 482, pp. 1-6, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00578-x>
- [53] A. Raina, S. Khan, P. K. Sahu, R. Sao, "Increasing rice grain yield under abiotic stresses: Mutagenesis, genomics and transgenic approaches" en *Rice Research for Quality Improvement: Genomics and Genetic Engineering*, vol. 1, A. Roychoudhury, Ed. Singapur: Springer, 2020, pp. 753-777. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4120-9\\_31](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4120-9_31)
- [54] O. Arriagada, F. Cacciuttolo, R. A. Cabeza, B. Carrasco, A. R. Schwember, "A comprehensive review on chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding for abiotic stress tolerance and climate change resilience", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 12, pp. 1-24, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23126794>
- [55] A. Rai, S. Bhujbal, S. J. Jambhulkar, "Development of abiotic stress-tolerant mustard genotype through induced mutagenesis" en *Global Climate Change*, S. Singh, P. Singh, S. Rangabhashiyam, K. K. Srivastava, Eds. Amsterdam: Elsevier, 2021, pp. 213-233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822928-6.00004-6>
- [56] A. Shankar, O. Choudhary, K. Singh, "Effect of EMS induced mutation in rice cultivar Nagina 22 on salinity tolerance", *bioRxiv*, pp. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.08.03.455004>
- [57] Z. Chen *et al.*, "Generation of a series of mutant lines resistant to imidazolinone by screening an EMS-based mutant library in common wheat", *The Crop Journal*, vol. 9, no. 5, pp. 1030-1038, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.11.001>
- [58] J. Lethin *et al.*, "Development and characterization of an EMS-mutagenized wheat population and identification of salt-tolerant wheat lines", *BMC Plant Biology*, vol. 20, no. 1, pp. 1-15, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2137-8>
- [59] M. V. Purankar, A. A. Nikam, R. M. Devarumath, S. Penna, "Radiation induced mutagenesis, physio-biochemical profiling and field evaluation of mutants in sugarcane cv. CoM 0265", *International Journal of Radiation Biology*, vol. 98, no. 7, pp. 1261-1276, 2022. <https://doi.org/10.1080/09553002.2022.2024291>
- [60] A. A. Nikam, R. M. Devarumath, A. Ahuja, H. Babu, M. G. Shitole, S. Penna, "Radiation-induced *in vitro* mutagenesis system for salt tolerance and other agronomic characters in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)", *The Crop Journal*, vol. 3, no. 1, pp. 46-56, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2014.09.002>
- [61] G. -J., Baeg, S. -H. Kim, D. -M. Choi, S. Tripathi, Y. -J. Han, J. -I. Kim, "CRISPR/Cas9-mediated mutation of 5-oxoprolinase gene confers resistance to sulfonamide compounds in *Arabidopsis*", *Plant Biotechnology Reports*, vol. 15, pp. 753-764, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00718-w>
- [62] D. T. Teshome, G. E. Zharare, S. Naidoo, "The threat of the combined effect of biotic and abiotic stress factors in forestry under a changing climate", *Frontiers in Plant Science*, vol. 11, no. 601009, pp. 1-19, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601009>

- [63] E. M. Jobson *et al.*, "Identification and molecular characterization of novel *Rht-1* alleles in hard red spring wheat", *Crop Science*, vol. 61, no. 2, pp. 1030-1037, 2021. <https://doi.org/10.1002/csc2.20375>
- [64] L. Huang *et al.*, "Developing superior alleles of yield genes in rice by artificial mutagenesis using the CRISPR/Cas9 system", *The Crop Journal*, vol. 6, no. 5, pp. 475-481, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.05.005>
- [65] A. Saha, "EMS induced polygenic mutation in tilottama cultivar of *Sesamum indicum*", *Plant Archives*, vol. 19, no. 1, pp. 630-632, 2019. [https://www.plantarchives.org/PDF%2019-1/630-632%20\(4657\).pdf](https://www.plantarchives.org/PDF%2019-1/630-632%20(4657).pdf)
- [66] S. K. Sandhu, R. Singh, S. Penna, "Radiation-induced mutants with increased cane number in sugarcane variety CoJ 85", *Journal of Crop Improvement*, vol. 33, no. 2, pp. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1080/15427528.2018.1554546>
- [67] J. F. Argüello Delgado *et al.*, "Costa Rica: Aumento de la variabilidad genética en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)" en *Inducción de mutaciones: Estado del conocimiento en el mejoramiento de plantas en América Latina y el Caribe*, S. de los Santos Villalobos, Ed. Ciudad de México, Editorial FONTARAMA, 2021, pp. 45-66. ISBN: 978-607-736-684-3.
- [68] A. Gatica-Arias, "The regulatory current status of plant breeding technologies in some Latin American and the Caribbean countries," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 141, no. 2, pp. 229-242, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01799-1>
- [69] D. M. Macall, J. Madrigal-Pana, S. J. Smyth, A. Gatica-Arias, "Costa Rican consumer perceptions of gene-editing," *Heliyon*, vol. 9, no. 8, pp. 1-11, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19173>
- [70] A. Gatica-Arias, M. Valdez-Melara, G. Arrieta-Espinoza, F. J. Albertazzi-Castro, and J. Madrigal-Pana, "Consumer attitudes toward food crops developed by CRISPR/Cas9 in Costa Rica," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 139, no. 2, pp. 417-427, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01647-x>
- [71] A. Hernández-Soto, J. P. Delgado-Navarro, M. Benavides-Acevedo, S. A. Paniagua, A. Gatica-Arias, "*NTH2 1271\_1272delTA* gene disruption results in salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*", *Fermentation*, vol. 8, no. 4, pp. 1-14, 2022. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040166>
- [72] F. M. Romero, A. Gatica-Arias, "CRISPR/Cas9: Development and application in rice breeding," *Rice Science*, vol. 26, no. 5, pp. 265-281, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.08.001>
- [73] R. Rojas-Vásquez, A. Gatica-Arias, "Use of genome editing technologies for genetic improvement of crops of tropical origin," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 140, no. 1, pp. 215-244, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01707-2>
- [74] C. Aguilar-Bartels, P. Quirós-Segura, A. García-Piñeres, A. Gatica-Arias, G. Arrieta-Espinoza, "Key aspects for the genetic transformation of rice (*Oryza sativa* L.) subspecies indica by *Agrobacterium tumefaciens*", *Agronomía Mesoamericana*, vol. 32, no. 3, pp. 764-778, 2021. <https://doi.org/10.15517/am.v32i3.44978>
- [75] J. Villalta-Villalobos, A. Gatica-Arias, "A look back in time: Genetic improvement of coffee through the application of biotechnology," *Agronomía Mesoamericana*, vol. 30, no. 2, pp. 577-599, 2019. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i2.34173>
- [76] R. Rojas Vásquez, "Edición del gen de la enzima trehalasa mediante CRISPR-Cas9 en arroz subsp. indica var. CR-5272," Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, 2022. [En línea]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10669/87766>
- [77] A. Sebiani-Calvo, "Desarrollo de un sistema de edición genética CRISPR/CAS9 in planta en embriones maduros de arroz (*Oryza sativa* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*," Tesis de maestría, Universidad de Costa Rica, 2023. [En línea]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10669/90585>