

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

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

**Hibridación entre biotipos de arroz maleza y variedades resistentes a
imidazolinonas: análisis morfológico y vigor híbrido**

Elena Vásquez Céspedes
A56014

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
2015

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

M.Sc. Griselda Arrieta Espinoza

Directora de tesis

Dr. Eric Fuchs Castillo

Lector de tesis

Dr. Federico Albertazzi Castro

Lector de tesis

Dra. Marta Valdez Melara

Miembro del Tribunal

Dra. Laura Solís Ramos

Presidente del Tribunal

Elena Vásquez Céspedes

Postulante

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mi comité de tesis: Griselda Arrieta, Eric Fuchs y Federico Albertazzi. Por su guía y apoyo durante la realización de este estudio.

A Bernal Valverde, por compartir su conocimiento sobre malezas asociadas al cultivo del arroz, así como por la facilitación del herbicida para la aplicación en las plantas.

A Ricardo Alvarado, por su gran ayuda, amabilidad y accesibilidad ante mis dudas estadísticas.

A mis compañeros de laboratorio y asistentes: Daniela Salazar, Daniel Corrales, Adriana Orozco, Eddier Villalobos, Cindy Aguilar, Kimberly Valverde y Marcela Turcios. Por toda la colaboración brindada en el laboratorio e invernaderos, así como por su amistad durante estos años.

A Lisela Moreira, William Villalobos, Mauricio Montero, Laura Garita, Beatriz Ortiz y Heidy-Lalo Villalobos. Por la constante motivación para la finalización de este trabajo.

Al personal del CIBCM: Susan, Heydi, Fran, Elida, Ronal y Dago. Por toda su colaboración durante mi permanencia en este Centro de Investigación.

Al personal del CIGRAS: Ramiro Alizaga, Carlos Hernández, Verónica Campos y Guillermo Solano. Por el préstamo de equipo e instalaciones y su amabilidad ante cualquier duda o contratiempo.

A Wendy Solís, Marcela Vásquez, Ana Catalina Sánchez y Gilbert Barrantes. Por sus valiosos comentarios y su apoyo en todo momento.

A mis padres y hermanos, por toda su ayuda y su ejemplo, por lo cual, siempre estaré agradecida.

A mis amigos, y a todos los me motivaron para seguir hasta el final.

¡Muchas Gracias!

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación.....	5
4. Hipótesis y predicciones	6
5. Objetivos	6
5.1. Objetivo general	6
5.2. Objetivos específicos	7
6. Materiales y métodos	7
6.1. Sitio de estudio	7
6.2. Material vegetal	7
6.3. Producción de plantas híbridas mediante cruces manuales dirigidos entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas	9
6.4. Germinación y siembra de semilla híbrida	11
6.5. Caracterización morfológica de las plantas híbridas	11
6.6. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico total	12
6.7. Confirmación de la naturaleza híbrida de las plantas por PCR	12
6.8. Evaluación fenotípica de resistencia al herbicida	14
6.9. Análisis de datos	16
7. Resultados	17
7.1. Obtención de plantas híbridas mediante cruces manuales dirigidos entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas	17
7.2. Caracterización morfológica de las plantas híbridas (H1 y H2) y líneas parentales durante el crecimiento vegetativo y madurez	19
7.2.1. Altura de la planta	19
7.2.2. Número de brotes	23
7.2.3. Número de panículas, ancho de la hoja bandera, longitud de panícula, semilla total y semilla llena	27
7.2.4. Determinación del período de floración	30
7.3. Confirmación de la naturaleza híbrida de las plantas por PCR	32

7.4. Evaluación fenotípica de resistencia al herbicida	35
8. Discusión	40
9. Conclusiones	48
10. Recomendaciones	49
11. Literatura citada	50
12. Anexos	60

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Procedimiento para realizar cruces manuales producidos en invernadero: 1) espiguilla de arroz; 2) corte de palea y lema en espiguilla; 3 y 4) emasculación: eliminación de las anteras mediante succión a través de una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío; 5) polinización: contacto directo de la panícula donadora de polen con la panícula emasculada, 6) etiquetar y proteger la panícula con bolsa microperforada 10
- Figura 2.** Altura promedio (cm) de las plantas híbridas, resultantes del cruce de arroz maleza y variedad CFX-18 (líneas punteadas), y plantas parentales (líneas continuas), en fase vegetativa y en madurez (mad). En la esquina superior derecha de cada gráfico se muestra el resultado del análisis estadístico ANOVA..... 20
- Figura 3.** Altura promedio (cm) de las plantas híbridas, resultantes del cruce de arroz maleza y variedad Puitá INTA (líneas punteadas), y plantas parentales (líneas continuas), en fase vegetativa y en madurez (mad). En la esquina superior derecha de cada gráfico se muestra el resultado del análisis estadístico ANOVA. 21
- Figura 4.** Número de brotes promedio (\pm error estándar) en híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad CFX-18 en primera (C1) y segunda generación (C2), y sus respectivas líneas parentales (020, 120, 023 y 121), en la fase vegetativa y en madurez (mad) 24
- Figura 5.** Número de brotes promedio (\pm error estándar) en híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad Puitá INTA en primera (P1) y segunda generación (P2), y sus respectivas líneas parentales (020, 120, 073 y 121), en la fase vegetativa y en madurez (mad) 25

Figura 6. Número de semilla llena y vana (semilla total) producida por las plantas híbridas en primera y segunda generación, y las líneas parentales (variedades comerciales y morfotipos de arroz)	29
Figura 7. Detección del alelo resistente (mutación S653D) mediante PCR. Línea 1: CFX-18, línea 2: CFX-18, línea 3: híbrido 136C, línea 4: AR136, línea 5: AR136, línea 6: control negativo (H ₂ O), línea 7: MM 50pb	33
Figura 8. Detección del alelo resistente (mutación A122T) y del alelo susceptible (alelo normal), gel de agarosa 1.5%. Línea 1: MM 100pb, línea 2: Puitá INTA, línea 3: híbrido-977P2 (morfotipo-121C2), línea 4: AR977, línea 5: control negativo (H ₂ O). Genotipo inferido: Puitá INTA: RR (homocigota resistente), híbrido 977P2: RS (heterocigota), AR977: SS (homocigota susceptible)	33
Figura 9. Efecto de dosis crecientes de imazapir (0, 36, 72 y 120 g/l) en plantas susceptibles: líneas maternas (arroz maleza) e híbridos pertenecientes a la segunda generación (H ₂), resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad CFX-18.....	36
Figura 10. Efecto de dosis crecientes de imazapir (0, 480, 768 y 1152 g/l) en plantas heterocigotas: híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad CFX-18, pertenecientes a la primera (H ₁) y segunda generación (H ₂)	37
Figura 11. Efecto de dosis crecientes de imazapir (0, 480, 768 y 1152 g/l) en plantas resistentes: híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad CFX-18, pertenecientes a la segunda generación (H ₂), y la variedad CFX-18	38
Figura 12. Porcentaje de hojas sanas y hojas afectadas en plantas susceptibles, heterocigotas y resistentes a imidazolinonas, en contacto con diferentes dosis de imazapir	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Accesiones de arroz maleza caracterizadas como: <i>sativa</i> , intermedio y <i>rufipogon</i> , pertenecientes al banco de semillas del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular utilizadas en este estudio	8
Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la detección del alelo resistente (Res) y alelo susceptible (Sus) para cada variedad de arroz resistente a imidazolinonas (CFx-18 y Puitá INTA)	13
Cuadro 3. Inferencia del genotipo para el gen <i>ALS</i> en las plantas híbridas de la segunda generación (H2), de acuerdo al resultado de las reacciones de PCR con imprimadores específicos para detectar la presencia del alelo mutado o normal	13
Cuadro 4. Dosis del herbicida Katrin® que se aplicó a las plantas híbridas, líneas parentales y variedad comercial CFX-18, de acuerdo al genotipo determinado mediante PCR. *Dosis estandarizadas de acuerdo a curva de respuesta al herbicida, diseñada por B. Valverde (comunicación personal)	15
Cuadro 5. Número de plantas híbridas caracterizadas morfológicamente, en primera (H1) y segunda (H2) generación de híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y CFX-18 (híbridos-C) y del cruce entre arroz maleza y Puitá INTA (híbridos-P)	18
Cuadro 6. Número de plantas caracterizadas morfológicamente, correspondientes a las líneas parentales (maternas y paternas)	18

Cuadro 7. Determinación de la similitud o diferencia de la altura promedio (cm) de las plantas híbridas en las dos generaciones con sus respectivas líneas parentales mediante el análisis de contrastes: **C:** híbrido es similar al arroz cultivado; **M:** híbrido es similar al arroz maleza; **CM:** híbrido es similar a ambos padres (cultivado y maleza), **Het+:** híbrido es superior a ambos padres; **I:** híbrido difiere de ambos padres y presenta un valor intermedio 22

Cuadro 8. Determinación de la similitud o diferencia del número de brotes promedio entre las plantas híbridas en las dos generaciones con sus respectivas líneas parentales mediante el análisis de contrastes: **C:** híbrido es similar al arroz cultivado; **M:** híbrido es similar al arroz maleza; **CM:** híbrido es similar a ambos padres (cultivado y maleza), **Het+:** híbrido es superior a ambos padres; **I:** híbrido difiere de ambos padres y presenta un valor intermedio. 26

Cuadro 9. Determinación de la similitud o diferencia del número de panículas (**P**), ancho de hoja bandera (**HB**), longitud de panícula (**LP**), número de semilla total (**ST**) y número de semilla llena (**SL**) entre las plantas híbridas con sus respectivas líneas parentales en madurez mediante el análisis de contrastes: **C:** híbrido es similar del arroz cultivado; **M:** híbrido es similar al arroz maleza; **CM:** híbrido es similar a ambos padres (cultivado y maleza), **Het+:** híbrido es superior a ambos padres; **Het-:** híbrido es inferior a ambos padres; **I:** híbrido difiere de ambos padres y presenta un valor intermedio 28

Cuadro 10. Número de plantas parentales e híbridas que iniciaron el proceso de la floración en diferentes períodos (DDS: días después de la siembra) 31

Cuadro 11. Inferencia del genotipo del gen *ALS* (RR, RS, SS) para las plantas híbridas pertenecientes a la segunda generación (H2) de híbridos, según los datos moleculares. *NI: plantas que no se lograron identificar por falta de material vegetal para obtener el ADN 34

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN genómico total de Lodhi y colaboradores (1994) modificado para arroz	60
Anexo 2. Reacción y condiciones cíclicas para detección de la mutación S653D y alelo susceptible para la variedad CFx-18 mediante PCR	61
Anexo 3. Reacción y condiciones cíclicas para detección de la mutación A122T y alelo susceptible para la variedad Puitá INTA mediante PCR	62
Anexo 4. Probabilidad obtenida en los análisis de contrastes al comparar los promedios de altura de la planta entre los híbridos y las líneas parentales en la primera y segunda generación de híbridos (H1 y H2)	63
Anexo 5. Probabilidad obtenida en los análisis de contrastes al comparar los promedios del número de brotes de la planta entre los híbridos y las líneas parentales en la primera y segunda generación de híbridos (H1 y H2)	64
Anexo 6. Probabilidad obtenida en los análisis de contrastes al comparar el número de panículas (P), ancho de la hoja bandera (HB), longitud de panícula (LP), semilla total (ST) y semilla llena (SL), entre los híbridos y las líneas parentales en la primera y segunda generación de híbridos	65
Anexo 7. Correlación entre número de brotes y número de panículas en madurez	66
Anexo 8. Probabilidad obtenida en la prueba de Tukey, al comparar el porcentaje promedio del hojas dañadas en plantas susceptibles (SS), heterocigotas (RS) y resistentes (RR), expuestas a dosis crecientes de imazapir	67

RESUMEN

El arroz maleza es un conjunto de plantas del género *Oryza* que son perjudiciales para la producción del arroz cultivado (*Oryza sativa*) en el mundo. Las variedades de arroz resistentes a imidazolinonas han sido empleadas como método de control, ya que permiten la aplicación de herbicidas que no sean tóxicos para el cultivo, pero sí para las plantas arvenses. Sin embargo, la hibridación entre el arroz maleza y estas variedades es posible, y en nuestro país se ha observado un aumento en la tolerancia al herbicida por parte de las formas maleza, lo que dificulta su selección y eliminación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar los rasgos morfológicos y reproductivos que predominan y persisten en las plantas híbridas resultantes del cruce entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas, en las primeras dos generaciones (H1 y H2). Para esto, se realizó cruces manuales dirigidos entre arroz maleza (5 morfotipos) y dos variedades resistentes a imidazolinonas (CFx-18 y Puitá INTA), en condiciones de invernadero. Las líneas parentales y las plantas híbridas resultantes fueron caracterizadas mediante 8 rasgos morfológicos. Se evaluaron un total de 403 plantas híbridas obtenidas en los cruces y 137 plantas de las líneas parentales. Se determinó una alta variación morfológica en los rasgos caracterizados en plantas híbridas y no se observan períodos uniformes de floración (96-116 DDS). Características como el ancho de la hoja bandera, la longitud de la panícula y el número de semilla total son superiores en los híbridos en comparación con las líneas parentales. Además, el número de semilla llena presenta heterosis negativa en H1, con un aumento no mayor a los padres en H2. La resistencia al herbicida, se detecta en todas las plantas híbridas H1 y se observa segregación en la proporción 1:2:1 en H2. Los resultados de la presente investigación indican que la hibridación entre el arroz maleza y las variedades resistentes a imidazolinonas cultivadas en Costa Rica, es completamente factible, no sólo permite la persistencia de características de interés agronómico generación tras generación, sino que permite nuevas combinaciones de genomas. Lo cual, origina amplios rangos morfológicos en los híbridos que van desde heterosis positiva hasta heterosis negativa dependiendo de la característica evaluada. La generación de múltiples combinaciones de arroz maleza híbrido con tolerancia al herbicida combinado con una

utilización constante del mismo en el campo puede favorecer la persistencia de los híbridos y disminuir la vida útil de las variedades comerciales con tolerancia al herbicida para el control del arroz maleza.

Palabras clave: heterosis, acetolactato sintetasa (ALS), arroz rojo, imazapir, *Oryza sativa*.

1. INTRODUCCIÓN

El arroz maleza (también conocido como arroz rojo, por el color que presentan algunos biotipos en el pericarpo) es un conjunto de plantas del género *Oryza* que coexisten y compiten con el arroz cultivado (*Oryza sativa* L., Vaughan 1989, FAO 2007). Se caracterizan por su crecimiento vigoroso, producción abundante de semillas, desgrane fácil y latencia prolongada, lo que les permite una eficiente dispersión y persistencia en el campo (Diarra *et al.* 1985, Gu *et al.* 2005). Estas malezas son perjudiciales para la producción del arroz cultivado, ya que su control incrementa los costos y su presencia disminuye el rendimiento y el valor comercial del grano (Fisher y Ramírez 1993).

Para controlar estas plantas, se han implementado varias prácticas que combinan métodos preventivos, culturales y químicos, como el uso de semilla certificada, agotamiento de la semilla maleza del banco de semillas del suelo, supresión de la germinación del arroz maleza (manejo de agua y compuestos químicos), destrucción o remoción del arroz maleza de los arrozales, rotación con otros cultivos, entre otras (Griffin y Harger 1990, Ampong-Nyarko y De Datta 1991, Dunand 1996, Pantoja *et al.* 1997, Esqueda 2000, Polón *et al.* 2005). Sin embargo, la mayoría de métodos no han resultado eficientes y hasta el momento el arroz maleza continúa siendo un grave problema a nivel mundial, debido a su similitud morfológica y fisiológica con el arroz cultivado (Brenes-Prendas 2006, FAO 2007, Brown 2013).

Debido a esto, se han desarrollado variedades resistentes a herbicidas como estrategia de control, entre ellas variedades de arroz convencionales y transgénicas (Oard *et al.* 1996, Inui *et al.* 2001, Tan *et al.* 2005). Entre las variedades convencionales, se encuentran las resistentes a imidazolinonas, las cuales fueron desarrolladas mediante la selección de mutantes inducidos químicamente. Estas variedades han sido oficialmente aprobadas para la producción comercial de arroz en el continente americano, en comparación con las transgénicas que requieren mayor cantidad de estudios para su liberación y comercialización por ser cultivos desarrollados a través de ingeniería genética (Croughan 1998, Peña 2005, Tan *et al.* 2005, Grumet *et al.* 2011, Akio-Kido *et al.* 2012).

Las variedades de arroz resistentes a imidazolinonas presentan mutaciones en el gen que codifica para la enzima acetolactato sintetasa (ALS). Esta enzima cataliza el primer paso en la síntesis de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) y puede ser

inhibida por varios compuestos como las imidazolinonas y sulfonilureas (Wakabayashi y Böger 2004). Diferentes mutaciones puntuales en esta enzima han sido asociadas con el cambio de aminoácidos que modifica la forma del sitio al cual se une el herbicida, esto resulta en la pérdida de varias interacciones con diferentes compuestos (McCourt *et al.* 2006), y de esta manera se logra que los cultivos de arroz comercial sean resistentes a imidazolinonas.

Por lo tanto, estas variedades han sido empleadas para realizar el control post-emergencia (aplicación del herbicida después de la emergencia o germinación del cultivo) de un amplio espectro de malezas, mediante la aplicación de inhibidores enzimáticos que no son tóxicos para el cultivo (Webster y Masson 2001, Gressel 2002, Tan *et al.* 2005, Whaley *et al.* 2007). En nuestro país, estas variedades son comercializadas como un sistema integrado de control de malas hierbas, bajo el nombre *Clearfield*®. Este sistema suministra la semilla resistente certificada, el herbicida certificado y un programa de custodia, el cual monitorea y asiste en la implementación de esta tecnología, con el objetivo de lograr la limpieza de campos infestados (BASF 2014).

Sin embargo, la utilización de variedades resistentes a herbicidas puede ser contraproducente, ya que la hibridación entre el arroz cultivado y el maleza ha sido reportada en varios estudios (Langevin *et al.* 1990, Chen *et al.* 2004). Este proceso es posible, debido a que existe una tasa de exocruzamiento (0.1-0.3%), la cual se da principalmente por la dispersión de polen a través del viento (OECD 1999). Esto puede llevar a la aparición de plantas híbridas superiores en diferentes características a sus progenitores (heterosis o vigor híbrido), y posteriormente, a la introgresión de características de interés agronómico del arroz comercial al arroz maleza, lo cual entorpece las estrategias de manejo implementadas para el control de malezas (Ellstrand *et al.* 1999, Olofsson *et al.* 2000, Gealy *et al.* 2003, Gressel y Valverde 2009).

En Costa Rica no hay reportes oficiales de hibridación entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas; sin embargo, observaciones realizadas en fincas arroceras en Guanacaste y Parrita indican la existencia de plantas de arroz maleza con tolerancia al herbicida (obs. per). Una posible explicación a este hecho, es una viable hibridación entre los materiales descritos anteriormente que requiere un estudio más detallado, que confirme la hibridación entre las variedades resistentes a imidazolinonas y el

arroz maleza, así como una caracterización detallada de los híbridos resultantes del cruce de estas plantas. Por lo tanto, la presente investigación tiene como objetivo estudiar la hibridación entre el arroz maleza y comercial tolerante a herbicidas, en condiciones de invernadero.

2. ANTECEDENTES

La producción de arroz es una de las principales actividades socioeconómicas en Costa Rica, sólo en el período 2013-2014 se sembró un área total de 66135 hectáreas y se registró un consumo anual *per capita* de 48.32 kg (CONARROZ 2015). Sin embargo, la producción se ve afectada frecuentemente por la incidencia de enfermedades, plagas y malezas, entre las que se destaca el arroz maleza, por su difícil control y amplia distribución en el mundo (Castaño 1985, De Galvis *et al.* 1985, González 1985, González *et al.* 1985, FAO 2007).

El arroz maleza en Costa Rica, ha sido clasificado de acuerdo a la morfología, en tres grandes grupos: grupo *sativa*, grupo intermedio y grupo *rufipogon*. Estas categorías permiten clasificar el arroz maleza que muestra rasgos similares al arroz comercial (*O. sativa*), el arroz maleza que posee características similares a la especie silvestre *O. rufipogon* y un tercer grupo que muestra características intermedias entre *O. sativa* y *O. rufipogon* (Arrieta-Espinoza *et al.* 2005). Además, se determinó la presencia de una alta variabilidad en la morfología y en el ciclo de vida, así como variables importantes (emergencia de las plántulas, inicio de macollamiento, altura de la planta y períodos de floración y maduración variables) que sugieren una alta competitividad por espacio y recursos, que garantiza un mayor desempeño de la progenie y el éxito reproductivo como un conjunto (Sánchez *et al.* 2007).

Estudios de hibridación entre arroz maleza y una variedad transgénica de arroz resistente a glufosinato de amonio fue reportada por Sánchez y colaboradores (2009), quienes detectaron entre un 0.1 y 0.3% de tasa de hibridación. La cual, es afectada por la combinación de varios factores, entre ellos: duración del traslape de anthesis, morfotipo y accesión de arroz rojo, pero no por el nivel de infestación (densidad de plantas). Los híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y esta variedad transgénica, fueron fenotípicamente variables y se observó heterosis positiva en rasgos de productividad, lo

que indica que pueden ser buenos competidores por recursos en el campo. Sin embargo, la producción de semilla presentó heterosis negativa, esto sugiere depresión exogámica, lo cual está relacionado con las distancias genéticas de los progenitores (Sánchez *et al.* 2009).

Las variedades resistentes a imidazolinonas fueron introducidas por primera vez en Estados Unidos en el 2002 y posteriormente, en países de América Latina bajo el nombre comercial de *Clearfield*®. Este sistema es un método popular para el control del arroz maleza, el cual ha sido empleado en Costa Rica desde el 2003; sin embargo, no se ha reportado ni observado un control eficaz del arroz maleza. Las variedades resistentes que han sido utilizadas en nuestro país son: CFX-18 y Puita INTA CL, las cuales fueron desarrolladas por la Universidad de Luisiana (Estados Unidos) y por la Estación Experimental Agropecuaria del INTA (Concepción del Uruguay, Argentina), respectivamente (Croughan 2008, Livore 2005, Linscombe 2010, PROARROZ 2013).

En Costa Rica, no existen estudios de híbridos producto del cruce entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas. Sin embargo, estudios recientes realizados en otros países, confirman la hibridación y el flujo de genes entre el arroz maleza y el comercial resistente a imidazolinonas (Shivrain *et al.* 2007, 2008, 2009, Burgos *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2008, Andres 2013, Goulart *et al.* 2015). Para Estados Unidos, China y Brasil, se ha reportado híbridos que producen semillas viables y plantas fértiles, cuyos rasgos dominantes pertenecen al parental maleza (Shivrain *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006, 2008). Además, poseen una baja capacidad reproductiva en la primera generación, aumentando levemente en la siguiente (Zhang *et al.* 2008). La forma de herencia de la resistencia a inhibidores de la enzima ALS (imidazolinonas) ha sido asociada con un único alelo con dominancia incompleta situado en el núcleo (Volenberg y Stoltenberg 2002). No obstante, se han reportado desviaciones en las proporciones esperadas, probablemente como consecuencia del tamaño de población y epistasis (Shivrain *et al.* 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

El arroz (*O. sativa*) es uno de los cereales más importantes en el mundo y alimenta cerca de un tercio de la población mundial (Posada 1985, FAO 2013). Se estima que para el 2030 la producción mundial de cereales aumentará en un 60%, por lo que la necesidad de desarrollar nuevas y mejores variedades, es inevitable (FAO 2002). Con el avance de la tecnología, existe la posibilidad de desarrollar y utilizar variedades de arroz transgénicas o convencionales. Sin embargo, para la aprobación y liberación de transgénicos en el mundo, se requiere rigurosos estudios, así como un adecuado control para evitar el flujo de transgenes hacia poblaciones silvestres o maleza (Akio-Kido *et al.* 2012). De la misma forma, existe la posibilidad de flujo de genes (resistencia a herbicidas, por ejemplo) de variedades convencionales hacia otras poblaciones, lo cual implicaría la necesidad de vigilancia para evitar el paso de características de importancia agronómica a otras poblaciones no-blanco, y así evitar la aparición de especies resistentes a herbicidas (Valverde *et al.* 2000, Gresel y Valverde 2009, Heap 2015).

El estudio de la hibridación entre morfotipos de arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas, es de importancia para generar información acerca de este proceso entre estas plantas, ya que el arroz rojo es uno de malezas más problemáticas en la producción de este cultivo en nuestro país. Su control se dificulta cada vez más, debido a la alta variabilidad morfológica y a la similitud con las variedades comerciales (FAO 2007). Por lo tanto, es importante comprender el comportamiento de diferentes morfotipos de arroz rojo y su capacidad de hibridar con variedades comerciales resistentes a herbicidas, así como las características que predominan en varias generaciones. Esto permitiría la posibilidad de realizar estudios sobre flujo de genes, así como propuestas para el posible manejo y control de estos híbridos en el campo.

Además, con este estudio se pretende generar información básica sobre bioseguridad ambiental para el caso del arroz en nuestro país y determinar de una manera indirecta, la factibilidad de la introducción de variedades de arroz convencionales o transgénicas con resistencia a herbicidas con distintos modos de acción, para el control de malezas. Debido a que es importante, que en nuestro país se realicen estudios en esta línea de investigación, que permitan una adecuada toma de decisiones por parte de autoridades competentes.

4. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

La combinación de rasgos en las plantas híbridas permite una diferenciación con las líneas parentales (Langevin *et al.* 1990). Por lo tanto, las plantas híbridas producidas por el cruce entre el arroz maleza y los cultivares de arroz resistentes a imidazolinonas, serán superiores a ambos padres en la primera generación, es decir, serán plantas más altas, con más brotes, con hojas bandera más anchas y panículas más largas que permiten una mayor producción de semilla que las de sus padres (Langevin *et al.* 1990). Ya que la combinación de rasgos, en la primera generación, les permite el dominio de alelos dominantes sobre recesivos en el fenotipo (Alberts *et al.* 2008). En la segunda generación, se observará mayor variación morfológica, debido a que ocurre segregación al azar en la producción de gametos, lo cual ha sido observado en arroz y en otros grupos de biología similar (Lippman y Zamir 2007, Sánchez *et al.* 2009).

El genotipo del gen *ALS* en los híbridos determina la respuesta de la planta a las imidazolinonas (Tranel y Wright 2002). Por lo tanto, la respuesta al herbicida por parte de las plantas híbridas en la primera generación (H1) será resistencia intermedia entre la observada en variedades comerciales y los morfotipos de arroz maleza, por la presencia del gen en forma heterocigota (RS). Sin embargo, en la segunda generación de plantas híbridas (H2), la característica de resistencia presentará segregación en la proporción 1:2:1 (RR, RS, SS), por lo tanto se presentarán plantas con diferentes respuestas: resistencia completa, resistencia intermedia y susceptibilidad al herbicida (Volenberg y Stoltenberg 2002).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar los rasgos morfológicos y reproductivos que predominan y persisten en las plantas híbridas (H) resultantes del cruce entre morfotipos de arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas, en la primera y segunda generación (H1 y H2) en condiciones de invernadero.

5.2. Objetivos específicos

- i.** Detectar la naturaleza híbrida de las plantas resultantes del cruce entre morfotipos de arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas.
- ii.** Estimar la heterosis (vigor híbrido) en las plantas híbridas (H1 y H2) resultantes del cruce entre morfotipos de arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas.
- iii.** Evaluar la resistencia al herbicida en las líneas parentales y en las plantas híbridas (H1 y H2) resultantes del cruce entre morfotipos de arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sitio de estudio.

La investigación se realizó en el invernadero del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (9°56'25"N, 84°2'37"W). Este sitio presenta temperaturas entre 26 y 40 °C, humedad relativa entre 50-70% y se encuentra a una elevación de 1200 m.

6.2. Material vegetal.

Se utilizaron 10 accesiones de arroz maleza del banco de semillas del CIBCM de acuerdo con la viabilidad y disponibilidad de semilla (Cuadro 1). Esta semilla fue colectada en el año 2000 previo a la liberación de las variedades resistentes a imidazolinonas y caracterizada como *sativa*, intermedio y *rufipogon* (Arrieta-Espinoza *et al.* 2005). Además, se utilizaron dos variedades resistentes a herbicida: CFX-18, la cual se ha cultivado en el país desde el año 2002, y Puitá INTA desde el 2006 (CONARROZ 2015), donadas por el Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS). La semilla se sembró semanalmente en el invernadero, en potes con aprox. 500 g de sustrato (mezcla de suelo y fibra de coco (2:1)), para conseguir sincronización en la floración y realizar cruces para la obtención de plantas híbridas.

Cuadro 1. Accesiones de arroz maleza caracterizadas como: *sativa*, intermedio y *rufipogon*, pertenecientes al banco de semillas del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular utilizadas en este estudio.

Tipo	Morfotipo	Sitio de recolecta	Georeferencia (grados decimales)
<i>sativa</i>	020	La Pacífica, Guanacaste	10.45, -85.17
	120	El Pelón, Guanacaste	10.43, -85.39
intermedio	023	Barbudal, Parrita	9.50, -84.29
	121	Barbudal, Parrita	9.50, -84.29
	073	El Pelón, Guanacaste	10.43, -85.40
<i>rufipogon</i>	379	Cañas, Guanacaste	10.44, -85.17

6.3. Producción de plantas híbridas H1, mediante cruces manuales dirigidos entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas.

Se realizaron cruces manuales dirigidos en invernadero, basándose en el protocolo implementado por Sarkarung (1991). La emasculación de las inflorescencias se realizó previamente a la antesis (período durante el cual ocurre la polinización). Para ello, se cortó las glumas fértiles por el área del apículo y se extrajeron las anteras mediante aspiración, con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío GAST® (modelo: 0823-101Q-SG608X, Estados Unidos). La panícula emasculada, fue polinizada, mediante contacto directo con las espiguillas de la planta donadora de polen, asegurando la liberación de polen sobre la panícula emasculada. Luego, se cubrió con una bolsa plástica con microporos Cryovac® (código: SM570, Francia) para evitar polinización con otras plantas (Figura 1).

Para los cruces, se utilizó los morfotipos de arroz maleza (Cuadro 1) como líneas maternas (receptor de polen) y las variedades CFX-18 y Puitá INTA como líneas paternas (donadores de polen). Se realizaron 47 cruces entre arroz maleza y la variedad CFX-18, 36 cruces entre arroz maleza y la variedad Puitá INTA, y se dejaron 27 panículas emasculadas sin polinizar, que no produjeron semilla como controles. Los híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y CFX-18 se identificaron como *Híbridos-C*, donde la primera y segunda generación se codificó *Híbridos-C1* e *Híbridos-C2* respectivamente. Asimismo, se identificaron los híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y Puitá INTA como *Híbridos-P*, donde los *Híbridos-P1* corresponde a las plantas híbridas obtenidas en la primera generación e *Híbridos-P2* para las plantas híbridas correspondientes a la segunda generación.

La semilla resultante de los cruces, corresponde a la primera generación de híbridos (H1) y se cosechó cuando la planta alcanzó madurez (aproximadamente 115-130 días). La semilla de la segunda generación de híbridos (H2) se obtuvo de la autopolinización de las plantas de la primera generación (H1) y se cosechó posteriormente a la maduración de la planta.

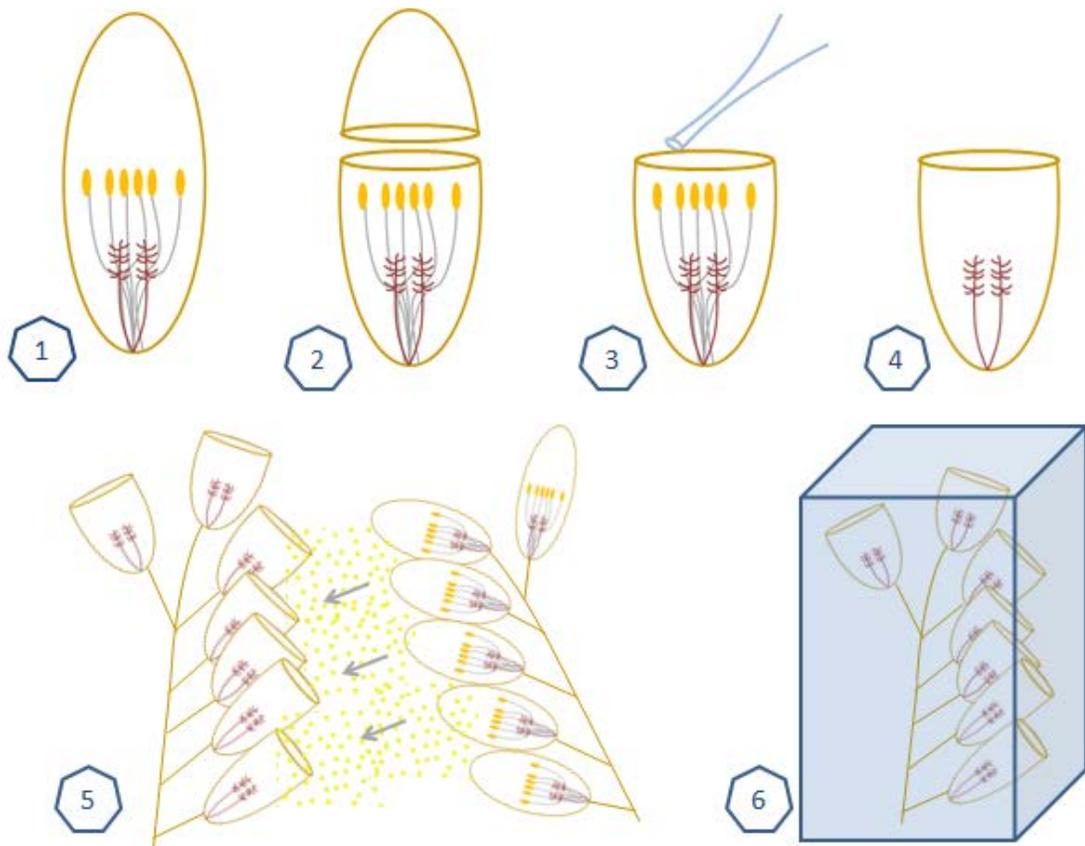


Figura 1. Procedimiento para realizar cruces manuales producidos en invernadero: 1) espiguilla de arroz; 2) corte de palea y lema en espiguilla; 3 y 4) emasculación: eliminación de las anteras mediante succión a través de una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío; 5) polinización: contacto directo de la panícula donadora de polen con la panícula emasculada, 6) etiquetar y proteger la panícula con bolsa microperforada.

6.4. Germinación y siembra de semilla híbrida.

Para la primera generación (H1), se sembró toda la semilla obtenida de los cruces manuales dirigidos y para la segunda (H2) se tomó una submuestra de la semilla producida en H1. La semilla se desinfectó con hipoclorito de sodio (3.5%) durante 20 min para evitar contaminación y se colocó a germinar en placas petri con papel filtro y agua destilada estéril. Luego, se incubó en el cuarto de crecimiento del CIBCM a una temperatura de 26 °C, 41% de humedad y fotoperíodo 12/12. Cuando las plántulas alcanzaron una altura aproximada de 10 cm se trasplantaron en potes y se aclimataron en invernadero. Se sembraron dos plantas por pote, con aproximadamente 500 g de sustrato (mezcla de suelo y fibra de coco (2:1)) y 3 g de fertilizante granulado Nitrofoska® (Agro Comercial S.A.).

Para el cuidado de las plantas en el invernadero, cada dos días fueron irrigadas con agua y cada 22 días se realizaron aplicaciones de fertilizante foliar Bayfolan Forte® (Bayer). Además, se aplicaron diferentes insecticidas, acaricidas y fungicidas de forma alterna para el control de plagas (cada 15 días o cada vez que fue necesario), entre ellos: Impide® (Dow AgroSciences), Colt® (BravoAG), Mimic® (Certis), Trebon® (Certis), Mitigan® (AganCheminalManufacturers) y Vitavax® (Bayer).

6.5. Caracterización morfológica de las plantas híbridas.

Se caracterizaron rasgos vegetativos y reproductivos en las plantas híbridas de ambas generaciones (H1 y H2) y en las líneas parentales, basándose en 8 variables descritas a continuación (descriptores morfológicos tomados de IRRI-IBPGR 1980): altura de la planta (cm), número de brotes, inicio de la floración, ancho de la hoja bandera (cm), longitud de la panícula más alta (cm), número de panículas por planta, número de semilla llena y vana. La altura de la planta y el número de brotes se midió cada 15 días, después de la siembra de la semilla (DDS: días después de la siembra), hasta madurez. Las variables restantes se midieron cuando la planta alcanzó madurez, y luego de esta evaluación se cosechó la semilla y se podó la planta.

6.6. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico total.

Se colectó aproximadamente 0.5 g de tejido foliar joven y se colocó durante dos días a 50 °C en 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). La extracción de ADN genómico total, se continuó con el protocolo de extracción de Lodhi y colaboradores (1994) modificado para arroz (Anexo 1). Para visualizar el ADN genómico total se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, que fue teñido 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 un Nano Drop 2000c (Thermo Scientific, Estados Unidos).

6.7. Confirmación de la naturaleza híbrida de las plantas por PCR.

La presencia de la mutación en el gen *ALS* se verificó mediante la técnica molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las variedades de arroz resistente a herbicida utilizadas en este estudio poseen una sola mutación que les confiere resistencia a imidazolinonas y cada variedad presenta una mutación diferente (Cuadro 2). Por lo que, se utilizó una PCR alelo-específico con imprimadores previamente diseñados (Cuadro 2), que permitieron la detección del alelo resistente y susceptible para la variedad Cfx-18, y el alelo resistente para Puitá INTA (Kadaru *et al.* 2008, Rosso *et al.* 2010a, Anexo 2 y 3). Además, se diseñó el iniciador *reverse* para la amplificación del alelo susceptible en la variedad Puitá INTA (Cuadro 2), a partir de la información publicada por Roso y colaboradores (2010) y de la secuencia AB049822 disponible en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Biometra (modelo: 070-601, Alemania), el contenido de la reacción y las condiciones cíclicas se describen en Anexo 2 y 3. Para cada alelo se realizó una reacción por separado de PCR, y de esta forma se verificó la presencia o ausencia de la mutación en el gen *ALS*, así como el alelo normal. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis de gel de agarosa al 1.5% en TAE, el cual se tiñó con GelRed (Thermo Scientific, Estados Unidos), y se fotografió con

Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la detección del alelo resistente (Res) y alelo susceptible (Sus) para cada variedad de arroz resistente a imidazolinonas (CFx-18 y Puitá INTA).

Variedad	Mutación	Alelo	Primers (F/R)	Referencia
CFX-18	S653D	Res	ALSResF/ALSR3	Kadaru <i>et al.</i> 2008
		Sus	ALSSusF/ALSR3	
Puitá INTA	A122T	Res	Ar6F/SNPPtaRev1	Rosso <i>et al.</i> 2010a
		Sus	Ar6F/PtaSus	Vásquez & Albertazzi 2013

Cuadro 3. Inferencia del genotipo para el gen *ALS* en las plantas híbridas de la segunda generación (H2), de acuerdo al resultado de las reacciones de PCR con imprimadores específicos para detectar la presencia del alelo mutado o normal.

Gen <i>ALS</i>	PCR alelo resistente (mutado)	PCR alelo susceptible (normal)
RR	Presente (+)	Ausente (-)
RS	Presente (+)	Presente (+)
SS	Ausente (-)	Presente (+)

una cámara Sony (modelo: DSX-W730). Para la primera generación, se consideró plantas híbridas, las que poseían el alelo resistente, ya que el alelo susceptible no se determinó. En la segunda generación de plantas híbridas, se determinó tanto el alelo resistente como el susceptible para lograr inferir el genotipo para el gen *ALS* (Cuadro 3).

6.8. Evaluación fenotípica de resistencia al herbicida.

La evaluación fenotípica de resistencia al herbicida se realizó con las plantas híbridas-C y sus respectivos padres. Los híbridos-P fueron excluidos, debido a problemas para detectar los genotipos, los cuales eran necesarios para realizar este ensayo.

Se tomó brotes jóvenes y en buen estado de plantas híbridas (C1 y C2), y de las líneas parentales. Se les aplicó el producto comercial Katrin® fuera del invernadero, el cual es un herbicida sistémico cuyo ingrediente activo es el imazapir. Se evaluó seis dosis en las plantas híbridas y en las líneas parentales, de acuerdo al genotipo determinado en este estudio (Cuadro 4). Se realizó observaciones cada semana y las plantas fueron evaluadas 30 días después de aplicado el herbicida, donde se realizaron observaciones para determinar daños en respuesta al herbicida (inhibición del crecimiento, amarillamiento y muerte). Además, se determinó el número de hojas sanas y el número de hojas con daños, para determinar el porcentaje de hojas afectadas por el herbicida.

Cuadro 4. Dosis del herbicida Katrin® que se aplicó a las plantas híbridas, líneas parentales y variedad comercial CFX-18, de acuerdo al genotipo determinado mediante PCR. *Dosis estandarizadas de acuerdo a curva de respuesta al herbicida, diseñada por B. Valverde (comunicación personal).

Genotipo	Imazapir (g/l)*	Número de plantas
SS	0	8
	36	8
	72	8
	120	8
RR, RS	0	13
	480	13
	768	13
	1152	13

6.9. Análisis de datos

El análisis de datos se realizó de la siguiente manera: 1) un análisis de varianza con repeticiones múltiples (ANOVA) seguido de un análisis de contrastes para la altura de las plantas durante el crecimiento vegetativo y en madurez; 2) un modelo lineal generalizado (GLM) seguido de un análisis de contrastes para el número de brotes durante el crecimiento vegetativo y en madurez, el número de panículas por planta y el número de semilla total y llena; 3) un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un análisis de contrastes para el ancho de la hoja bandera y la longitud de la panícula. Para todos los análisis estadísticos, los datos mostraron normalidad y homocedasticidad. Todos los modelos lineales generalizados (GLMs) con distribución de *Poisson*, mostraron sobre-dispersión, por lo que se ajustó la distribución a *quasipoisson*.

El análisis de contrastes, se realizó para determinar diferencias significativas entre los promedios de los rasgos caracterizados entre plantas híbridas y líneas parentales. Esto permitió la comparación de la morfología entre los híbridos resultantes y sus respectivos padres. Además, se empleó la siguiente simbología para describir las características del híbrido resultante, mediante el análisis de contrastes: **C**: híbrido es similar del arroz cultivado; **M**: híbrido es similar al arroz maleza; **CM**: híbrido es similar a ambos padres (cultivado y maleza), **Het+**: híbrido es superior a ambos padres; **Het-**: híbrido es inferior a ambos padres; **I**: híbrido difiere de ambos padre, presenta un valor intermedio.

Para verificar si la proporción de genotipos obtenidos se ajustó a la proporción de genotipos esperados (1:2:1), se realizó una prueba de bondad-ajuste (Chi-cuadrado (χ^2)). Además, se calculó una probabilidad binomial (éxito/fallo) para determinar si la proporción que se obtuvo en los híbridos-P era posible, de acuerdo al tamaño de la muestra analizada, ya que las proporciones genotípicas observadas se desvían de las esperadas en las plantas resultantes del cruce entre los morfotipos de arroz maleza y la variedad Puitá INTA.

Para la evaluación fenotípica de resistencia al herbicida, se analizó el porcentaje de hojas con daños mediante un ANOVA, seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey). Para todos los análisis se utilizó el sistema estadístico R (<http://www.r-project.org/>).

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de plantas híbridas mediante cruces manuales dirigidos entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas.

Se obtuvo un total de 403 plantas híbridas correspondientes a 16 híbridos distintos distribuidos en 8 morfotipos (Cuadro 5). Para la primera generación (H1) se obtuvo 204 plantas y 199 corresponden a la segunda generación (H2), todas provenientes de cruces entre el arroz maleza del grupo *sativa* e intermedio (Cuadro 5). Además, se obtuvo plantas híbridas provenientes de las dos variedades resistentes a herbicida, sin embargo, se consiguió un mayor número de híbridos con la variedad Puitá INTA (híbridos-P, n=243), que con la variedad CFx-18 (híbridos-C, n=160).

Se apreció que la cantidad de plantas híbridas generadas fue muy variable, es decir, provienen de diferentes accesiones y morfotipos de arroz maleza. Asimismo, se observó que el número de plantas producidas para cada tipo de híbrido difiere entre sí. Además, a excepción de uno de los morfotipos híbridos (121C), todos produjeron semilla viable para la primera generación (Cuadro 5).

De las líneas parentales, se logró el crecimiento de 137 plantas en total (Cuadro 6). Para las variedades resistentes a herbicida se obtuvieron 23 plantas, mientras que para el arroz maleza se obtuvieron 114 plantas, del grupo *sativa* e intermedio. Además, la cantidad de semilla producida para el arroz maleza es muy variable, debido a que depende de la viabilidad y disponibilidad de semilla para germinar.

Cuadro 5. Número de plantas híbridas caracterizadas morfológicamente, en primera (H1) y segunda (H2) generación de híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y CFx-18 (híbridos-C) y del cruce entre arroz maleza y Puitá INTA (híbridos-P).

Híbrido	Grupo	Morfotipo	H1	H2	Total
Híbridos-C	sativa	020C	36	60	96
		120C	18	17	35
	intermedio	023C	6	19	25
		121C	4	0	4
Híbridos-P	sativa	020P	55	43	98
		120P	40	33	73
	intermedio	073P	22	15	37
		121P	23	12	35
Total			204	199	403

Cuadro 6. Número de plantas caracterizadas morfológicamente, correspondientes a las líneas parentales (maternas y paternas).

Líneas	Grupo	Morfotipo	Plantas
Maternas	<i>sativa</i>	020	51
		120	22
	intermedio	023	15
		073	9
		121	17
Paternas	<i>O. sativa</i>	CFx-18	8
	<i>O. sativa</i>	Puitá INTA	15
Total			137

7.2. Caracterización morfológica de las plantas híbridas (H1 y H2) y líneas parentales durante el crecimiento vegetativo y madurez.

7.2.1. Altura de la planta.

Para los híbridos-C1 (cruces con CFX-18), se observa una predominancia en la altura de la planta en los híbridos sobre las líneas parentales durante el crecimiento vegetativo, principalmente entre los 30-60 DDS (Figura 2, Cuadro 7). Al llegar a madurez, se observa que las plantas híbridas son similares en la altura a las líneas maleza, a excepción del morfotipo 121C1 que presenta heterosis positiva (Cuadro 7). En la segunda generación (híbridos-C2), se observa que las plantas híbridas son más altas que las líneas parentales entre los 45-75 DDS (Figura 2, Cuadro 7). Además, el morfotipo 023C2 presenta heterosis positiva en madurez, y el morfotipo 121C2, perteneciente a la segunda generación, no pudo ser caracterizado debido a que la cantidad de semilla llena producida en H1 fue muy baja y las plantas que lograron germinar no sobrevivieron.

Para los híbridos-P1 (cruces con Puitá INTA) sólo el morfotipo 121P1 es más alto que los padres durante todo el crecimiento vegetativo. Los demás morfotipos son muy similares al parental Puitá INTA entre los 30-75 DDS, y algunos presentan heterosis positiva en algún momento del crecimiento (Figura 3, Cuadro 7). Después de los 90 DDS y en madurez, los híbridos-P1 alcanzan una altura similar al arroz maleza, a excepción del 121P1 que presenta heterosis positiva (Cuadro 7). En la segunda generación de híbridos (híbridos-P2), los resultados son muy variables y en todos los morfotipos se observa al menos una vez heterosis positiva durante el crecimiento vegetativo (Cuadro 8). En madurez, se observa que el 020P presenta una altura intermedia entre los padres, los morfotipos 120P y 073P no difieren del parental maleza, y el 121P presenta heterosis positiva desde los 75 DDS (Figura 3, Cuadro 7).

Además, al comparar los promedios de la altura entre los híbridos de la primera generación con los de la segunda (H2). Se observó, que los H1 poseen una mayor altura que los H2 entre los 30-45 DDS (Anexo 4).

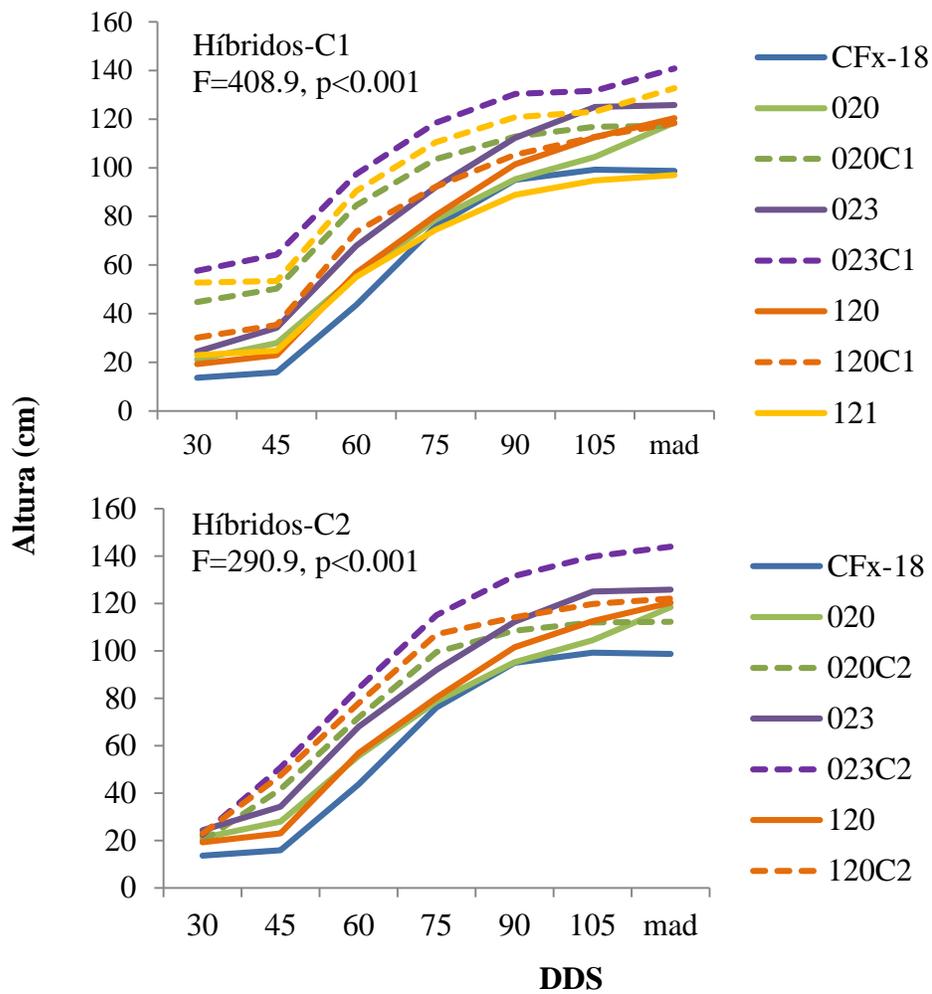


Figura 2. Altura promedio (cm) de las plantas híbridas, resultantes del cruce de arroz maleza y variedad CFX-18 (líneas punteadas), y plantas parentales (líneas continuas), en fase vegetativa y en madurez (mad). En la esquina superior derecha de cada gráfico se muestra el resultado del análisis estadístico ANOVA.

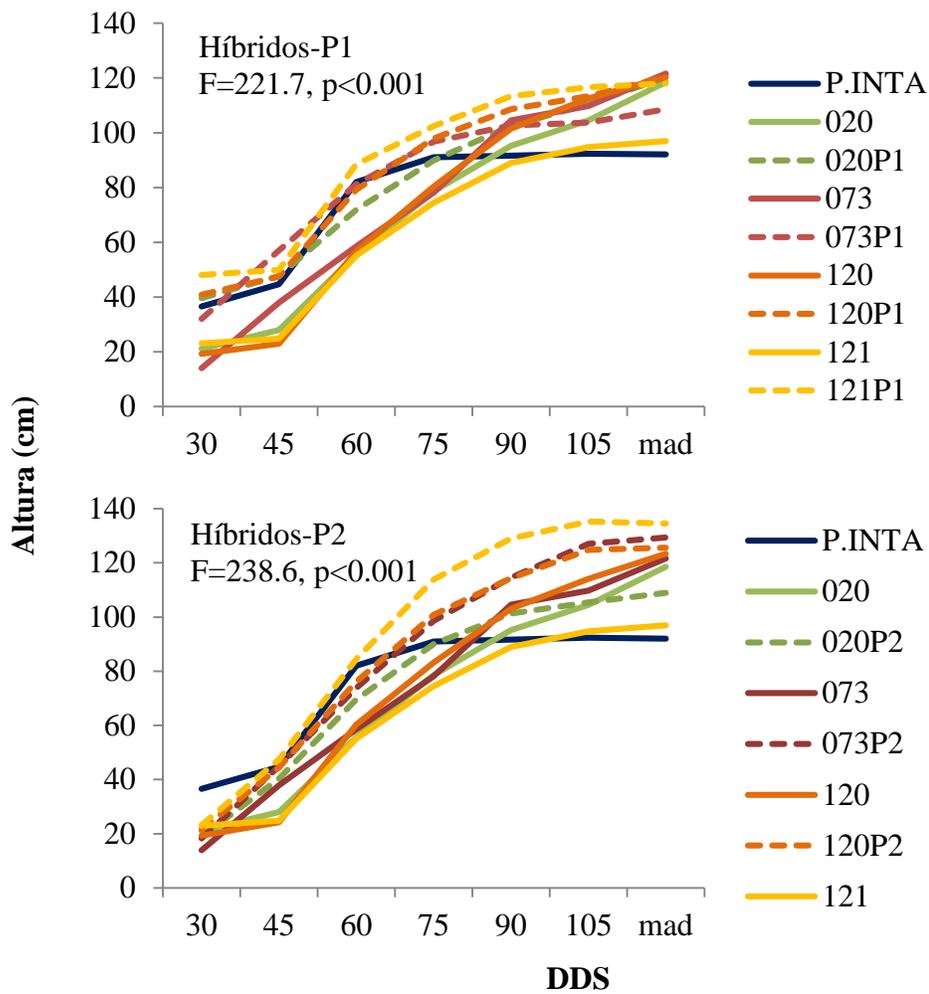


Figura 3. Altura promedio (cm) de las plantas híbridas, resultantes del cruce de arroz maleza y variedad Puitá INTA (líneas punteadas), y plantas parentales (líneas continuas), en fase vegetativa y en madurez (mad). En la esquina superior derecha de cada gráfico se muestra el resultado del análisis estadístico ANOVA.

Cuadro 7. Determinación de la similitud o diferencia de la altura promedio (cm) de las plantas híbridas en las dos generaciones con sus respectivas líneas parentales mediante el análisis de contrastes: **C:** híbrido es similar al arroz cultivado; **M:** híbrido es similar al arroz maleza; **CM:** híbrido es similar a ambos padres (cultivado y maleza), **Het+:** híbrido es superior a ambos padres; **I:** híbrido difiere de ambos padres y presenta un valor intermedio.

		DDS							
Generación	Tipo híbrido	Morfotipo	30	45	60	75	90	105	Mad
<i>Híbridos-C1</i>	sativa	020C1	Het+	Het+	Het+	Het+	Het+	Het+	M
		120C1	Het+	Het+	Het+	M	CM	CM	M
	intermedio	023C1	Het+	Het+	Het+	Het+	Het+	M	M
		121C1	Het+	Het+	Het+	Het+	C	C	Het+
<i>Híbridos-C2</i>	sativa	020C2	CM	Het+	Het+	Het+	C	C	CM
		120C2	CM	Het+	Het+	Het+	M	M	M
	intermedio	023C2	M	Het+	Het+	Het+	Het+	M	Het+
		121C2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Híbridos-P1</i>	sativa	020P1	C	C	Het+	M	CM	M	M
		120P1	C	C	C	C	M	M	M
	intermedio	073P1	C	Het+	C	C	M	M	M
		121P1	Het+	Het+	Het+	Het+	Het+	Het+	Het+
<i>Híbridos-P2</i>	sativa	020P2	M	C	Het+	M	M	M	I
		120P2	M	C	C	C	Het+	Het+	M
	intermedio	073P2	M	CM	Het+	C	M	Het+	M
		121P2	M	C	C	Het+	Het+	Het+	Het+

Nota: valores de probabilidad en Anexo 4.

7.2.2. Número de brotes.

Se determinó que el número de brotes no es una característica que se diferencia entre los híbridos y las líneas parentales, ya que sólo varios morfotipos presentan heterosis positiva durante cierto momento del crecimiento vegetativo y no se observa una tendencia de brotación clara y definida a través del tiempo (Figura 4 y 5, Cuadro 8). En madurez, se encontró que el número de brotes no cambia significativamente en relación a los padres en ambas generaciones de híbridos. Además, ninguno presenta heterosis positiva o negativa (Cuadro 8). Al comparar el número de brotes promedio entre los híbridos de la primera generación con los de la segunda, se observa que los híbridos-H1 presentan una mayor producción de brotes que los híbridos-H2 entre los 75-105 DAS (Figura 4 y 5, valores de probabilidad en Anexo 5).

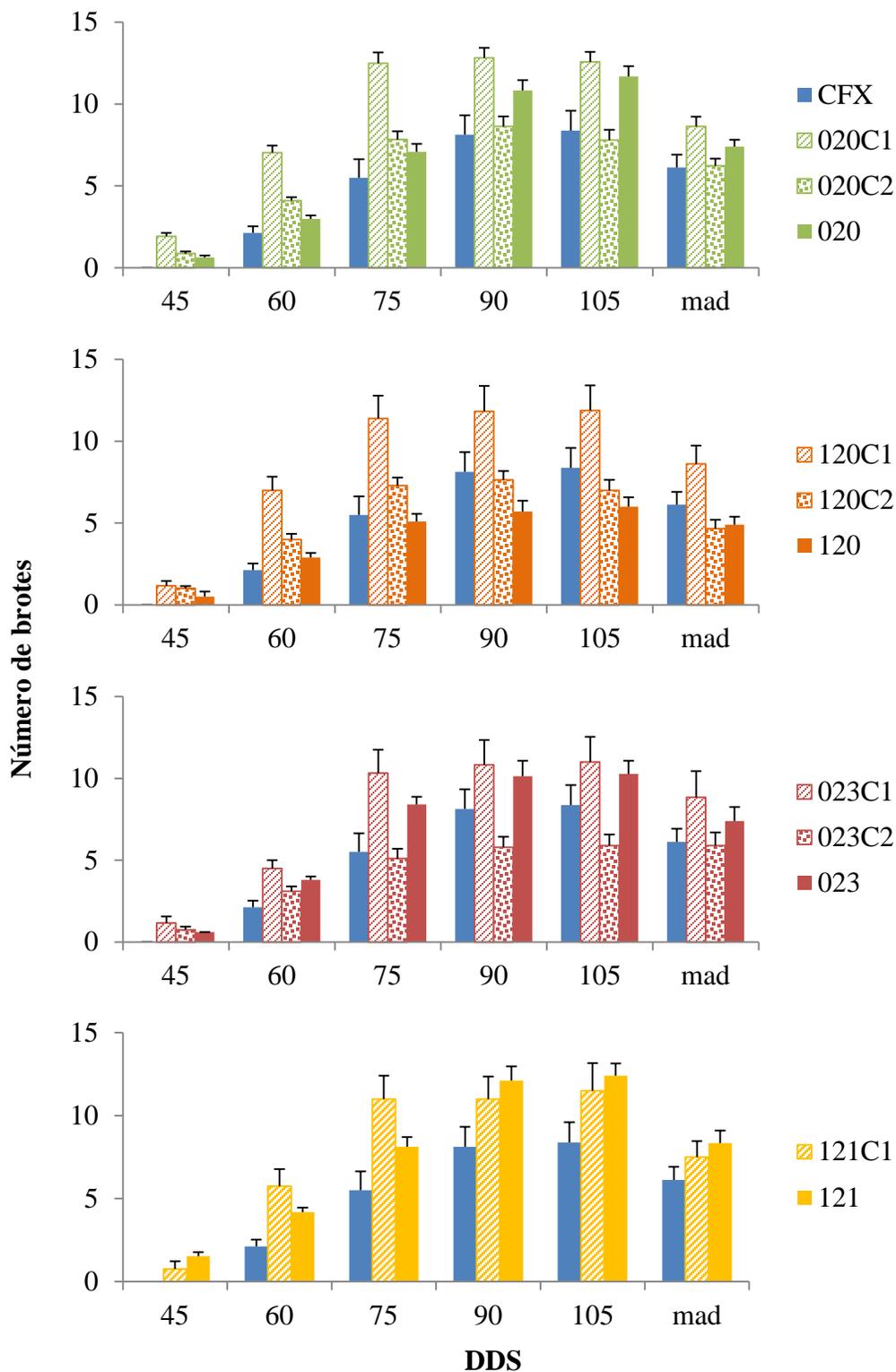


Figura 4. Número de brotes promedio (\pm error estándar) en híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad CFX-18 en primera (C1) y segunda generación (C2), y sus respectivas líneas parentales (020, 120, 023 y 121), en la fase vegetativa y en madurez (mad).

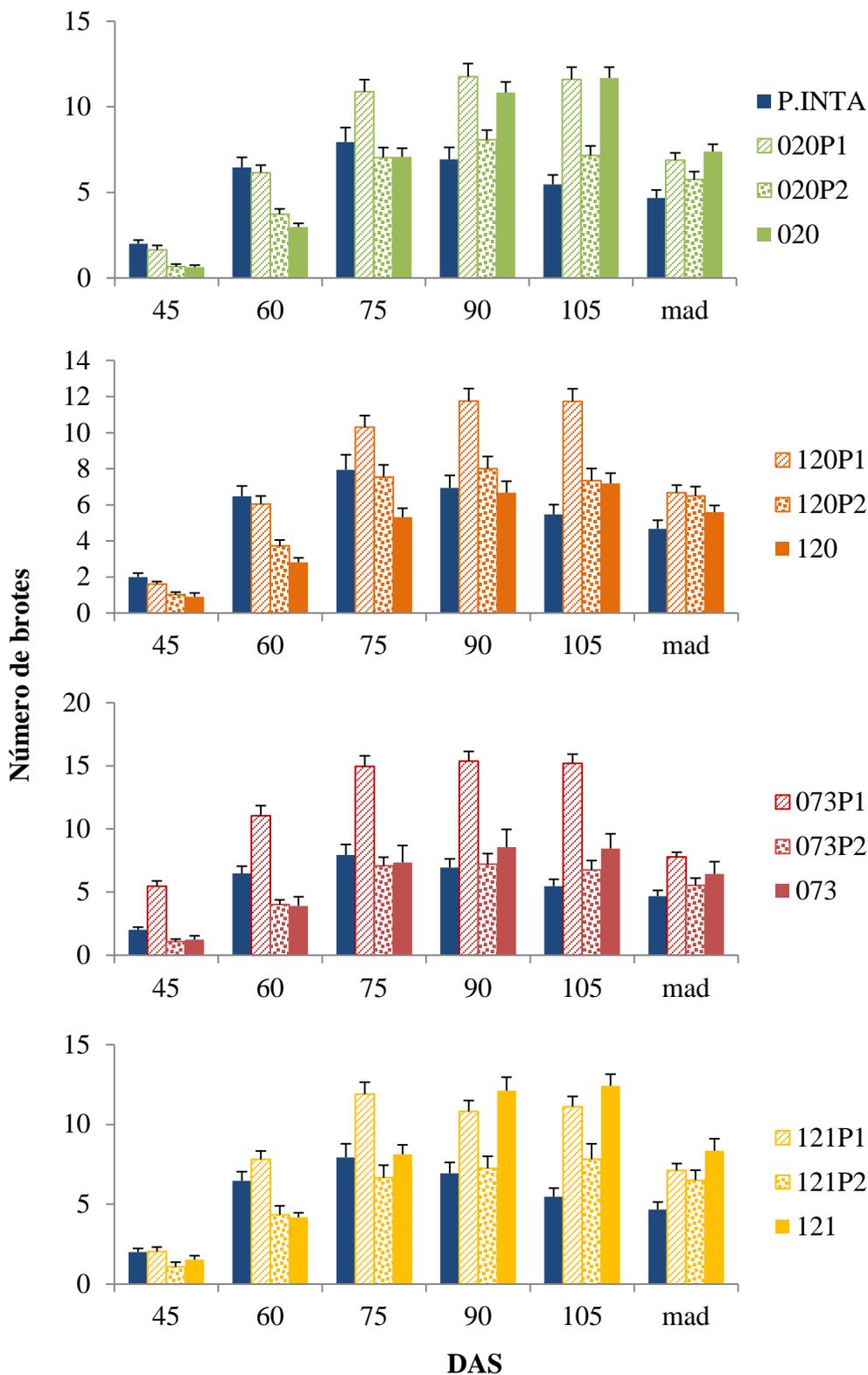


Figura 5. Número de brotes promedio (\pm error estándar) en híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad Puitá INTA en primera (P1) y segunda generación (P2), y sus respectivas líneas parentales (020, 120, 073 y 121), en la fase vegetativa y en madurez (mad).

Cuadro 8. Determinación de la similitud o diferencia del número de brotes promedio entre las plantas híbridas en las dos generaciones con sus respectivas líneas parentales mediante el análisis de contrastes: **C:** híbrido es similar al arroz cultivado; **M:** híbrido es similar al arroz maleza; **CM:** híbrido es similar a ambos padres (cultivado y maleza), **Het+:** híbrido es superior a ambos padres; **I:** híbrido difiere de ambos padres y presenta un valor intermedio.

			DDS					
Generación	Tipo híbrido	Morfotipo	45	60	75	90	105	mad
<i>Híbridos-C1</i>	sativa	020C1	C	Het+	Het+	M	CM	CM
		120C1	CM	Het+	Het+	C	C	C
	intermedio	023C1	CM	M	M	CM	CM	CM
		121C1	CM	M	M	CM	CM	CM
<i>Híbridos-C2</i>	sativa	020C2	CM	Het+	CM	C	C	CM
		120C2	CM	CM	CM	CM	CM	CM
	intermedio	023C2	CM	CM	C	C	C	CM
		121C2	-	-	-	-	-	-
<i>Híbridos-P1</i>	sativa	020P1	C	C	C	M	M	M
		120P1	C	C	C	Het+	Het+	CM
	intermedio	073P1	Het+	Het+	Het+	Het+	Het+	M
		121P1	CM	Het+	Het+	M	M	M
<i>Híbridos-P2</i>	sativa	020P2	M	M	CM	C	C	C
		120P2	M	M	CM	CM	CM	CM
	intermedio	073P2	M	M	CM	CM	CM	CM
		121P2	CM	M	CM	C	I	CM

Nota: valores de probabilidad en Anexo 5.

7.2.3. Número de panículas, ancho de la hoja bandera, longitud de panícula, semilla total y semilla llena de las plantas híbridas en madurez.

El número de panículas (P), es una característica muy relacionada con el número de brotes ($R^2 > 0.9$, Anexo 7). En este rasgo se observa la misma tendencia que presenta el número de brotes en las plantas híbridas, y se determina que la cantidad de panículas producidas en los híbridos en ambas generaciones no cambió significativamente en relación a las líneas parentales en madurez (Cuadro 9).

El ancho de la hoja bandera (HB), fue el rasgo que presentó la menor variación morfológica en las plantas híbridas. Se observó que todas las plantas de la primera generación (C1 y P1) presentaron hojas bandera con mayor área foliar que la del arroz maleza. Para la segunda generación, algunos híbridos presentaron la misma condición anterior, mientras que los morfotipos 023C2, 120P2, 073P2 y 121P2 mostraron una mayor área foliar que la observada en ambos padres (Cuadro 9).

Para la longitud de panícula (LP), los morfotipos 023C1, 023C2 y 020C2 presentaron panículas más largas que ambos padres. En los morfotipos restantes de los híbridos-C, la longitud de la panícula del híbrido fue similar a la del arroz maleza. En los híbridos-P no hubo diferencias en relación a ambos padres en la primera generación. Mientras que en la segunda se observó heterosis positiva para esta característica en los morfotipos 120P2, 073P2 y 121P2 (Cuadro 9).

Para el número de semilla total (ST), el resultado fue variable en ambas generaciones en los híbridos-C (C1 y C2). Los morfotipos 120C1 y 023C1 produjeron la misma cantidad de semilla total que produjo el arroz maleza, el morfotipo 121C1 produjo un número de semilla total similar al arroz cultivado. Mientras que la cantidad de semilla total producida por los morfotipos 020C1, 020C2 y 023C2 superó la cantidad de semilla que producían los padres. En el caso de los híbridos-P, en las dos generaciones se observaron morfotipos (020P1, 073P1, 121P1, 120P2, 073P2 y 121P2) con mayor producción de semilla total que las líneas parentales (Cuadro 9).

Para el número de semilla llena (SL), en la primera generación de híbridos (híbridos-C e híbridos-P), con la excepción del morfotipo 023C1, la producción de semilla llena disminuyó considerablemente en las plantas híbridas en comparación con las líneas parentales. En la segunda generación, sólo el morfotipo 120C2 presenta heterosis negativa,

Cuadro 9. Determinación de la similitud o diferencia del número de panículas (**P**), ancho de hoja bandera (**HB**), longitud de panícula (**LP**), número de semilla total (**ST**) y número de semilla llena (**SL**) entre las plantas híbridas con sus respectivas líneas parentales en madurez mediante el análisis de contrastes: **C**: híbrido es similar del arroz cultivado; **M**: híbrido es similar al arroz maleza; **CM**: híbrido es similar a ambos padres (cultivado y maleza), **Het+**: híbrido es superior a ambos padres; **Het-**: híbrido es inferior a ambos padres; **I**: híbrido difiere de ambos padres y presenta un valor intermedio.

Generación	Tipo híbrido	Morfotipo	P	HB	LP	ST	SL
Híbridos-C1	sativa	020C1	CM	C	M	Het+	Het-
		120C1	C	C	M	M	Het-
	intermedio	023C1	CM	C	Het+	M	CM
		121C1	CM	C	M	C	Het-
Híbridos-C2	sativa	020C2	CM	C	Het+	Het+	C
		120C2	CM	C	M	CM	Het-
	intermedio	023C2	CM	Het+	Het+	Het+	C
		121C2	-	-	-	-	-
Híbridos-P1	sativa	020P1	M	C	C	Het+	Het-
		120P1	CM	C	CM	M	Het-
	intermedio	073P1	M	I	CM	Het+	Het-
		121P1	M	C	CM	Het+	Het-
Híbridos-P2	sativa	020P2	CM	C	C	CM	CM
		120P2	CM	Het+	Het+	Het+	CM
	intermedio	073P2	CM	Het+	Het+	Het+	CM
		121P2	CM	Het+	Het+	Het+	CM

Nota: valores de probabilidad en Anexo 6.

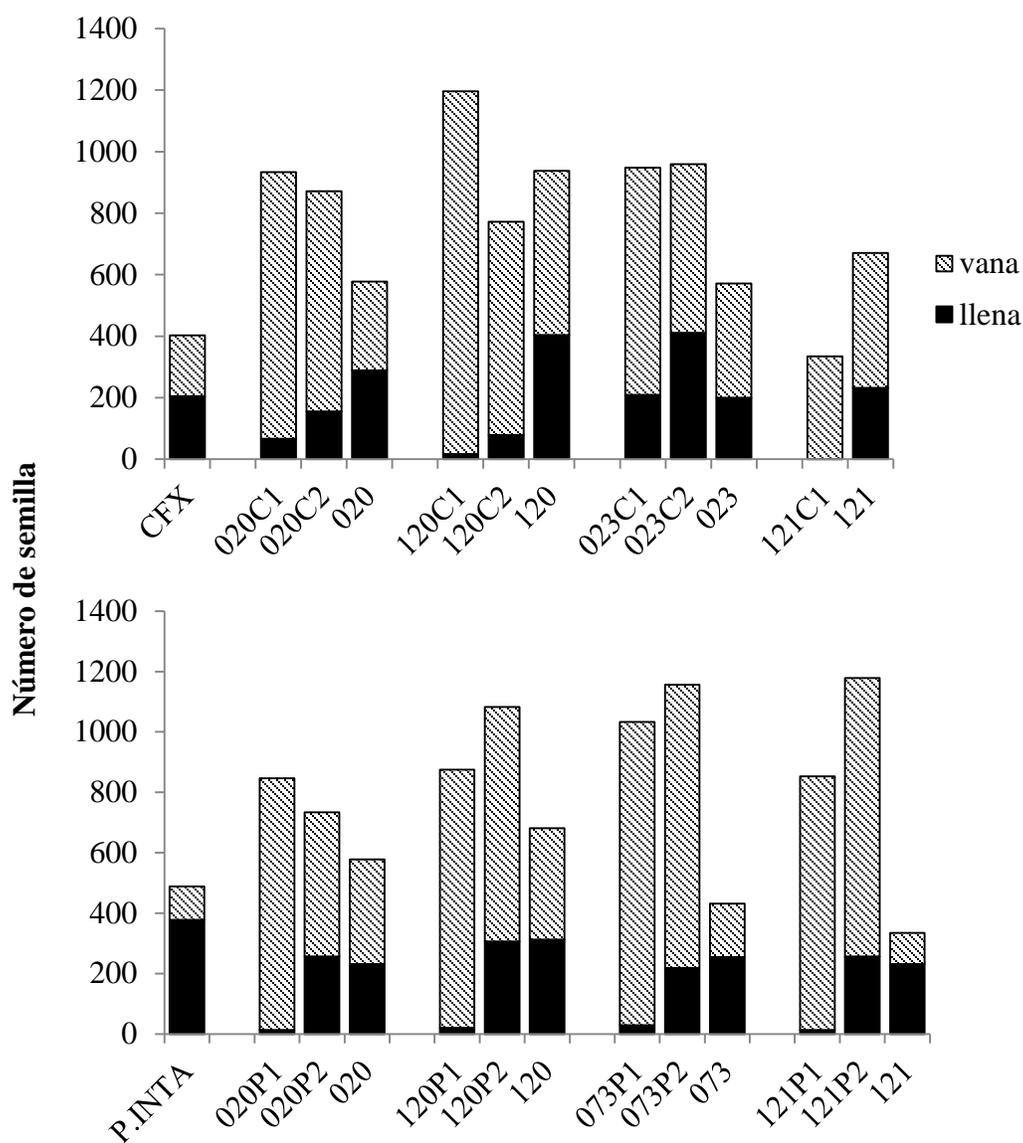


Figura 6. Número de semilla llena y vana (semilla total) producida por las plantas híbridas en primera y segunda generación, y las líneas parentales (variedades comerciales y morfotipos de arroz).

mientras que los híbridos restantes (020C2, 023C2, 020P2, 120P2, 073P2 y 1212P2) son semejantes a la cantidad de semilla llena producida por las líneas maternas y paternas (Cuadro 9, Figura 6).

7.2.4. Determinación del inicio del periodo de floración.

Las plantas maleza y la variedad CFX-18 mostraron períodos de floración superior a los 116 DDS. Mientras que para la variedad Puitá INTA la floración inició entre los 90-95 DDS (Cuadro 10). Para la primera generación de híbridos (H1), se encontró 68 plantas en floración entre los 100-105 DDS, y el resto de plantas híbridas inició esta fase luego de los 116 DDS. En la floración de los híbridos pertenecientes a la segunda generación (H2), se determinó que 55 plantas iniciaron este periodo antes de los 115 DDS. De ellos, 23 plantas se encontraron en floración entre los 100-105 DAS y 17 plantas entre los 111-115 DDS. El resto de híbridos iniciaron este periodo, luego de 116 DDS (Cuadro 10). Después de 116 DDS, no se cuantificó la variación en este período.

Cuadro 10. Número de plantas parentales e híbridas que iniciaron el proceso de la floración en diferentes períodos (DDS: días después de la siembra).

Generación	Morfotipo- Variedad	DDS						Total
		90-95	96-100	100-105	106-110	111-115	>116	
Parentales	020	0	0	0	0	0	51	51
	120	0	0	0	0	0	22	22
	023	0	0	0	0	0	15	15
	073	0	0	0	0	0	9	9
	121	0	0	0	0	0	17	17
	CFX-18	0	0	0	0	0	8	8
	Puitá INTA	15	0	0	0	0	0	15
Híbridos-C1	020C1	0	0	26	0	0	10	36
	023C1	0	0	5	0	0	1	6
	120C1	0	0	7	0	0	11	18
	121C1	0	0	4	0	0	0	4
Híbridos-P1	020P1	0	0	5	0	0	50	55
	073P1	0	0	19	0	0	3	22
	120P1	0	0	2	4	3	31	40
	121P1	0	0	0	0	0	23	23
Híbridos-C2	020C2	0	6	11	7	3	33	60
	023C2	0	0	0	0	1	18	19
	120C2	0	0	2	0	4	11	17
Híbridos-P2	020P2	1	0	1	0	4	37	43
	073P2	0	0	2	0	0	13	15
	120P2	0	0	4	0	5	24	33
	121P2	0	0	3	1	0	8	12
Total		16	6	91	12	20	395	540

7.3. Confirmación de la naturaleza híbrida de las plantas por PCR.

Para la primera generación de híbridos, se obtuvo 64 plantas positivas para la mutación S653D (presente en la variedad CFx-18) y 140 plantas positivas para la mutación A122T (presente en variedad Puitá INTA). Esto confirmó la naturaleza híbrida de las plantas H1, debido a que se detectó el alelo resistente proveniente de la planta donadora de polen.

En las líneas parentales y en la segunda generación de híbridos se determinó tanto el alelo resistente como el alelo susceptible, lo cual permitió inferir el genotipo para el gen *ALS* (Figura 7 y 8). Se encontró que las líneas maternas (arroz maleza) presentan el gen *ALS* en forma homocigotas susceptibles (SS), mientras que las variedades resistentes a imidazolinonas (CFX y Puitá) son homocigotas resistentes (RR, Cuadro 11). Además, para los híbridos-C2, se obtuvo 20 plantas homocigotas resistentes (RR), 39 heterocigotas (RS) y 24 homocigotas susceptibles (SS). Para los híbridos-P2, se obtuvo 41 plantas heterocigotas (RS), 43 homocigotas susceptibles (SS) y el genotipo RR no se detectó en estos híbridos. Un 16% de las plantas H2 no pudo ser determinado por falta de material vegetal para extraer el ADN; sin embargo, no se excluyeron del análisis de datos morfológicos, porque se tuvo certeza que eran plantas híbridas que se derivaron de una H1, que presentó la mutación que confiere la resistencia al herbicida (Cuadro 11).

En adición, se realizó una prueba de bondad-ajuste (Chi-cuadrado, χ^2), que determinó que los híbridos-C2 sí cumplen con las proporciones esperadas 1:2:1 para cada uno de los genotipos ($\chi^2= 2.13$, $gl=4$, $p=0.71$). Mientras, que los híbridos-P no cumplen con esta disposición ($\chi^2= 105.90$, $gl=6$, $p<0.001$). Además, se calculó una probabilidad binomial donde se encontró que la probabilidad de encontrar cero homocigotas resistentes (RR) en una muestra de 84 plantas (muestra analizada), con una probabilidad de éxito de 0.25, es muy baja ($p<0.001$). Por tanto, sería normal que en esta muestra analizada ($n=84$) se observara el genotipo RR, lo cual no está ocurriendo y como consecuencia hay una desviación de las proporciones genotípicas observadas.

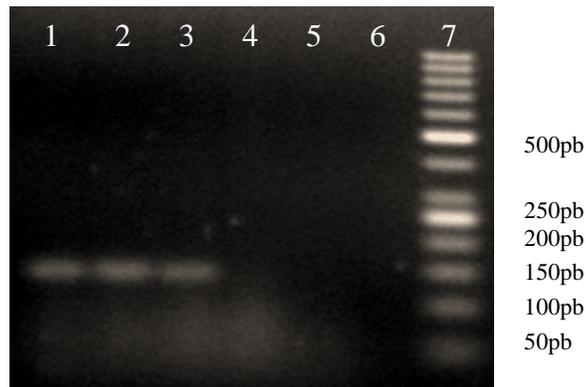


Figura 7. Detección del alelo resistente (mutación S653D) mediante PCR. Línea 1: CFX-18, línea 2: CFX-18, línea 3: híbrido 136C, línea 4: AR136, línea 5: AR136, línea 6: control negativo (H₂O), línea 7: MM 50pb.

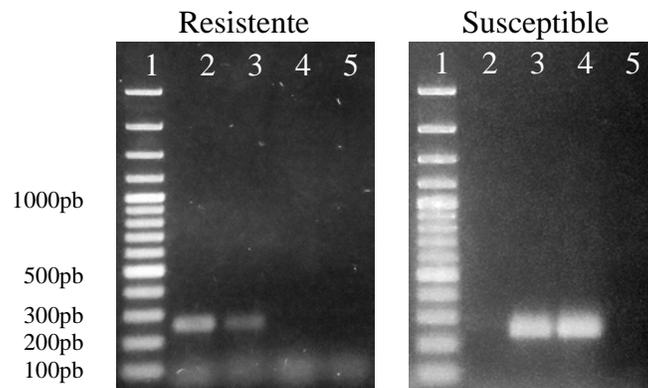


Figura 8. Detección del alelo resistente (mutación A122T) y del alelo susceptible (alelo normal), gel de agarosa 1.5%. Línea 1: MM 100pb, línea 2: Puitá INTA, línea 3: híbrido-977P2 (morfofoto-121C2), línea 4: AR977, línea 5: control negativo (H₂O). Genotipo inferido: Puitá INTA: RR (homocigota resistente), híbrido 977P2: RS (heterocigota), AR977: SS (homocigota susceptible).

Cuadro 11. Inferencia del genotipo del gen *ALS* (RR, RS, SS) para las plantas híbridas pertenecientes a la segunda generación (H2) de híbridos, según los datos moleculares. *NI: plantas que no se lograron identificar por falta de material vegetal para obtener el ADN.

Híbrido	Morfotipo	RR	RS	SS	NI*	Total
	020C2	12	25	16	7	60
<i>Híbridos-C2</i>	023C2	5	8	3	3	19
	120C2	3	6	5	3	17
	020P2	0	2	31	10	43
<i>Híbridos-P2</i>	073P2	0	11	3	1	15
	120P2	0	18	8	7	33
	121P2	0	10	1	1	12
CFx-18	-	8	0	0	0	8
Puitá INTA	-	9	0	0	0	9
Arroz maleza	-	0	0	10	0	10
Total		37	80	77	32	226

7.4. Evaluación fenotípica de resistencia al herbicida.

Se logró ver diferencias en la tolerancia al herbicida en las plantas sometidas a diferentes dosis de Katrin® (30 días después de la aplicación). Para las plantas susceptibles (SS), se observó inhibición del crecimiento en las plantas con diferentes dosis de imazapir y no se observaron diferencias en el daño en las hojas en plantas expuestas a diferentes dosis de imazapir (Figura 9 y 12, Anexo 8). En las plantas heterocigotas (RS), se dió una disminución en el crecimiento con las diferentes dosis de imazapir (Figura 10). Sin embargo, no se notó un efecto como el que se observó en las plantas susceptibles, a pesar de ser dosis más concentradas. En las plantas resistentes (RR), se logró apreciar que estas plantas crecen más que las susceptibles y las heterocigotas en presencia del herbicida (Figura 11). Además, el porcentaje de hojas con daños es similar entre las tres dosis utilizadas (480, 768 y 1152 g/l) con los genotipos RS y RR (Figura 12, Anexo 8).

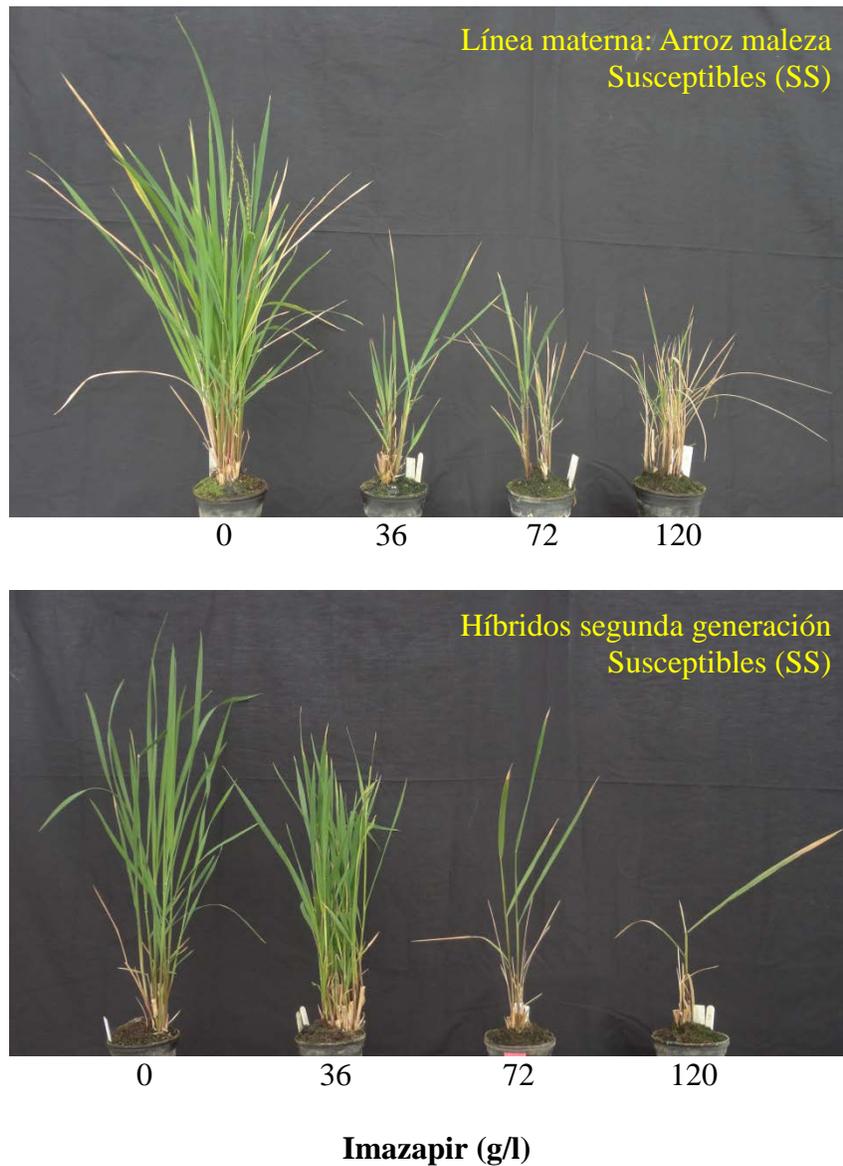


Figura 9. Efecto de dosis crecientes de imazapir (0, 36, 72 y 120 g/l) en plantas susceptibles (SS) para el gen *ALS*: líneas maternas (arroz maleza) e híbridos pertenecientes a la segunda generación (H2), resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad CFX-18.

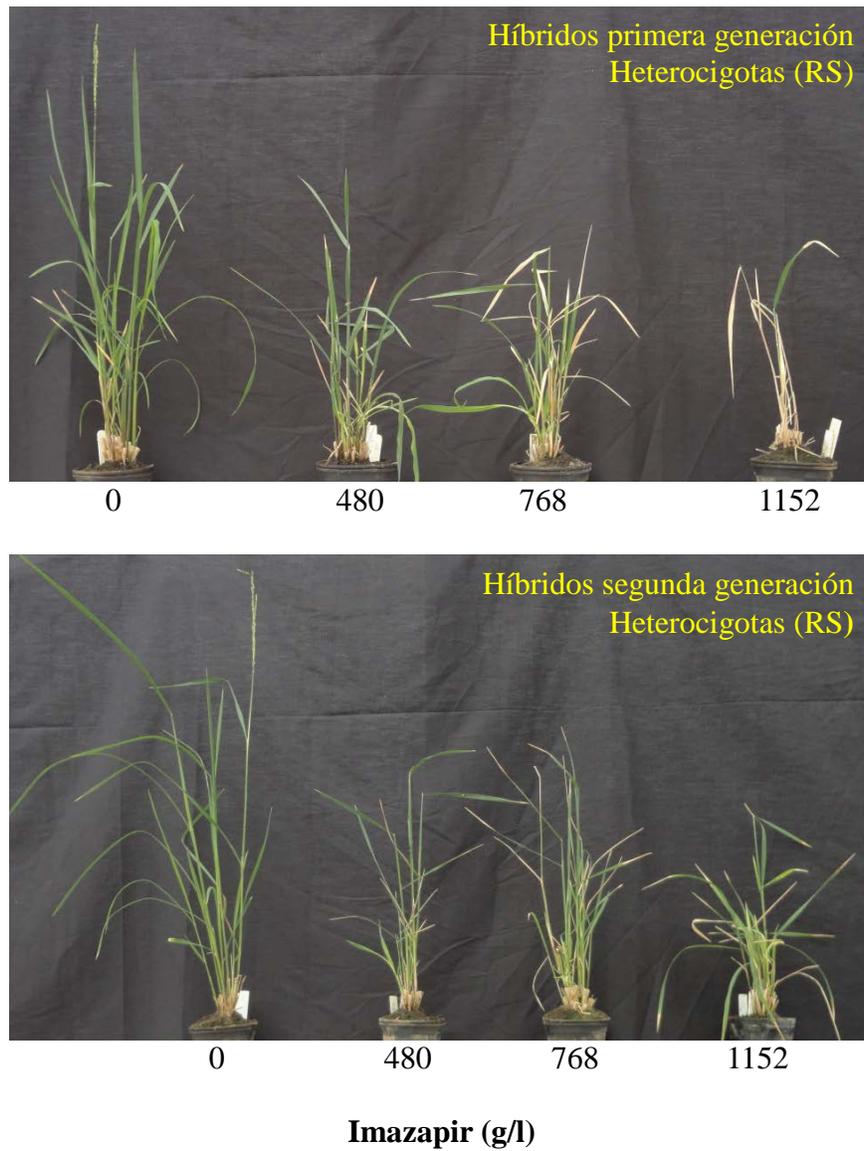


Figura 10. Efecto de dosis crecientes de imazapir (0, 480, 768 y 1152 g/l) en plantas heterocigotas (RS) para el gen *ALS*: híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad CFX-18, pertenecientes a la primera (H1) y segunda generación (H2).

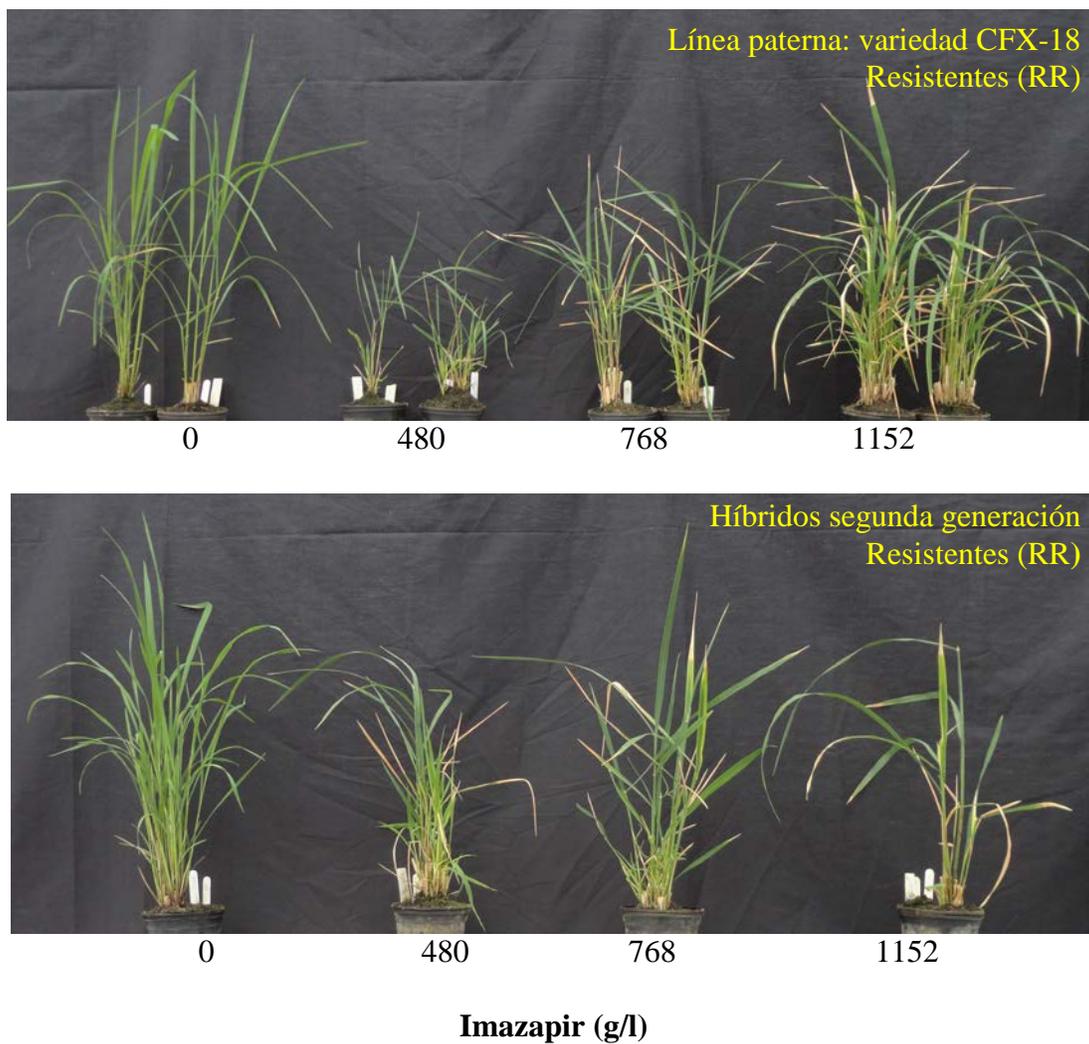


Figura 11. Efecto de dosis crecientes de imazapir (0, 480, 768 y 1152 g/l) en plantas resistentes (RR): variedad CFX-18 y plantas híbridas resultantes del cruce entre arroz maleza y variedad CFX-18, pertenecientes a la segunda generación (H2).

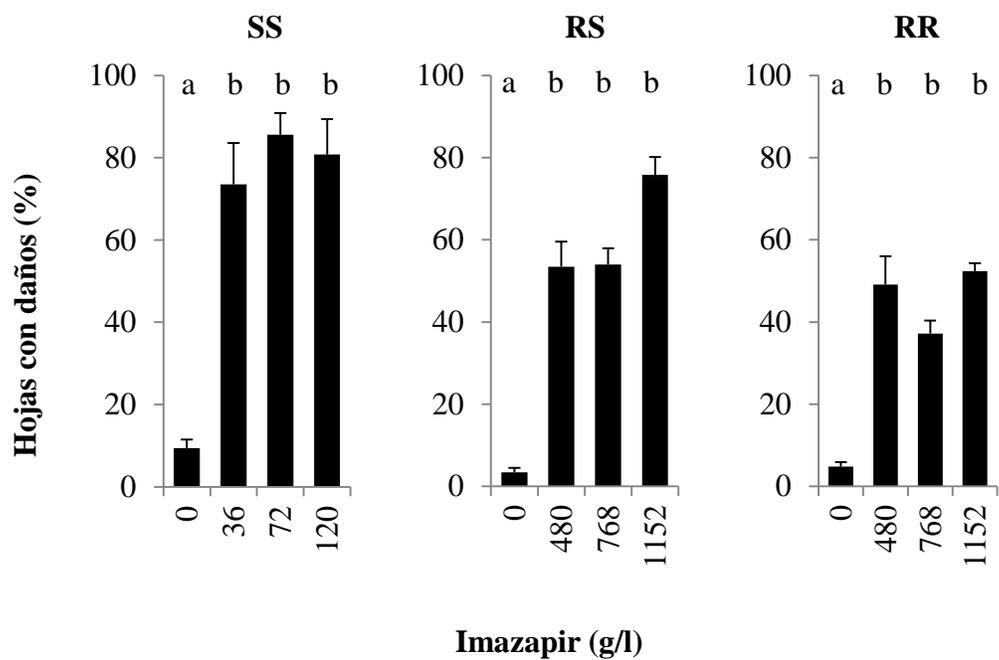


Figura 12. Porcentaje promedio de hojas con daños en plantas susceptibles (SS), heterocigotas (RS) y resistentes (RR), expuestas a dosis crecientes de imazapir.

8. DISCUSIÓN

8.1. Producción de híbridos en condiciones de invernadero.

La hibridación y el flujo de genes entre cultivos y malezas, se da de forma natural, dependiendo de una combinación de factores, tanto ambientales como genéticos (Ellstrand *et al.* 1999, Papa y Gepts 2004, Mallet 2005). En condiciones controladas, la hibridación entre arroz maleza y variedades resistentes a herbicidas es completamente posible, ya que muchos de los factores ambientales fueron eliminados, y la producción de semilla híbrida dependió de la cantidad de plantas disponibles para emasculas, así como de la disposición de polen a la hora de polinizar. En este estudio, se obtuvo un mayor número de plantas con P. INTA (n=243), se cree que esto se debe a que esta variedad producía mayor cantidad de polen que CFX (obs. pers.), lo que puede haber limitado la producción de híbridos con esta variedad (Cuadro 6). Además, se realizaron una mayor cantidad de cruces con la variedad CFX (n=47) que con la variedad P. INTA (n=36), por lo que también se debe considerar que algunas poblaciones de arroz maleza presentan compatibilidad variable con variedades resistentes a imidazolinonas (Shivrain *et al.* 2009).

Asimismo, se produjo una mayor cantidad de híbridos con los morfotipos correspondientes al grupo *sativa*, mientras que no se logró la misma cantidad con los morfotipos pertenecientes al grupo intermedio. Por lo que, se cree que el morfotipo de arroz maleza utilizado influyeron en la producción de híbridos en invernadero, ya que se ha reportado que la hibridación varía de acuerdo al arroz maleza utilizado (Sánchez *et al.* 2009). También, se sugiere que morfotipos del grupo *sativa*, han sufrido hibridaciones previas con variedades cultivadas (Arrieta-Espinoza *et al.* 2005), y por tanto poseen mayor similitud genética y esto les permite una mayor habilidad para hibridar.

De los morfotipos que hibridaron con las variedades resistentes a imidazolinonas, la gran mayoría produjo semilla viable, excepto el morfotipo híbrido 121C1 (Cuadro 6). Esto indica que existe compatibilidad genética entre el arroz maleza y las variedades CFX-18 y Puitá INTA (Rieseberg 1997, Rieseberg & Willis 2007). Pero, que hay morfotipos que no presentan estas características, como las plantas resultantes del cruce entre el morfotipo intermedio 121 y la variedad CFX-18. Para este híbrido (121C), se determinó que la producción de semilla total fue alta y la semilla llena fue baja (en comparación con ambos padres), y que las pocas semillas que germinaron, murieron poco después de la emergencia

de las plántulas (datos no mostrados). Esto no permitió la producción de plantas para la segunda generación (Cuadro 6, Figura 7), lo cual puede ocurrir por la presencia de incompatibilidades genéticas en esta combinación híbrida. Ya que, la viabilidad y fertilidad depende de interacciones epistáticas entre alelos en diferentes *loci*, que pueden ser fijados en algunas poblaciones (variedades cultivadas, por ejemplo). Por lo que, en la hibridación entre el morfotipo maleza 121 con la variedad CFX-18, se podrían presentar interacciones epistáticas diferentes entre los genes que controlan esta característica, así como cambios en la expresión de genes o contribuciones asimétricas de los padres, diferentes a las de los demás híbridos que sí produjeron semilla (Maheshwari & Barbash 2011, Matsubara *et al.* 2014).

8.2. Caracterización morfológica de las plantas híbridas y líneas parentales.

El análisis de los diferentes rasgos morfológicos caracterizados en los híbridos, revela una alta variación en ambas generaciones. Así como la presencia de heterosis positiva (en altura de la planta, hoja bandera, longitud de panícula y semilla total) y heterosis negativa (en número de semilla llena) en ciertos rasgos en diferentes momentos del crecimiento vegetativo o en madurez.

El vigor híbrido observado en la altura de la planta durante el crecimiento vegetativo, en la primera y segunda generación de híbridos, demuestra que el crecimiento de estas plantas fue más rápido (aproximadamente 30-60 DDS) que en las líneas parentales. Los morfotipos híbridos 121C1, 121P1 y 121P2 sobresalen con heterosis positiva en ambos tipos de cruces (con CFX-18 y Puitá), lo cual puede ser un efecto del morfotipo maleza 121. Es interesante, que los híbridos que se diferencian de los padres en madurez pertenecen a morfotipos del grupo intermedio, y los del grupo *sativa* son muy similares a la maleza, lo cual puede estar relacionado con los eventos previos de hibridación (anteriormente mencionados) del grupo *sativa* (Arrieta-Espinoza *et al.* 2005). En otros estudios, generalmente se han encontrado plantas híbridas (F1) más altas que sus padres (Shivrain *et al.* 2006), pero también plantas que no presentan variaciones sustanciales con alguno o ambos progenitores (Gealy *et al.* 2003, Song *et al.* 2004). Además, entre generaciones de híbridos (C1-C2 y P2-P2) se observaron diferencias en la altura promedio sólo en etapas tempranas del crecimiento (30-45 DDS). Esta variación en la altura de la

planta, puede ocurrir debido a que se conoce que los caracteres cuantitativos, como la altura, son reguladas por diferentes genes y mecanismos como la dominancia y la epistasis, las cuales han sido considerados como los principales contribuidores para la altura de las plantas híbridas de arroz (Shen *et al.* 2014).

El número de brotes, durante el crecimiento vegetativo y en madurez, no se diferencia significativamente con las líneas parentales. Esto puede ocurrir debido se ha encontrado que patrones temporales de expresión de genes asociados con diferentes rasgos puede ser diferente e incluso genes individuales o genes en una misma región genómica pueden tener efectos genéticos opuestos en diferentes etapas del crecimiento (Yan *et al.* 1998). Por lo que, se sugiere que la expresión de genes que permitieron superioridad en altura de la planta en los híbridos, pueden haber actuado de forma contraria en la producción de brotes o viceversa. Como se puede observar en el morfotipo 073C1, que durante el crecimiento vegetativo presenta una altura similar a los padres, pero en la producción de brotes se observa heterosis positiva (Cuadro 10).

El número de brotes y panículas por planta son características muy correlacionadas ($R^2 > 0.9$), y ambas no cambian significativamente en los híbridos en relación a sus padres (Cuadro 10). Además, se conoce que el número de brotes es una de las características más importantes, ya que determina el número de panículas, el cual es un componente clave en el rendimiento del cultivo (Li *et al.* 2003). Por tanto, esta variable depende directamente del número de brotes producidos durante la etapa vegetativa.

La presencia de hojas banderas con mayor área foliar en las plantas híbridas, es una característica importante, ya que este factor determina el rendimiento potencial de las plantas, aumentando el número de espiguillas por panícula, lo cual está asociado directamente con la tasa fotosintética en la hoja bandera (Bing *et al.* 2006). Además, en estudios previos, características como la hoja bandera, la longitud de panícula y la producción de semilla han sido estrechamente asociadas, con diversos QTLs que afectan rasgos relacionados con el rendimiento, lo cual ha llevado a pensar en el ligamiento de múltiples genes que afectan diferentes características o con efectos pleiotrópicos en rasgos relacionados (Xue *et al.* 2008, Wang *et al.* 2012). Esto, puede estar ocurriendo en este estudio, ya que se observó la presencia de vigor híbrido en el tamaño de la hoja bandera, la longitud de la panícula y en la producción de semilla total (Figura 7). Sin embargo, la

cantidad de semilla llena (SL) en la primera generación, presentó heterosis negativa (depresión endogámica). Los resultados de la investigación coinciden con lo observado en otros estudios por Song *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2008, Sánchez *et al.* 2009 en los que se explica y se asocia el resultado con la distancia genética entre los progenitores (Ellstrand 2003), y lleva a reducir el valor medio de la cantidad de semilla llena que conduce a la pérdida de vigor en este rasgo y en algunos casos de la fecundidad (ejemplo morfotipo 121C).

Por lo que, en este estudio la hibridación producto del cruce entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas, genera una amplia variación morfológica en los rasgos caracterizados. Esto, debido a la combinación de nuevos genomas entre alelos provenientes de variedades mejoradas, que han sido fijados en las poblaciones de arroz cultivado, con alelos presentes en el arroz maleza y una constante segregación de esas características. Además, la heterosis o vigor híbrido en los híbridos fue muy variable dependiendo de la característica evaluada, la fase de desarrollo (vegetativa o madurez) el individuo y la generación. Además, se vieron favorecidos rasgos tales como la altura durante el crecimiento, así como ciertas características relacionadas con el rendimiento del cultivo. Este resultado puede deberse tanto de la presencia de ciertos alelos en el genoma de los híbridos, así como de la expresión de los mismos (Huang *et al.* 2015, Song *et al.* 2010).

En adición, estudios previos en nuestro país, han permitido la caracterización morfológica y genética del arroz maleza presente en Costa Rica, en los que se ha encontrado una alta diversidad y variabilidad morfológica. La morfología estudiada en el arroz maleza, indica que existe una alta probabilidad de que hayan ocurrido eventos de hibridación entre especies silvestres y variedades comerciales (Arrieta-Espinoza *et al.* 2005). Además, un análisis realizado con microsatélites (Trejos-Espinosa 2006), afirma que el arroz maleza de Costa Rica presenta mayor cercanía con variedades comerciales (*O. sativa*). Por lo que, el autor plantea que el arroz maleza en nuestro país no es producto de hibridación entre especies silvestres y variedades comerciales, sino que es un proceso de hibridación y degeneración a partir de variedades comerciales de arroz que se han sido sembradas en el país (tipo *indica* y *japonica*). Según Qi *et al.* 2015 en un estudio realizado en Estados Unidos este proceso aún no está claro y no ha sido estudiado con suficiente

detalle, y quizá sea una combinación de ambas posibilidades o mecanismos genéticos completamente independientes.

Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación reflejan la amplia variación fenotípica del arroz maleza y su carácter de enjambre híbrido (Arrieta-Espinoza *et al.* 2005, Trejos-Espinosa 2006, Sanchez *et al.* 2007, Sanchez *et al.* 2009), con un trasfondo genético que no es conocido con precisión y que debería estudiarse con miras a plantear y utilizar un manejo adecuado para evitar la hibridación del arroz maleza con las variedades comerciales.

8.3. Determinación del período de la floración.

La variación observada en el inicio del periodo de floración en plantas híbridas, es mayor a la que se observa en las líneas parentales. Esta misma tendencia, ha sido observada en híbridos resultantes del cruce entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas (Shivrain *et al.* 2006) y en híbridos resultante del cruce entre arroz rojo y arroz resistente a glufosinato (Oard *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2003), lo cual sugiere que esta variación se da debido a la combinación de alelos que han sido fijados en variedades comerciales con los alelos presentes en el arroz maleza, que no ha sufrido procesos de domesticación.

Además, se conoce que la inducción del inicio de la floración en arroz está regulado por condiciones ambientales, como fotoperiodo y temperatura (Zeevaart 2008, Luan *et al.* 2009, Song *et al.* 2012). Se han encontrado al menos 18 genes involucrados en este proceso (Tsuji *et al.* 2011) y se conoce que genes relacionados con la sensibilidad al fotoperiodo (*RFT1*, *Hd1* y *Hd3a*) son esenciales para la floración en este cultivo (Yano *et al.* 2000, Komiya *et al.* 2008, Shrestha *et al.* 2014). En estos genes se han reportado variaciones naturales en cultivares, así como en distintos grupos de arroz maleza (Ogiso-Tanaka *et al.* 2013, Thuerber *et al.* 2014), que diversifican el periodo de floración en las plantas y se consideran responsables de nuevos fenotipos. Por lo que, determinar la presencia de estas variaciones en los híbridos resultantes en este estudio podría dar otras explicaciones acerca de las variaciones observadas.

Esta variación en el período de floración en las plantas híbridas de ambas generaciones es una habilidad importante que poseen los híbridos resultantes del cruce

entre arroz maleza y variedades resistentes a imidazolinonas, ya que un amplio ámbito en el periodo de floración, es uno de los factores que favorece la polinización cruzada con otros individuos de variedades comerciales o individuos maleza, para así asegurar el éxito reproductivo y su persistencia en el campo (Gealy *et al.* 2003, Shivrain *et al.* 2009).

8.4. Detección de alelos resistentes y susceptibles en plantas híbridas y líneas parentales.

La detección del alelo resistente en la primera generación de híbridos, permitió incluir en el análisis de datos morfológicos, sólo plantas que recibieron la mutación S653D o A122T. Esto, permitió un alto grado de confianza en el estado híbrido de las plantas H1 y H2, ya que a través de la morfología es muy difícil diferenciarlas de sus parentales (FAO 2007). El alelo susceptible no se determinó en estas plantas, ya que por ser una primera generación (F1), se concluye que todas las plantas son heterocigotas para el gen *ALS*.

En la segunda generación de híbridos, al inferir el genotipo del gen *ALS*, se encontró que los híbridos-C2 cumplen con las proporciones genotípicas esperadas (1:2:1), debido a la segregación de caracteres independiente (Alberts *et al.* 2008). Esto, confirma que los híbridos-C1 son heterocigotas. Por lo que, probablemente la forma de herencia del gen *ALS* en estas plantas esté asociada al núcleo, como se ha descrito previamente en otras plantas maleza del género *Solanum* (Volenberg y Stoltenberg 2002, Ashigh *et al.* 2008).

No obstante, en los híbridos-P2 no se observa esta condición (1:2:1) y no aparece ninguna planta homocigota resistente (RR). La probabilidad de que esto ocurra es muy baja ($p < 0.001$), por lo que, la desviación de estas proporciones y no detectar plantas con genotipo RR, puede estar sucediendo por diferentes situaciones: 1) Las plantas híbridas en condición homocigota resistente (RR) no germinan o no sobreviven por alguna razón genética o metabólica, es decir, esta combinación es letal, 2) La temperatura utilizada para la PCR de la mutación A122T hizo la reacción muy específica, 3) El tamaño de la población evaluada no es suficiente para observar estas proporciones, y 4) Las plantas Puitá INTA, son heterocigotas para el gen *ALS* (sólo presentan un alelo resistente).

En estudios previos, se ha asociado alelos resistentes a imidazolinonas con la disminución del *fitness* en plantas, como consecuencia de efectos pleiotrópicos, los cuales no son letales para la planta, pero perjudican el crecimiento o el rendimiento del cultivo

(Zhang *et al.* 2006, Sha *et al.* 2007, Vila-Aiub *et al.* 2009, Yu *et al.* 2010, Matsubara *et al.* 2014). Además, se ha reportado que la variedad P. INTA, que posee la mutación A122T, muestra una germinación más rápida que variedades con otras mutaciones en el gen *ALS* (Goulart *et al.* 2012). Por lo que, debido a las características de los iniciadores, se considera la opción 2 como la más viable, ya que el diseño del iniciador SNPPtaRev1 fue creado mediante SNAP (*single nucleotide-amplified polymorphism*). Esto consiste en la inserción de un nucleótido adicional en la segunda base desde el extremo 3' (G/T) que no concuerda con la secuencia, por lo que se cambian dos nucleótidos de la secuencia original: el complementario a la mutación y otro adicional. Esto aumenta la fiabilidad de la amplificación y la discriminación de mutaciones puntuales entre los individuos (Rosso *et al.* 2010a).

Al realizar la estandarización de esta PCR, se efectuó cambios del artículo original (Rosso *et al.* 2010a), e inicialmente se programó un touchdown-PCR (temperatura de *annealing* de 62°C a 55°C, Anexo 3), con el que se determinó la mutación A122T en la variedad Puitá INTA y en la primera generación (híbridos-P1). Durante la determinación del alelo resistente para la segunda generación de híbridos, se presentaron problemas con amplificaciones inespecíficas, por lo que se eliminó el touchdown-PCR y se cambió la temperatura de *annealing* a 62°C (Anexo 3). Esto pudo tener consecuencias, ya que la reacción se hizo más específica, es decir, al aumentar la temperatura, se incrementa la probabilidad de discriminar primers incorrectamente alineados y reduce el alineamiento de nucleótidos incorrectos en el extremo 3' (Innis *et al.* 2012), sitio en el que precisamente ha sido modificado el iniciador SNPPtaRev1 con una base no complementaria a la secuencia que se desea detectar (Rosso *et al.* 2010a).

Esta modificación realizada en el primer SNPPtaRev1, ocurre en el diseño de los primers para la mutación S653D, pero en la cuarta base desde el extremo 3' (Kadaru *et al.* 2008), y este no presentó problemas con las modificaciones realizadas para la estandarización de la PCR realizadas en este estudio (Anexo 2). Además, en otros estudios, se han reportado desviaciones de estas proporciones como consecuencia del tamaño de población (Shivrain *et al.* 2006), sin embargo, al tomar en cuenta una probabilidad binomial de éxito baja, este factor puede ser descartado. También, es importante considerar, que la variedad Puitá INTA, es un producto mejorado y comercializado, por lo que la probabilidad

de que presente el gen *ALS* en su forma heterocigota es baja, ya que ha pasado por procesos de selección sucesivos que garantiza la calidad del producto para el control del arroz maleza (Livore 2005, PROARROZ 2013). En adición, todos los genotipos de Puitá INTA caracterizados en este estudio, son homocigotas resistentes (n=9, Cuadro 12). Por lo que, el cambio en la temperatura de *annealing* del par de primers Ar6F/SNPPtaRev1, pudo disminuir la amplificación del alelo resistente en las plantas híbridas-P2 y de esta forma desviar las proporciones observadas de las esperadas.

A pesar, de estas diferencias en la detección del alelo resistente entre los híbridos-C2 e híbridos-P2, es importante recalcar, que la resistencia a imidazolinonas (S653D, A122T) aparece en el genoma de las plantas híbridas en la primera y segunda generación (C1, C2, P1 y P2), ya sea de forma homocigota o heterocigota (RR o RS). Y es heredada de las variedades resistentes cultivadas en Costa Rica, a través de hibridación, lo cual podría generar tolerancia del arroz maleza al herbicida y dificultar su selección en el campo.

8.5. Evaluación fenotípica de resistencia la herbicida.

Los daños observados en las plantas híbridas y líneas parentales tratadas con imazapir, corresponden con el genotipo del gen *ALS*, detectado a nivel molecular mediante PCR (Cuadro 11). Por lo que, esto confirma la asociación de este rasgo con un único gen nuclear y que presenta dominancia incompleta en el fenotipo, como se ha determinado previamente en plantas maleza del género *Solanum* (Volenberg y Stoltenberg 2002, Ashigh *et al.* 2008). Los resultados observados, confirman la expresión del alelo mutado (S653D) en las plantas híbridas provenientes del cruce entre arroz maleza y la variedad CFX-18. Ya que, este gen se traduce en la enzima ALS con cambio de un aminoácido que disminuye las interacciones con imidazolinonas, y les permite ser resistentes a estos compuestos (McCourt *et al.* 2006).

Sin embargo, la mayoría de plantas no murieron con dosis elevadas de imazapir, por lo que se considera que hubo un efecto del tamaño de las plantas, ya que la aplicación del herbicida se realiza cuando las plantas tienen entre 24 y 31 DDS. En nuestro caso, se usaron plantas que presentaban una antigüedad mayor a los 30 DDS y tenían un sistema radicular muy desarrollado, lo cual les permitió una mayor tolerancia al herbicida.

8.6. Implicaciones del análisis morfológico y vigor híbrido en plantas resultantes del cruce entre arroz maleza y variedades resistentes a herbicidas.

La introducción de variedades resistentes a imidazolinonas en Costa Rica, se realizó con el propósito de controlar el arroz maleza mediante la aplicación de herbicidas. Sin embargo, se ha observado que estas variedades no han mostrado un control eficaz de estas malezas, y el presente análisis comprueba que puede darse hibridación entre variedades resistentes a imidazolinonas y el arroz maleza.

Esta hibridación reporta la generación de múltiples combinaciones de arroz maleza híbrido con tolerancia al herbicida, que combinado con una utilización constante del mismo en el campo puede favorecer la persistencia de los híbridos y disminuir la vida útil de las variedades comerciales. Además, en estudios previos se reportó la hibridación de estas variedades resistentes con la especie silvestre *Oryza glumaepatula* (Villalobos 2015, com. pers.). Y a pesar de que estos híbridos fueron obtenidos y evaluados en condiciones de invernadero, se evidencia que las variedades resistentes a imidazolinonas tienen las condiciones y el potencial para hibridar de forma natural con el arroz maleza y con especies silvestres. Por lo que, se debería de comprobar la existencia de plantas híbridas resultantes del cruce del arroz maleza con variedades resistentes a imidazolinonas en arrozales de nuestro país, ya que la probabilidad de encontrarlas es muy alta.

9. CONCLUSIONES

Se logró producir híbridos entre arroz maleza y dos variedades resistentes a herbicidas, en condiciones de invernadero. La semilla híbrida producida es fértil en ambas generaciones de híbridos y estas plantas poseen en su genoma la resistencia al herbicida. Los rasgos caracterizados en los híbridos revelan una alta variabilidad morfológica en ambas generaciones y entre los más relevantes se determinan el ancho de la hoja bandera, la longitud de panícula y el número de semilla total. Los periodos variables de floración es una habilidad importante en plantas híbridas, que facilita la polinización cruzada, como estrategia de sobrevivencia en el campo.

Además, se determina que la hibridación entre el arroz maleza y las variedades resistentes a imidazolinonas cultivadas en Costa Rica, genera múltiples combinaciones híbridas que facilitan el paso de características de interés agronómico generación tras

generación, que pueden estar complementando una posible tolerancia del arroz maleza a las imidazolinonas y que podría favorecer su persistencia en el campo.

10. RECOMENDACIONES

Como recomendaciones, sería bueno hacer un análisis con mayor muestra para describir mejor la variación morfológica en los híbridos resultantes del cruce entre los morfotipos de arroz maleza y las variedades resistentes a imidazolinonas. Además, para realizar una selección más rápida de las plantas que poseen la mutación, se recomienda remojar la semilla en herbicida antes de la germinación, ya que esto facilita la selección de híbridos con base en la longitud de la raíz (Rosso *et al.* 2010b, Goulart *et al.* 2015), y es una técnica más barata, rápida y eficiente. Posteriormente, se puede verificar mediante PCR para confirmar la presencia de la mutación en el genoma de las plantas. Además, realizar prueba de PCR para la mutación A122T, con temperaturas de *annealing* de 62-55°C y de 62°C, para determinar si existe alguna diferencia en la amplificación del alelo resistente en las mismas muestras con diferentes temperaturas, o talvez, utilizar otro método de detección más sensible y específico (Rosas *et al.* 2014).

También, la aplicación del herbicida debería de repetirse en plantas más jóvenes, para observar un efecto más claro de acuerdo a los diferentes genotipos determinados previamente. Por último, estudiar la hibridación en la dirección contraria, es decir, utilizar las variedades resistentes como líneas maternas y el arroz maleza como donador de polen, sería útil para determinar características que se heredan del arroz maleza al arroz cultivado.

11. LITERATURA CITADA

- Akio-Kido, E., E. Hodson de Jaramillo, F. C. Zelaschi, F. J. Lima-Aragao, G. Delfino de Sousa, I. Saad-Villegas, J. L. Solleiro-Rebolledo, J. Correa de Faria, M. Almeida de Melo, M. M. Roca, M. Burachik, P. Paes de Andrade, S. Ortiz-García & W. Parrott (eds.). 2012. Guía para la Evaluación de Riesgo Ambiental de Organismos Genéticamente Modificados. Internacional Life Sciences Institute, Brasil. 140 p.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. 2008. Molecular Biology of the Cell. Taylor & Francis Group, New York. 1601 p.
- Among-Nyarko, K. & S. K. De Datta. 1991. A Handbook for Weed Control in Rice. International Rice Research Institute, Manila.
- Andres, A., G. Theisen, G. Concenço & L. Galon. 2013. Weed Resistance to Herbicides in Rice Fields in Southern Brazil. In: A. J. Prince & J. A. Kelton (eds.). Herbicides Current Research and Case Studies in Use. INTECH. 632 p.
- Ashigh, J., I. Rajcan & F. J. Tardif. 2008. Genetics of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors in populations of eastern black nightshade (*Solanum ptychanthum*) from Ontario. Weed Science 56:210–215.
- 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.
- BASF. 2014. BASF Crop Protection Centroamérica. Disponible en: http://agro.basf.co.cr/clearfield/componentes_del_spcapca.php
- Bing, Y., W. Y. Xue, L. J. Luo & Y. Z. Xing. 2006. QTL analysis for flag leaf characteristics and their relationships with yield and yield traits in rice. Acta Genetica Sinica 33:824–832.
- Brenes-Prendas, S., R. Agüero-Alvarado & A. M. Rodríguez-Ruiz. 2006. Distribución espacial y densidad de poblaciones de arroz rojo (*Oryza sativa* L.) en dos sistemas de labranza. Agronomía Mesoamericana 17:35-39.
- Brown, W. M. 2013. Arroz rojo: principal enemigo de los arroceros. Revista Tierra Fértil 41:4-7. Disponible en: <http://www.croplifela.org/pdfs/TIERRA-FERTIL-CA-2013.pdf>

- Burgos, N., J. Norsworthy, R. Scott & K. Smith. 2008. Red rice (*Oryza sativa*) status after 5 years of imidazolinone-resistant rice technology in Arkansas. *Weed Technology* 22:200-208.
- Castaño, J. 1985. Principales enfermedades del arroz y su control en América Latina. *In*: E. Toscón & E. García eds. *Arroz: Investigación y Producción*. Centro Internacional para la Agricultura Tropical, Palmira. 696 p.
- Chen, L. J., D. S. Lee, Z. P. Song, H. S. Suh & B. R. Lu. 2004. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Annals of Botany* 93:67-73.
- CONARROZ (Corporación Arroceras Nacional). 2015. Informe estadístico período 2013/2014. Disponible en: <http://www.conarroz.com>
- Croughan, T. P. 1998. Herbicide resistant rice. Patent No.:US5736629.
- Croughan, T. P. 2008. Resistance to acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicides in rice. Patent No.:US7399905B2.
- De Galvis, Y., J. González, J. Reyes & O. Arregocés. 1985. Descripción y daño de los insectos que atacan el arroz en América Latina. *In*: E. Toscón & E. García eds. *Arroz: Investigación y Producción*. Centro Internacional para la Agricultura Tropical, Palmira. 696 p.
- Diarra, A., R. J. Smith & R. E. Talbert. 1985. Growth and morphological characteristics of red rice (*Oryza sativa*) biotypes. *Weed Science* 33:310-314.
- Dunand, R. T. 1996. Maleic hydrazide for red rice suppression-direct effects on rice. *Proceedings of the Rice Technical Working Group* 26:193-194.
- Ellstrand, N. C., H. C. Prentice & J. F. Hancock. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:539-563.
- Ellstrand, N. C. 2003. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358:1163-1170.
- Esqueda, V. A. 2000. Control químico del arroz rojo (*Oryza sativa* L.) en arroz, con herbicidas no selectivos-protectantes a la semilla. *Agronomía Mesoamericana* 11: 57-61.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2002. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Informe resumido. Roma. 106 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2007. Arroces maleza: origen biología, ecología y control. Delouche, J. C., N. R. Burgos, D. R. Gealy, G. Zorrilla de San Martin, R. Labrada, M. Larinde & C. Rosell (eds.). Roma. 157 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2013. Disponible en: <http://www.fao.org>
- Fisher, A. J. & A. Ramirez. 1993. Red rice (*Oryza sativa*): competition studies for management decision. *International Journal of Pest Management* 39:133-138.
- Gealy, D. R., D. H. Mitten & J. N. Rutger. 2003. Gene flow between red rice (*Oryza sativa*) and herbicide-resistant rice (*O. sativa*): Implications for weed management. *Weed Technology* 17:627-645.
- GenBank®. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
- González, J. 1985. El arroz rojo y su control. *In*: E. Toscón & E. García eds. Arroz: Investigación y Producción. Centro Internacional para la Agricultura Tropical, Palmira. 696 p.
- González, J., R. Zelaya & O. Arregocés. 1985. Principales malezas en el cultivo del arroz en América Latina. *In*: E. Toscón & E. García eds. Arroz: Investigación y Producción. Centro Internacional para la Agricultura Tropical, Palmira. 696 p.
- Goulart, I., F. O. Matzenbacher, & A. Merotto Jr. 2012. Differential germination pattern of rice cultivars resistant to imidazolinone herbicides carrying different acetolactate synthase gene mutations. *Weed Research* 52:224–232.
- Goulart, I., V. G. Menezes, E. D. Bortoly, V. Kupas & A. Merotto Jr. 2015. Detecting gene flow from ALS-resistant hybrid and inbred rice to weedy rice using single plant pollen donors. *Exploring Agricultural Science* pág. 1-14. Disponible en: doi:10.1017/S0014479715000058.
- Gressel, J. 2002. *Molecular Biology of Weed Control*. Taylor & Francis. New York. 504 p.
- Gresel, J. & B. E. 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 Management Science* 65:723–731.

- Griffin, J. L. & T. J. Harger 1990. Red rice (*Oryza sativa*) control options in soybeans (*Glycine max*). *Weed Technology* 4:35-38.
- Grumet, R., J. F. Hancock, K. M. Mareid & C. Weebadde. 2011. Environmental Safety of Genetically Engineered Crops. Michigan State University Press, USA. 400 p.
- Gu, X. Y., S. F. Kianian, & M. E. Foley. 2005. Seed dormancy imposed by covering tissues interrelates to shattering and seed morphological characteristics in weedy rice. *Crop Science* 45:948–955.
- Heap, I. 2015. Number resistant species for several herbicide sites of action. International Survey of Herbicide-Resistant Weeds. Disponible en: <http://weedsociety.org>
- Huang, X., S. Yang, J. Gong, Y. Zhao, Q. Feng, H. Gong, W. Li, Q. Zhan, B. Cheng, J. Xia, N. Chen, Z. Hao, K. Liu, C. Zhu, T. Huang, Q. Zhao, L. Zhang, D. Fan, C. Zhou, Y. Lu, Q. Weng, Z. X. Wang, J. Li & B. Han. 2015. Genomic analysis of hybrid rice varieties reveals numerous superior alleles that contribute to heterosis. *Nature Communications* 6(6258):1-9.
- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White. 2012. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, USA. 482 p.
- Inui, H., N. Shiota, Y. Ido, T. Inoue, S. Hirose, H. Kawahigashi, Y. Ohkawa & H. Ohkawa. 2001. Herbicide metabolism and tolerance in the transgenic rice plants expressing human CYP2C9 and CYP2C19. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 71:156–169.
- IRRI-IBPGR. 1980. Descriptors for rice *Oryza sativa* L. 21 p.
- Kadaru, S., W. Zhang, A. Yadav & J. Oard. 2008. Development and application of PCR-based assays for high-throughput screening of aromatic and herbicide resistant rice. *Euphytica* 160:431–438.
- Komiya, R., A. Ikegami, S. Tamaki, S. Yokoi & K. Shimamoto. 2008. *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice. *Development* 135:767-774.
- Langevin, S. A., K. Clay & J. B. Grace. 1990. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution* 44:1000-1008.

- Li, X., Q. Qian, Z. Fu, Y. Wang, G. Xiong, D. Zeng, X. Wang, X. Liu, S. Teng, F. Hiroshi, M. Yuan, D. Luok, B. Han & J. Li. 2003. Control of tillering in rice. *Nature* 422: 618-621.
- Linscombe, S. D. 2010. Rice cultivar designated 'CL131'. Patent No.: US7786360B2.
- Lippman, Z. B. & D. Zamir 2007. Heterosis: revisiting the magic. *Trends in Genetics* 23:60-66.
- Livore, A.B. 2005. Rice plants having increased tolerance to imidazolinone herbicides. Patent No. WO2005/020673A1.
- 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.
- Luan, W., H. Chen, Y. Fu, H. Si, W. Peng, S. Song, W. Liu, G. Hu, Z. Sun, D. Xie & C. Sun. 2009. The effect of the crosstalk between photoperiod and temperature on the heading-date in rice. *PLoS ONE* 4: e5891.
- Maheshwari, S & D. A. Barbash 2011. The genetics of hybrid incompatibilities. *Annual Review of Genetics* 45:331-355.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20:229-237.
- Matsubara, K., E. Yamamoto, R. Mizobuchi, J. I. Yonemaru, T. Yamamoto, H. Kato & M. Yano. 2014. Hybrid breakdown caused by epistasis-based recessive incompatibility in a cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Heredity* doi:10.1093/jhered/esu065
- McCourt, J. A., S. Pang, J. King-Scott, L. W. Guddat & R. G. Duggleby. 2006. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *PNAS* 17:569-573.
- Oard, J., S. D. Linscombe, M. P. Braverman, F. Jodari, D. C. Blouin, M. Leech, A. Kohli, P. Vain, J. C. Cooley & P. Christou. 1996. Development, field evaluation, and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. *Molecular Breeding* 2:359-368.
- Oard, J., M. A. Cohn, S. Linscombe, D. Gealy & K. Gravois. 2000. Field evaluation of seed production, shattering, and dormancy in hybrid populations of transgenic rice (*Oryza sativa*) and the weed, red rice (*Oryza sativa*). *Plant Science* 157:13-22.

- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1999. Consensus Document on the Biology of *Oryza sativa* (Rice). ENV/JM/MONO99.
- Ogiso-Tanaka, E., K. Matsubara, S. Yamamoto, Y. Nonoue, J. Wu, H. Fujisawa, H. Ishikubo, T. Tanaka, T. Ando, T. Matsumoto & M. Yano. 2013. Natural variation of the *RICE FLOWERING LOCUS T1* contributes to flowering time divergence in rice. PLOS ONE 8(10): e75959. doi:10.1371/journal.pone.0075959.
- Olofsson, M., B. E. Valverde & K. H. Madsen. 2000. Herbicide resistant rice (*Oryza sativa* L.): Global implications for weedy rice and weed management. Annals of Applied Biology 137:279-295.
- Papa, R. & P. Gepts. 2004. Gene Flow Between Crops and Their Wild Progenitors. Encyclopedia of Plant and Crop Science 488-491.
- Pantoja, A., A. Fischer, F. Correa-Victoria, L. R. Sanint & A. Ramírez. 1997. Manejo integrado de plagas en arroz: artrópodos, enfermedades y malezas. Centro Internacional para la Agricultura Tropical, Colombia. 148 p.
- Peña, L. 2005. Transgenic Plants: Methods and Protocols. Human Press, New Jersey. 437 p.
- Polón, R., G. S. Díaz, R. Morejón, R. I. Castro, N. Pérez, A. Miranda, y M. A. Ramírez. 2005. Posibilidad de control del arroz rojo (*Oryza sativa* L.) con la inundación prolongada. Cultivos Tropicales 26:79-82.
- Posada, R. 1985. El arroz en el mundo y América Latina. In: E. Toscón & E. García eds. Arroz: Investigación y Producción. Centro Internacional para la Agricultura Tropical, Palmira. 696 p.
- PROARROZ. 2013. Puita INTA CL. Arroz resistente a herbicida. Disponible en: <http://www.proarroz.com.ar/variedades.php?pag=puita>.
- Qi, X. Y. Liu, C. C. Vigueira, N. D. Young, A. L. Caicedo, Y. Jia, D. R. Gealy & K. M. Olsen. 2015. More than one way to evolve a weed: Parallel evolution of U.S. weedy rice through independent genetic mechanisms. Molecular Ecology DOI: 10.1111/mec.13256.
- R Project for Statistical Computing (<http://www.r-project.org/>).
- Rieseberg, L. H. 1997. Hybrid origins of plant species. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 28:359–89.

- Rieseberg, L. H. & J. H. Willis. 2007. Plant Speciation. *Science* 317: 910–914.
- Rosas, J. E., V. Bonnacarrère & F. Pérez de Vida. 2014. One-step, codominant detection of imidazolinone resistance mutations in weedy rice (*Oryza sativa* L.). *Electronic Journal of Biotechnology* 17:95-101.
- Roso, A. C., A. Merotto, C. A. Delatorre & V. G. Menezes. 2010a. Regional scale distribution of imidazolinone herbicide-resistant alleles in red rice (*Oryza sativa* L.) determined through SNP markers. *Field Crops Research* 119:175–182.
- Roso, A. C., A. Merotto Jr. & C. A. Delatorre. 2010b. Bioensaios para diagnóstico da resistência aos herbicidas imidazolinonas em arroz. *Planta Daninha* 28:411–419.
- Sánchez, E., G. Arrieta-Espinoza & A. M. Espinoza-Esquivel. 2007. Vegetative and reproductive development of Costa Rican weedy rice compared with commercial rice (*Oryza sativa*). *Planta Daninha* 25: 13-23.
- Sánchez, E., G. Arrieta-Espinoza, J. A. Lobo & A. M. Espinoza-Esquivel. 2009. Assessment of gene flow from a herbicide-resistant *indica* rice (*Oryza sativa* L.) to the Costa Rican weedy rice (*Oryza sativa*) in Tropical America: factors affecting hybridization rates and characterization of F₁ hybrids. *Transgenic Research* 4:633-647.
- Sarkarung, S. 1991. A simplified crossing method for rice breeding: A manual. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali. 32 p.
- Sha, X. Y., S. D. Linscombe, & D. E. Groth. 2007. Field Evaluation of Imidazolinone-Tolerant Clearfield Rice (*Oryza sativa* L.) at Nine Louisiana Locations. *Crop Science* 47:1177–1185.
- Shen, G., W. Zhan, H. Chen & Y. Xing. 2014. Dominance and epistasis are the main contributors to heterosis for plant height in rice. *Plant Science* 215-216:11-18.
- Shivrain, V., N. R. Burgos, K. A. K. Moldenhauer, R. W. Mcnew & T. L. Baldwin. 2006. Characterization of spontaneous crosses between Clearfield rice (*Oryza sativa*) and red rice (*Oryza sativa*). *Weed Technology* 20:576-584.
- Shivrain, V., N. R. Burgos, M. M. Anders, S. N. Rajguru, J. Moore & M. A. Sales. 2007. Gene flow between ClearfieldTM rice and red rice. *Crop Protection* 26:349-356.

- Shivrain, V., N. R. Burgos, D. R. Gealy, K. A. K. Moldenhauer & C. J. Baquireza. 2008. Maximum outcrossing rate and genetic compatibility between red rice (*Oryza sativa*) biotypes and Clearfield rice. *Weed Science* 56:807–813.
- Shivrain, V., N. R. Burgos, M.A. Sales, A. Mauromoustakos, D. R. Gealy, K. L. Smith, H. L. Black & M. Jia. 2009. Factors affecting the outcrossing rate between Clearfield rice and red rice (*Oryza sativa*). *Weed Science* 57:394-403.
- Shrestha, R., J. Gómez-Ariza, V. Brambilla & F. Fornara. 2014. Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. *Annals of Botany* 114:1445-1458.
- Song, Z. P., B. R. Lu, B. Wang & J. K. Chen. 2004. Fitness estimation through performance comparison of F1 hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O. sativa*. *Annals of Botany* 93: 311-316.
- Song, G. S., H. L. Zhai, Y. G. Peng, L. Zhang, G. Wei, X. Y. Chen, Y. G. Xiao, L. Wang, Y. J. Chen, B. Wu, B. Chen, Y. Zhang, H. Chen, X. J. Feng, W. K. Gong, Y. Liu, Z. J. Yin, F. Wang, G. Z. Liu, H. L. Xu, X. L. Wei, X. L. Zhao, P. B.F. Ouwkerk, T. Hankemeier, T. Reijmers, R. van der Heijden, C. M. Lu, M. Wang, J. van der Greef & Z. Zhu. 2010. Comparative transcriptional profiling and preliminary study on heterosis mechanism of super-hybrid rice. *Molecular Plant* 3:1012-1025.
- Song Y, Z. Gao & W. Luanet. 2012. Interaction between temperature and photoperiod in regulation of flowering time in rice. *Science China Life Sciences* 55:241–249.
- Tan, S., R. R. Evans, M. L. Dahmer, B. K. Singh & D. L. Shaner. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Management Science* 61:246-257.
- Thurber, C., M. Reagon, K. M. Olsen, Y. Jia & A. L. Caicedo. 2014. The evolution of flowering strategies in US weedy rice. *American Journal of Botany* 101:1737-1747.
- Tranel, P. J. & T. R. Wright 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* 50:700–712.
- Trejos-Espinosa, R. 2006. Estudio sobre las relaciones genéticas del arroz maleza y biología reproductiva e hibridación de *Oryza glumaepatula* de Costa Rica. Tesis de Maestría. Programa de Posgrado de Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

- Tsuji, H., K. Taoka & K. Shimamoto. 2011. Regulation of flowering in rice: two florigen genes, a complex gene network, and natural variation. *Current Opinion in Plant Biology* 14:45-52.
- Valverde, B. E., C. R. Riches & J. C. Caseley. 2000. Prevención y manejo de malezas resistentes a herbicidas en arroz: experiencias en América Central con *Echinochloa colona*. San José, Costa Rica. 136 p.
- Vaughan, D. A. 1989. The genus *Oryza* L. Current status of taxonomy. IRRI Research Paper Series 138:3-21.
- Vila-Aiub, M. M., P. Neve & S. B. Powles. 2009. Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist* 184:751–767.
- Volenberg, D. S & D. E. Stoltenberg. 2002. Inheritance of resistance in Eastern Black Nightshade (*Solanum nigrum*) to acetolactate synthase inhibitors. *Weed Science* 50:731-736.
- Wakabayashi, K. & P. Böger. 2004. Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 2): amino acid, lipid and cell wall biosynthesis, and other targets for future herbicides. *Weed Biology and Management* 4:59–70.
- Wang, P., G. Zhou, K. Cui, Z. Li & S. Yu. 2012. Clustered QTL for source leaf size and yield traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding* 29:99-113.
- Webster, E. & J. Masson. 2001. Acetolactate synthase-inhibiting herbicides on imidazolinone-tolerant rice. *Weed Science* 49:652–657.
- Whaley, C. M., H. P. Wilson & J. Westwood. 2007. A new mutation in plant ALS confers resistance to five classes of ALS-inhibiting herbicides. *Weed Science* 55:83–90.
- Xue, W., Y. Xing, X. Weng, Y. Zhao, W. Tang, L. Wang, H. Zhou, S. Yu, C. Xu, X. Li & Q. Zhang. 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nature Genetics* 40:761-767.
- Yan, J. Q., J. Zhu, C. X. He, M. Benmoussa & P. Wu. 1998. Quantitative trait loci analysis for the developmental behavior of tiller number in rice (*Oryza sativa* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 97:267-274.
- Yano, M., Y. Katayose, M. Ashikari, U. Yamanouchi, L. Monna, T. Fuse, T. Baba, K. Yamamoto, Y. Umehara, Y. Nagamura & T. Sasaki. 2000. *Hd1*, a major

- photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. *The Plant Cell* 12: 2473-2483.
- Yu, Q., H. Han, M. M. Vila-Aiub & S. B. Powles. 2010. AHAS herbicide resistance endowing mutations: effect on AHAS functionality and plant growth. *Journal of Experimental Botany* 61: 3925–3934.
- Zeevaart, J. 2008. Leaf-produced floral signals. *Current Opinion in Plant Biology* 11:541-547.
- Zhang, N., S. Linscombe, J. Oard & N. Y. Zhang. 2003. Out-crossing frequency and genetic analysis of hybrids between transgenic glufosinate herbicide-resistant rice and the weed, red rice. *Euphytica* 130: 35-45.
- Zhang, W., S. D. Linscombe, E. Webster, S. Tan & J. H. Oard. 2006. Risk assessment of the transfer of imazethapyr herbicide tolerance from Clearfield rice to red rice (*Oryza sativa*). *Euphytica* 152:75-86.
- Zhang, W., S. D. Linscombe & J. H. Oard. 2008. Genetic and agronomic analyses of red rice-Clearfield hybrids and their progeny produced from natural and controlled crosses. *Euphytica* 164:659-668.

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 Nano Drop.
12. Almacenar a corto plazo a -20 °C y a largo plazo a -70°C.

Anexo 2. Reacción y condiciones cíclicas para detección de la mutación S653D y alelo susceptible para la variedad CFX-18 mediante PCR (Kadaru *et al.* 2008).

Contenido de la reacción

Reactivo	µl
Agua	11.35
Primer F (10µM)	1.00
Primer R (10µM)	1.00
BSA (10mg/ml)	0.80
10x Buffer Taq	2.00
dNTPs (10mM)	0.40
MgCl ₂	1.20
Taq Polimerasa	0.25
ADN (50µl/ng)	2.00
Total	20.00

Primers para detección de la mutación S653D: ALS653ResF/ALSR3.

Primers para detección de alelo susceptible: ALS653SusF/ALSR3.

Tamaño del producto de la amplificación: 134bp

Secuencia de los iniciadores (mutación: A/G)

Primer	Secuencia	Tm (°C)
ALS653ResF	5'-GTGCTGCCTATGATCCTAAA-3'	56.4
ALS653SusF	5'-GTGCTGCCTATGATCCTAAG-3'	58.4
ALSR3	5'-TGGGTCATTCAGGTCAAACA-3'	56.4

Condiciones cíclicas: desnaturalización durante 3 min a 94°C, seguido de 28 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 63.2°C y 30 s a 72°C, por último 5 min a 72°C de elongación.

Anexo 3. Reacción y condiciones cíclicas para detección de la mutación A122T y alelo susceptible para la variedad Puitá INTA mediante PCR (Roso *et al.* 2010a).

Contenido de la reacción

Reactivo	μ l
Agua	10.02
Primer F (10 μ M)	1.00
Primer R (10 μ M)	1.00
BSA (10mg/ml)	0.80
DMSO (99%)	1.33
10x Buffer Taq	2.00
dNTPs (10mM)	0.40
MgCl ₂	1.20
Taq Polimerasa	0.25
ADN (50 μ l/ng)	2.00
Total	20.00

Primers para detección de la mutación A122T: Ar6F, SNPPtaRev1.

Primers para detección de alelo susceptible: Ar6F, PtaSus.

Tamaño del producto de la amplificación: 253pb

Secuencia de los iniciadores (mutación: T/C)

Primer	Secuencia	T _m (°C)
SNPPtaRev1	5'-CCTGGTGGATCTCCATGGACTT-3'	64.0
PtaSus	5'- TGGTGGATCTCCATGGACGC-3'	62.5
Ar6F	5'-CCAAGACCGCCGTAAGAAC-3'	62.5

Condiciones cíclicas touchdown-PCR (Puitá INTA e híbridos-P1): desnaturalización durante 3 min a 94°C, seguido de 7 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min 62°C (-1°C cada ciclo) y 1.5 min a 72°C, luego 26 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1.5 min a 72°C. Por último 10 min a 72°C de elongación.

Condiciones cíclicas (híbridos-P2): desnaturalización durante 3 min a 94°C, seguido de 28 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 62°C y 1 min a 72°C, por último 10 min a 72°C de elongación.

Anexo 4. Probabilidad obtenida en los análisis de contrastes al comprar altura promedio entre los híbridos y las líneas parentales en la primera y segunda generación de híbridos.

Comparación	30 DAS	45 DAS	60 DAS	75 DAS	90 DAS	105 DAS	madurez
CFX-020C	*	*	*	*	*	*	*
020-020C	*	*	*	*	*	*	0.982
CFX-020C2	0.051	*	*	*	0.061	0.113	0.108
020-020C2	0.710	*	*	*	*	*	0.170
^a 020C1-020C2	*	*	*	0.605	0.493	0.412	0.450
CFX-120C	*	*	*	*	0.195	0.111	*
120-120C	*	*	*	0.066	0.850	1.000	0.985
CFX-120C2	0.055	*	*	*	*	*	*
120-120C2	0.694	*	*	*	0.053	0.552	0.993
^a 120C1-120C2	*	*	0.705	*	0.146	0.437	0.886
CFX-023C	*	*	*	*	*	*	*
023-023C	*	*	*	*	*	0.832	0.336
CFX-023C2	*	*	*	*	*	*	*
023-023C2	0.743	*	*	*	*	0.056	*
^a 023C1-023C2	*	*	0.096	0.932	0.997	0.713	0.983
CFX-121C	*	*	*	*	0.103	0.157	*
121-121C	*	*	*	*	*	*	*
Pta-020P	0.350	0.892	*	0.880	0.064	*	*
020-020P	*	*	*	*	0.126	0.708	0.824
Pta-020P2	*	0.322	*	0.991	*	*	*
020-020P2	0.302	*	*	*	0.074	0.985	*
^a 020P1-020P2	*	*	0.997	0.924	0.981	0.908	0.129
Pta-120P	0.095	0.624	0.989	0.133	*	*	*
120-120P	*	*	*	*	0.096	0.964	1.000
Pta-120P2	*	0.999	0.460	0.059	*	*	*
120-120P2	0.556	*	*	*	*	*	0.539
^a 120P1-120P2	*	0.320	0.415	0.947	0.580	*	0.434
Pta-073P	0.153	*	0.990	0.255	*	*	*
073-073P	*	*	*	*	0.974	0.580	0.072
Pta-073P2	*	1.000	*	0.117	*	*	*
073-073P2	0.382	0.192	*	*	0.162	*	0.514
^a 073P1-073P2	*	*	*	0.928	*	*	*
Pta-121P	*	*	*	*	*	*	*
121-121P	*	*	*	*	*	*	*
Pta-121P2	*	0.791	0.928	*	*	*	*
121-121P2	1.000	*	*	*	*	*	*
^a 121P1-121P2	*	0.250	*	0.418	0.225	0.105	0.210

^a Comparación entre híbridos de primera y segunda generación, *probabilidad < 0.05.

Anexo 5. Probabilidad obtenida en los análisis de contrastes al comprar el número de brotes promedio entre los híbridos y las líneas parentales en la primera y segunda generación de híbridos.

Comparación	45 DAS	60 DAS	75 DAS	90 DAS	105 DAS	madurez
CFX-020C	1.000	*	*	*	0.086	0.225
020-020C	*	*	*	0.168	0.802	0.306
CFX-020C2	1.000	*	0.344	0.985	0.976	1.000
020-020C2	0.422	*	0.705	*	*	0.192
^a 020C1-020C2	*	*	*	*	*	*
CFX-120C	1.000	*	*	0.197	0.248	0.314
120-120C	0.270	*	*	*	*	*
CFX-120C2	1.000	0.067	0.569	0.991	0.819	0.591
120-120C2	0.466	0.417	0.311	0.512	0.888	0.995
^a 120C1-120C2	0.950	*	*	*	*	*
CFX-023C	1.000	*	*	0.452	0.515	0.409
023-023C	0.498	0.792	0.685	0.977	0.977	0.811
CFX-023C2	1.000	0.295	0.986	0.208	0.193	0.998
023-023C2	0.956	0.508	*	*	*	0.485
^a 023C1-023C2	0.715	0.176	*	*	*	0.177
CFX-121C	1.000	*	*	0.289	0.203	0.647
121-121C	0.217	0.114	0.195	0.838	0.879	0.849
Pta-020P	0.647	0.974	0.164	*	*	*
020-020P	*	*	*	0.800	1.000	0.780
Pta-020P2	*	*	0.850	0.766	0.385	0.530
020-020P2	0.992	0.230	1.000	*	*	*
^a 020P1-020P2	*	*	*	*	*	0.242
Pta-120P	0.644	0.845	0.220	*	*	0.058
120-120P	*	*	*	*	*	0.481
Pta-120P2	*	*	0.984	0.734	0.222	0.075
120-120P2	0.945	0.287	0.064	0.468	0.998	0.545
^a 120P1-120P2	*	*	*	*	*	1.000
Pta-073P	*	*	*	*	*	*
073-073P	*	*	*	*	*	0.4691
Pta-073P2	*	*	0.865	0.994	0.498	0.606
073-073P2	0.969	0.999	0.997	0.718	0.443	0.722
^a 073P1-073P2	*	*	*	*	*	*
Pta-121P	0.949	*	*	*	*	*
121-121P	0.357	*	*	0.969	0.949	0.678
Pta-121P2	0.246	*	0.611	0.988	*	0.097
121-121P2	0.736	0.994	0.483	*	*	0.174
^a 121P1-121P2	0.080	*	*	*	*	0.641

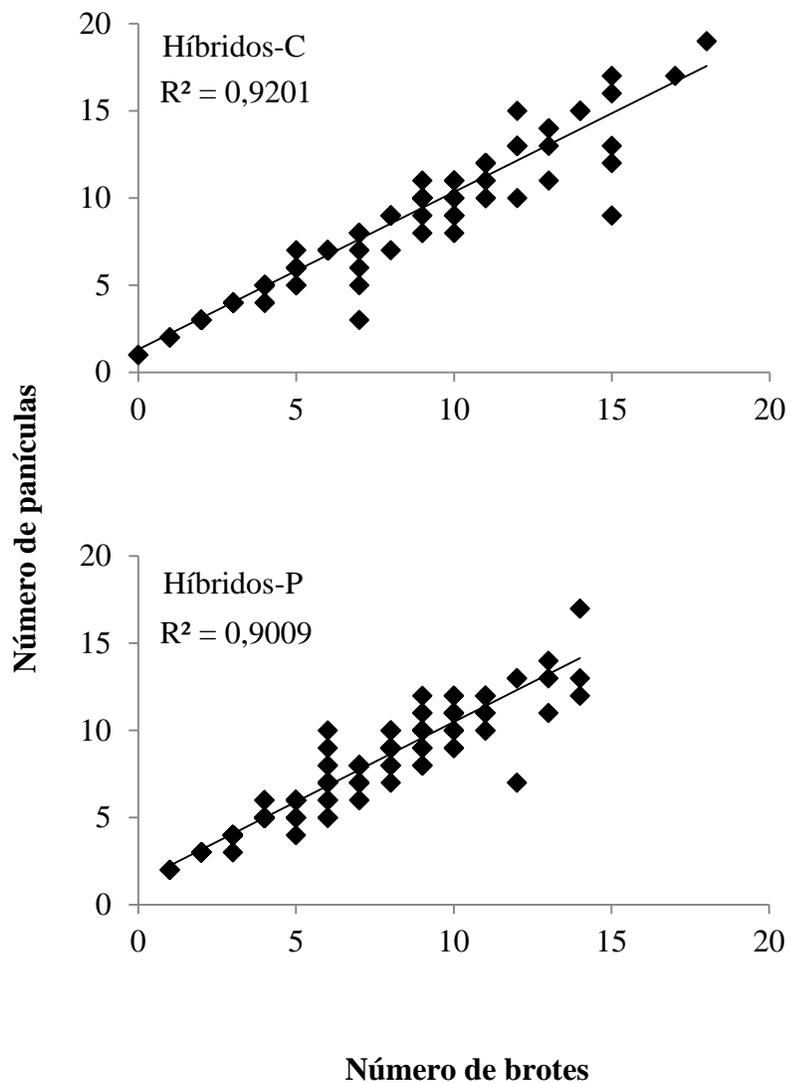
^a Comparación entre híbridos de primera y segunda generación, *probabilidad < 0.05.

Anexo 6. Probabilidad obtenida en los análisis de contrastes al comparar el número de panículas (P), ancho de la hoja bandera (HB), longitud de panícula (LP), semilla total (ST) y semilla llena (SL), entre los híbridos y las líneas parentales en la primera y segunda generación de híbridos.

Comparación	P	HB	LP	ST	SL
CFX-020C1	0.413	0.864	*	*	*
020-020C1	0.135	*	0.282	*	*
CFX-020C2	0.999	0.259	*	*	0.868
020-020C2	0.818	*	*	*	*
^a 020C1-020C2	*	0.350	*	0.926	*
CFX-120C1	0.428	0.532	*	*	*
120-120C1	*	*	0.803	0.372	*
CFX-120C2	0.684	0.898	*	0.217	*
120-120C2	0.998	*	0.714	0.986	*
^a 120C1-120C2	*	0.852	0.997	0.098	*
CFX-023C1	0.738	0.156	*	*	1.000
023-023C1	0.729	*	*	0.06	0.999
CFX-023C2	0.997	*	*	*	0.156
023-023C2	0.980	*	*	*	0.032
^a 023C1-023C2	0.535	0.978	0.130	0.999	0.269
CFX-121C1	0.925	0.392	*	0.151	0.599
121-121C1	0.882	*	0.248	*	0.586
Pta-020P	*	0.994	0.997	0.835	*
020-020P	0.770	*	*	*	*
Pta-020P2	0.740	0.515	0.660	0.174	0.531
020-020P2	0.266	*	*	*	1.000
^a 020P1-020P2	*	0.408	0.532	0.616	*
Pta-120P	0.517	0.118	0.167	*	*
120-120P	0.870	*	0.373	0.266	*
Pta-120P2	0.114	*	*	*	0.726
120-120P2	0.295	*	*	*	0.999
^a 120P1-120P2	0.722	*	0.318	0.160	*
Pta-WM073P	*	*	0.954	*	*
073-073P	0.617	*	0.551	*	*
Pta-073P2	0.660	*	*	*	0.162
073-073P2	0.877	*	*	*	0.977
^a 073P1-073P2	0.085	*	*	0.803	*
Pta-121P	*	0.984	0.803	*	*
121-121P	0.885	*	0.223	*	*
Pta-121P2	0.215	*	*	*	0.518
121-121P2	0.518	*	*	*	0.986
^a 121P1-121P2	0.853	*	*	0.052	*

^a Comparación entre híbridos de primera y segunda generación, *probabilidad < 0.05.

Anexo 7. Correlación entre número de brotes y número de panículas en madurez.



Anexo 8. Probabilidad obtenida en prueba de Tukey, al comprar el porcentaje de hojas dañadas en plantas susceptibles (SS), heterocigotas (RS) y resistentes (RR), expuestas a dosis crecientes de imazapir.

Genotipo	Comparación entre dosis	Probabilidad
SS	0-36	*
	0-72	*
	0-120	*
	36-72	0.639
	36-120	0.888
	120-72	0.965
RS	0-480	*
	0-768	*
	0-1152	*
	480-768	1.000
	480-1152	0.121
	768-1152	0.139
RR	0-480	*
	0-768	*
	0-1152	*
	480-768	0.860
	480-1152	0.999
	768-1152	0.646

*probabilidad < 0.05.