

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Básicas
Escuela de Biología

Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis
en Biología Molecular y Biotecnología

**“Estudio de la adaptabilidad de híbridos resistentes o susceptibles
a imidazolinonas producidos entre el arroz maleza y la
variedad comercial de arroz CFX-18”**

Adriana Orozco Portuguez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
2015

Miembros del Tribunal

M.Sc. Griselda Arrieta Espinoza
Directora de tesis

Ph. D. Bernal Valverde Mora
Lector de tesis

Ph. D. Gerardo Ávalos Rodríguez
Lector de tesis

Dra. Laura Solís Ramos
Miembro del Tribunal

Ph. D. Javier Trejos Zelaya
Presidente del Tribunal

Adriana Orozco Portuguez
Postulante

A mi familia

Agradecimientos

A mi comité de tesis, Griselda Arrieta, Bernal Valverde y Gerardo Ávalos, por su paciencia, colaboración y disposición, además de sus enseñanzas académicas y personales.

A mis padres, hermanos y familiares, por su paciencia y amor incondicional. Mención especial para mi madre, Roy, Ricardo y tía Carmen, por su amable colaboración en situaciones de apremio.

A mis compañeros de Licenciatura y del proyecto de tesis, Elena Vázquez y Eddier Villalobos, un verdadero apoyo en todo el proceso. Gracias por su valiosa amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Cindy Aguilar, Marcela Turcios, Genuar Núñez y Sofía Carvajal, por toda la camaradería y colaboración brindada.

A Federico Albertazzi, Catalina Murillo, Walter Hernández y Eduardo Hernández, por su importante asesoría que llevó a buen término este proyecto.

Al personal del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular y a IDEA Tropical, por toda su colaboración durante mi permanencia en sus instalaciones. Un agradecimiento especial a Heidy Villalobos y a Isaac Rayo, por su amable cooperación.

A Roy Ovarés, Natalia Valverde, Adriana Rebolledo, Emilia Triana, Karla Trejos, Daniela Rojas, Ruth Delgado, Patricia Espinoza, Sofía Bernal, Paola Muñoz, Rosa Quesada, Marianela Masis, Jairo Moya, María Fernanda Miranda, Mario Ulate y Rafa Hernández, por su cariño y amistad en todo momento, y por ser un auténtico comité de apoyo.

¡Gracias por todo!

Índice General

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
3. Justificación	8
4. Hipótesis de trabajo	9
5. Objetivos.....	10
5.1. Objetivo General	10
5.2. Objetivo específico	10
6. Materiales y Métodos	10
6.1. Obtención de las semillas a utilizar en el ensayo de competencia	11
6.2. Establecimiento del experimento de competencia	12
6.3. Evaluación de las plantas en competencia	14
6.4. Confirmación del genotipo del gen <i>ALS</i> mediante técnicas moleculares	15
6.4.1. Extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) genómico total	15
6.4.2. Identificación genotípica del gen <i>ALS</i> mediante PCR alelo-específico	15
6.5. Análisis de datos	17
7. Resultados	19
7.1. Confirmación de la naturaleza híbrida de las plantas utilizadas en el experimento de competencia	19
7.2. Caracterización morfológica de los híbridos en condiciones de competencia	21
7.2.1. Altura de las plantas	22
7.2.2. Culmos	26
7.2.3. Biomasa vegetativa.....	31
7.2.4. Número de espigas	34
7.2.5. Semillas llenas	36

8. Discusión.....	39
8.1. Altura de las plantas	40
8.2. Culmos	41
8.3. Biomasa vegetativa.....	43
8.4. Número de espigas	44
8.5. Número de semillas	45
9. Conclusiones	45
10. Recomendaciones	47
11. Literatura Citada	47
12. Anexos	55

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución espacial de las plantas en competencia en cada tratamiento.....	13
Figura 2. Detección del alelo mutante (S653D) del gen <i>als</i> que confiere resistencia a las imidazolinonas en plantas de arroz, mediante corrida en electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con los primers ALSR3/ALSResF. Gel de agarosa 1,5%, TAE 1X. Muestras: Línea 1: Arroz CFX-18 (Control positivo), línea 2: planta resistente #1 (RR1), línea 3: planta resistente #2 (RR2), línea 4: planta susceptible (SS), línea 5: control negativo agua (C-), línea 6: marcador molecular 100pb	20
Figura 3. Detección del alelo silvestre del gen <i>ALS</i> que confiere susceptibilidad a las imidazolinonas en plantas de arroz, mediante corrida en electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con los primers ALSR3/ALS653SusF. Gel de agarosa 1,5%, TAE 1X. Muestras. Línea 1: Marcador molecular (MM) 100pb, línea 2: Arroz maleza AR997 (AR), control positivo, línea 3: biotipo susceptible #1 (SS1), línea 4: biotipo susceptible #2 (SS2), línea 5: biotipo susceptible #3 (SS3), línea #6: CFX-18, línea 7: control negativo, agua (C-)	21
Figura 4. Altura promedio (cm) del biotipo resistente y susceptible a las imidazolinonas según la edad de las plantas (en días después de la siembra, DDS) en condiciones de monocultivo. Las barras de error indican la desviación estándar correspondiente a cada tratamiento.....	22

Figura 5. Rendimiento relativo (RY) y total (RYT) de la altura en plantas de arroz maleza resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas a través de su periodo de crecimiento, según sus proporciones de siembra. Los valores esperados se representan con líneas negras..... 24

Figura 6. Número promedio de culmos del biotipo resistente y susceptible a las imidazolinonas según la edad de las plantas (en días después de la siembra, DDS), en condiciones de monocultivo. Las barras de error indican la desviación estándar correspondiente a cada tratamiento..... 27

Figura 7. Rendimiento relativo (RY) y total (RYT) de culmos en plantas de arroz maleza resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas a través de su período de crecimiento, según sus proporciones de siembra. Los valores esperados se representan con líneas negras..... 29

Figura 8. Variación de la biomasa vegetativa producida por plantas de arroz resistente (R) y susceptible (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, según sus proporciones de siembra. Las barras de error indican la desviación estándar correspondiente a cada tratamiento..... 32

Figura 9. Rendimiento relativo (RY) y total (RYT) de la biomasa vegetativa producida por plantas resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, según sus proporciones de siembra. Los valores esperados se representan con líneas negras..... 33

Figura 10. Variación del número promedio de espigas producida por plantas de arroz resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, sembradas en diversas proporciones de competencia. Las barras de error indican la desviación estándar correspondiente a cada tratamiento..... 34

Figura 11. Rendimiento relativo (RY) y total (RYT) en el número de espigas en plantas de biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, según sus proporciones de siembra. Los valores esperados se representan con líneas negras..... 35

Figura 12. Variación del número de semillas totales, llenas y vanas promedio correspondiente a plantas de arroz resistente (R) y susceptible (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, en diversas proporciones de siembra..... 37

Figura 13. Rendimiento relativo (RY) y total (RYT) del número de semillas llenas en plantas de arroz que alcanzaron la madurez, para diferentes proporciones de siembra de biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas. Los valores esperados se representan con líneas negras..... 38

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Proporciones de siembra del biotipo resistente y del biotipo susceptible a las imidazolinonas, por tratamiento. Cada tratamiento estuvo conformado por diez plantas.....	14
Cuadro 2. Imprimadores diseñados para la amplificación parcial del gen <i>ALS</i> en la variedad de arroz CFX-18, que detectan el alelo mutado y el alelo silvestre (Kadaru <i>et al.</i> 2008)....	16
Cuadro 3. Amplificación esperada en las pruebas de PCR alelo-específico realizados a las plantas en competencia, para verificar su genotipo.....	17
Cuadro 4. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionado a la altura promedio, en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas en diferentes proporciones de siembra a través del tiempo.....	25
Cuadro 5. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionado al número promedio de culmos, en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas en diferentes proporciones de siembra a través del tiempo	30
Cuadro 6. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionada a la biomasa vegetativa, en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, en diferentes proporciones de siembra.....	33

Cuadro 7. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionada al número promedio de espigas en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, en diferentes proporciones de siembra..... 36

Cuadro 8. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionada al número de semilla llena en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, en diferentes proporciones de siembra..... 39

Índice de Anexos

Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN genómico total de Lodhi y colaboradores (1994) modificado para arroz	55
---	----

Resumen

El arroz maleza se define como un grupo heterogéneo de plantas del género *Oryza*, que compiten directamente por recursos nutricionales y energéticos con las variedades de arroz comercial, y tienen un impacto negativo en el rendimiento del cultivo. Se han desarrollado variedades de arroz resistentes a imidazolinonas como método de control para las arvenses, tal es el caso del arroz cultivo Clearfield®, obtenido mediante mutaciones inducidas. Esta tecnología consiste en la aplicación de herbicidas que no sean tóxicos para la variedad, pero sí para todas aquellas plantas que no tengan la mutación que otorga la resistencia. Sin embargo, se ha reportado la hibridación entre el arroz maleza y las variedades resistentes a imidazolinonas, lo que ha producido un aumento en la tolerancia al herbicida por parte de las formas arvenses, lo que dificulta su selección y eliminación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio se enfocó en el estudio de la competitividad entre biotipos híbridos entre el arroz maleza y el arroz cultivado Clearfield® variedad CFX-18, que portan el rasgo de resistencia o susceptibilidad a las imidazolinonas en condiciones de invernadero. Se sembraron plantas de arroz maleza tanto resistentes como susceptibles a las imidazolinonas, que provenían de una misma planta híbrida de arroz maleza y la variedad comercial CFX-18, la cual fue recolectada en el campo. Las plantas utilizadas en los análisis de competencia fueron sometidas a estudios moleculares mediante PCR alelo específico para verificar el genotipo del gen Acetolactato Sintasa (*ALS*). Se utilizó un modelo de series de reemplazo con seis tratamientos, cada uno con diez plantas; dos de los tratamientos corresponden a plantas en monocultivo del biotipo resistente (100R:0S) y del biotipo susceptible (0R:100S). Los cuatro

tratamientos restantes corresponden a cultivo mixto de plantas resistentes (R) y susceptibles (S), con las proporciones 80R:20S, 60R:40S, 40R:60S y 20R:80S. Cada tratamiento contó con seis repeticiones, para un total de 360 plantas. En el día 115 después de la siembra, las plantas fueron cosechadas dado que alcanzaron su madurez. Se determinó que el rendimiento total relativo de la altura de las plantas en competencia en cultivo mixto a través del tiempo no varió de manera relevante con respecto al rendimiento relativo del monocultivo. El número de culmos, biomasa vegetativa, número de espigas y semilla llena del biotipo resistente mostró un mayor rendimiento en comparación con el monocultivo que el biotipo susceptible. Este comportamiento se puede atribuir a que a mayor número de culmos se da mayor fijación de nitrógeno, lo que se traduce en mayor crecimiento vegetativo y espigas que producen semilla. Los resultados indican que bajo condiciones de competencia en invernadero, el biotipo resistente presenta mayor agresividad en comparación con el biotipo susceptible. Este tipo de información es valiosa para conocer el comportamiento de los híbridos de arroz maleza y arroz comercial Clearfield® CFX-18, como herramienta para el desarrollo e implementación de futuras estrategias de manejo de arroz maleza.

Palabras clave: *Oryza sativa*, experimento de competencia de Wit, acetolactato sintasa (ALS), arroz maleza, imidazolinonas.

1. INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los principales cultivos a nivel internacional y un alimento básico para casi la mitad de la población mundial (FAO 2005). La producción global proyectada para el 2015 es de 742,6 millones de toneladas para un área de 162 millones de hectáreas (FAO 2015). Debido al incremento constante de la población humana se hace necesario obtener un mayor rendimiento en la producción de alimentos que permita satisfacer las necesidades nutricionales que se derivarán en el futuro inmediato (FAO 2002). En el caso concreto de Costa Rica, para el período 2013/2014 se reportó que el consumo promedio anual de arroz por persona fue de 48,32 Kg (CONARROZ 2015), con un aporte energético aproximado de 22% y 18% en lo que respecta al consumo de proteína (CONARROZ 2006), con lo cual se evidencia que el arroz es uno de los alimentos esenciales en la dieta del costarricense.

Las malezas o plantas arvenses se definen como plantas no deseadas que aparecen en áreas cultivables y provocan efectos económicos negativos en los sistemas agrícolas al competir directamente con los cultivos por los recursos ambientales y energéticos que ambos necesitan para su supervivencia (Auld 1996, Fernández 1982). Pueden adaptarse a hábitats alterados por el hombre, por lo que tienen repercusiones sobre las actividades humanas y pueden generar pérdidas económicas (Holzner 1978).

Las malezas compiten con los cultivos por los nutrimentos del suelo, agua y luz, al tiempo que pueden servir de hospederas a insectos y patógenos dañinos y producir sustancias tóxicas que afecten al cultivo (Labrada & Parker 1996). Estas plantas también pueden entorpecer las

tareas de cosecha en áreas agrícolas, encareciendo el valor del producto final debido a que para su control debe invertirse una suma de dinero importante; de esta manera, su presencia no solo perjudica al productor, sino al consumidor y a cuantos fungen como intermediarios en la relación comercial de venta del producto agrícola (Fernández 1982).

El primer paso en el control de las malezas es la prevención de la infestación: muchas de las malezas que afectan los cultivos de arroz poseen un patrón de madurez similar con respecto a la variedad comercial utilizada, de manera que son cosechadas y diseminadas con las semillas del cultivo (Moody 1996). Así, los principales factores que contribuyen con la infestación de los terrenos son el uso de semilla no certificada, el uso deficiente de medidas preventivas, y el desconocimiento del mecanismo de dispersión de las malezas por parte de los productores (Montealegre & Vargas 1989).

El arroz maleza corresponde a plantas del género *Oryza* que infestan y compiten con el arroz cultivado y que se caracterizan por ser fenotípica y genéticamente diversas, vigorosas y agresivas (Delouche *et al.* 2007). La presencia del arroz maleza disminuye el rendimiento del arroz cultivado, principalmente en la producción de grano y en la biomasa de las plantas (Delouche *et al.* 2007).

Una medida para contrarrestar los efectos negativos derivados de la competencia con el arroz maleza ha sido el desarrollo de variedades de arroz resistentes a herbicidas. Con la implementación de este tipo de sistema se garantiza que posterior a la aplicación del herbicida en un campo de cultivo agrícola, únicamente sobrevivan aquellas plantas que cuenten con el

rasgo de resistencia a la sustancia química (Croughan 2003). Las variedades de arroz resistente a las imidazolinonas pertenecen al sistema Clearfield ®; en Costa Rica se han comercializado las variedades CFX- 18 y Puita INTA CL, las cuales se desarrollaron a partir de los trabajos pioneros de la Universidad Estatal de Luisiana y por la Estación Experimental Agropecuaria del INTA ubicada en Argentina respectivamente (Croughan 2003, Croughan 2008, PROARROZ 2015). El arroz Clearfield ® CFX-18 se comercializó en los EE.UU en 2002 (Tan *et al.* 2005) y se introdujo en Costa Rica en 2004 (Valverde 2005).

Las imidazolinonas inhiben a la enzima acetolactato sintasa (ALS), la cual tiene un papel primordial en la síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina que son esenciales para las plantas. El sitio de unión de la molécula de imidazolinona a la enzima ALS está muy cercano a su sitio activo, por lo que en presencia del herbicida la enzima es incapaz de llevar a cabo sus funciones normales (Tan *et al.* 2005). La mayoría de las variedades resistentes a este herbicida corresponden a mutaciones puntuales que reducen la afinidad de la enzima por el herbicida (Tan *et al.* 2005). Estos herbicidas muestran un modo de acción sistémico debido a que se transportan a los puntos de crecimiento de las plantas donde se acumulan, provocando la muerte de la planta (Valverde *et al.* 2000). No obstante, el arroz Clearfield ® no ha demostrado ser eficiente a largo plazo en el control de malezas debido al flujo de genes entre las variedades mejoradas y los arrozales maleza (Zhang *et al.* 2006). La siembra de arroz Clearfield ® se ha introducido en los Estados Unidos (Buehring 2008), Brasil (Rangel *et al.* 2010), Colombia, Panamá, Nicaragua, Costa Rica, Argentina, Republica Dominicana (Gressel & Valverde 2009), Paraguay, Bolivia (Kharkwal

& Shu 2009), Malasia (Azmi *et al.* 2010), Uruguay (Delouche *et al.* 2007) e Italia (Scarabel *et al.* 2012). Se ha encontrado híbridos que portan rasgos intermedios de estos parentales en campos agrícolas de Luisiana, EEUU (Zhang *et al.* 2006), Arkansas, EEUU (Burgos *et al.* 2007), Brasil (Villa *et al.* 2006), Colombia (Gressel & Valverde 2009), Costa Rica (Valverde 2005) e Italia (Busconi *et al.* 2012). En vista de que la persistencia de estos híbridos en los campos está relacionada con su adaptabilidad, esta investigación se enfocó en el estudio de la competitividad en condiciones de invernadero entre biotipos híbridos del arroz maleza y el Clearfield® que portan el rasgo de resistencia o susceptibilidad a las imidazolinonas.

2. ANTECEDENTES

El éxito agronómico del arroz maleza se asocia a sus características biológicas, entre las que sobresalen su buena adaptación a las prácticas agronómicas, un ciclo biológico estrechamente sincronizado con el arroz cultivado, gran producción de semillas que pueden ser dispersadas ampliamente debido a un desgrane precoz, fácil y abundante; rápida emergencia de las plántulas seguida por un crecimiento vegetativo vigoroso, y latencia prolongada de las semillas, la cual mantiene la capacidad de germinación bajo condiciones ambientales difíciles (Delouche *et al.* 2007). La siembra de semilla de arroz contaminada es la principal fuente de dispersión a larga distancia de los arroces maleza (Delouche *et al.* 2007).

Oryza sativa es esencialmente una especie autógama (Franquet & Borrás 2004), en la cual la tasa de exocruzamiento de las plantas es menor al 1% (Shivrain *et al.* 2007). Sin embargo,

existen Númerosos casos reportados de cruces naturales entre el arroz maleza y el arroz Clearfield ® (Burgos *et al.* 2005; Burgos *et al.* 2007; Busconi *et al.* 2012; Chen *et al.* 2004; Gealy 2005a; Shivrain *et al.* 2009; Villa *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006; Kaloumenos *et al.* 2013).

La resistencia mostrada por la variedad de arroz Clearfield ® a las imidazolinonas se debe a la presencia de una mutación puntual en el gen de la enzima ALS, lo cual deriva en una sustitución del aminoácido serina por una asparagina en la posición 653 de la secuencia proteica en el caso de la variedad CFX-18 (Tan *et al.* 2005), y una alanina por una treonina en la posición 122 en el caso de la variedad Puita INTA CL (Roso *et al.* 2010). Estas mutaciones pueden detectarse mediante pruebas moleculares, tales como PCR y secuenciación parcial o total del gen de la enzima ALS. Kadaru *et al.* (2008) reporta el desarrollo de un método de detección mediante la técnica de PCR alelo específico en plantas de la variedad CFX-18 con el cual se puede detectar genotipos homocigotas y heterocigotas para este locus; un protocolo similar ha sido establecido para la variedad Puita INTA CL (Roso *et al.* 2010). Estas metodologías se utilizan en la detección de híbridos entre arroces resistentes a las imidazolinonas y arroces malezas (Kadaru *et al.* 2008, Roso *et al.* 2010).

Este tipo de híbridos han sido descritos y se ha reportado que presentan mayor altura, hojas más largas, mayor cantidad de semillas y un número de culmos superior a los tipos parentales, y en ciertos casos, expresaron resistencia de intermedia a alta al herbicida (Shivrain *et al.* 2006, Shivrain *et al.* 2007). Sin embargo, se requieren más experimentos de competencia para evaluar la adaptabilidad de estos híbridos.

La adaptabilidad de un organismo se define como la habilidad de establecerse, sobrevivir y reproducirse de manera exitosa en un ambiente dado (Menchari *et al.* 2008), en tanto el concepto de competencia se define como la disputa entre organismos por recursos limitantes para su desarrollo, tales como acceso a luz, agua y nutrimentos en el caso de las plantas (Hamilton *et al.* 1992). Ciertas variables morfológicas de las plantas, como la altura, el número de culmos y la cantidad de semilla viable son indicadores de su adaptabilidad.

La adaptabilidad de los híbridos entre el arroz maleza y el arroz resistente a imidazolinas suele ser mayor que la reportada en sus parentales (Shivrain *et al.* 2009). Otros híbridos, como los originados por el cruce de arroz comercial *O. sativa* con *Oryza rufipogon* muestran un menor desempeño en comparación con sus parentales (Ping Song *et al.* 2004). Estas diferencias pueden ligarse al vigor híbrido que suele derivarse del cruce de dos especies o biotipos diferentes entre sí, debido a la alta heterocigosis del híbrido (de Alba 1964) y a diversos efectos pleiotrópicos, en donde ciertos alelos pueden modificar la expresión de otros rasgos (Menchari *et al.* 2008). Sin embargo, a la fecha no se reportan estudios en donde se comparen la adaptabilidad en condiciones de competencia, y con trasfondo genético similar, entre biotipos híbridos entre arroz maleza y arroz Clearfield®, que muestren el genotipo de susceptibilidad (S) y resistencia (R) al herbicida imidazolinona.

Un diseño experimental efectivo para evaluar el efecto de un rasgo, como la resistencia a un herbicida en la adaptabilidad de un biotipo, consiste en las series de reemplazo. Este modelo se recomienda para cuantificar el efecto de la competencia entre dos especies o variedades manteniendo la densidad total constante, en tanto se varían las proporciones de cada especie

o variedad (Cousens 1991; Cousens & O'Neill 1993). Este diseño es especialmente útil para comparar el rendimiento de dos especies que interactúan con respecto a su rendimiento en monocultivo, de manera que se pueden analizar diversas variables morfológicas y así dilucidar el tipo de relación biológica entre ambas (Cousens 1991; Cousens & O'Neill 1993). La homogeneidad en el trasfondo genético es un requerimiento importante para este tipo de experimento pues con esto se garantiza que las plantas posean un genoma muy similar entre sí, por lo que se pueden atribuir las posibles diferencias observadas a la variación en el rasgo de resistencia o susceptibilidad (Vila-Aiub *et al.* 2011).

Las plantas en asociación con individuos de la misma u otra especie, dan lugar a interacciones e interferencias entre los individuos que comparten un espacio común. Para describir este tipo de interacciones entre dos especies o variedades en un experimento de series de reemplazo se puede utilizar el rendimiento relativo de cada variedad, el rendimiento relativo total (Harper 1977) y el índice de agresividad (McGilchrist 1965) entre otros.

El rendimiento relativo (RY) se implementó para calcular la superioridad de un cultivo mixto en comparación con un monocultivo de la misma variedad (Harper 1977). El rendimiento relativo total (RYT) es la suma del RY de las variedades en competencia, y se utilizan para describir la relación ecológica existente entre las plantas en competencia. Un valor de RYT cercano a 1 implica que las especies tienen demandas similares de recursos limitados en el ambiente. Un valor de $RYT > 1$ sugiere que las especies tienen diferentes demandas de recursos, evitando la competencia entre sí o mostrando algún tipo de relación simbiótica. Por otra parte, un valor de $RYT < 1$ indica una relación de mutuo antagonismo (Harper 1977).

Sin embargo, para analizar el rendimiento relativo de cada especie o variedad hay que graficar los valores respectivos del rendimiento relativo (RY) para cada especie o variedad en competencia junto con el rendimiento relativo total, lo cual origina los siguientes escenarios: a) RY de la planta tipo A es convexa y RY de la planta tipo B es cóncava, existe una relación de competencia entre ambos, b) ambas curvas son convexas, debido a que las plantas conviven en nichos diferentes (no compiten entre sí), c) ambas curvas son cóncavas, las plantas en competencia son antagonistas, d) RY es igual al esperado, las plantas interfieren entre sí de igual manera, por lo que el efecto neto se cancela (Harper 1977).

El índice de agresividad (AI) mide el incremento relativo de una variedad o biotipo con respecto al incremento relativo de otra variedad. Cuando es igual a cero, ambas especies son igualmente competitivas, mientras que si es diferente de cero alguna de las especies en competencia sobresale sobre la otra (Chargoy Zamora 2004). Estos índices se analizan en conjunto, de manera que se puede interpretar las relaciones mutuas entre las especies o variedades e identificar la relación de competencia (Chargoy Zamora 2004, Bagavathiannan *et al.* 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

El rasgo de resistencia a un xenobiótico puede provocar una disminución de la adaptabilidad de los organismos que portan esa característica (Coustau *et al.* 2000). La adquisición de nuevas adaptaciones por parte de un organismo involucra la modificación de su genotipo

previo, el cual ha sido moldeado y probado por diversas fuerzas evolutivas a través del tiempo; una alteración en esa compleja red de interacciones puede derivar en consecuencias negativas para el organismo (Coustau *et al.* 2000). Asimismo, las modificaciones fisiológicas originadas por la introducción de un rasgo de resistencia en un organismo pueden desembocar en la alteración de funciones en proteínas asociadas al mecanismo de resistencia (Coustau *et al.* 2000).

Es necesario generar información acerca de la evolución de la resistencia a herbicidas en plantas, para caracterizar la difusión de estos rasgos en las poblaciones (Roux *et al.* 2004) y mejorar los programas de manejo de malezas resistentes a herbicidas. Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios que analicen la adaptabilidad asociada a la resistencia a herbicidas en biotipos híbridos entre arroz maleza y arroz Clearfield® que presenten un trasfondo genético similar, y que porten el genotipo de resistencia y susceptibilidad a las imidazolinonas.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En condiciones de competencia y en ausencia del herbicida los biotipos híbridos entre arroz maleza y arroz resistente a imidazolinonas que son susceptibles a la acción de las imidazolinonas van a presentar una adaptabilidad mayor en comparación con los híbridos que muestran resistencia a ese herbicida. Esto se evidenciará en una mayor altura, mayor número de culmos, de semilla y del peso fresco de la planta en las plantas susceptibles.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Describir la adaptabilidad de híbridos que muestren un genotipo resistente y susceptible a herbicida tipo imidazolinonas, provenientes del cruzamiento natural entre arroz maleza y arroz Clearfield ® CFX-18, en condiciones de invernadero y competencia.

5.2. Objetivos Específicos

Caracterizar genotípicamente el carácter de la enzima ALS para clasificar a las plantas como resistentes o susceptibles a las imidazolinonas.

Comparar la adaptabilidad de plantas híbridas resistentes y susceptibles a imidazolinonas, en condiciones de competencia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

La experimento se realizó en los invernaderos de Investigación y Desarrollo en Agricultura Tropical S.A. (IDEA Tropical), localizada en Tambor de Alajuela (10°2'6.96"N, 84°14'33.44"O). Los análisis moleculares se realizaron en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica (9°56'25"N, 84°2'37"W) en Montes de Oca, Costa Rica.

6.1. Obtención de las semillas a utilizar en el estudio de competencia:

La semilla de híbridos entre arroz maleza y arroz Clearfield ® fue provista por IDEA Tropical. La planta híbrida madre se recolectó en el lote Río Seco de la finca arrocera Pelón de la Bajura (10°29'28.02"N y 85°24'37.04"O) en Guanacaste (B. Valverde, comunicación personal). La precipitación anual de la zona se encuentra en el rango de los 1300 a 1700 mm y la temperatura promedio anual es de 28°C (Herrera 1985).

Al momento de la recolección, estos lotes tenían un historial de siembra de más de dos ciclos productivos con la variedad Clearfield ® CFX-18. La semilla se recolectó justo antes de la cosecha del cultivo, a partir de plantas de arroz maleza sobrevivientes a la aplicación repetida (dos veces durante el ciclo) de la mezcla de los herbicidas imazapir e imazapic. La semilla (F1) se sembró en macetas que se mantuvieron en los invernaderos de IDEA Tropical en Alajuela. Una vez que las plantas presentaron un número suficiente de culmos, cada una se subdividió mecánicamente en clones que se separaron en dos grupos, los cuales fueron resembrados en macetas: el primer grupo se trató con imazapir para comprobar su resistencia a ese herbicida, en tanto el segundo grupo de plantas se utilizó para la obtención de semilla. Las plantas que exhibieron resistencia intermedia al herbicida se designaron como posibles heterocigotas para el gen *ALS* (portando un alelo con la mutación de resistencia y un alelo silvestre) lo cual se comprobó mediante secuenciación parcial del gen mencionado a partir de ADN extraído del tejido foliar de la plantas. La semilla (F2) de las plantas con genotipo heterocigota comprobado se germinó y sembró en macetas: cada planta se subdividió nuevamente y separó en dos grupos, según la metodología mencionada anteriormente. Las

plantas que presentaron resistencia marcada al herbicida, así como aquellas que se mostraron susceptibles a la acción del mismo y murieron se clasificaron como plantas con genotipo homocigoto para el alelo mutado de la enzima ALS y con genotipo homocigota para el alelo silvestre, respectivamente. La semilla de las plantas (F3) caracterizadas como homocigotas para el alelo mutado (resistentes al herbicida) y de las plantas homocigotas para el alelo silvestre (susceptibles al herbicida) se utilizaron en este estudio, debido a que poseen un trasfondo genético similar al provenir de una misma planta madre (B. Valverde, comunicación personal). Esta semilla (F3) se obtuvo en un proyecto previo a la presente investigación, y fue cedida por IDEA Tropical.

6.2. Establecimiento del experimento de competencia

Se trabajó con semillas pertenecientes a las plantas de la F3, caracterizadas como biotipo homocigota para el alelo mutado (plantas resistentes al herbicida: R) y homocigotas para el alelo silvestre (plantas susceptibles al herbicida: S). Los experimentos de competencia se establecieron en los invernaderos de IDEA Tropical en Alajuela.

Se utilizaron macetas cilíndricas de 25 cm de diámetro y 20 cm de altura; cada maceta corresponde a un tratamiento diferente, y en cada una de ellas se sembraron 10 plantas con una distribución espacial uniforme, acomodando las plantas en tres hileras (Figura 1). Para caracterizar el efecto de la competencia entre el biotipo resistente y susceptible que comparten recursos limitados, se implementaron seis tratamientos correspondientes con

diferentes proporciones de siembra mediante un modelo de series de reemplazo, en donde dos tratamientos corresponden a plantas en monocultivo, y cuatro tratamientos son plantas en competencia (Cuadro 1). Cada tratamiento contó con seis repeticiones, con un total de 360 plantas en el experimento.

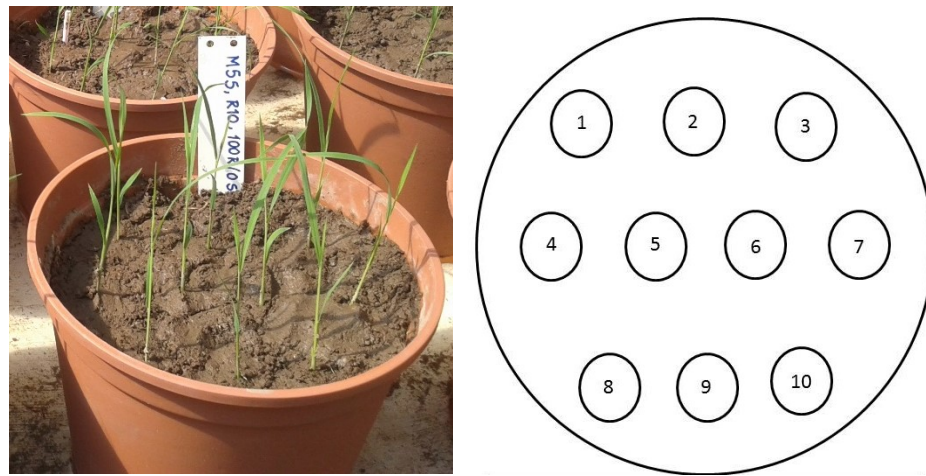


Figura 1. Distribución espacial de las plantas en competencia en cada tratamiento.

Cuadro 1. Proporciones de siembra del biotipo resistente y del biotipo susceptible a las imidazolinonas, por tratamiento. Cada tratamiento estuvo conformado por diez plantas.

Tratamiento	Biotipo Resistente (%)	Biotipo susceptible (%)
1	100	0
2	80	20
3	60	40
4	40	60
5	20	80
6	0	100

Las macetas se rotaron aleatoriamente cada tres semanas para evitar el efecto de borde y homogenizar el error inducido por diferencias posicionales. El suelo se mantuvo saturado mediante la colocación de las macetas en bandejas metálicas con una lámina de agua de 2cm, en condiciones de invernadero durante todo su ciclo de vida.

6.3. Evaluación de las plantas en competencia

Se cuantificó la altura y el número de culmos del eje principal para cada planta, cada 15 días durante las 16 semanas que tardaron las plantas en alcanzar la madurez. En la última fecha se midió el número de espigas producidas, biomasa vegetativa, número de semillas llenas, número de semillas vacías, y la altura final para cada planta.

6.4. Confirmación del genotipo del gen *ALS* mediante técnicas moleculares

6.4.1. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico total

Se obtuvo ADN genómico total a partir de tejido foliar de cada planta con la finalidad de corroborar el genotipo de las plantas. Se recolectó 0.5 g de tejido foliar joven y se colocó por dos días a 50 °C en una incubadora Digisystem Laboratory Instruments Inc. (modelo. LE-529, Taiwán) para asegurar la deshidratación completa de las hojas. La maceración del tejido se realizó mediante el FastPrep-24® MP Biomedicals (modelo: 910519, Estados Unidos) a una velocidad de 6 m/s durante 40 s (2 veces), para proceder posteriormente con el protocolo de extracción propuesto por Lodhi *et al.* (1994) modificado para arroz. La verificación de la presencia de ADN genómico total en las muestras se realizó mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa de concentración al 0.8%, que fue teñido con GelRed (Thermo Scientific, Estados Unidos), y fotografiado con una cámara Sony (modelo: DSX-W730). Además, se determinó la concentración (ng/μl) y pureza (A_{260}/A_{280}) del ADN, mediante su cuantificación en un NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Estados Unidos).

6.4.2. Identificación genotípica del gen *ALS* mediante PCR alelo-específico

Se realizaron pruebas de PCR alelo-específicos a las 360 plantas utilizadas en este estudio. La presencia de la mutación en el gen *ALS* se verificó mediante PCR alelo-específico, con imprimadores que permiten detectar la presencia o ausencia del alelo mutado y silvestre del gen *ALS* (Cuadro 2, Kadaru *et al.* 2008), y determinar el genotipo para ese locus (Cuadro 3). Se prepararon reacciones de PCR de 20 μL cada una, para los cuales se empleó 9.35 μL de

agua miliporo filtrada, 2 µL de 10X Taq buffer, 1.2 µL MgCl₂ (25mM), 1 µL de imprimador forward (10 mM), 1 µL de imprimador reverse (10 mM), 0.8 µL BSA (1mg/mL), 0.4 µL de dNTP's (10mM), 0.25 µL de Taq polimerasa y 4 µL de ADN genómico total (50 µg/ µL).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Biometra (modelo: 070-601, Alemania) con las siguientes condiciones para la reacción: 3 minutos a 94°C; 28 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 63,2°C y 30 segundos a 72°C, y 5 minutos a 72°C. Para la detección de los productos de amplificación del PCR se cargó 10 µL de cada reacción con 2 µL de buffer de carga 6X, en un gel de agarosa al 1.5% que se corrió por una hora a 110 V en TAE 1X (40 mM de Tris-Acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0), el cual se tiñó con GelRed (Thermo Scientific, Estados Unidos), para ser fotografiado posteriormente con una cámara Sony (modelo: DSX-W730).

Cuadro 2. Imprimadores diseñados para la amplificación parcial del gen *ALS* en la variedad de arroz CFX-18, que detectan el alelo mutado y el alelo silvestre (Kadaru *et al.* 2008).

Imprimador	Detección del Alelo Mutado	Imprimador	Detección del Alelo Silvestre
ALS653ResF	5 - GTGCTGCCTATGATCCTAAA - 3	ALS653SusF	5 – GTGCTGCCTATGATCCTAAG – 3
ALS R3	5 - TGGGTCATTCAGGTCAAACA - 3	ALS R3	5 - TGGGTCATTCAGGTCAAACA – 3

Cuadro 3. Amplificación esperada en las pruebas de PCR alelo-específico realizados a las plantas en competencia para verificar su genotipo.

Amplificación con imprimadores para Alelo mutado	Amplificación con imprimadores para Alelo silvestre	Genotipo Gen <i>ALS</i>	Fenotipo esperado
Presente (+)	Ausente (-)	RR	Resistente a imidazolinona
Ausente (-)	Presente (+)	SS	Susceptible a imidazolinona

6.5. Análisis de datos

Se midió la competitividad relativa de los biotipos resistente y susceptible mediante los índices de series de reemplazo (Cousens & O'Neill 1993; Bagavathiannan *et al.* 2011), los cuales se muestran a continuación. Estos parámetros se calcularon para la altura del eje principal de las plantas, el número de culmos, el número de espigas, peso fresco y semillas producidas.

a) Rendimiento relativo (RY):

$$RY (S) = P (S_{mix}/S_{mono})$$

$$RY (R) = (1-P) (R_{mix}/R_{mono})$$

El RY (*R*) y el RY (*S*) corresponde al rendimiento relativo para el biotipo resistente y susceptible respectivamente, *P* es la proporción de siembra del biotipo según el tratamiento, *S_{mix}* y *R_{mix}* se refiere al rendimiento del biotipo resistente y susceptible en condiciones de

siembra combinada, y S_{mono} y R_{mono} es el rendimiento de los biotipos en condiciones de monocultivo.

b) Rendimiento relativo total (RYT):

$$RYT = RY (S) + RY (R)$$

c) Índice de agresividad (AI) (McGilchrist & Trenbath 1971):

$$AI = 1/2[(R_{mix}/R_{mono}) - (S_{mix}/S_{mono})]$$

No se pudo aplicar un modelo estadístico a estos modelos para validar si existen diferencias significativas entre las proporciones de siembra analizadas debido al reducido tamaño de la muestra. En este caso, se consideró que diferencias mayores o iguales a 0,10 unidades con respecto a 1 para el rendimiento relativo, se consideran significativos teniendo en cuenta que una variación del 10% en una variable morfológica puede tener un impacto significativo en la competitividad de una planta. Asimismo, con base en estos datos se relacionó que los valores del índice de agresividad que varían en al menos 0,07 unidades de 0 son significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Confirmación de la naturaleza híbrida de las plantas utilizadas en el experimento de competencia

Las muestras que presentaron un producto de amplificación de un peso entre 100 y 200 pb con las condiciones de PCR detalladas con anterioridad y los imprimadores ALSR3/ALSResF, se consideraron portadores de al menos un alelo mutado del gen *ALS* que confiere resistencia a las imidazolinonas. Asimismo, aquellas muestras que presentaron productos de amplificación de un peso molecular de entre 100 y 200 pb con los imprimadores ALSR3/ALS653SusF, se consideraron portadoras de al menos una copia del alelo silvestre para el gen que codifica para enzima ALS. Por medio de PCR's se comprobó que todas las plantas utilizadas en el experimento de competencia y descritas como resistentes a las imidazolinonas son homocigotas para el alelo mutado del gen *als*, y que todas las plantas descritas como susceptibles al herbicida mencionado son homocigotas para el alelo silvestre del gen *ALS* (Figura 2 y 3).

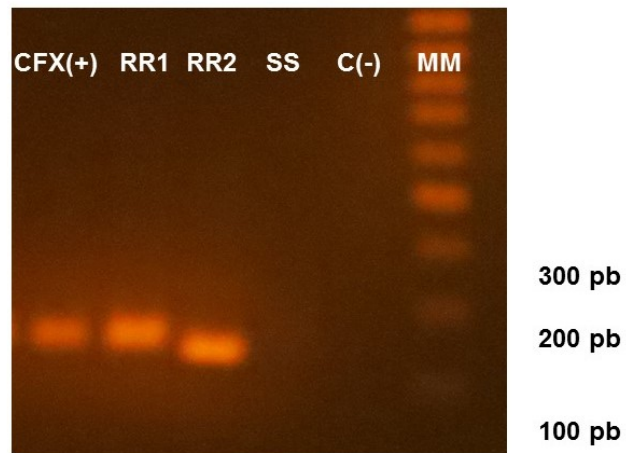


Figura 2. Detección del alelo mutante (S653D) del gen *als* que confiere resistencia a las imidazolinonas en plantas de arroz, mediante corrida en electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con los primers ALSR3/ALSResF. Gel de agarosa 1,5%, TAE 1X. Muestras: Línea 1: Arroz CFX-18 (Control positivo), línea 2: planta resistente #1 (RR1), línea 3: planta resistente #2 (RR2), línea 4: planta susceptible (SS), línea 5: control negativo agua (C-), línea 6: marcador molecular 100pb.

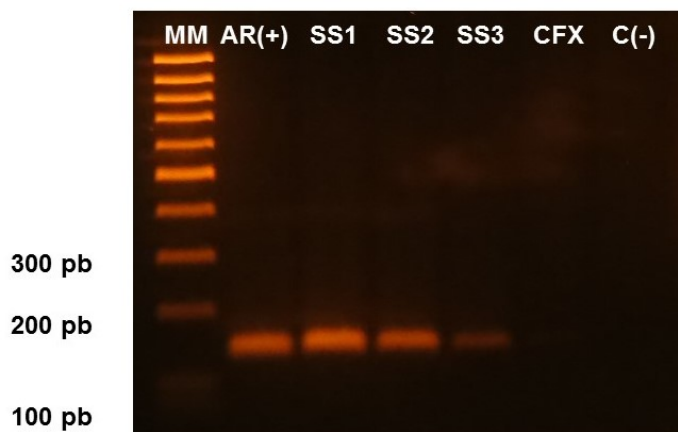


Figura 3. Detección del alelo silvestre del gen *ALS* que confiere susceptibilidad a las imidazolinonas en plantas de arroz, mediante corrida en electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con los primers ALSR3/ALS653SusF. Gel de agarosa 1,5%, TAE 1X. Muestras. Línea 1: Marcador molecular (MM) 100pb, línea 2: Arroz maleza AR997 (AR), control positivo, línea 3: biotipo susceptible #1 (SS1), línea 4: biotipo susceptible #2 (SS2), línea 5: biotipo susceptible #3 (SS3), línea #6: CFX-18, línea 7: control negativo, agua (C-).

7.2. Caracterización morfológica de los híbridos en condiciones de competencia

Para calcular el desempeño y la competitividad de los biotipos en competencia según la proporción de siembra analizada, se tomó en cuenta el rendimiento relativo de cada tipo de planta, el rendimiento relativo total que toma en cuenta ambas plantas, y el índice de agresividad. Se consideró que diferencias mayores o iguales a 0,10 unidades con respecto a 1 para el rendimiento relativo, se consideran significativas, en tanto valores del índice de agresividad que varían en al menos 0,07 unidades de 0 son significativos.

7.2.1 Altura de las plantas

La medición de la altura de las plantas se realizó en los días 15, 24, 36, 50, 73 y 115 de edad de los híbridos. Las plantas homocigotas para el alelo mutante del gen *als* (biotipos resistentes al herbicida) mostraron una mayor altura con respecto a las plantas homocigotas para el alelo silvestre (biotipo susceptible) en condición de monocultivo. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, considerando que las desviaciones estándar de los promedios se traslapan entre sí (Figura 4).

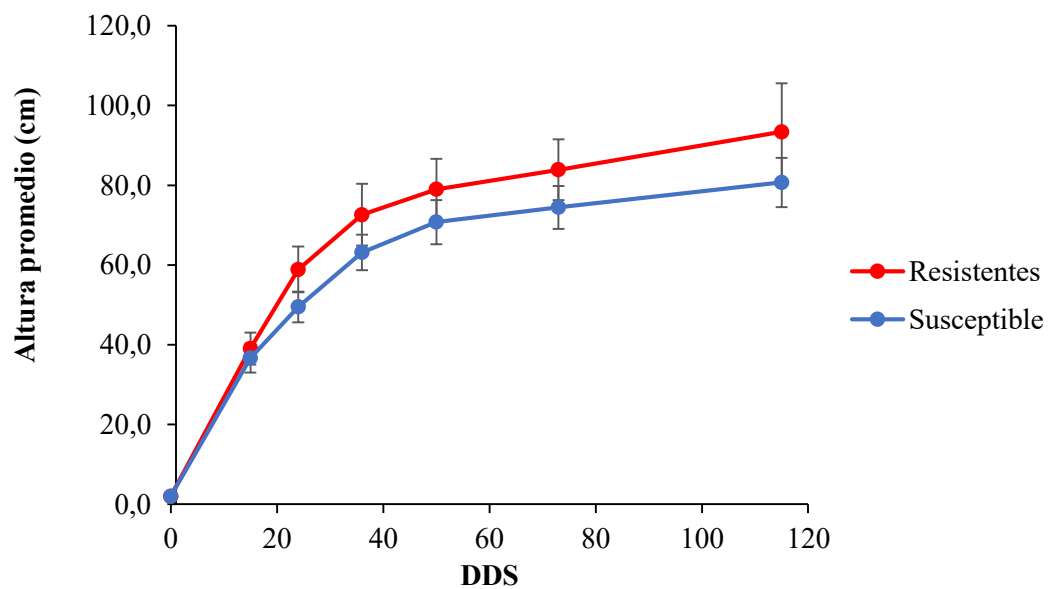


Figura 4. Altura promedio (cm) del biotipo resistente y susceptible a las imidazolinonas según la edad de las plantas (en días después de la siembra, DDS) en condiciones de monocultivo. Las barras de error indican la desviación estándar correspondiente a cada tratamiento.

En condiciones de cultivo mixto se observó que no hubo variación en el rendimiento relativo de las plantas resistentes y susceptibles con respecto al monocultivo, a través de todo el ciclo de vida de las plantas (Figura 5). Esto se concluye al comparar el rendimiento relativo de las plantas susceptibles y resistentes con los valores esperados (representados por líneas negras), en donde se observa que la variación es inexistente. Esta condición también se ve reflejada en los valores del índice de agresividad (Cuadro 4), los cuales no variaron con respecto a 0 (valor esperado) en más de 0,07 unidades, definido como el punto de corte. La relación de competitividad entre los biotipos en competencia, para cada proporción de siembra y día de medición de las plantas, se resume en el cuadro 4.

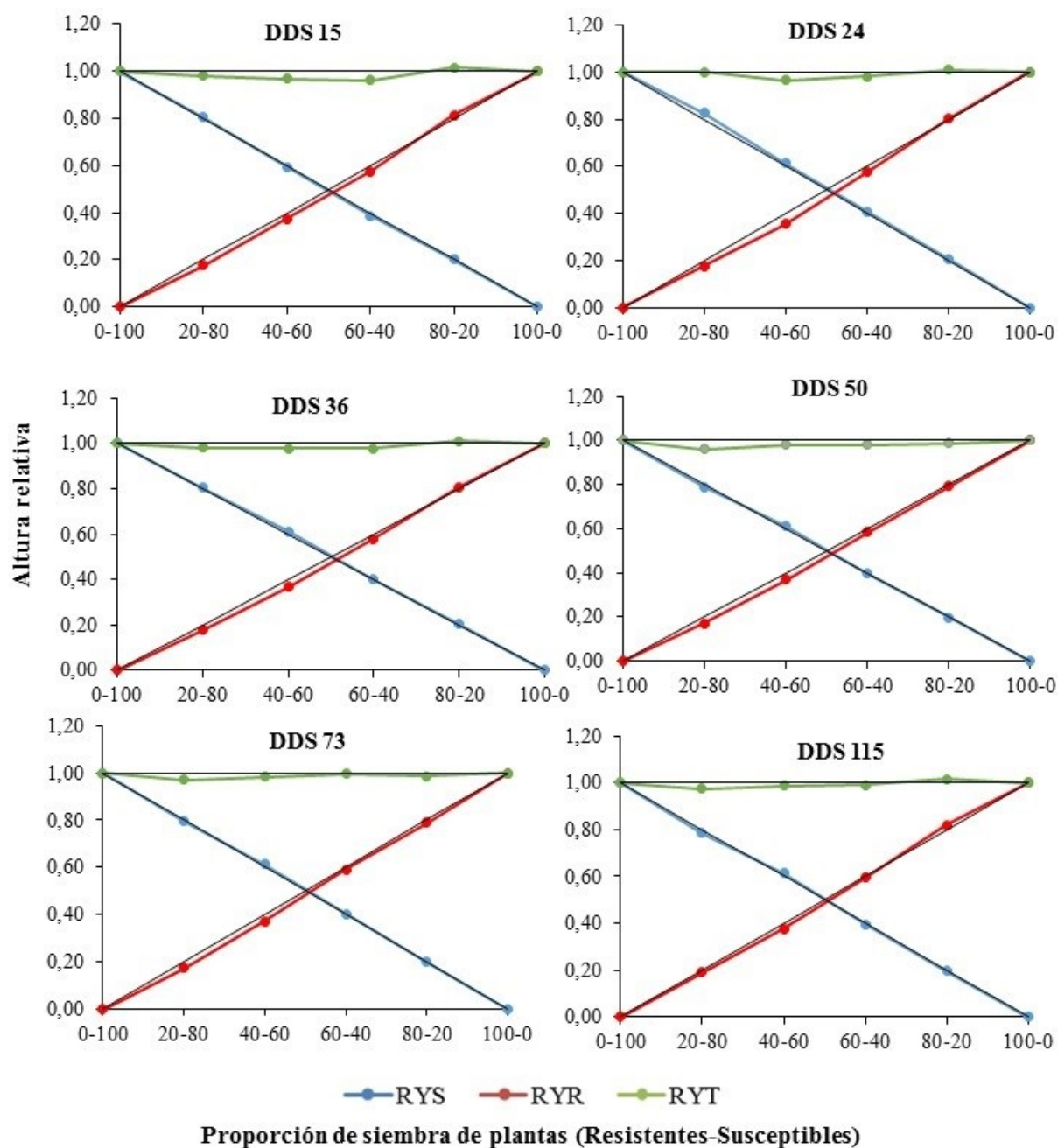


Fig 5. Rendimiento relativo (RY) y total (RYT) de la altura en plantas de arroz maleza resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas a través de su periodo de crecimiento, según sus proporciones de siembra. Los valores esperados se representan con líneas negras.

Cuadro 4. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionado a la altura promedio, en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas en diferentes proporciones de siembra a través del tiempo.

DDS 15		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	0,00	Similar entre biotipos
60R/40S	-0,01	Similar entre biotipos
40R/60S	-0,02	Similar entre biotipos
20R/80S	-0,06	Similar entre biotipos
DDS 24		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	-0,02	Similar entre biotipos
60R/40S	-0,03	Similar entre biotipos
40R/60S	-0,07	Similar entre biotipos
20R/80S	-0,06	Similar entre biotipos
DDS 36		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	0,01	Similar entre biotipos
60R/40S	-0,01	Similar entre biotipos
40R/60S	-0,04	Similar entre biotipos
20R/80S	-0,06	Similar entre biotipos
DDS 50		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	0,00	Similar entre biotipos
60R/40S	-0,01	Similar entre biotipos
40R/60S	-0,03	Similar entre biotipos
20R/80S	-0,06	Similar entre biotipos
DDS 73		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	0,00	Similar entre biotipos
60R/40S	-0,01	Similar entre biotipos
40R/60S	-0,04	Similar entre biotipos
20R/80S	-0,06	Similar entre biotipos

AI: índice de agresividad (diferencias del 0,07 con respecto de 0 se consideran relevantes y se marcan con * en caso de estar presentes).

Cuadro 4 (Continuación). Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionado a la altura promedio, en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas en diferentes proporciones de siembra a través del tiempo.

DDS 115 (Madurez)		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	0,06	Similar entre biotipos
60R/40S	0,00	Similar entre biotipos
40R/60S	-0,02	Similar entre biotipos
20R/80S	-0,02	Similar entre biotipos

AI: índice de agresividad (diferencias del 0,07 con respecto de 0 se consideran relevantes y se marcan con * en caso de estar presentes).

7.2.2. Culmos

La medición de los culmos se realizó en los días 15, 24, 36, 50, 73 y 115 de edad de los híbridos. En condiciones de monocultivo, las plantas híbridas susceptibles al herbicida mostraron un número muy similar de culmos durante el crecimiento vegetativo que las plantas resistentes; sin embargo, una vez alcanzado el período de madurez aumentó el número promedio de culmos en las plantas susceptibles (Figura 6).

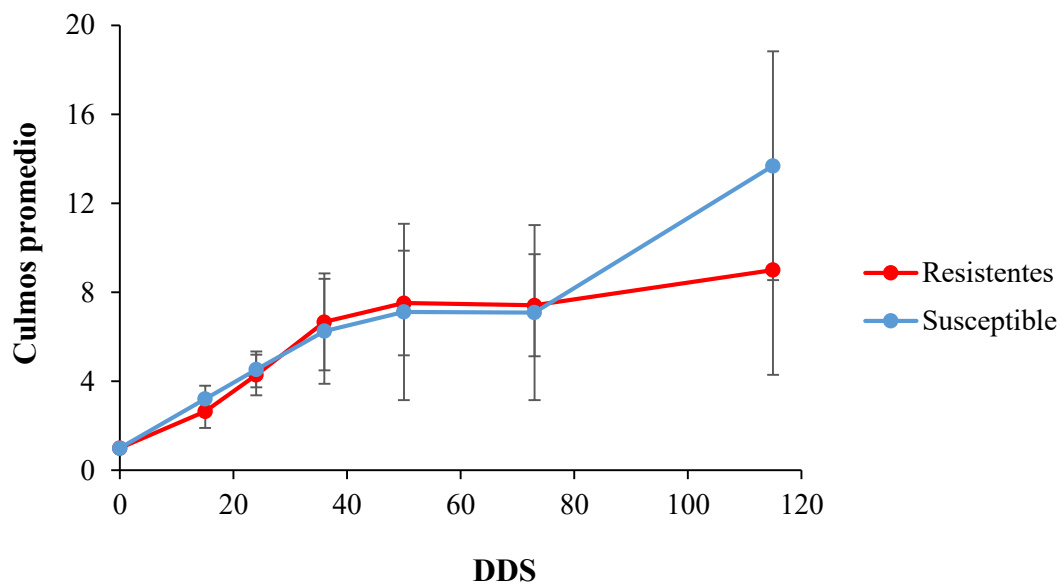


Figura 6. Número promedio de culmos del biotipo resistente y susceptible a las imidazolinonas según la edad de las plantas (en días después de la siembra, DDS), en condiciones de monocultivo. Las barras de error indican la desviación estándar correspondiente a cada tratamiento.

En condiciones de cultivo mixto se encontraron diferencias al comparar el rendimiento relativo de las plantas resistentes y susceptibles en distintas proporciones de siembra, conforme aumentaba la edad de las plantas (Figura 7). En la medición realizada en el día 15 después de la siembra, el rendimiento relativo de culmos se mantuvo en el rango de valor esperado, lo cual se denota al observar que las líneas del rendimiento relativo esperado y calculado se traslapan, y que el valor del IA no varía significativamente de cero (Cuadro 5).

Sin embargo, esta situación cambió para las mediciones realizadas en los días 24 y 36 de edad de las plantas, en los cuales se observa un aumento del rendimiento relativo de culmos para el biotipo susceptible con respecto al monocultivo en la proporción de siembra 20R/80S;

este aumento se advierte como una curvatura convexa en la recta de rendimiento relativo del biotipo susceptible en la Figura 7.

En los días 50 y 73 de edad de las plantas se percibió un aumento del rendimiento relativo de ambos biotipos para la proporción de siembra 20R/80S, lo cual implica que ambos biotipos produjeron más culmos en comparación con los biotipos en monocultivo. Se puede observar en la Figura 7 como ambos biotipos aumentan con respecto al rendimiento relativo esperado, para esa proporción y día de siembra.

Una vez que las plantas alcanzaron su madurez y fueron cosechadas se evidenció que el rendimiento relativo del biotipo resistente aumentó con respecto al monocultivo para las proporciones de siembra 80R/20S y 60R/40S, lo cual se evidencia como una curvatura convexa en la recta de rendimiento relativo del biotipo resistente (Figura 7, 115 DDS). En tanto, el rendimiento relativo del biotipo susceptible disminuyó con respecto al monocultivo, lo cual se evidencia como una curvatura cóncava en la recta de rendimiento relativo susceptible. Los valores de RYT en las diferentes mediciones realizadas a través del tiempo señalan que al disminuir la proporción del biotipo resistente aumenta el rendimiento relativo total (Figura 7). Los valores del IA son significativamente mayores a cero, por lo cual se concluye que en el periodo de madurez el biotipo resistente es más competitivo que el biotipo susceptible (Cuadro 5).

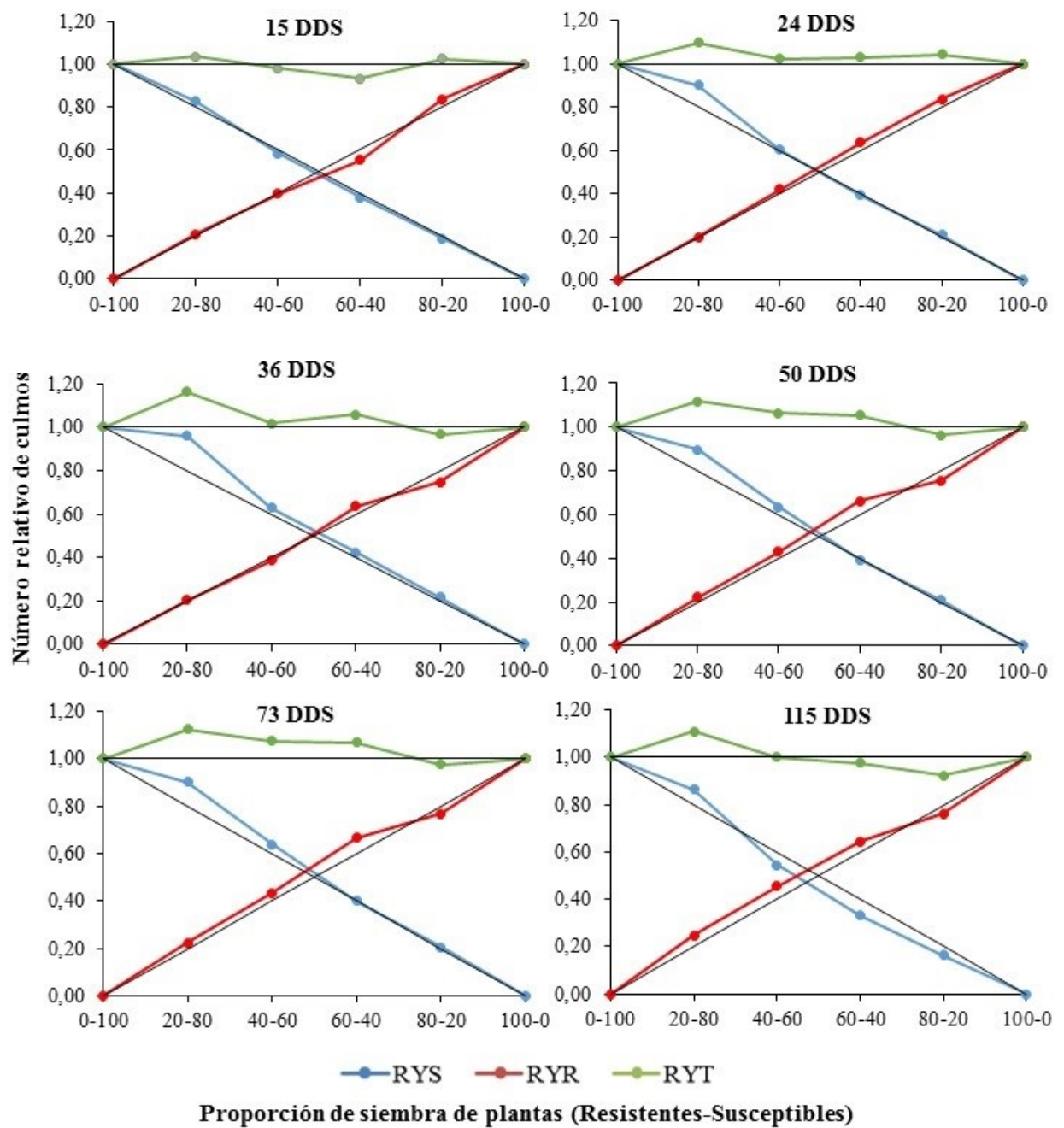


Figura 7. Rendimiento relativo (RY) y total (RYT) de culmos en plantas de arroz maleza resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas a través de su período de crecimiento, según sus proporciones de siembra. Los valores esperados se representan con líneas negras.

Cuadro 5. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionado al número promedio de culmos, en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas en diferentes proporciones de siembra a través del tiempo.

DDS 15		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	0,05	Similar entre biotipos
60R/40S	-0,01	Similar entre biotipos
40R/60S	0,01	Similar entre biotipos
20R/80S	0,00	Similar entre biotipos
DDS 24		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	0,00	Similar entre biotipos
60R/40S	0,04	Similar entre biotipos
40R/60S	0,02	Similar entre biotipos
20R/80S	-0,07*	S aumenta
36 DDS		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	-0,08	Similar entre biotipos
60R/40S	0,00	Similar entre biotipos
40R/60S	-0,04	Similar entre biotipos
20R/80S	-0,10*	S aumenta
50 DDS		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	-0,05	Similar entre biotipos
60R/40S	0,06	Similar entre biotipos
40R/60S	0,01	Similar entre biotipos
20R/80S	-0,01*	Aumenta en ambos biotipos
73 DDS		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	-0,04	Similar entre biotipos
60R/40S	0,06	Similar entre biotipos
40R/60S	0,01	Similar entre biotipos
20R/80S	0,00*	Aumenta en ambos biotipos

AI: índice de agresividad (diferencias del 0,07 con respecto de 0 se consideran relevantes y se marcan con *).

Cuadro 5 (Continuación). Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionado al número promedio de culmos, en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas en diferentes proporciones de siembra a través del tiempo.

115 DDS (Madurez)		
Porcentaje de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	0,07*	S disminuye
60R/40S	0,12*	S disminuye
40R/60S	0,11*	R aumenta/S disminuye
20R/80S	0,08*	R aumenta

AI: índice de agresividad (diferencias del 0,07 con respecto de 0 se consideran relevantes y se marcan con *).

7.2.3. Biomasa vegetativa

La medición de la biomasa vegetativa de las plantas se realizó cuando alcanzaron la madurez en el día 115 DDS. El biotipo resistente y susceptible no presentó diferencias en biomasa vegetativa en condiciones de monocultivo. Sin embargo, se observó la tendencia de que el biotipo resistente produjo más biomasa que el biotipo susceptible en condiciones de cultivo mixto (Figura 8).

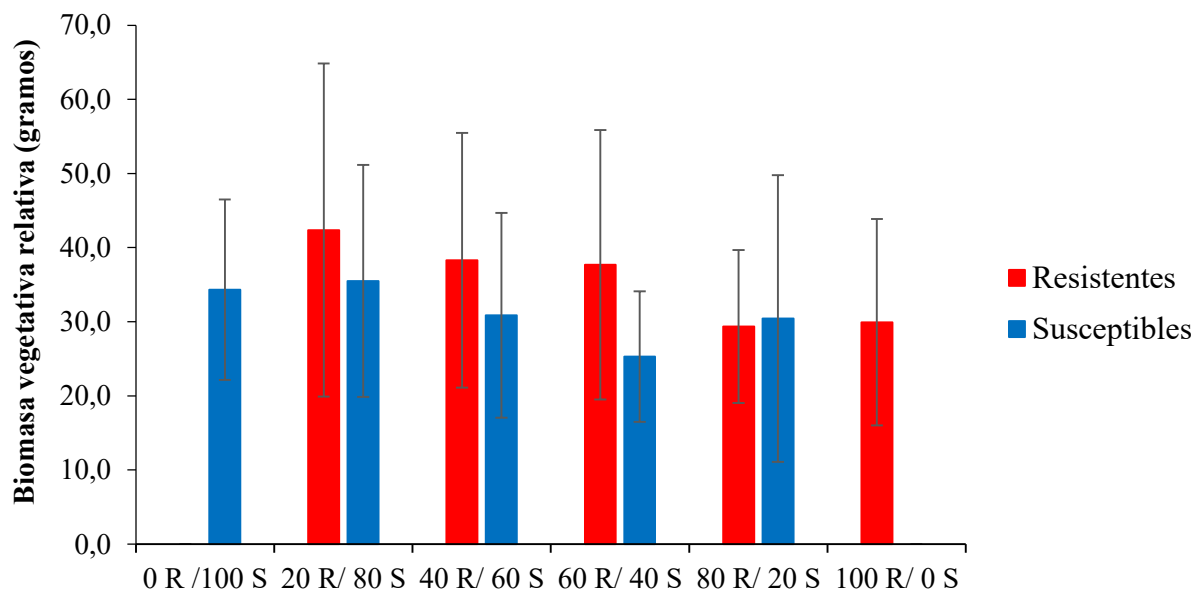


Figura 8. Variación de la biomasa vegetativa producida por plantas de arroz resistente (R) y susceptible (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, según sus proporciones de siembra. Las barras de error indican la desviación estándar correspondiente a cada tratamiento.

Para la proporción de siembra 60R/40S, 40R/60S y 20R/80S el rendimiento relativo del biotipo resistente aumenta en comparación con el monocultivo, lo cual se puede observar por la forma convexa de la recta del RY (R), en tanto se mantuvo igual al promedio en la proporción 80R/20S (Figura 9). En tanto, el rendimiento relativo del biotipo susceptible disminuyó en las proporciones de siembra 80R/20S, 60R/40S y 40R/60S, formando una curva cóncava en estas proporciones de siembra, y se mantuvo similar al monocultivo en la proporción 20R/80 (Figura 9). Los valores de AI señalan un aumento neto del rendimiento relativo del biotipo resistente, al ser significativos y mayores que cero (Cuadro 6).

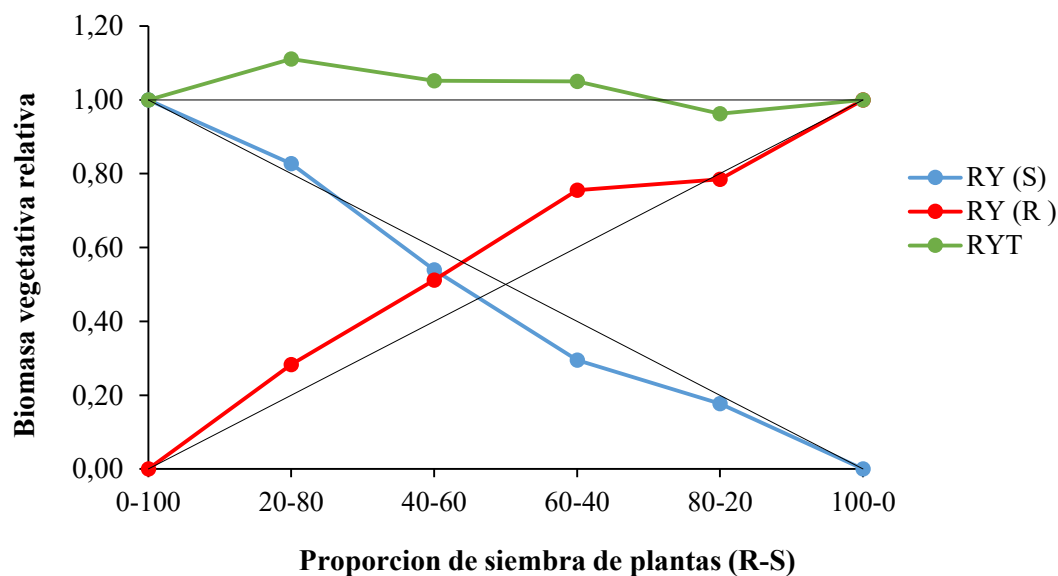


Figura 9. Rendimiento relativo (RY) y total (RYT) de la biomasa vegetativa producida por plantas resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, según sus proporciones de siembra. Los valores esperados se representan con líneas negras.

Cuadro 6. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionada a la biomasa vegetativa, en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, en diferentes proporciones de siembra.

Proporción de siembra	IA	Rendimiento Relativo
80R/20S	0,07*	S disminuye
60R/40S	0,26*	R aumenta/S disminuye
40R/60S	0,19*	R aumenta/S disminuye
20R/80S	0,19*	R aumenta

AI: índice de agresividad (diferencias del 0,07 con respecto de 0 se consideran relevantes y se marcan con *).

7.2.4. Número de espigas

La medición del número de espigas de las plantas se realizó cuando las plantas alcanzaron la madurez, en el día 115 de edad de las mismas. El biotipo resistente y susceptible no presentó diferencias en el número de espigas en condiciones de monocultivo (Figura 10).

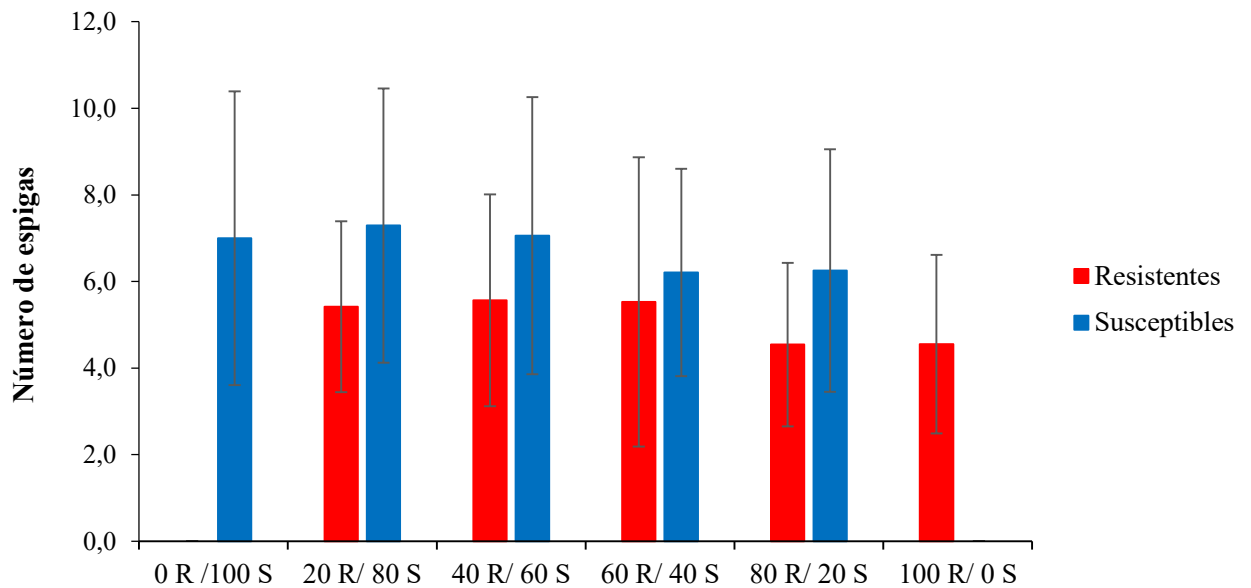


Figura 10. Variación del número promedio de espigas producida por plantas de arroz resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, sembradas en diversas proporciones de competencia. Las barras de error indican la desviación estándar correspondiente a cada tratamiento.

En la proporción de siembra 20R/80S, 40R/80S y 60R/40S aumentó el rendimiento relativo de espigas del biotipo resistente con respecto al monocultivo, lo cual se visualiza como una

curva convexa en la recta RY(R). En tanto, en la proporción 80R/20S el rendimiento relativo de culmos se mantuvo constante con relación al monocultivo (Figura 11). En el caso del rendimiento relativo de espigas con respecto al biotipo susceptible, este disminuyó con respecto al monocultivo en las proporciones de siembra 80R/20S y 60R/40S conformando una curva cóncava en la recta RY(S), y no varió en las proporciones de siembra 40R/60S y 20R/60S, siendo la línea observada similar a la esperada en este punto. El rendimiento relativo total (RYT) de las plantas no varió significativamente respecto al valor esperado (Figura 11). Los valores de AI señalan un aumento neto de los rendimientos relativos del biotipo resistente, al ser mayores que cero y significativos (Cuadro 7).

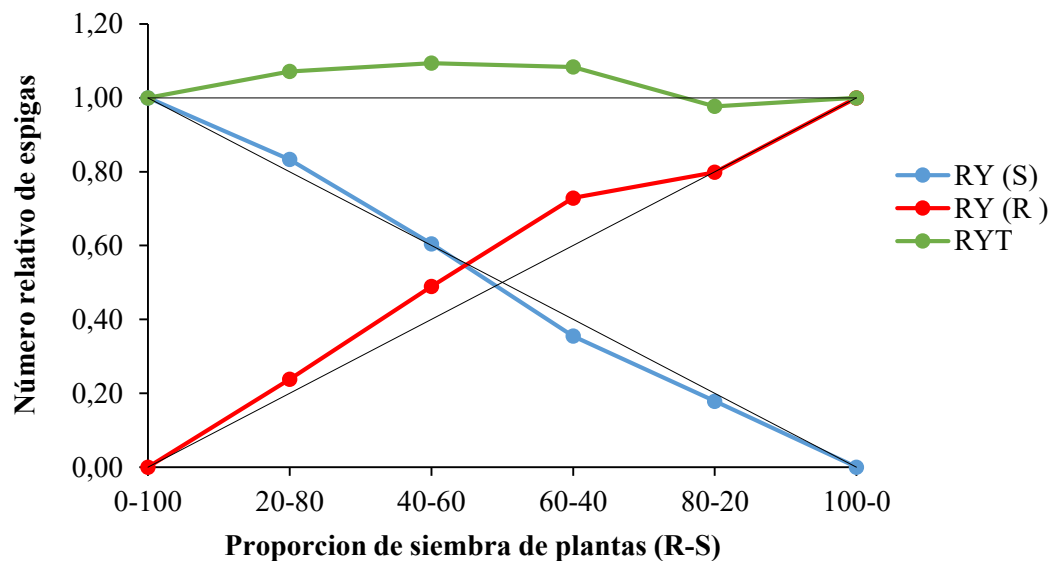


Figura 11. Rendimiento relativo (RY) y total (RYT) en el número de espigas en plantas de biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, según sus proporciones de siembra. Los valores esperados se representan con líneas negras.

Cuadro 7. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionada al número promedio de espigas en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, en diferentes proporciones de siembra

Proporción de siembra	IA	Competitividad de los biotipos
80R/20S	0,07*	S disminuye
60R/40S	0,16*	R aumenta/S disminuye
40R/60S	0,11*	R aumenta
20R/80S	0,07*	R aumenta

AI: índice de agresividad (diferencias del 0,07 con respecto de 0 se consideran relevantes y se marcan con *).

7.2.5. Semillas llenas

El conteo del número de semillas se realizó un vez cosechadas las plantas, cuando alcanzaron su madurez (115 DDS). El número de semillas totales no fue afectado por la proporción de siembra (Figura 12 y 13). Sin embargo, el biotipo resistente consistentemente produjo más semillas llenas que el biotipo susceptible en todos los tratamientos.

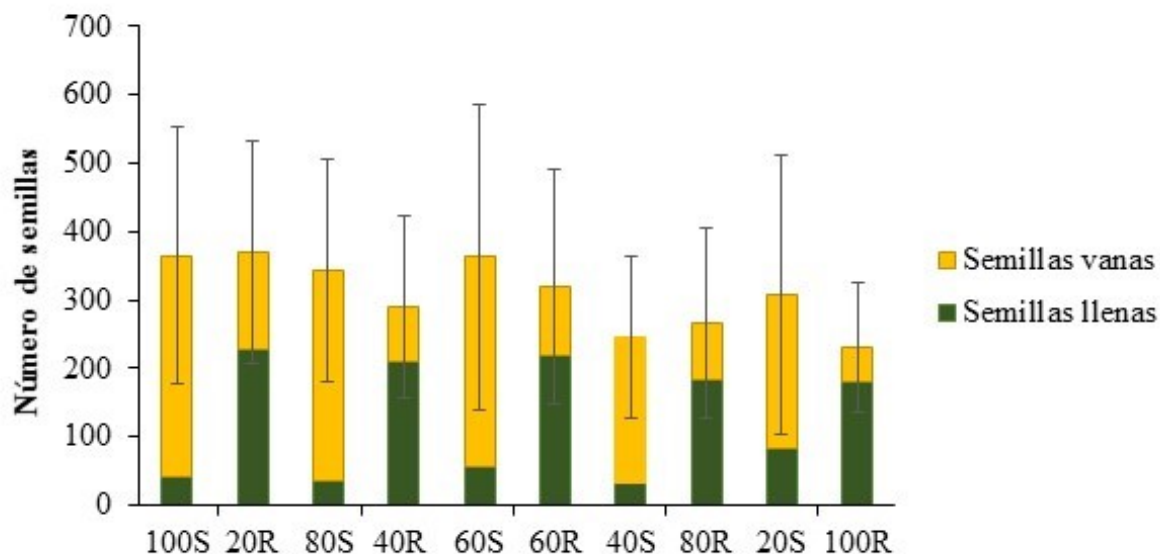


Figura 12. Variación del número de semillas totales, llenas y vanas promedio correspondiente a plantas de arroz resistente (R) y susceptible (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, en diversas proporciones de siembra.

En las proporciones de siembra 60R/40S, 40R/60S y 20R/80S aumentó el rendimiento relativo de la semilla llena, con respecto al monocultivo. Este comportamiento se puede visualizar en la Figura 13, en la cual la recta RY(R) tiene forma convexa en las proporciones indicadas. Para la proporción 80R/20S, el biotipo resistente mantiene un rendimiento relativo similar al monocultivo.

Para las proporciones de siembra 80R/20S y 40R/60S, el rendimiento relativo del biotipo susceptible a las imidazolinonas aumenta, lo que se denota en la forma convexa de la recta RY(S) para esos puntos; sin embargo, para la proporción 60R/40S el rendimiento disminuye,

conformando una curva cóncava para la recta RY(S) (Figura 13), por lo cual la recta RY(S) no presenta un patrón de variación definido. El rendimiento relativo total (RYT) aumenta significativamente en las proporciones de siembra 40R/60S y 80R/20S.

Los valores del IA corresponden con estas observaciones (Cuadro 8). Para la proporción de siembra 40R/60S el rendimiento relativo de ambos biotipos aumentó; sin embargo, el IA es negativo debido a que el rendimiento del biotipo susceptible fue superior al resistente.

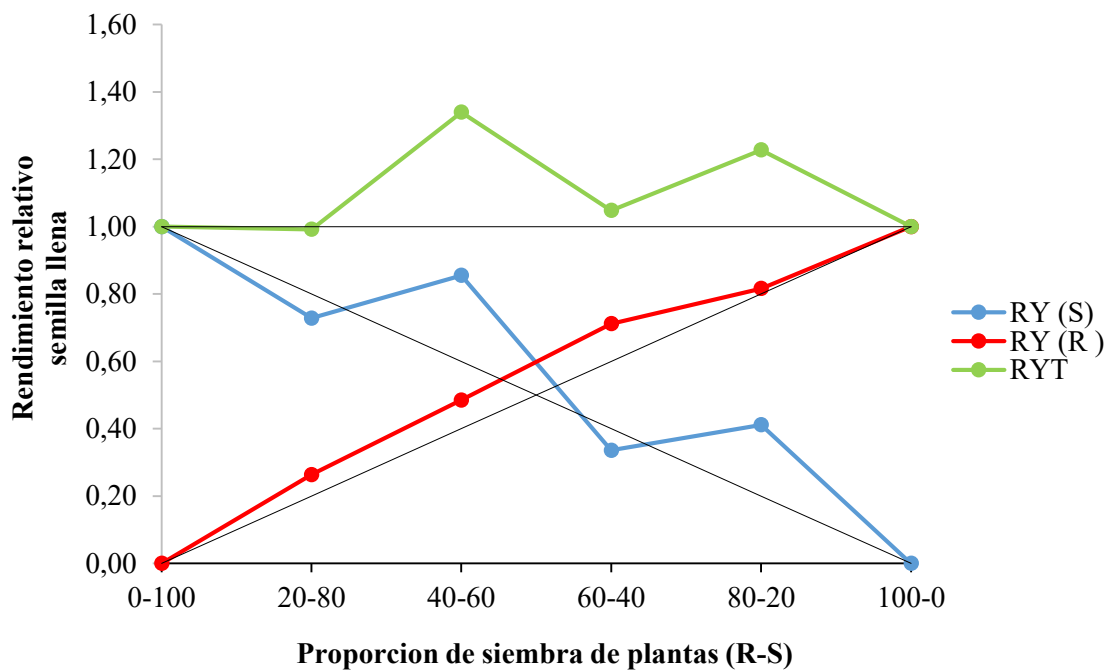


Figura 13. Rendimiento relativo (RY) y rendimiento total (RYT) del número de semillas llenas en plantas de arroz que alcanzaron la madurez, para diferentes proporciones de siembra de biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas. Los valores esperados se representan con líneas negras.

Cuadro 8. Índice de agresividad (AI) y competitividad relacionada al número de semilla llena en biotipos resistentes (R) y susceptibles (S) a las imidazolinonas que alcanzaron la madurez, en diferentes proporciones de siembra

Proporción de siembra	AI	Competitividad de los biotipos
80R/20S	-0,52*	S aumenta
60R/40S	0,17*	R aumenta
40R/60S	-0,11*	Ambos biotipos aumentaron
20R/80S	0,20*	

AI: índice de agresividad (diferencias del 0,07 con respecto de 0 se consideran relevantes y se marcan con *).

8. Discusión

Las diferencias en la proporción de siembra en el cultivo de híbridos resistentes y susceptibles a las imidazolinonas afectaron el crecimiento vegetativo de las plantas, en especial el número de culmos y la biomasa, en tanto la altura de las plantas no fue afectada por las proporciones de siembra de los biotipos. Las variables relacionadas con el rendimiento reproductivo, tales como número de espigas, número de semilla total y semilla llena también fueron afectadas por las proporciones de siembra. Esto muestra que entre biotipos híbridos de arroz rojo y arroz comercial Clearfield ® creciendo en competencia existen interacciones que afectan negativamente el crecimiento de los híbridos que portan el alelo silvestre, en tanto favorecen el rendimiento de los híbridos que portan el alelo resistente. Diversos estudios que evalúan el efecto de los arrozales malezas en cultivos comerciales de arroz en condiciones de competencia señalan un descenso en el rendimiento del arroz comercial bajo estas condiciones (Estorninos *et al.* 2000, Estorninos *et al.* 2002, Estorninos *et al.* 2005, Vidotto

& Ferrero 2009, Sales *et al.* 2011, Dai *et al.* 2014); sin embargo, no se reportan experimentos previos en los cuales se hayan comparado biotipos de malezas resistentes y susceptibles a las imidazolinonas. Un estudio de series de reemplazo realizado por Bagavathiannan *et al.* (2011) entre biotipos resistentes y susceptibles a herbicidas con propanil y clomazona como compuesto activo, pertenecientes a la especie *Echinochloa crus-galli* no encontró diferencias significativas en la habilidad competitiva de los biotipos relacionados que puedan relacionarse a una penalización del rendimiento. Así, el presente experimento plantea preguntas interesantes acerca de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que provocan la penalización del rendimiento del biotipo portador del alelo silvestre, en comparación con el biotipo resistente.

8.1. Altura de las plantas

La proporción de siembra de los biotipos resistentes y susceptibles a las imidazolinonas no afectó el rendimiento relativo de la altura de las plantas con respecto al monocultivo, por lo que ambos biotipos son igualmente competitivos para el rasgo de altura. Este tipo de respuesta es definido como tipo Modelo I por Harper (1977), el cual indica que los biotipos en competencia responden de manera similar a la interferencia recíproca, lo cual puede atribuirse a que las necesidades ambientales de ambos tipos de plantas son similares, al tiempo que presentan capacidades similares para la obtención de recursos.

Es probable que el trasfondo genético similar de los biotipos en competencia utilizados en este estudio, al provenir de una misma planta madre, compartan alelos similares relacionados a genes que determinan el tamaño, a pesar de ser este rasgo multifactorial (Ishimaru *et al.*

2004, Kovi *et al.* 2011, Yan *et al.* 2011, Wu *et al.* 2015). Los arrozales maleza están sujetos a una fuerza de selección artificial con respecto a su altura, debido que las plantas que presentan tamaños sobresalientes con respecto al arroz cultivado son detectadas y eliminadas de manera más eficiente por los agricultores, que aquellas que poseen tamaño similar al cultivo (Delouche *et al.* 2007), por lo cual portar alelos relacionados a una altura estándar se relacionan a una mayor sobrevivencia, y pueden verse aumentados en las poblaciones de arvenses al tiempo que se disminuye la diversidad del pool genético (Hartl 2000). La altura promedio del arroz comercial CFX-18 es de 93 cm (Tinoco & Acuña 2008), semejante al promedio de altura alcanzado por el biotipo resistente y susceptible a las imidazolinonas en este experimento, lo cual refuerza la hipótesis acerca de una fuerte selección en el campo que está originando malezas de tamaños similares entre sí y con el cultivo comercial.

8.2. Culmos

El número promedio de culmos en condiciones de monocultivo se mantuvo similar para ambos biotipos durante todo el ciclo de vida de las plantas; sin embargo, en condiciones de cultivo mixto se dieron diferencias con respecto a las proporciones de siembra a través del tiempo, lo cual indica que hay interferencia sobre las plantas en competencia que causa variación sobre la producción de culmos. Durante la primera etapa de crecimiento de las plantas (primeros 36 DDS) el biotipo susceptible mostró un rendimiento relativo significativamente mayor con respecto al monocultivo que el biotipo resistente; no obstante, esta situación cambió durante la segunda etapa del crecimiento de las plantas (del 36 al 73

DDS), en donde ambos biotipos mostraron un aumento significativo del número de culmos con respecto al monocultivo.

La medición del rendimiento relativo de culmos realizado en la madurez muestra que el biotipo resistente tiene mayor rendimiento relativo que el biotipo susceptible en las diferentes proporciones de siembra a la que se sometieron. Este resultado sugiere que las plantas susceptibles muestran un crecimiento más acelerado que las plantas resistentes durante la primera etapa del crecimiento, que sin embargo se nivela durante la segunda etapa de crecimiento de las plantas y finalmente es superado por el biotipo resistente en la madurez. Se observa que el rendimiento relativo del biotipo resistente en la madurez aumenta conforme disminuye la proporción de siembra de este biotipo en competencia, lo cual se relaciona con la Ley de Rendimiento Recíproco (Reciprocal Yield Law) que consiste en que a mayor proporción de individuos similares por área disminuye el rendimiento de los mismo, lo cual puede atribuirse una mayor competencia intraespecífica (relativa a plantas pertenecientes al mismo biotipo que tienen las mismas exigencias nutricionales y ambientales) que limita los recursos ambientales disponibles (Radosevich *et al.* 2007).

El tipo de gráfico que muestra el rendimiento relativo de culmos en la madurez de las plantas es similar al denominado por Harper (1977) como Modelo tipo II, en la cual se interpreta que la influencia del biotipo resistente sobre el biotipo susceptible es mayor que la influencia ejercida de manera inversa, de manera que el biotipo resistente muestra mayor competitividad. Un aumento del número de culmos o macollamiento de las plantas aumenta la competitividad debido a que aumenta el área foliar de la planta (Estorninos *et al.* 2002), y con eso la producción fotosintética. A su vez, Burgos *et al* (2006) señala que el arroz maleza

es más eficiente captando nitrógeno que utiliza en la producción de biomasa, gracias a que posee un mejor sistema de enraizamiento y producción continua de culmos en comparación con las variedades comerciales, lo que garantiza un gradiente de difusión constante de nitrógeno a los nuevos brotes. Por lo tanto, que el biotipo resistente tenga un mayor número de culmos se traduce en mayor competitividad en comparación con el biotipo susceptible. Mennan *et al.* (2012) sugiere que la habilidad de producir culmos es más determinante para el éxito de la planta que la altura y otras variables.

8.3. Biomasa vegetativa

La biomasa vegetativa de los biotipos en competencia no varió en condiciones de monocultivo. En la siembra mixta de arroces malezas sí hubo diferencias en el rendimiento de ambas variables, siendo el biotipo resistente el que mostró mayor rendimiento relativo en comparación con el monocultivo. El rendimiento relativo de la biomasa en biotipos resistentes aumentó conforme disminuyó la proporción de siembra, lo cual puede atribuirse a una disminución en la competencia intraespecífica que favorece el desarrollo de los individuos cuando hay menor proporción del mismo biotipo (Radosevich *et. al.* 2007). Esto coincide con lo señalado por Fleming *et al* (1988), en donde menciona que la especie más competitiva aumenta su masa conforme aumenta la proporción de siembra de la especie menos agresiva.

La mayor competitividad del biotipo resistente en referencia al rendimiento de biomasa vegetativa puede explicarse gracias a la mayor competitividad de culmos que presenta ese mismo biotipo. Mayor número de culmos se traduce en mayor cantidad de biomasa por planta (Burgos *et al* 2006).

8.4. Número de espigas

El número de espigas de los biotipos en competencia no varió en condiciones de monocultivo. En la siembra mixta de arroces malezas sí hubo diferencias en el rendimiento de ambas variables. El rendimiento de espigas del biotipo resistente aumentó en comparación con el monocultivo conforme disminuyó la competencia intraespecífica, lo cual sigue el mismo patrón que la variación del biotipo resistente en el número de culmos y la biomasa vegetativa. Esta tendencia puede explicarse atribuirse a que durante la etapa reproductiva de la planta, el número de panículas es proporcional al número de culmos (Burgos *et al* 2006), debido a que cada culmo puede producir una inflorescencia que madura y se diferencia en una panícula. Así, si los biotipos resistentes al herbicida producen mayor cantidad de culmos en comparación con el biotipo susceptible, también producirán mayor cantidad de panículas en comparación.

8.5. Número de semillas

El número de semillas totales fue similar para ambos biotipos en los diferentes tratamientos. Sin embargo, el número de semillas llenas siempre fue mayor en las plantas resistentes en comparación con el biotipo susceptible, lo cual parece ser una característica intrínseca de ambos tipos de planta. Esto puede deberse a que la planta madre de la cual se originaron los biotipos resistentes y susceptibles utilizados en este estudio es un arroz maleza, los cuales poseen alta diversidad morfológica (Arrieta-Espinoza *et al.* 2005) y genética (Shivrain *et al.* 2010), por lo que se esperaría que cada tipo de planta posea diferentes conjuntos de alelos que tengan un impacto variable en la población. Algunos de los genes relacionados al llenado de semilla son *OsFIE2*, *OsSPL16* y *GS5* entre otros (Nallamilli *et al.* 2013, Wang *et al.* 2012 & Li 2011).

Se concluyó que el biotipo resistente produce un número mayor de semilla llena en comparación con el biotipo susceptible, lo cual fue un resultado esperable debido a que el biotipo resistente presentó mayor rendimiento en las variables vegetativas analizadas (exceptuando la altura) y en el número de panículas, lo cual es un patrón similar al encontrado en otros estudios (Eleftherohorinos *et al.* 2002, Cao *et al.* 2009).

9. Conclusiones

Los resultados de esta investigación son los primeros que se obtienen para comparar la adaptabilidad en condiciones de competencia de biotipos híbridos de arroz maleza y

Clearfield ® y que tengan un trasfondo genético similar pero con un genotipo de susceptibilidad (S) y resistencia (R) al herbicida imidazolinona. En las condiciones experimentales evaluadas, el biotipo resistente presenta mayor agresividad en condiciones de competencia que el biotipo susceptible, ya que presenta mayor número de culmos, biomasa vegetativa, número de panículas, número de semilla total y llena. Estos hallazgos contradicen la hipótesis de trabajo planteada inicialmente, con lo cual se esperaba que existiera alguna penalización en contra de las plantas que portaran el alelo mutado que otorga resistencia a las imidazolinonas (Al-Ahmad & Galili 2005), de manera que la resistencia al herbicida no afectó la competitividad de las plantas.

El biotipo resistente a las imidazolinonas es más competitivo que el biotipo susceptible, por lo cual podría aumentar su frecuencia en las poblaciones de malezas en el campo. Por lo tanto, los resultados producidos en esta investigación ponen en evidencia la necesidad de desarrollar estrategias de manejo que minimicen el surgimiento de híbridos entre arroz maleza y arroz comercial con resistencia a herbicidas.

Este tipo de información es valiosa para conocer el comportamiento y competitividad de los híbridos de arroz maleza y arroz comercial Clearfield ® CFX-18, debido a que puede ser una herramienta favorable para el desarrollo e implementación de futuras estrategias de manejo de arvenses (Gealy *et al.* 2005b), las cuales deben ser integrales para minimizar la aplicación de herbicidas imidazolinonas.

10. Recomendaciones

En este estudio se utilizaron plantas resistentes y susceptibles que provienen de una única planta madre, por lo que se espera que tengan un trasfondo genético similar entre sí. Esto puede ayudar a reducir las diferencias intrínsecas entre grupos, pero también hace necesario la implementación de mayor cantidad de plantas que representen con mayor fidelidad la diversidad presente en el grupo de arvenses, de manera que las conclusiones obtenidas sean hasta cierto punto extrapolables a lo que sucede en el campo. Asimismo, se hace necesario replicar estos análisis en condiciones de campo, para introducir las variables ambientales a las que están sujetas las plantas en cultivos arroceros al diseño experimental. Estas condiciones darán mayor fortaleza a este tipo de análisis.

11. Literatura citada

Al-Ahmad H. & S. Galili. 2005. Poor competitive fitness of transgenicall mitigated tobacco in competition with the wild type in a replacement series. *Planta*. 222: 372–385.

Arrieta-Espinoza, G., E. Sánchez, S. Vargas, J. Lobo, T. Quesada & A. M. Espinoza. 2005. The weedy rice complex in Costa Rica. I. Morphological study of relationships between commercial rice varieties, wild *Oryza* relatives and weedy types. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 575-587.

Auld, B. 1996. Criterios económicos para el desarrollo de manejo de malezas, p. 255-272. In R. Labrada, J.C. Caseley & C. Parker (eds.). *Manejo de malezas para países en desarrollo*. FAO, Italia.

Azmi, M., S. Azlan, F.W. Lim, K. Hadzim, V. George, S.E. Chew, A. Saad, H. Habibuddin & R. Yim. 2010. Effective control of weedy rice through imidazolinone-tolerant rice variety, p. 98-110. In S. Othman, M. Azmi, A. Mukthar, Z.A. Rahman, A.A- Razak, S. Hashim & W. Said (eds.). *Proc. Nat'l. Rice Conf.*, Malaysia.

Bagavathiannan, M.V., J.K. Norsworthy, P. Jha & K. Smith. 2011. Does resistance to propanil or clomazone alter the growth and competitive abilities of Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*)?. Weed Science. 59: 353-358.

Buehring, N.W. 2008. Clearfield ® Rice. Mississippi State University Extension Service. (Consultado el 29 de setiembre del 2013 en <http://msucares.com/pubs/publications/e0019.pdf>).

Burgos, N., K. Shivrain, A. Sales & M. Anders. 2005. Outcrossing potential of Clearfield ® rice varieties with red rice, 103-109. In R. J. Norman & T. H. Johnston (eds). B. R. Wells Rice Research Studies. Fayetteville: University of Arkansas Agriculture Experiment Station, Arkansas, USA.

Burgos N., R.J. Norman, D.R. Gealy & H. Black. 2006. Competitive N uptake between rice and weedy rice. Field Crops Research. 99: 96–105.

Burgos, N., R. Scott & J. Guice. 2007. Detectable gene flow in commercial rice fields and impact of Clearfield ® technology on red rice infestation. Proc. Annual Meeting Weed Sci. Soc. of Amer. 47: 300.

Busconi M., D. Rossi, C. Lorenzoni, G. Baldi & C. Fogher. 2012. Spread of herbicide resistant weedy rice (red rice, *Oryza sativa* L.) after 5 years of Clearfield ® rice cultivation in Italy. Plant Biol. 14: 751-759.

Cao Q., H. Xia, X. Yang & B. Lu. 2009. Performance of hybrids between weedy rice and insect-resistant transgenic rice under field experiments: implication for environmental biosafety assessment. Journal of Integrative Plant Biology. 51 (12): 1138–1148.

Chargoy Zamora, C. 2004. La medición agronómica de la eficiencia en el rendimiento de los cultivos múltiples, p. 110-117. In J. Chavez-Servia, J. Tuxill & D. Jarvis (eds.). Manejo de la diversidad de los cultivos en los sistemas tradicionales. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia.

Chen, J., S. Lee, Z. Song, S. Suh & B. Lu. 2004. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. Ann. Bot. 93:67-73.

CONARROZ. 2006. Laboratorio de Control de calidad. (Consultado el 11 de mayo del 2013 en http://www.conarroz.com/index.php?option=com_content&view=article&id=64&Itemid=89).

CONARROZ. 2015. Informe estadístico, período 2013/2014. (Consultado el 14 de noviembre del 2015 en http://www.conarroz.com/UserFiles/File/INFORME_ANUAL_ESTADISTICO_2013%2014.pdf).

Cousens, R. 1991. Aspects of the design and interpretation of competition (interference) experiments. *Weed Technology*. 5: 664-673.

Cousens, R. & M. O'Neill. 1993. Density dependence of replacement series experiments. *Oikos*. 66: 347-352.

Coustau, C., C. Chevillon & R. French-Constant. 2000. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends in Ecology & Evolution*. 15 (9): 378-383.

Croughan, T. P. 2003. Clearfield ® rice: It's not a GMO. *Louisiana Agriculture*. 46 (4): 24-26.

Croughan, T. P. 2008. Resistance to acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicides in rice. Patent No.:US7399905B2.

Dai, L., W. Dai, X. Song, B. Lu & S. Qiang. 2014. A comparative study of competitiveness between different genotypes of weedy rice (*Oryza sativa*) and cultivated rice. *Pest Manag Sci*. 70: 113–122.

De Alba, J. 1964. Reproducción y Genética Animal. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Turrialba, Costa Rica.

Delouche, J., N. Burgos, D. Gealy, G. Zorrilla & R. Labrada. 2007. Arroces maleza: Origen, biología, ecología y control. FAO, Italia.

Eleftherohorinos, I., K. Dhima & I. Vasilakoglou. 2002. Interference of red rice in rice grown in Greece. *Weed Science*. 50: 167–172.

Estorninos L.E., D.R. Gealy & R.E. Talbert. 2000. Interference between red rice and rice in a replacement series study. *Arkansas Agricultural Experiment Station Mimeograph Series*. 476: 463-468.

Estorninos, L.E., D.R. Gealy, & R.E. Talbert. 2002. Growth Response of rice (*Oryza sativa*) and red rice (*O. sativa*) in a replacement series study. *Weed Technology*. 16: 401–406.

Estorninos, L.E., D.R. Gealy, E. Gbur, R.E. Talbert & M. McClelland. 2005. Rice and red rice interference. II. Rice response to population densities of three red rice (*Oryza sativa*) ecotypes. *Weed Science*. 53: 683–689.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2002. Agricultura mundial hacia los años 2015/2020. (Consultado el 11 de mayo del 2013 en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/004/y3557S/y3557s00.pdf>).

FAO (Food and Agriculture Organization). 2005. Perspectivas agrícolas OCDE – FAO 2005-2014. FAO, Italia.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2015. Seguimiento del mercado de arroz de la FAO, octubre del 2015. (Consultado el 23 de noviembre del 2015 en <http://www.fao.org/economic/est/publicaciones/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>).

Fernández, O. 1982. Manejo Integrado de malezas. Planta Daninha. 2: 69-79.

Fleming, G. F., F. L. Young & A. G. Ogg, Jr. 1988. Competitive relationships among winter wheat (*Triticum aestivum*), jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*), and downy brome (*Bromus tectorum*). Weed Sci. 36: 479–486.

Franquet, J.M. & C. Borrás. 2004. Variedades y mejora del arroz (*Oryza sativa*, L). Universidad Internacional de Cataluña, Cataluña, España.

Gealy, D. 2005a. Gene movement between rice (*Oryza sativa*) and weedy rice (*Oryza sativa*) – A U.S. temperate rice perspective, p. 323-354. In J. Gressel (ed). Crop ferality and volunteerism. CRC Press, Taylor and Francis Group, Miami, USA.

Gealy, D., L. Estorninos, E. Gbur & R. Chavéz. 2005b. Interference interactions of two rice cultivars and their F3 cross with barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in a replacement series study. Weed Science. 53: 323–330.

Gressel, J. & B. Valverde. 2009. A strategy to provide long-term control of weedy rice while mitigating herbicide resistance transgene flow, and its potential use for other crops with related weeds. Pest Manag. Sci. 65: 723-731.

Hartl, D. 2000. A primer of population genetics. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA.

Hamilton, P., R. Evert & S. Eichhorn. 1992. Biología de las plantas: vol. 2. Editorial Reverté, Barcelona, España.

Harper J. L. 1977. Population Biology of plants. Academic Press, London, England.

Herrera, W. 1985. Clima de Costa Rica: Vegetación y clima de Costa Rica. Ed. UNED. San José. Costa Rica.

Holzner, W. 1978. Weed species and weed communities, p. 119-126. In E. Vender and M. Werger (eds). Plant species and plant communities. Boston, USA.

Ishimaru K, K. Ono & T. Kashiwagi. 2004. Identification of a new gene controlling plant height in rice using the candidate-gene strategy. *Planta*. 218: 388-395.

Kadaru, S., W. Zhang, A. Yadav & J. Oard. 2008. Development and application of allele-specific PCR assays for imazethapyr resistance in rice (*Oryza sativa*). *Euphytica*. 160: 431-438.

Kaloumenos, N. S., N. Capote, A. Aguado & I. G. Eleftherohorinos. 2013. Red rice (*Oryza sativa*) cross-resistance to imidazolinone herbicides used in resistant rice cultivars grown in northern Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 105: 177–183.

Kharkwal M. C & Q.Y. Shu. 2009. Induced plant mutations in the genomics era. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.

Kovi, M. R., Y. Zhang, S. Yu, G. Yang, W. Yao & Y. Xing. 2011. Candidacy for a chitin-inducible gibberelin-responsive gene for a major locus affecting plant height in rice that is closely linked to Green Revolution gene *sd1*. *Theor Appl Genet*. 123: 705-714.

Labrada R. & C. Parker. 1996. El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas, p. 3-10. In R. Labrada, J.C Caseley & C. Parker (eds.). Manejo de malezas para países en desarrollo. FAO, Italia.

Li, Y. C. Fan, Y. Xing, Y. Jiang, L. Luo, L. Sun, D. Shao, C. Xu, X. Li, J. Xiao, Y. He & Q. Zhang. 2011. Natural variation in GS5 plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nature Genetics*. 43: 1266–1269.

Lodhi, M. A., Y. Guang-Ning, N. F. Weeden & B. I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12: 6-13.

McGilchrist C. A. 1965. Analysis of competition experiments. *Biometrics*. 21 (4): 975-985.

McGilchrist C.A. & B.R. Trenbath. 1971. A Revised Analysis of Plant Competition Experiments. *Biometrics*. 27 (3): 659-671.

Mennan H., M. Ngouajio, M. Sahin, D. Is & E. K. Altop. 2012. Competitiveness of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars against *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. in water-seeded production systems. *Crop Protection*. 41: 1-9.

Menchari, Y., B. Chauvel, H. Darmency & C. Délye. 2008. Fitness cost associated with three mutant acetyl-coenzyme A carboxylase alleles endowing herbicide resistance in black-grass *Alopecurus myosuroides*. *Journal of applied ecology*. 45: 939-947.

Montealegre, F. & J. Vargas. 1989. Efecto de algunas prácticas culturales sobre la población de arroz rojo y los rendimientos del arroz comercial. *Arroz*. 38 (359): 19-24.

Moody, K. 1996. Manejo de malezas en arroz, p. 265-272. In Labrada R., Caseley J.C. & C. Parker (eds.). *Manejo de malezas para países en desarrollo*. FAO, Italia. 403 p.

Nallamilli B. R., J.Zhang, H. Mujahid, B. Malone, S. Bridges & Z. Peng. 2013. Polycomb group gene OsFIE2 regulates rice (*Oryza sativa*) seed development and grain filling via a mechanism distinct from *Arabidopsis*. *PLOS Genetics*. 9 (3): e1003322.

Ping Song Z., B.R. Lu, B. Wang & J. Kuan Chen. 2004. Fitness estimation through performance comparison of F1 hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O. sativa*. *Ann. Bot.* 93: 311-316.

PROARROZ. 2015. Puita INTA CL. Arroz resistente a herbicida. Disponible en: <http://proarroz.com.ar/informacion-de-interes/variedades-de-arroz/puita-inta-cl>

Radosevich S., J. Holt & C. Ghersa. 2007. *Ecology of weeds and invasive plants: relationship to agricultura and natural resource management*, 3° edition. Wiley Interscience. New Jersey, USA.

Rangel, P.H.N., F. P.M. Neto, P.R.R. Fagundes, Jr. A.M de Magalhaes, O.P. de Moraes, A.B. Schmidt, J.A. Mendonca, C.M. Santiago, P.N. Rengel, V. dos A. Cutrim & M.E. Ferreira. 2010. Development of herbicide-tolerant irrigated rice cultivars. *Pesq. Agropecu. Bras.* 45: 701-708.

Roso, A. C., A. Merotto, C. A. Delatorre & V. G. Menezes. 2010. Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. *Field Crops Research*. 119:175–182.

Roux, F., J. Gasquez & X. Reboud. 2004. The dominance of the herbicide resistance cost in several *Arabidopsis thaliana* mutant lines. *Genetics*. 166: 449-460.

Sales. M.A, N, Burgos, V.K. Shivrain, B. Murphy & E. Gbur. 2011. Morphological and physiological responses of weedy red rice (*Oryza sativa* L.) and cultivated rice (*O. sativa*) to N supply. *American Journal of Plant Sciences*. 2: 569-577

Scarabel, L., C. Cenghialta, D. Manuello & M. Sattin. 2012. Monitoring and management of imidazolinone-resistant red rice (*Oryza sativa* L. var. *sylvatica*) in Clearfield Italian paddy rice. *Agronomy*. 2(4): 371-383.

Shivrain, V., N. Burgos, K. Moldenhauer, R. McNew & T. Baldwin. 2006. Characterization of spontaneous crosses between Clearfield® rice (*Oryza sativa*) and red rice (*Oryza sativa*). Weed Technology 20 (3): 576-584.

Shivrain, V., N. Burgos, M. Anders, S. Rajguru, J. Moore & M. Sales. 2007. Gene flow between Clearfield® rice and red rice. Crop Protection. 26: 349 -356.

Shivrain, V., N. Burgos, D. Gealy, M. Sales & K. Smith. 2009. Gene flow from weedy red rice (*Oryza sativa* L.) to cultivated rice and fitness of hybrids. Pest Manag Sci. 65: 1124-1129.

Shivrain V., N. Burgos, R. Scott, E. Gbur Jr., L. Estorninos Jr. & M. McClelland. 2010. Diversity of weedy red rice (*Oryza sativa* L.) in Arkansas, U.S.A. in relation to weed management. Crop Protection. 29: 721-730.

Tan, S., R. Evans, M. Dahmer, B. Singh & D. Shaner. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. Pest Manag Sci. 61: 246-257.

Tinoco R. & A. Acuña. 2008. Manual de recomendaciones del cultivo de arroz. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia Tecnológica Agropecuaria. San José, Costa Rica.

Valverde, B., C. Riches & J. Caseley. 2000. Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona*. Cámara de Insumos Agropecuarios, San José, Costa Rica.

Valverde, B. 2005. Flujo de genes de cultivos resistentes a herbicidas a malezas emparentadas: Experiencias con el arroz (*Oryza* spp.), p. 110-128. In Proc. Resistencia a Herbicidas y Cultivos Transgénicos, Uruguay.

Vila-Aiub, M., P. Neve & F. Roux. 2011. A unified approach to the estimation and interpretation of resistance cost in plants. Heredity. 107: 386-394.

Villa, S., E. Marchezan, L. Avila, P. Massoni, G. Telo, S. Machado & E. Camargo. 2006. Imidazolinone-tolerant rice: red rice control, out-crossing and herbicide carryover to non tolerant crops. Planta Daninha. 24: 761-768.

Vidotto F. & A. Ferrero. 2009. Interactions between weedy rice and cultivated rice in Italy. Ital. J. Agron. 4: 127-136.

Wang S., K. Wu, Q. Yuan, X. Liu, Z. Liu, X. Lin, R. Zeng, H. Zhu., G. Dong, Q. Qian, G. Zhang & Xi. Fu. 2012. Control of grain size, shape and quality by OsSPL16 in rice. Nature Genetics. 44: 950–954.

Wu B, D. Mao, T. Liu, Z. Li & Y. Xing. 2015. Two quantitative trait loci for grain yield and plant height on chromosome 3 are tightly linked in coupling phase in rice. *Mol Breeding*. 35: 156.

Zhang, W., S. Linscombe, E. Webster, S. Tan & J. Oard. 2006. Risk assessment of the transfer of imazethapyr herbicide tolerance from Clearfield ® rice to red rice (*Oryza sativa*). *Euphytica*. 152: 75-86.

Yan W. H., P. Wang, H. Chen, H. Zhou, Q. P. Li, C.R. Wang, Z. H. Ding, Y. S. Zhang, S.B. Yu, Y.Z. Xing & Q.F. Zhang. 2011. A major QTL, Ghd8, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice. *Molecular Plant*. 4 (2): 319-330.

12. Anexos

Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN genómico total de Lodhi y colaboradores (1994) modificado para arroz.

1. Agregar 500µl de buffer de extracción (Tris-HCl, CTAB 2%, 2-mercaptoetanol) al tejido macerado e incubar durante 30min a 60°C.
2. Agregar 500 µl de cloroformo: octanol (24:1), mezclar por inversión de tubo.
3. Centrifugar durante 6 min a 8000 rpm. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
4. Agregar 1/10 de acetato de sodio (3M) y 2 vol de etanol frio (95%).
5. Refrigerar a -20°C durante 15-20 min.
6. Centrifugar durante 3 min a 3000 rpm y luego durante 3 min a 5000 rpm.
7. Descartar sobrenadante. Lavar el “pellet” con etanol frio (76%).
8. Centrifugar durante 6 min a 5000 rpm y descartar el sobrenadante.
9. Secar (evaporar etanol) a 37 °C durante 30 min.
10. Disolver el ADN en 50µl de TE (Tris-EDTA) e incubar durante 15 min a 50 °C.
11. Cuantificar la concentración de ADN en Nanodrop.
12. Almacenar a corto plazo a -20 °C y a largo plazo a -70°C.