

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DIVERSIDAD MORFOLOGICA Y GENETICA DE LAS ESPECIES DE *ORYZA*
(POACEAE) NATIVAS DE COSTA RICA**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Biología para optar al grado de *Magister Scientiae***

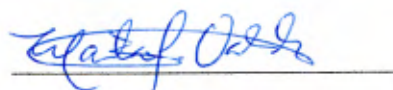
ALEJANDRO ZAMORA MELENDEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

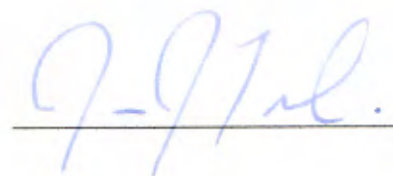
2001

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae*.

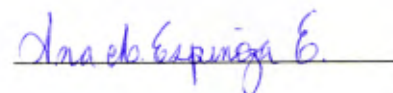
Dra. Marta Valdéz Melara
Representante
Decana del Sistema de Estudios de Posgrado



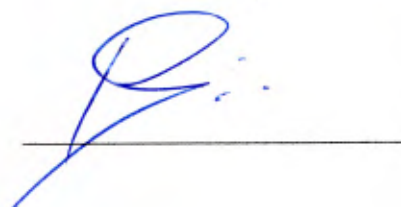
Dr. Jorge A. Lobo Segura
Director de Tesis



Dra. Ana M. Espinoza Esquivel
Asesor



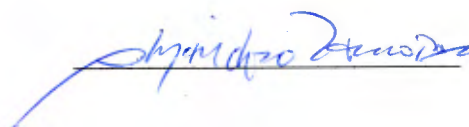
M. Sc. Jorge Gómez Laurito
Asesor



Dra. Virginia Solís Alvarado
Directora
Programa de Posgrado en Biología



Alejandro Zamora Meléndez
Candidato



Dedicatoria

A mis hijas Leticia y Lucía,
por ser mi fuente de inspiración
para seguir adelante con éste y
todos mis otros proyectos en la vida.

Agradecimientos

A mi esposa Peggy, quien siempre me apoyó y quien estaría muy feliz al ver esta tesis terminada.

A mi padres Raúl y Marta, por inculcarme que el máximo valor es la educación y por apoyarme de manera absoluta e incondicional.

A la Dra. Ana Mercedes Espinoza, quien aparte de la biología molecular me enseñó sobre la vida, la Universidad y la investigación. Fue ella quien me invitó a su laboratorio y quien con su energía y apoyo logró encender en mí la ilusión de hacer investigación nuevamente. Su excelente laboratorio y equipo de trabajo hicieron de este proceso una experiencia magnífica e inolvidable.

A mi profesor y amigo Dr. Jorge Lobo, quien me ha enseñado a hacer un trabajo de calidad, a ser crítico en el análisis y a disfrutar del trabajo de laboratorio y de campo.

Al Dr. Carlos Quesada y al Ing. Pablo González, del CIEDES, por su gran colaboración, que enriqueció ampliamente este trabajo.

Al Dr. Pedro León, por permitirme usar su laboratorio para el análisis de microsatélites y por enseñarme que una de las cosas más importantes en la ciencia es la perseverancia. Su disposición a enseñar y apoyar la ciencia básica son ejemplares.

A todos los compañeros del CIBCM, Miguel, Griselda, Erwin, Tania, Glen, Rebeca, quienes siempre estuvieron más que dispuestos a compartir su tiempo e ideas.

A Javier, Audi y Elías, de Transportes, por ser siempre capaces de conseguirme un carro para las numerosas giras de campo, a pesar de la escasez de vehículos.

A la Dra. Susan McCouch quien me recibió amablemente en su laboratorio en Cornell y cuya calidad y espíritu crítico me han inspirado.

A Carolina por su invaluable apoyo y por su cariño. sin ella no hubiera podido terminar este trabajo.

A Bernal, Gibi, Ana P, Ana C, Silvana, Mariamalia, Laura May, F. Bolaños, Maricelle, Karla, J. M. Mora, Franklin, José Garita, Kattia Z. Marlen, Rafa, Eduardo, Emilia y Adriana, por apoyarme en las buenas y en las malas.

Indice

	Página
Portada	i
Firmas	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Indice	v
Resumen	vi
Abstract	viii
Lista de Cuadros	x
Lista de Figuras	xi
Capítulo 1: Introducción General	1-17
Capítulo 2: Diversidad de las especies de <i>Oryza</i> de Costa Rica	18-42
Capítulo 3: Hibridación Natural entre especies nativas de <i>Oryza</i>	43-68
Capítulo 4: Biogeografía y Ecología del género <i>Oryza</i> en Costa Rica	69-108
Capítulo 5: Diferenciación intraespecífica de <i>O. latifolia</i> Desv. en Costa Rica	109-126
Capítulo 6: Estructura genética de <i>O. glumaepatula</i> Steud. de Costa Rica	127-162
Capítulo 7: Discusion Final	163-165
Referencias	167-176

RESUMEN

Zamora Meléndez, Alejandro

Diversidad morfológica y genética de las especies de *Oryza* (Poaceae) de Costa Rica

Tesis de Maestría en Biología. San José, Costa Rica.:

A.Zamora.M., 2001

178h.:il.-99 refs.

Se realizó un estudio de la diversidad del género *Oryza* L. en Costa Rica, que incluyó un inventario de especies y poblaciones, la descripción de dos híbridos naturales, el análisis de la variabilidad morfológica de las especies, con énfasis en *O. latifolia* y el estudio de la estructura genética de *O. glumaepatula*.

Se encontraron en las zonas bajas de Costa Rica un total de 312 poblaciones de plantas del género *Oryza*. Éstas mostraron gran variabilidad morfológica y los estudios univariados y multivariados demostraron que las plantas pertenecían a cinco grupos diferentes. Tres de estos correspondían a especies ya descritas, a saber, *O. latifolia*, *O. grandiglumis* y *O. glumaepatula*. Los otros dos grupos son híbridos naturales entre las especies nativas de Costa Rica. Estas plantas tienen morfología distinta e intermedia entre las líneas parentales, son estériles y además muestran características genéticas que apoyan la hipótesis de un origen híbrido, como lo son la expresión de alelos típicos de las líneas parentales en forma heterocigota para varios loci de isoenzimas y en loci de secuencias simples repetidas. *O. latifolia* es la especie más abundante y ampliamente distribuida en Costa Rica. Las plantas de la vertiente Atlántica son significativamente más robustas en varias características, así como también que las plantas de climas más húmedos son más grandes que las de climas más secos. También se encontró que las plantas de microhábitats con una mayor disponibilidad de agua y de luz tienen hábitos más grandes. A diferencia de las otras especies, *O. latifolia* se encuentra en una gran cantidad de zonas de vida, tipos de clima, elevaciones y microhábitats, lo que indica que ésta especie ha tenido una gran capacidad de adaptación. Esta es la primera vez que se registra *O. grandiglumis* para Costa Rica. Esta especie se diferencia de *O. latifolia* principalmente en la mayor longitud de la lema estéril. Se encuentra únicamente en la región de Río Frío, y tiene varios rasgos que sugieren una adaptación a bancos lodosos a orillas de ríos grandes en zonas muy estacionales. *O. glumaepatula* es una planta con genoma diploide tipo AA, por lo que es la especie costarricense más relacionada

filogenéticamente a *O. sativa*, el arroz cultivado. Esta especie había sido registrada en Costa Rica con muestras de la población de Guanacaste. Sin embargo, en éste estudio se descubrió una población adicional en el humedal del Río Medio Queso, Los Chiles. Esta población es perenne y mucho más grande que la población de Guanacaste. Existen diferencias genéticas marcadas entre las dos poblaciones de *O. glumaepatula* de Costa Rica. Sin embargo, dentro de la población de Medio Queso se encontró una alta estructuración, donde las subpoblaciones situadas a lo largo del humedal, mostraron diferencias marcadas en las frecuencias génicas y también en la presencia de los alelos. Esta distribución espacial de la variabilidad genética puede ser causada por el efecto del aislamiento por distancia y por el endocruzamiento que ocurre en esta población como producto del apareamiento con individuos muy cercanos y por autogamia. La ineficiencia a largas distancias (e.g. >10m) de la polinización eólica y la muy limitada capacidad de dispersión de la semilla hacen que ésta especie tenga una migración muy reducida, lo que sumado a la autopolinización facultativa hace que los individuos tengan un parentesco que es inversamente proporcional a la distancia entre ellos.

Las especies de *Oryza* de Costa Rica, incluyendo a los dos tipos de híbridos, constituyen una gran fuente de materia prima para la investigación en genética ecológica, especiación por hibridación, flujo de genes, así como para aplicaciones prácticas como la búsqueda de genes de tolerancia a factores bióticos o abióticos. Estas especies tienen un gran potencial para ser usadas en el mejoramiento del arroz cultivado y deben ser protegidas en sus ecosistemas naturales, dando continuidad así al proceso evolutivo de las plantas en relación al ambiente y los patógenos.

Palabras clave: *Oryza latifolia*, *O. grandiglumis*, *O. glumaepatula*, recursos genéticos, hibridación natural, genética de poblaciones.

Director de la investigación: Dr. Jorge Arturo Lobo Segura
Programa de Estudios de Posgrado en Biología

filogenéticamente a *O. sativa*, el arroz cultivado. Esta especie había sido registrada en Costa Rica con muestras de la población de Guanacaste. Sin embargo, en éste estudio se descubrió una población adicional en el humedal del Río Medio Queso, Los Chiles. Esta población es perenne y mucho más grande que la población de Guanacaste. Existen diferencias genéticas marcadas entre las dos poblaciones de *O. glumaepatula* de Costa Rica. Sin embargo, dentro de la población de Medio Queso se encontró una alta estructuración, donde las subpoblaciones situadas a lo largo del humedal, mostraron diferencias marcadas en las frecuencias génicas y también en la presencia de los alelos. Esta distribución espacial de la variabilidad genética puede ser causada por el efecto del aislamiento por distancia y por el endocruzamiento que ocurre en esta población como producto del apareamiento con individuos muy cercanos y por autogamia. La ineficiencia a largas distancias (e.g. >10m) de la polinización eólica y la muy limitada capacidad de dispersión de la semilla hacen que ésta especie tenga una migración muy reducida, lo que sumado a la autopolinización facultativa hace que los individuos tengan un parentesco que es inversamente proporcional a la distancia entre ellos.

Las especies de *Oryza* de Costa Rica, incluyendo a los dos tipos de híbridos, constituyen una gran fuente de materia prima para la investigación en genética ecológica, especiación por hibridación, flujo de genes, así como para aplicaciones prácticas como la búsqueda de genes de tolerancia a factores bióticos o abióticos. Estas especies tienen un gran potencial para ser usadas en el mejoramiento del arroz cultivado y deben ser protegidas en sus ecosistemas naturales, dando continuidad así al proceso evolutivo de las plantas en relación al ambiente y los patógenos.

Palabras clave: *Oryza latifolia*, *O. grandiglumis*, *O. glumaepatula*, recursos genéticos, hibridación natural, genética de poblaciones.

Director de la investigación: Dr. Jorge Arturo Lobo Segura
Programa de Estudios de Posgrado en Biología

Abstract

Many wild populations of the genus *Oryza* were found throughout the lowlands of Costa Rica. The plants found showed extensive morphological variation, suggesting the presence of several species. Morphological and genetic analyses served to classify the populations in three species: *O. grandiglumis*, *O. latifolia* and *O. glumaepatula*. The first, *O. grandiglumis* is a new record for Costa Rican flora. Two different hybrid forms were found. One of these is here shown to be a hybrid between *Oryza glumaepatula* ($2n=24$) and *O. grandiglumis* ($2n=48$). Its morphology is significantly different and intermediate to that of the parental lines. The isozyme and microsatellite pattern of these plants at several loci is different from both parent species, resulting from a combination of their bands. These hybrid plants occur only in the bank of the Medio Queso river, Los Chiles, Alajuela and perpetuate reproducing asexually by fision of the culms and hydric dispersion. The second hybrid is proposed to be a cross between *O. latifolia* and *O. grandiglumis*. The hybrid *O. sp1* is found only in the banks of the Medio Queso River, while *O. sp2* is found in the same localities as *O. grandiglumis*. Both hybrids are sterile and propagate asexually by fision of the culms and hydric dispersion. The species *O. glumaepatula* and *O. grandiglumis* occur in restricted geographical areas where there is a marked seasonality in the freatic level. This suggests that these species may have particular habitat requirements, perhaps related to germination. It seems that the diversity of life zones and microhabitats available in Costa Rica allows for the development of viable populations of species with particular habitat requirements. The populations of *O. latifolia* from Costa Rica show extensive variation and plants from different geographic regions, climatic areas and microhabitats possess significantly different habits as assessed by ANOVA and principal component analysis (PCA). The genetic structure of two

populations of *O. glumaepatula* from Costa Rica was assessed using microsatellite primers designed for cultivated rice. There is a high degree of structuring in the population ($F_{IT}=0.866$), attributed to a high differentiation of the populations ($F_{ST}=0.713$) and to a moderate degree of inbreeding ($F_{IS}=0.453$). This may be the result of selfing or crosspollination with related plants in the near vicinity. Private alleles were found for the populations of Guanacaste and Medio Queso situated 100 km apart. A cline was observed to occur (RM5 and RM38) at the Medio Queso River wetlands population, which may be formed by the limited flow of genes between adjacent populations. Both limited seed dispersal (as inferred from the phenology and the morphology of the seed, and the reduced gene flow via pollen (due to its short viability and dispersal) can explain the limited gene flow estimated to occur in this species.

Lista de Cuadros

Capítulo 1	Página
Cuadro 1. Producción de arroz en el mundo	16
Cuadro 2. Principales países productores de arroz	16
Cuadro 3. Principales países exportadores de arroz	16
Capítulo 2	
Cuadro 1. Correlaciones en las especies de <i>Oryza</i>	26
Capítulo 4	
Cuadro 1. Comparación de las especies de <i>Oryza</i> de Costa Rica	97
Capítulo 5	
Cuadro 1. ANOVA de una vía (región geográfica) y dos vías tipo de clima y microhábitat	122
Cuadro 2. Matriz de correlaciones en <i>O. latifolia</i>	123
Capítulo 6	
Cuadro 1. Características de los imprimadores utilizados	152
Cuadro 2. Frecuencias alélicas por población	153
Cuadro 3. Estadísticas de la diversidad genética de <i>O. glumaepatula</i>	154
Cuadro 4. Estadísticas F para los loci estudiados en <i>O. glumaepatula</i>	155
Cuadro 5. Análisis de variancia molecular (AMOVA)	156
Cuadro 6. Cálculos de parentesco	157
Cuadro 7. Comparación entre <i>O. glumaepatula</i> de Costa Rica y Amazonas	158

Lista de Figuras

Capítulo 2

1. Distribución de muestras de <i>Oryza</i> en Costa Rica	34
2. Análisis de componentes principales (PCA)	35
3. Análisis discriminante de las especies de <i>Oryza</i> de Costa Rica	36
4. Diferencias alélicas entre <i>O. glumaepatula</i> y <i>O. rufipogon</i>	37
5. Diferencias alélicas entre <i>O. glumaepatula</i> , <i>O. grandiglumis</i> y <i>O. latifolia</i>	38
6. Semillas de las especies de <i>Oryza</i> de Costa Rica	39
7. Características de <i>O. grandiglumis</i>	40
8. Características de <i>O. glumaepatula</i>	41

Capítulo 3

1. Híbrido <i>O. sp1</i> en el Río Medio Queso y comparación de las ligulas de <i>O. glumaepatula</i> , <i>O. sp1</i> y <i>O. grandiglumis</i>	62
2. Estadísticas descriptivas de algunas características de los híbridos	63
3. Análisis de componentes principales incluyendo a los híbridos	64
4. Análisis discriminante incluyendo a los híbridos	65
5. Mapa del humedal del Río Medio Queso	66
6. Zimograma de la esterasa fluorogénica	67
7. Microsatélites de los híbridos	68

Capítulo 4

1. Modelo de elevación digital	98
2. Humedales en donde se encuentran las principales poblaciones de <i>Oryza</i>	99
3. Proporción de poblaciones de <i>O. latifolia</i> por zona de vida	100
4. Proporción de poblaciones de <i>O. latifolia</i> por categoría de protección	100
5. Características de la historia de vida de <i>O. grandiglumis</i>	101
6. Fenograma de <i>O. glumaepatula</i> de Medio Queso	102
7. Variaciones en el nivel freático en el humedal de Medio Queso	103

Capítulo 5

1. Mapa de tipo de clima	124
2. Análisis de componentes principales de <i>O. latifolia</i> por vertientes	125
3. Frecuencia de coloraciones en algunas estructuras morfológicas	126

Capítulo 6

1. Frecuencia de los alelos de dos loci en las subpoblaciones de Medio Queso y Murciélagos	159
2. Alelos determinados en los microsatélites estudiados en <i>O. glumaepatula</i>	160
3. Dendrograma con distancias genéticas de Rst	161

Capítulo 1

Introducción General

El arroz fue uno de los primeros cereales domesticados en el mundo

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los primeros cereales que se domesticaron, hace aproximadamente 7000 a 9000 años y es el cultivo que ha alimentado a más gente desde el inicio de la agricultura (Huke y Huke, 1990). Según Swaminathan (1986) el arroz se ha cultivado en India y China desde hace mas de 5000 años.

Su cultivo y uso constituye una parte fundamental de la tradición de numerosas culturas en Asia. No es extraño que en Myanmar (Burma), donde se encuentra el centro de diversidad de variedades y se consume 210 Kg de arroz per cápita anualmente, se le ligue al origen mismo del hombre. En Bali se le considera regalo de los dioses Vishnu, quien lo hizo salir de la tierra, e Indra quien le enseñó al hombre a sembrarlo. En India, las religiones Hindú y Budista consideran al arroz como una ofrenda digna para los dioses. Allí existen variedades aromáticas como el Pusa Basmati, que son consideradas como delicadezas. En Japón, trenzas hechas con los culmos secos del arroz adornan los templos y segun la tradición Shinto, el Emperador es la encarnación de Ninigo-no-mikoto, el dios del arroz maduro (<http://www.riceweb.org/History.htm>).

En Africa del oeste, el arroz (*O. glaberrima*) fue domesticado de manera paralela e independiente, probablemente a partir de la especie silvestre *O. barthii*, hace más de 1500 años (BOSTID, 1996) y también es parte esencial de la cultura de Sierra Leona y Costa de Marfil. Este arroz africano tiene gran cantidad de variedades lo mismo que *O. sativa* (Vaughan, 1994).

El arroz fue llevado al Sur de Europa en el Siglo IV a. C., como resultado de la conquista de India por Alejandro Magno a ca. 324 A.C y su interés por la unificación de su reino. Con éste objetivo incentivó los casamientos entre personas de diferentes culturas y el intercambio de cultivos entre las regiones de su imperio (Quillet, 1979). De esta manera, el arroz llegó posiblemente a Grecia de donde se dispersó hacia otros países

de Europa (<http://www.riceweb.org/History.htm>). En el sur de España y en Italia el arroz es parte importante de la cultura de estos países.

En América Latina, el arroz cultivado fue introducido durante el período de conquista (Cabezas y Espinoza, 2000) y debido a la dominación de la cultura Ibérica su consumo se generalizó en muchos países, principalmente en Centro y Sur América. En Costa Rica, se consumen anualmente 55 Kg de arroz per cápita lo que constituye el 45 % de las calorías diarias. Además, forma parte de los platos típicos más reconocidos, tanto de la región del Valle Central, con el “gallo pinto”, como de la cultura afrocaribeña de la Costa Atlántica, con el “rice and beans”.

Aún cuando el arroz no ha sido domesticado en América, los pobladores nativos del Amazonas recolectan las semillas de las especies silvestres de arroz *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis*. Agitando las panículas encima de los botes consiguen suficientes semillas y las consumen de la misma manera que el resto del mundo lo hace con el arroz cultivado (Oka, 1961; Vaughan, 1994; Morishima y Martins, 1994).

El arroz es el principal alimento en los países en vías de desarrollo

Actualmente, este cultivo es uno de los principales del mundo actual (Ronald, 1997). Dos mil millones de personas, cerca de un tercio del total de la población humana, consume arroz (*O. sativa* L.) diariamente como su fuente principal de carbohidratos (Ronald, 1997). En algunos países como Bangladesh, Cambodia, Indonesia, Laos, Myanmar, Tailandia y Vietnam, el arroz brinda un 55-80% del total de calorías consumidas diariamente. A nivel mundial se producen 597.154.664 toneladas, para un primer lugar en producción en el mundo (Cuadro 1). El 95,7% del arroz se produce en países en vías de desarrollo, principalmente para consumo interno en los países productores, ya que solamente entre un 4-8% se exporta (<http://www.riceweb.org/>). En total se siembran 155.128.000 hectáreas, por lo que el arroz ocupa el segundo lugar después del trigo y antes que el maíz en área cultivada (<http://mckenna.cses.vt.edu/cses3444/3444lec15html>).

Producción de arroz en otros países y en Costa Rica

Más de 50 países en el mundo producen 597 millones de toneladas de arroz anualmente, siendo los países asiáticos los responsables del 92% de esta producción. Los países con la mayor producción de arroz son China e India con 200 y 131 millones de toneladas anuales respectivamente (57% del total), prácticamente todo para consumo interno (Cuadro 2).

El rendimiento por hectárea de las plantaciones de arroz varía ampliamente desde 0,9 toneladas (Mozambique) hasta 10.1 toneladas en Australia (IRRI World Rice Statistics). Esta variación se debe principalmente al tipo de siembra, variedades, mecanización y uso de agroquímicos.

Estados Unidos y Tailandia, producen 9.5 y 23.3 millones de toneladas métricas anuales respectivamente, pero un alto porcentaje de esta producción es para exportación. Tailandia es el país que exporta más arroz con 6.3 millones de toneladas métricas anuales (Cuadro 3). Sin embargo, sus estrategias de competencia son diferentes, el primero apunta a la eficiencia y tecnificación, logrando una producción cercana a las 6,6 toneladas por hectárea, mientras que el segundo lo logra mediante una reducción de costos basada en mano de obra barata y grandes extensiones de terreno, con una producción pobre de 2,3 toneladas por hectárea.

De esta manera, a pesar de que tiene uno de los rendimientos más bajos en el mundo, Tailandia es uno de los mayores exportadores de arroz en el mundo (Cuadro 3) debido al área que siembra y que produce mucho más de lo que necesita para consumo interno. Solo un 4% de la producción total de arroz (13,4 millones de toneladas) se comercia a nivel internacional (UCDavis, 1999, <http://www.agronomy.ucdavis.edu/uccerice/stat/faqs.htm>).

Problemática del crecimiento poblacional

A pesar de que las cosechas mundiales de arroz han aumentado continuamente

durante los últimos 30 años, la producción per cápita se ha estabilizado debido al crecimiento de la población (Mann, 1999). A pesar de los esfuerzos por disminuir la tasa de nacimientos, se proyecta que la población mundial crecerá un 50% en las próximas tres décadas (Tanksley and McCouch, 1997). Así, la humanidad podría enfrentarse pronto a una gran demanda de cereales en un momento en que pareciera como si las variedades comerciales de arroz hubieran alcanzado ya su rendimiento potencial (Mann, 1999).

En el pasado, la Revolución Verde logró expandir la producción de granos mediante cuatro estrategias o innovaciones tecnológicas: la producción de nuevas variedades, uso de agroquímicos, la expansión de la frontera agrícola y el aumento de la irrigación (Tanksley and McCouch, 1997; Mann, 1999). La situación actual es diferente debido a que las reservas de agua han disminuido y las crecientes poblaciones humanas ejercen una presión cada vez mayor sobre las mismas. De la misma manera, la tierra cultivable se mantiene constante e incluso disminuye debido a la degradación de los suelos y la urbanización. Además, la contaminación de los ecosistemas debido al uso desmedido de agroquímicos ha producido una fuerte acción social en su contra que probablemente se intensificará en los próximos años. Por lo tanto, el mejoramiento genético de variedades, que permita un uso más eficiente del agua, suelo y nutrientes, permanece como la única estrategia razonable para aumentar la producción (Tanksley and McCouch, 1997).

Sin embargo, la homogeneidad genética de los cultivares de arroz permite un incremento anual de apenas un 1% en la producción, cuando se hace mejoramiento intraespecífico tradicional. El proceso de domesticación en todos los cereales consistió en una selección artificial de plantas con floración sincronizada, persistencia del grano en la panícula y alta producción. Desdichadamente, un efecto secundario de éste proceso selectivo fue la eliminación de algunos de los alelos no ligados a las características seleccionadas, por lo que alelos potencialmente valiosos se perdieron en muchos loci (Tanksley and McCouch, 1997).

Una reducción similar de la variabilidad genética ocurrió debido al mejoramiento

genético moderno y a las políticas agrícolas asociadas a la Revolución Verde en los años 60 y 70. Esta vez, la liberación masiva de unas pocas variedades mejoradas eliminó muchos cultivares locales dejando a los productores con unas pocas líneas casi isogénicas que se tornaron susceptibles a muchas enfermedades.

Los cultivares locales tienen un rendimiento bajo en promedio, pero tienen también una alta estabilidad en rendimiento a largo plazo debido a su variabilidad genética (Morishima *et al.*, 1992). Por el contrario, las variedades mejoradas se caracterizan por su alto rendimiento en condiciones muy controladas y su homogeneidad genética. Estas características son provechosas en esquemas automatizados de producción y donde se da una rotación de variedades frecuentemente. Sin embargo, cuando una de estas variedades se siembra en forma continua y sin la dosificación apropiada de agroquímicos, rápidamente se vuelve susceptible a enfermedades y su rendimiento disminuye.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de aumentar el acervo genético del arroz cultivado, mediante cruzamientos intra e inter específicos con especies silvestres y mediante la ingeniería genética. Esto es fundamental para proveer a los mejoradores con la variación y las características novedosas necesarias para crear muchas nuevas variedades con un rendimiento potencial mayor y con una mayor tolerancia a las enfermedades (Tanksley y McCouch, 1997; Mann, 1999).

Limitaciones genéticas a la producción de arroz

El proceso de domesticación en el arroz consistió en la selección de características como sincronización de la floración, persistencia del grano en la panícula, alta productividad y autofecundación (Morishima, Sano y Oka, 1992). En este proceso de selección direccional, se perdió gran parte de la variabilidad de la especie silvestre ancestral *O. rufipogon*, debido a que no todas las poblaciones de *O. rufipogon* se tomaron como base para la especie cultivada y debido al proceso de selección en sí mismo en el que los alelos no ligados a los seleccionados se perdieron (Tanksley y

McCouch, 1997). Por esta razón *O. sativa* cuenta apenas con una fracción de la variabilidad genética de la especie silvestre a partir de la cual se domesticó, *O. rufipogon*, lo que limita la capacidad de aumentar su producción.

Cada planta tiene una capacidad máxima de producción en condiciones óptimas de nutrientes, agua, luz, temperatura y salud. En estas condiciones la productividad potencial de las variedades de arroz costarricense es de 12 toneladas por hectárea. Sin embargo, en el campo las condiciones frecuentemente distan de las óptimas, y debido a esto se da una gran variación en el rendimiento, con Australia a la cabeza con 10 toneladas métricas por hectárea y países africanos como Mozambique con 0.9 toneladas en los últimos lugares.

Limitaciones a la producción en Costa Rica. aspectos económicos y área de siembra.

En la década de 1980, el arroz era el segundo cultivo, después del café, en área de siembra aún cuando las 86.000 hectáreas sembradas eran totalmente para consumo interno (Stout, 1983). El área cultivada de arroz en Costa Rica ha disminuido un 50% en los últimos treinta años. La producción de arroz en Costa Rica se ve limitada por varios factores, que involucran los edáficos, climáticos y biológicos, pero también los tecnológicos, económicos y políticos.

La combinación de factores climáticos adversos, enfermedades, escaso financiamiento, ausencia de subsidios al cultivo, han hecho que el cultivo no sea rentable cuando se le compara a los precios del arroz proveniente de Estados Unidos y Tailandia debido a subsidios y al bajo costo de producción respectivamente.

Los factores físicos, químicos y climáticos del entorno tienen una gran influencia en la capacidad productiva de la planta. La falta o exceso de diferentes elementos, así como la disponibilidad de agua son factores fundamentales para un buen desarrollo, floración y fructificación. En algunos países Asiáticos la salinidad es uno de los principales obstáculos para el cultivo del arroz, mientras que en Africa las sequías son causantes de graves pérdidas. En Costa Rica, el exceso de hierro en los suelos y la

impredictabilidad del clima, especialmente durante años en que el fenómeno de El Niño se presenta, son factores que afectan al cultivo del arroz.

Factores de estrés biótico en Costa Rica

El virus de la hoja blanca del arroz (*Rhbv*) es el causante de la enfermedad del mismo nombre, que se expresa como una clorosis o blanqueamiento en estrías longitudinales paralelas a la venación de la hoja. Esta enfermedad puede ser letal si ataca a una planta susceptible durante las primeras semanas de vida. Las pérdidas producidas por esta enfermedad pueden llegar a un 80% (Jennings, 1963). Este virus es endémico de América y es transmitido exclusivamente por el delfácido *Tagosodes oryzicolus*. Este delfácido (Homoptera: Delphacidae) se alimenta exclusivamente de plantas de *Oryza sativa* y aparte de ser el vector del *Rhbv*, es también una plaga en si mismo para el arroz debido al daño que causa al ovipositar en la planta (McGuire *et al.*, 1960). Es importante por lo tanto determinar cual de las especies americanas de *Oryza* puede haber sido la especie hospedera original del insecto y del virus, y si es que hay en estas especies factores de tolerancia al insecto y al virus.

La Piricularia o tizón del arroz es la enfermedad más importante actualmente en Costa Rica y los agricultores invierten una gran cantidad de recursos en fungicidas para combatirla. Es causada por el hongo *Magnaporthe grisea* (= *Pyricularia grisea*) y puede causar pérdidas hasta de un 100% si ataca a un cultivo de pocos días de germinado (Correa-Victoria y Zeigler, 1993). Su control se basa en el uso de variedades tolerantes y fungicidas, aunque debido a la variabilidad genética del hongo la tolerancia se pierde rápidamente y los hongos se vuelven cada vez más resistentes a los pesticidas.

Posibilidades de aumentar la producción o de brindarle al cultivo mejores características

Ingeniería genética

La transformación genética de plantas permite introducir en una variedad cultivada genes de diversos organismos, que no están disponibles en especies

relacionadas como para hacer cruces viables. De esta manera se han transferido horizontalmente a diversas plantas cultivadas, genes que brindan resistencia a herbicidas, virus, insectos, o que protegen contra el congelamiento. Por otra parte, características que aumentan la calidad nutricional, como el arroz dorado desarrollado por Al-Abibi y Potrykus (2001), que tiene genes para producir B-caroteno (provitamina A), son una opción interesante para producir arroz con un valor agregado.

En Costa Rica, el Programa de Biotecnología de Arroz del CIBCM ha desarrollado la capacidad de hacer transformación genética de arroz en cuanto a infraestructura, equipo y recursos humanos capacitados. Actualmente las líneas de investigación en las que trabajan son el desarrollo de plantas transgénicas resistentes al herbicida fosfinotricina, al virus de la hoja blanca y resistencia a insectos chupadores (*T. oryzae*). Las especies silvestres podrían proveer genes para introducir en el arroz mediante ingeniería genética o cruzamiento convencional.

Mejoramiento convencional intraespecífico

Los cruces entre variedades y la posterior selección son prácticas muy antiguas y generalizadas, que ha dado buenos resultados, aunque está limitada por la variación genética que se da dentro de *O. sativa*. En este caso se trata de seleccionar las variedades que presentan las características más apropiadas y hacer cruces con el fin de obtener la mejor combinación de las características. Actualmente una de las técnicas más utilizadas es la conversión, en la que se pretende integrar al genoma de una variedad élite una única característica de interés mediante cruzamiento, como puede ser la resistencia natural a un herbicida o a un patógeno.

Mejoramiento usando germoplasma silvestre con marcadores moleculares

La limitada variabilidad de los cultivares de arroz contrasta con la de las 23 especies del género *Oryza*. Aún cuando hay muchos cultivares de *O. sativa*, éstos contienen solamente una porción de la variabilidad de su ancestro, *O. rufipogon* (Morishima *et al.*, 1992; Tanksley y McCouch, 1997). Además, las especies silvestres de

arroz en general tienen nueve tipos de genomas (Vaughan, 1994; Ge *et al.*, 1999). Estas especies representan un 70% de la variabilidad genética dentro del género, según los polimorfismos de ADN encontrados mediante varios tipos de marcadores (Tanksley y McCouch, 1997). Muestran además más diversidad genética a nivel de cloroplasto que las especies cultivadas (Provan *et al.*, 1997).

Las especies silvestres de *Oryza* ya han sido utilizadas exitosamente como fuentes de valiosos QTL y genes únicos en el mejoramiento genético de los cultivares de arroz. Ronald (1997) clonó el gen *Xa 21*, que confiere resistencia a la bacteria *Xanthomonas oryzae*, a partir de la especie Africana *O. longistaminata*, y éste ha sido introducido en el genoma de varias líneas élite mediante la ingeniería genética para producir variedades que sean resistentes a dicho patógeno.

Los cruces inter específicos permiten la ampliación del acervo genético del arroz cultivado como un todo. Estos cruces producen plantas con genomas híbridos que al recombinarse, proveen la variación genética, que es la materia prima necesaria para obtener cambio fenotípico significativo, seleccionando las combinaciones alélicas más favorables (Ando y Rangel, 1994). Yang *et al.*, (1991), obtuvieron híbridos F1 de *O. sativa* y *O. glumaepatula*. Estos híbridos eran parcialmente fértiles y mostraron resistencia al rice black streaked dwarf virus (RBSdV, virus del enanismo y rayado negro del arroz). Asimismo, el uso de microsatélites como marcadores genéticos y el retrocruce repetitivo de material híbrido, han permitido la introgresión de QTL para aumentar la producción, a partir de la especie asiática *O. rufipogon* hacia las variedades élite de arroz. El rendimiento por hectárea en estas líneas seleccionadas aumentó hasta en un 30% sobre la variedad original en un período de tres años (Tanksley y McCouch, 1997; Xiao *et al.*, 1998; Thomme com. pers.).

Actualmente se realizan grandes esfuerzos por localizar y conservar el germoplasma silvestre de arroz

Muchos sitios donde antes se encontraban poblaciones naturales de *Oryza* han

desaparecido debido a la expansión de la frontera agrícola y se han convertido en pastizales o arrozales. Por esta razón, muchos centros internacionales de investigación en el mundo, como el Instituto Internacional de Investigaciones en Arroz (IRRI, Filipinas), el West African Rice Development Association (WARDA, Costa de Marfil) el Instituto Nacional de Genética (NIG, Japón), y el CIAT (Colombia) están localizando y estudiando los recursos genéticos del arroz, con el objetivo de desarrollar nuevas variedades con mayor rendimiento y resistencia a enfermedades. El presente estudio fue auspiciado por IRRI y formó parte de su proyecto global "Collection and conservation of rice germplasm".

Sistemática del género *Oryza* y relaciones con otras tribus dentro de Poaceae

El arroz pertenece al género *Oryza* L. (Poaceae: *Oryzanae*), y sus parientes más cercanos, a nivel de tribu, son los bambúes (tribu *Bambusanae*). Otros cereales conocidos como el trigo, avena, cebada, centeno y maíz, pertenecen a varias subfamilias y tribus distantemente relacionadas a la del arroz (Vaughan, 1994).

En la tribu *Oryzanae*, se encuentran además otros géneros relacionados a *Oryza*, de los cuales varios se encuentran en América, como *Luziola*, *Leersia*, *Zizania*, *Zizaniopsis* y *Rhynchoriza*. De estos, los dos primeros se encuentran en Costa Rica, con las especies *Leersia hexandra*, *Luziola subintegra* y *Luziola fragilis* (Pohl, 1980).

Dos especies han sido domesticadas: *O. glaberrima* Steud., en África y *O. sativa* L. en Asia. Esta última ha sido subdividida en tres subespecies de acuerdo a su morfología y a marcadores moleculares: *indica*, *japonica* y *javanica*. *O. sativa* se cultiva ampliamente en regiones tropicales y subtropicales hasta los 50° N en China y 40° S en Argentina (Vaughan, 1994).

Las especies silvestres del género *Oryza* tienen una distribución pantropical, con una distribución latitudinal de hasta 23 grados en promedio de latitud norte y sur. El número total de especies varía según el autor entre 20 (Vaughan, 1994) y 23 (Ge *et al.*, 1999). Muchas de las especies son comunes en humedales, la mayoría de áreas abiertas y

algunas de zonas boscosas (Vaughan, 1994).

Existen tres secciones dentro del género, a saber: *Oryza*, *Ridleyanae* y *Granulata* (Roschevitz, 1931). Además, Tateoka (1962a,b) describió cuatro complejos de especies que congregan a una serie de especies de morfología similar, determinando varios tipos de genomas, basándose en el estudio del apareamiento de los cromosomas en la meiosis de los híbridos F1 entre cada una de las especies y *O. sativa*.

Según Vaughan (1994) éstos complejos, a saber: *O. sativa*, *O. officinalis*, *O. ridleyi* y *O. meyeriana*, se ajustan mejor a la variación genética del género. El primero incluye especies con genoma diploide tipo AA, y el segundo, también llamado complejo de *O. latifolia*, congrega a una serie de especies con genomas B, C, D y E, de los cuales las especies alotetraploides CCDD son endémicas de América Tropical.

Estas clasificaciones pretenden expresar la cercanía filogenética de las especies y comprenden los acervos genéticos o grupos de cruzamiento primario, secundario y terciario. Es de estos grupos de cruzamiento de los que se pueden transferir características de interés al arroz, con un grado de dificultad proporcional a la distancia genética de cada especie. El primer grupo de cruzamiento corresponde a las especies de genoma diploide AA, el segundo incluye a todas las especies del complejo de *O. officinalis* que tienen genomas B, C, D, E y el tercero está compuesto por las especies más divergentes que tienen genomas F, G, H, J, K (Ge *et al.*, 1999). Todas las especies de los complejos de *O. sativa* y *O. officinalis* han sido hibridizados artificialmente con *O. sativa* (Vaughan, 1994).

Especies de *Oryza* en América y estatus específico de *O. glumaepatula*.

Cuatro especies del género *Oryza* han sido registradas para el Neotrópico Americano: *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis*, *O. alta* y *O. latifolia*. La primera es una especie diploide de genoma tipo AA que pertenece al grupo de *O. sativa*, de manera que es la especie Americana nativa más relacionada al arroz cultivado. Las otras tres son especies de genoma alotetraploide CCDD pertenecientes al complejo de especies de *O.*

officinalis y corresponden al segundo grupo de cruzamiento del arroz cultivado.

O. glumaepatula está distribuida desde México hasta Brasil (Vaughan, 1994). Es muy similar en su morfología a *O. rufipogon*, razón por la cual ha sido clasificada históricamente como la raza Latinoamericana de *O. rufipogon*, principalmente por Vaughan (1994, 1999) quien las considera una misma especie.

Sin embargo, los cruces interespecíficos entre *O. glumaepatula* y *O. rufipogon*, realizados por varios investigadores (Chu *et al.*, 1969; Hinata y Oka, 1962; Akimoto, com. pers.) demostraron que las plantas de F1 tienen una alta esterilidad del polen, lo que sugiere un grado de diferenciación a nivel de especie por aislamiento postcigótico. Ellos concluyeron que éstas especies están aisladas reproductivamente y por lo tanto son líneas evolutivas independientes, es decir, diferentes especies. Juliano *et al.* (1998) también concluyeron que *O. glumaepatula* del Amazonas es significativamente diferente de la *O. rufipogon* de Asia, según sus análisis de componentes principales (PCA). Sano y Sano (1990) mostraron que la especie diploide AA americana se diferencia a nivel molecular del resto de las especies de este tipo de genoma del mundo. Dentro del grupo de *O. sativa*, *O. glumaepatula* tiene una proximidad genética mayor con las especies Africanas *O. barthii* y *O. longistaminata* (Doi *et al.*, 1995; Akimoto, 1998; Ge *et al.*, 1999) que con la especie asiática *O. rufipogon*, según datos de RFLP y la secuencia de los genes *Adh* nucleares y de cloroplasto. La cercanía filogenética entre especies de África y América es común y se debe a que éstas masas continentales estaban unidas hace 200 millones de años.

Parte de la confusión taxonómica parece haber surgido por la semejanza morfológica de estas dos especies, distinguibles solamente con análisis multivariado (Juliano *et al.* 1998), además de que Second (1985), sugirió que las plantas americanas diploides podrían ser una introducción reciente debido a la similitud que encontró en sus estudios de isoenzimas.

Sin embargo, en estudios recientes de cruzamiento, algunos diploides americanos formaron híbridos fértiles F1 con *O. rufipogon*, mientras la mayoría de las plantas

americanas formaron progenie F1 estéril (Naredo *et al.*, 1998). Por lo tanto, es posible que plantas de *O. rufipogon* introducidas accidentalmente en América junto con el arroz comercial pueden haber oscurecido la diferenciación taxonómica de estas especies (Naredo *et al.*, 1998).

Origen de las especies alotetraploides (CCDD) y el enigma del genoma DD

O. alta, *O. latifolia*, y *O. grandiglumis* son especies alotetraploides (CCDD, $2n=48$) y forman un grupo único y endémico del neotrópico. Estas especies están altamente relacionadas filogenéticamente, según se ha demostrado mediante el análisis de RFLPs (Jena y Kochert, 1991). De acuerdo a Vaughan (1994), *O. latifolia* difiere de *O. alta* solamente en la longitud de la semilla y el ancho de la hoja bandera, siendo ambos valores mayores en la última. Sin embargo, Aggarwal *et al.* (1996), utilizando RFLPs e hibridación de ADN, mostró que *O. alta* y *O. grandiglumis* son especies distintas monofiléticas y que *O. latifolia* es la especie más divergente del grupo.

El tipo de genoma DD sólo se ha encontrado en estas especies endémicas de América y no en forma diploide (Morishima, 1994). Provan *et al.* (1997) mostraron que el ADN nuclear de las especies CCDD está cercanamente relacionado al de las especies con genoma tipo AA y sugirieron de la misma manera que lo hizo Wang *et al.* (1992) anteriormente, que éstas especies pueden haber surgido de un evento único de poliploidización, pero no explican si por autopoliploidización o por hibridación. El que son aloploidoides sugiere que se originaron de un evento de hibridación.

Sin embargo, Ge *et al.* (1997), sugirieron que el genoma DD está relacionado al genoma EE de *O. australiensis* y que por lo tanto las especies CCDD, deben ser el producto de un sólo evento de hibridación entre una especie de genoma CC, que actuó como madre según los datos de ADN de cloroplasto, y una especie relacionada al ancestro de la actual *O. australiensis*, que tiene genoma EE. Este evento de poliploidización por hibridación debe haber ocurrido en América, posteriormente a la separación de África, no hace más de 200 millones de años.

Oryza latifolia se encuentra desde México hasta Brasil y las islas del Caribe. Tiene una gran variabilidad morfológica que se correlaciona con las diferentes zonas en que se encuentra, con plantas de 1- 2 m de alto, y semilla de 5 a 7 mm de longitud. Es común en las savanas de ambientes secos, zacatales inundados, bosques secundarios, áreas cultivadas, bordes de ríos, riachuelos y lagunas temporales, del nivel del mar hasta los 700 m.s.n.m. (Pohl, 1980). Sus hojas miden menos de 50 mm de ancho y su semilla mide menos de 7 mm (Vaughan, 1994).

Oryza grandiglumis ha sido registrada solamente para Sur América, principalmente en el Amazonas, donde se encuentra en simpatria con *O. glumaepatula*. Es una planta robusta, que se distingue fácilmente debido a las grandes lemas estériles, que pueden ser tan largas como la lema fértil (Vaughan, 1994). Estas lemas estériles varían en longitud en diferentes poblaciones de una misma región del Río Amazonas (Morishima, 1994). Es una planta que crece en las orillas de ríos de agua clara (pH 6-7) ricas en nutrientes (Akimoto, 1998) principalmente en zonas bajas menores a 230 msnm. En Suramérica florece de marzo a julio y en noviembre (Vaughan, 1994). Se le ha encontrado en la Guyana Francesa, Ecuador, Brasil y Argentina (Vaughan, 1994), y también en la vertiente del Río Orinoco, Venezuela (Vaughan y Tomooka, 1999).

Oryza alta se encuentra principalmente en Sur América, aunque una población fue registrada en Belice. Es muy similar a *O. latifolia* de la que se diferencia por ser una planta robusta que crece a la orilla de ríos y tiene hojas de 50 mm de ancho y semilla de más de 7 mm (Vaughan, 1994).

El estudio de la estructura genética de las especies silvestres de arroz y su importancia en la selección de material para cruces interespecíficos y en la conservación

La cuantificación de la diversidad genética de las variedades (Newbury *et al.* 1997) y especies silvestres de arroz (Barbier, 1989a,b). Oka y Morishima, 1992; Akimoto *et al.*, 1998), así como la distribución espacial de esta variabilidad, han sido del interés de genetistas y mejoradores de arroz en los últimos decenios.

La historia de vida de las plantas está estrechamente ligada a la selección, deriva genética y migración (Hamrick *et al.*, 1993). Estas fuerzas evolutivas unidas a la mutación determinan la estructura genética de una especie, la cual se relaciona a su viabilidad y capacidad de adaptación a cambios ambientales.

El estudio de la cantidad y distribución de la variabilidad genética de estas especies es importante para diseñar planes de conservación apropiados. Este interés se debe a la necesidad de conservar las poblaciones tanto *in situ* como *ex situ* de una manera objetiva. Los bancos de germoplasma están saturados de muestras, algunas de las cuales están repetidas o son muy similares. El Instituto Internacional de Investigaciones en Arroz (IRRI, Filipinas) tiene 120.000 accesiones que debe multiplicar e incrementar, por lo que un volumen de accesiones tan grande se vuelve inmanejable. Por esta razón, han determinado conservar las accesiones que tengan menos de un 60% de similitud (Jackson, 1995).

Por otra parte, el conocer la variabilidad genética de las especies es también importante para usar los recursos genéticos apropiadamente. Aunque los marcadores que se utilizan para evaluar la diferenciación de las poblaciones son neutros o cercanamente neutros, se supone que poblaciones divergentes podrían aportar alelos diferentes en los planes de mejoramiento de cultivares. Esto es algo que se ha observado con *O. rufipogon* donde los alelos que aumentan el rendimiento en los cruces realizados con una variedad élite se localizan en diferentes cromosomas (C. Martínez, CIAT, Colombia, comunicación personal).

Cuadro 1. Comparación de la producción para el 2000 de diversos cultivos en países desarrollados y en desarrollo.

Cereales	Países Desarrollados (TM)	Países en Desarrollo (TM)	Total (TM)
Arroz	25,389,163	571,765,501	597,154,664
Maíz	335,068,150	254,287,206	589,355,356
Trigo	313,386,061	266,628,534	580,014,595
Sorgo	14,602,074	44,162,469	58,764,543
Avena	23,474,730	2,519,773	25,994,503
Cebada (Rye)	18,645,398	1,326,050	19,971,448
Otros cultivos			
Papa	178,651,886	129,564,702	308,216,588
Yuca	0	171,517,343	171,517,343

Fuente: Página electrónica de la Organización del Alimento y la Agricultura (FAO).

<http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>

Cuadro 2. Principales países productores de arroz en el mundo y rendimiento por hectárea

País	Producción Mill TM (1999)	Area (Mill Ha.)	Rendimiento T/ha (1998)	Consumo (kg/cap/año)
China	200,499	31,720	6,3	91,6
India	131,200	44,800	2,9	80,4
Indonesia	49,534	11,624	4,3	149,3
Vietnam	31,394	7648	4,1	165,1
Bangladesh	29,857	10470	2,9	149,7
Tailandia	23,272	10,000	2,3	109,0

Fuente: IRRI World Rice Statistics

Cuadro 3. Principales países exportadores de arroz del mundo

País	Exportaciones (Mill. TM)	Rendimiento (T/ha)
Tailandia	6,356	2,3
India	4,800	2,9
Vietnam	3,800	4,1
China	3,791	6,3
Estados Unidos	3,112	6,6

Fuente: IRRI World Rice Statistics (<http://www.riceweb.org/>)

Objetivo general

Estudiar la diversidad de especies de *Oryza* en Costa Rica y su variabilidad morfológica y genética en relación a su biogeografía y ecología

Objetivos específicos

Determinar cuales especies del género *Oryza* se encuentran en Costa Rica.

Estudiar la biogeografía y ecología de las especies de *Oryza* de Costa Rica.

Estudiar la diversidad morfológica de la especie más abundante y ampliamente distribuida: *O. latifolia*.

Conocer la diversidad fenotípica y la estructura genética de *O. glumaepatula*, por ser la especie americana más relacionada a *O. sativa*

Capítulo 2

Diversidad de las especies nativas del género *Oryza* L. de Costa Rica

Alejandro Zamora^{1§}, Jorge Lobo², Ana M. Espinoza^{1, 3}.

1. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

2. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

3. Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

§Email: azamoram@cariari.ucr.ac.cr

Abstract

Many wild populations of the genus *Oryza* were found throughout the lowlands of Costa Rica. The plants found showed extensive morphological variation, suggesting the presence of several species. Morphological and genetic analyses served to classify the populations in three species: *O. grandiglumis*, *O. latifolia* and *O. glumaepatula*. The first, *O. grandiglumis* is a new record for Costa Rican flora. Its main population is located in Caño Negro Wildlife Refuge, and two smaller populations occur in Lagartera, Río Frio and Medio Queso River, Los Chiles, Alajuela. *O. latifolia* was previously known to occur in Costa Rica and it is distributed throughout the lowlands in all the country. *O. glumaepatula* was registered for Costa Rica only for a small population in Murciélago, Guanacaste, but its specific status was still uncertain. A population of *O. glumaepatula* of hundreds of thousands of plants was discovered in the Medio Queso River wetland, Los Chiles, Alajuela. This population is the most important source of genes for cultivar's improvement from the primary gene pool of rice in Costa Rica. In the morphologic study, 33 traits were scored for 212 plants of all the species and populations and subsets of these traits were used for different statistical tests. Principal component and discriminant analyses revealed the significant morphological separation of the different species, in agreement with their phylogenetic relationships. The small ligule

and the wide flag leaf characteristic of the two CCDD species separated them from the AA diploid *O. glumaepatula*. Seed size, ligule size, number of branches in the panicle, plant height and sterile lemma length are all bigger in *O. grandiglumis*, and influenced the second factor that separated the CCDD species (*O. grandiglumis* and *O. latifolia*) in two discrete clusters. Also, Costa Rican plants of *O. grandiglumis* have white stigma, long bright yellow anthers and no purple color in nodes or elsewhere. Different correlations between characteristics are observed in the three species, which suggests that their development and growth may be fitted for different ecological needs by particular gene expression patterns.

KEYWORDS: wild rice, genetic resources, biodiversity, morphology, Costa Rica, *O. latifolia*, *O. grandiglumis*, *O. glumaepatula*.

Introducción

Costa Rica tiene muchos humedales que proveen el hábitat apropiado para las especies del género *Oryza*, tales como pantanos herbáceos, bosques anegados, orillas de ríos, quebradas y lagunas.

O. latifolia se había registrado previamente en Costa Rica por Pohl (1980) y Vaughan (1994) reportó además la presencia de *O. rufipogon* raza Latinoamericana. Sin embargo, Akimoto (com. pers.) identificó como *O. rufipogon* algunas muestras de plantas de genoma AA de Costa Rica colectadas en arrozales, debido a que presentaban una gran similitud isoenzimática con las muestras de esta especie Asiática. Akimoto (com. pers.) también sugirió que las plantas del humedal de Medio Queso, zona norte de Costa Rica, podrían ser *O. glumaepatula*. Consecuentemente, había un malentendido en cuanto a si *O. glumaepatula* era una especie válida, si *O. glumaepatula* efectivamente se encontraba en Costa Rica, o si las plantas de genoma AA de Costa Rica eran producto de una introducción accidental de *O. rufipogon* Asiática. Claramente había una necesidad de dilucidar el estatus de la población de genoma diploide costarricense, además de conocer si había otras especies de *Oryza* en Costa Rica. Esta información es esencial para obtener

información relevante acerca de estas especies en estudios futuros (Warwick, 1997).

Se muestrearon varios humedales y algunos fueron monitoreados a través del año para establecer cuales especies de arroz silvestre se encuentran en Costa Rica, determinar su ubicación geográfica y potencial en mejoramiento genético del arroz. Este artículo describe la morfología de las diferentes especies de *Oryza* encontradas en el presente inventario de recursos genéticos para el arroz en Costa Rica y describe la diversidad de especies, su identidad taxonómica y su variabilidad morfológica como un primer paso para evaluar su variabilidad genética. Adicionalmente, se realizaron pruebas genéticas con microsátélites (Chen *et al.*, 1997.), para confirmar la identificación de cada especie.

Material y Metodos

Colecta de la muestra. Se realizaron giras de campo a humedales en las diferentes regiones biogeográficas de Costa Rica en 1997, 1998 y 1999. En estos sitios se recorrió transectos que incluyeron áreas alteradas, agroecosistemas y áreas protegidas. Muchos sitios se recorrieron varias veces a través del año pero especialmente durante la época lluviosa, con el fin de tener una mayor certeza de las especies presentes. En algunos sitios que se visitaron no se encontró ninguna especie. Esto ocurrió particularmente en algunas lagunas en la Península de Osa (e.g. Chocuaco), y en la Península de Nicoya (Cabo Blanco). Se colectaron muestras de herbario durante la estación lluviosa para reducir el efecto del ambiente en la morfología de las plantas. Se colectaron muestras de plantas de localidades separadas al menos un kilometro para tratar de obtener una mejor representatividad de la diversidad total de la especie. La mayor parte de las poblaciones identificadas consistieron en agrupaciones de mas de 10 individuos. Se identificó a cada población de arroz silvestre con un número de herbario y las coordenadas de la población se obtuvieron con un Sistema de Posicionamiento Global (GPS). Se colectaron muestras de herbario, semillas de plantas individuales y plantas vivas para invernadero. Se estimó el tamaño de la población como múltiplos de diez. Se anotaron las características del hábitat y microhábitat en que crecían las plantas. Se registró la vegetación asociada, así como también los insectos y hongos. Los especímenes fueron depositados en los

herbarios de la Universidad de Costa Rica (USJ), Museo Nacional de Costa Rica (MNCR) y el Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio). Las semillas se germinaron in vitro en medio de cultivo MS básico (Murashige y Skoog, 1962) y las plantas se plantaron posteriormente en el invernadero para incremento de semilla y caracterización morfológica.

Morfología de las especies de *Oryza*

Se evaluaron doscientas doce plantas traídas del campo, pertenecientes a todas las especies para 33 características morfológicas. Veintiseis de éstas eran caracteres cuantitativos y fueron usados para calcular estadísticas descriptivas, correlaciones y pruebas de estadística multivariada. Las otras siete eran características cualitativas y se usaron para calcular frecuencias de categorías discretas. Estas características corresponden a descriptores morfológicos comúnmente usados para las variedades y especies de *Oryza*, así como también a algunas características para las que se observó que existía variación entre las plantas encontradas en Costa Rica.

Las características estudiadas fueron:

Estructuras vegetativas

ALT: altura total de la planta incluyendo la panícula; LBAN: longitud de la hoja bandera; ABAN: ancho de la hoja bandera; LBAN2A: distancia de la hoja bandera a la segunda hoja; L2A: longitud de la segunda hoja; A2A: ancho de la segunda hoja; DIA: diámetro del culmo en la base de la segunda hoja; INTR: número de ramificaciones intravaginales del tallo; POSIT: número de la hoja en que ocurre la ramificación intravaginal; L1-2: distancia del primer al segundo nudo; L2-3: distancia del segundo al tercer nudo; L3-4: distancia del tercer al cuarto nudo; LLIG: longitud de la lígula; AUR: ancho de las aurículas

Estructuras florales

PAN: tamaño de la panícula de la hoja bandera a la punta de la panícula; DBB: distancia de la hoja bandera a la base de la panícula; DBP: distancia de la base de la panícula a la

punta de la panícula; RAM: longitud de la ramificación más larga de la panícula; LSINSEM: longitud de la parte sin semillas del raquis; NORAM: número de ramificaciones en la panícula; LSEM: longitud de la semilla; ASEM: ancho de la semilla; LLEMA: longitud de la lema estéril (lado de la lema fértil); LARI: longitud de la arista; LANT: longitud de la antera (seco); LSTI: longitud del estigma (seco).

Características cualitativas

CSTI: color del estigma; CARI: color de la arista; CESP: color de la espiguilla (lemma y palea); CNUDO: color del segundo nudo de arriba hacia abajo; CRAQ: color del raquis de la panícula; CLIG: color de la ligula; CAURI: color de las aurículas.

Las descripciones de las especies de *Oryza* de Vaughan (1994), Morishima (1994), Pohl (1980) y Akimoto (1998, 1999), sirvieron para la identificación de las especies encontradas en Costa Rica. Además, el Instituto Internacional de Investigación en Arroz (IRRI) facilitó muestras de referencia para todas las especies Americanas de *Oryza*, así como también de *O. rufipogon* de Asia, y *O. glaberrima* de Africa.

Análisis de componentes principales. Con el objetivo de estudiar la diferenciación de las poblaciones de *Oryza* encontradas y evaluar la validez de su clasificación como diferentes especies se realizó un análisis de componentes principales usando el programa MINITAB (MINITAB, 1995). Se utilizó esta prueba multivariada debido a que los índices que calcula son una combinación de todas las variables estudiadas en unas pocas nuevas que pretenden explicar la mayor parte de la variación presente en las muestras. Esta estrategia reduccionista permite obtener información de muchas características relacionadas y visualizarla de una forma simplificada. El análisis de componentes principales no trata de calcular una función que maximice la separación de grupos definidos a priori, por lo que los grupos que se forman son más objetivos (Manly, 1986). Los primeros dos componentes fueron usados para obtener un gráfico de la dispersión de los individuos de las diferentes poblaciones.

Análisis discriminante multivariado. Con la intención de determinar si existen individuos cuya clasificación a priori resulta dudosa se utilizó el análisis discriminante. Se usó el algoritmo Análisis Discriminante del programa STATISTICA (Statistica, 1997). Se realizó una selección de las variables más discriminantes con base a una selección múltiple escalonada, usando el valor de la estadística F como criterio de selección. Una variable fue incluida en el modelo si su adición incrementaba significativamente el valor de F entre grupos. Un total de 212 individuos de todas las poblaciones fueron asignados "a priori" a especies "hipotéticas", con base a su semejanza a la descripción original de cada especie, y se calculó la función que maximiza la separación de los grupos definidos como especies. La membresía de cada muestra a cada uno de los grupos definidos en el análisis discriminante fue comprobada con pruebas de probabilidad "a posteriori" (Manly, 1986). Cada individuo se graficó utilizando las coordenadas de las primeras dos funciones discriminantes calculadas.

Análisis de Microsatélites. Se colectaron plantas enteras, muestras de hojas y semillas de todas las poblaciones de *Oryza*. Las plantas y semillas se llevaron al invernadero donde se sembraron en pots con su número de identificación individual. Para extraer ADN se siguió el protocolo de Lohdi *et al.* (1994). Los microsatélites utilizados (Research Genetics) fueron diseñados para *O. sativa* (Panaud, *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997) y han probado ser útiles para distinguir variedades dentro de *O. sativa* pero también especies incluso distantemente relacionadas al arroz (Cho *et al.*, 2000). Se utilizaron los microsatélites RM14, RM21, RM31, RM48, RM208, RM215, RM224, RM229, RM234, RM235, RM237, RM240, RM256, AG 275, AG206, WX, GA309, y GA550. Estos microsatélites han sido utilizados antes en otros estudios taxonómicos de especies silvestres (Harrington, 1998).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en termocicladores Perkin Elmer 9600, DNA Engine Tetrad y PTC 100 (MJ Research). El perfil de temperaturas para la amplificación fue el recomendado por Research Genetics, i.e. 1min a 95°C, luego 30 ciclos de 1min a 95°C, 15s a 55°C, 30s a 72°C, con una extensión final de 7min a 72°C. La electroforesis de los amplicones se realizó en geles desnaturizantes de

poliacrilamida-urea y teñidos con plata (Johansson y Skoog, 1987; Vari y Bell, 1996). Los geles se secaron a temperatura ambiente, se fotografiaron, se determinaron los alelos de cada individuo y se guardó una imagen digital de cada gel para registro.

Resultados

Especies de *Oryza* en Costa Rica

Tres de las cuatro especies reconocidas para América se encontraron en los humedales de Costa Rica: *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis* y *O. latifolia*. La especie *O. grandiglumis* representa un nuevo registro para Costa Rica. Además, durante esta investigación se estableció definitivamente la presencia *O. glumaepatula* de Costa Rica, y se descubrió una nueva población de ésta especie en los Llanos del Rio Medio Queso en Los Chiles.

Se encontró un total de 312 poblaciones de plantas pertenecientes al género *Oryza*, de las cuales 75% pertenecen a *O. latifolia*, *O. grandiglumis* (10,6%), y *O. glumaepatula* (3,1%). Las otras poblaciones son de híbridos naturales (ver Capítulo 4, Zamora, *et al.*, en preparación) y muestras de “arroz rojo” o arroces maleza tomadas de arrozales (Arrieta *et al.*, en preparación) (Fig 1).

Análisis de Componentes Principales de las poblaciones de *Oryza*

Este análisis confirmó la separación de las muestras colectadas en tres grupos que no se traslapan, correspondiendo a las tres especies identificadas, que se observan como grupos discretos de individuos significativamente diferentes. Estas especies son *O. latifolia*, *O. grandiglumis* y *O. glumaepatula*, de acuerdo a la descripción de las especies Americanas según Vaughan (1994), Morishima (1994) y Akimoto (1998, 1999). Los primeros dos factores calculados explican un 48% de la variancia total (34,4 % y 14,4% respectivamente).

Las características que influyeron más en la diferenciación de las especies CCDD

con respecto a *O. glumaepatula* fueron, en orden de importancia para el primer factor: el tamaño de la panícula, la longitud de la parte sin semillas del raquis, la longitud de la ligula, ancho de la hoja bandera, el número de ramas en la panícula, el ancho de la segunda hoja, la altura total y la longitud de la segunda hoja. El segundo factor fue influenciado principalmente por el tamaño de la semilla, ligula, arista, lema estéril, segunda hoja y longitud de la hoja bandera. Estas características permiten distinguir las especies CCDD, *O. grandiglumis* y *O. latifolia* (Fig. 2).

Análisis Discriminante Multivariado de las especies de *Oryza* de Costa Rica

Los individuos asignados a priori a grupos considerados especies fueron reasignados consistentemente a sus grupos originales en el análisis discriminante, sin que se detectara muestras con una clasificación dudosa. Además, dichos grupos se separaron claramente debido al efecto combinado de las características estudiadas. La longitud de la ligula, largo de la semilla, ancho de la hoja bandera, longitud de la lema, altura total y la distancia del 2do al 3er nudo fueron las variables seleccionadas por el algoritmo como las más informativas, debido a que mostraron un alto coeficiente de variación entre los grupos definidos como especies. Un análisis multivariado de variancia de estas variables resultó en un valor significativo para la estadística Wilks Lambda de 0,1447 ($F(28,344) = 89.841, p < 0.000$)).

La longitud de la ligula es la principal característica que separa a *O. glumaepatula* (AA) de *O. grandiglumis* y *O. latifolia* (ambas CCDD), influenciando el la primera función discriminante. Por otro lado, el tamaño de la semilla, la longitud de la ligula, el número de ramificaciones en la panícula, la altura total y la longitud de la lemma estéril son todas mayores en *O. grandiglumis* que en *O. latifolia*, e influenciaron el segundo factor que separa a las dos especies tetraploides en conglomerados diferentes (Fig. 3).

Correlaciones entre variables

Algunas variables están correlacionadas en una especie pero no en otras, lo que indica un tipo distinto de diferenciación relacionado a variaciones en la expresión de los

genes que determinan la morfología. En *O. glumaepatula* la altura de la planta se correlaciona significativamente con el tamaño de la panícula ($r: 0.6$, $p<0.05$) y con el número de ramificaciones de la panícula (BRA, $r: 0.59$, $p<0.05$). La altura total está también correlacionada con la distancia del 2do al 3er nudo ($r: 0.44$, $p<0.05$) y con el diámetro del segundo nudo ($r: 0.54$, $p<0.05$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variación en las correlaciones entre algunas características observadas en las especies de *Oryza* de Costa Rica.

Característica	Especies		
	<i>O. latifolia</i>	<i>O. grandiglumis</i>	<i>O. glumaepatula</i>
ALT vs LSEM	0.27*	-0.25	-0.2
ABAN vs LSEM	0.2*	-0.54	0.77*
ALT vs ABAN	0.48*	0.22	0.14
PAN vs LARI	0.06	0.3	0.51*
RAM vs LARI	0.21*	0.39	0.42*
ALT vs DIA	0.24*	0.34	0.34
LLEMA vs DBP	-0.03	0.5	0.14
LSINSEM vs DBP	0.75*	0.73*	0.24

El valor de significancia es distinto para cada especie. * = $p<0,05$

En *O. glumaepatula*, la longitud de la arista no está correlacionada a la longitud de la semilla y no está correlacionada tampoco a la altura de la planta, de la misma manera que ocurre en *O. grandiglumis* y *O. latifolia*. La longitud de la semilla está correlacionada al ancho de la hoja bandera ($r: 0,77$) y al ancho de la segunda hoja ($r: 0,77$).

Algunas correlaciones ocurren en las tres especies por igual, tales como: altura vs. panícula; número de ramificaciones vs. ancho de la segunda hoja. El ancho de la hoja bandera está correlacionado con número de ramificaciones, tamaño de la panícula y ancho de la segunda hoja. Sin embargo, la longitud de la semilla está correlacionada con la altura total de la planta en *O. latifolia*, pero no es así en *O. grandiglumis* ni en *O. glumaepatula*. Por otro lado, la longitud de la semilla está altamente correlacionada con el ancho de la hoja bandera en *O. glumaepatula* ($r: 0.77$), pero está levemente correlacionada en *O. latifolia* ($r: 0.2$, $p<0,05$), y está inversamente correlacionada en *O. grandiglumis* ($r: -0,54$, $p<0,05$).

Diferenciación genética de las especies de *Oryza* de Costa Rica

El estudio con microsatélites reveló que *O. glumaepatula* amplificó para 14 de los 18 microsatélites usados y muestra alelos diferentes a los que tienen las especies de genoma CCDD. Además, en todos los casos *O. glumaepatula* presentó alelos diferentes a *O. rufipogon* (W1927 Tailandia) (Fig. 4). Los alelos de *O. rufipogon* eran siempre más parecidos en su tamaño en pares de bases al testigo IR64 que a *O. glumaepatula*. La accesión W1169 (*O. glumaepatula* de Cuba) presentó alelos diferentes a los de *O. glumaepatula* de Costa Rica en 12 de 14 ocasiones, pero las diferencias con respecto a la especie costarricense (en pares de bases) eran generalmente mas pequeñas que las de *O. rufipogon* (Fig. 4a). En dos marcadores, RM229 y GA206, *O. glumaepatula* de Cuba y Costa Rica presentaron los mismos alelos (Fig. 4c). Estos marcadores no presentaron variación dentro de la población de Costa Rica tampoco por lo que parecen marcadores conservados.

Las especies tetraploides amplificaron solamente para 8 de los 18 marcadores utilizados. Estos fueron los marcadores RM48, RM208, RM224, RM234, RM240, RM215, RM31, y GA309. *O. latifolia* tiene alelos diferentes a las otras dos especies costarricenses en los marcadores RM208, RM224 y RM234 (Figura 5).

Oryza latifolia Desv.

O. latifolia es la especie de arroz silvestre costarricense más ampliamente distribuida y también la más variable a nivel morfológico. Diferencias grandes en el tamaño de la semilla (Fig. 6) y la pubescencia de las hojas causaron una confusión inicial, en la que pensamos que habían dos especies diferentes (*O. alta* y *O. latifolia*). Posteriormente, al ampliar la muestra se determinó que hay un continuo en el tamaño de las semillas y en las otras características en estas poblaciones. Como se describe en el capítulo 5, hay diferencias significativas en el tamaño de varias características que responden a diferentes ambientes, pero existe un continuo a nivel de todas las características formando un único grupo.

Estas plantas tienen un promedio de 178 cm de altura en floración, pero se pueden

encontrar plantas de 50 a 400 cm de alto, incluyendo la panícula, en diferentes zonas de vida. De la misma manera el tamaño de la panícula, de las ramificaciones en la panícula y de la semilla tienen un coeficiente de variación mayor en esta especie que en las otras dos.

Oryza grandiglumis (Doell) Prod.

Este es el primer registro de *O. grandiglumis* en Costa Rica. Esta es una planta muy robusta, con culmos hasta 7.60 m de largo (promedio= 309±84cmSD), parte del cual está dentro del agua, o yaciendo en los bancos lodosos en el verano. Producen panículas prominentes de hasta 90 cm (Fig. 7A), con muchas ramificaciones en un tallo central hueco y ancho. Este tipo de tallo central de la panícula es un rasgo particular de ésta especie y permite tener un gran número de ramificaciones, las cuales a diferencia de *O. latifolia*, son muy delgadas y apenas soportan el peso de las semillas. Las semillas de *O. grandiglumis* son las más grandes de todas las especies encontradas en Costa Rica, con un promedio de $8,9 \pm 0.3\text{mm SD}$. Esta situación es diferente de la que se encuentra en Sur América, en donde *O. glumaepatula* tiene las semillas más grandes (Morishima, 1994).

El tamaño de las lemmas estériles normalmente se extiende hasta la mitad de la semilla y alcanza en raras ocasiones el tamaño de la lema fértil. Esta variación también se ha reportado para poblaciones de Suramérica y ocurre incluso dentro de una misma planta, donde lemas estériles de diferentes tamaños pueden encontrarse (Fig. 7b).

Las anteras de *O. grandiglumis* son las más grandes de las especies costarricenses, alcanzando hasta 6mm cuando frescas y 4.5mm secas. El color amarillo brillante de las anteras es visible a través de la lema y la palea. Algo único acerca de *O. grandiglumis* es que los estigmas son blancos. Todas las otras especies tienen estigmas de color rojo vino.

La lígula es robusta (5 mm) y pubescente en la parte de atrás, es decir, la cara que da hacia la vaina de la hoja (Fig. 7c). Las aurículas son grandes y gruesas (2 mm).

Ninguna de éstas dos estructuras presenta coloración púrpura en ésta especie. El culmo de *O. grandighumis* tiene un notorio aerénquima, en el que las cavidades aéreas en el tejido que rodea al tallo son grandes y evidentes. Esta característica puede permitir a la planta flotar y acomodarse a las variaciones en el nivel del agua, así como también dispersarse con la corriente. Algunos detalles de la ecología de *O. grandighumis* se describen en el capítulo 4 de éste documento.

Oryza glumaepatula Steud.

O. glumaepatula se localiza únicamente en dos localidades en Costa Rica, en Murciélago (Guanacaste) y en Medio Queso (Los Chiles, Alajuela). La primera población es muy pequeña y consiste de ca. 50 plantas. Ésta había sido registrada por Davidse (citado en Vaughan, 1994) como la población latinoamericana de *O. rufipogon*. La segunda población fue encontrada durante esta investigación y comprende cientos de miles de plantas, distribuidas en los 20 Km² del humedal en forma de parches de unas cuantas plantas hasta de varias hectáreas, en el llano del Río Medio Queso, Los Chiles, Alajuela. Esta población tiene una floración altamente sincronizada (ver capítulo 4) y una marcada estructura genética (capítulo 6) producto de un flujo de genes limitado y que no es evidente de su morfología.

Las plantas de *O. glumaepatula* pueden ser identificadas aún cuando no están en floración por la larga y apergaminada lígula ($\bar{x}$:23.36±5.6mmSD) y las largas, delgadas y setulosas aurículas ($\bar{x}$:0.13±0.11mmSD) (Fig. 8a). La panícula es corta ($\bar{x}$:30.79±8.5cmSD), con pocas ($\bar{x}$:7.1±2.9SD) y cortas ramificaciones ($\bar{x}$:5.8±1.7cmSD). Algunas ramificaciones tienen una sólo semilla. La semilla ($\bar{x}$:8.3±0.3mm) es más pequeña que la de las poblaciones suramericanas ($\bar{x}$:9.27 ±0.34SD, n=28, datos tomados de Shimamoto *et al.*, 1994), lo mismo que la arista ($\bar{x}$: 60±21mm en Costa Rica vs hasta 160 mm en Suramérica, según Vaughan 1994).

La arista tiene la típica coloración roja de las especies del grupo de *O. sativa*, y se observan algunas plantas que tienen aristas blancas, polimorfismo que también se ha

reportado en suramérica (Vaughan, 1994) (Fig. 8b).

La floración en ésta especie es altamente sincronizada, extendiéndose el pico de la floración por dos semanas. Quince días después ya hay semilla madura abundante. Posteriormente se produce una segunda floración, producto de brotes secundarios fértiles, por lo que la floración se extiende hasta que el nivel del agua baja. La floración que se produce después del pico inicial es desincronizada y conlleva un esfuerzo reproductivo menor, lo que se observa en el tamaño de las panículas y la cantidad de las ramificaciones. También se nota que la fertilización disminuye y no se produce mucha semilla por panícula.

Discusion

Taxonomía de las especies costarricenses de *Oryza*

La taxonomía de las especies americanas de *Oryza* ha sido objeto de discusión debido a la similitud morfológica entre *O. glumaepatula* y *O. rufipogon*, así como también las semejanzas entre las especies de genoma CCDD.

La evidencia que brindan los datos de RFLPs de ADN nuclear (Doi *et al.* ; Akimoto, 1999), RFLP de cloroplasto y mitocondria (Akimoto, 1999), e hibridación artificial (Naredo *et al.*, 1999) demuestran que la población americana de *Oryza* con genoma AA es una especie diferente.

En este estudio se observó que las muestras de *O. rufipogon* difieren mucho de las de *O. glumaepatula* a nivel de marcadores moleculares. En general el peso molecular de los alelos de *O. rufipogon* es más divergente de los de *O. glumaepatula* de Costa Rica que los de *O. glumaepatula* de Cuba. Debido a que el tipo de mutación que ocurre en los microsatélites es del tipo de paso a paso (Slatkin, 1995), los alelos más divergentes sugieren un mayor tiempo de separación.

Por otro lado, pareciera que las plantas introducidas de *O. rufipogon* que se encuentran en arrozales (Arrieta, en preparación) formando parte del complejo de arroz rojo, podrían haber afectado las conclusiones con respecto al estatus taxonómico de *O. glumaepatula* en algunos estudios morfológicos (Juliano et al, 1999) y moleculares (Second, 1985). Sin embargo, la prueba fundamental de especiación es la esterilidad de los híbridos entre *O. glumaepatula* y *O. rufipogon*, determinada por varios autores en investigaciones independientes.

El que los microsatélites desarrollados para *O. sativa* amplifiquen fragmentos de longitud variable en *O. rufipogon*, ha sido probado antes (Xiao et al., 1998) y es normal debido a su cercanía filogenética. *O. glumaepatula* no había sido estudiado antes usando estos microsatélites y sin embargo amplificó confiablemente, generando fragmentos de longitud variable dentro de la población costarricense, así como también con respecto a otras poblaciones conespecíficas. Algunos microsatélites también muestran grandes diferencias con respecto al peso molecular en diferentes especies. De manera que se puede interpretar que las regiones flanqueantes están conservadas para los marcadores usados y pueden utilizarse en estudios genéticos, poblacionales y evolutivos.

En este estudio se demostró que en Costa Rica existen poblaciones de *O. grandiglumis*, que son significativamente diferentes de *O. latifolia* tanto a nivel morfológico como genético. Se determinó además que esta especie es *O. grandiglumis* y no *O. alta* debido al gran tamaño de la lemma estéril, que aunque no es del tamaño de la lemma fértil como en la planta tipo, es del 50% del tamaño de la lemma fértil y en algunos casos se pueden encontrar espiguillas con lemas estériles tan grandes como la fértil. Este desarrollo de la lemma estéril nunca ocurre en *O. alta*. Por otro lado, Sánchez (en preparación) determinó usando microscopía electrónica de barrido, que la espiguilla de *O. grandiglumis* de Costa Rica se parece a *O. grandiglumis* de Brasil, y es diferente a las muestras testigo de *O. alta*.

Aggarwal et al. (1996) estudió las relaciones filogenéticas entre las especies

CCDD utilizando hibridación ADN-ADN y RFLPs y determinaron que *O. grandiglumis* y *O. alta* forman un grupo monofilético, mientras que *O. latifolia* parece haberse separado más temprano en el tiempo evolutivo. Así que aunque ellos consideran al primer par de especies como válidas, también sugieren que algún grado de hibridización puede ocurrir entre ellas y que podrían confundirse en base a su morfología. Jena y Khush (1988) indicaron que en un 59% de los cruces artificiales entre *O. grandiglumis* y *O. alta* se producen plantas híbridas, pero que la semilla de éstas es completamente estéril. Por lo tanto es posible encontrar plantas de morfología intermedia entre éstas dos especies, pero serían estériles. Este sin embargo, no es el caso de las plantas de *O. grandiglumis* de Costa Rica, que producen polen y semilla viable. Sin embargo, si se encuentran en Costa Rica dos tipos de plantas híbridas estériles que se describen en el capítulo 2 de ésta tesis.

El que las plantas de *O. grandiglumis* de Costa Rica, así como algunas poblaciones suramericanas tengan lemas estériles más pequeñas, tiene como consecuencia que las semillas de *O. grandiglumis* de Costa Rica pierden la propiedad de flotar, como si ocurre en las *O. grandiglumis* tipo y de la mayor parte de las poblaciones sudamericanas. La pérdida de capacidad de flotación puede estar implicando un cambio en los mecanismos de dispersión de las poblaciones de *O. grandiglumis* de lema estéril pequeña.

El origen filogenético y biogeográfico de las especies americanas del grupo de *O. officinalis*, cuyo genoma CCDD es endémico de América, es bastante diferente al de *O. glumaepatula*. De acuerdo a Ge *et al.* (1999), el ancestro de éstas plantas puede haberse originado a partir de un sólo evento de hibridización entre una especie de genoma CC y una especie desconocida relacionada al ancestro de la especie actual de genoma EE, *O. australiensis*. Es poco claro cual especie CC puede haber dado origen a éste grupo, pero por las características de sus genomas organelares, se sabe que actuó como la planta madre. También es incierto, cuando y donde ocurrió éste evento, pero el hecho de que estas especies americanas tengan a sus parientes más cercanos en Australia no es único. Otros organismos como los marsupiales americanos (Mammalia: Didelphidae) presentan el mismo patrón (Woodburne y Zinsmeister, 1982), lo que se debe a que América y

Australia estuvieron unidos por la Antártica, que constituía un gran puente de tierra entre éstos continentes hace ca. 200 millones de años.

Morfología de las especies de *Oryza* de Costa Rica

La presencia de correlaciones entre algunas características de una especie y no en otras indica que hay una diferenciación entre éstas especies que está asociada a la expresión de los genes relacionadas al crecimiento de éstas plantas. Parece ser que éstas diferentes correlaciones se deben a los distintos hábitos que las plantas de éstas especies necesitan para desarrollarse bien en distintos microhábitats.

Llama la atención que las plantas de *O. grandiglumis* de Costa Rica se distinguen de las típicas suramericanas en que tienen lemas estériles más pequeñas y que además tienen estigmas de color blanco, cuando sus conespecíficas así como todas las otras especies americanas tienen color rojo vino en sus estigmas. Podría ser que éstas plantas sufrieron una mutación en algún paso de la vía de síntesis de las antocianinas, la cual se fijó en la población talvez por una reducción drástica en el tamaño de la población, quizás relacionado a el evento de dispersión que trajo ésta especie a la región del Río Frío.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Dr. Michael T. Jackson por escoger a Costa Rica para realizar este estudio y por sus comentarios. El Dr. Rodrigo Gámez, por su apoyo a esta investigación y al Dr. Carlos Quesada por su ayuda en el análisis biogeográfico. Esta investigación es parte del proyecto “Global Rice Germplasm Collection and Conservation Project” de IRRI. Agradecemos a la Dra. Susan McCouch por permitirnos realizar el análisis de microsatélites en su laboratorio de la Universidad de Cornell.

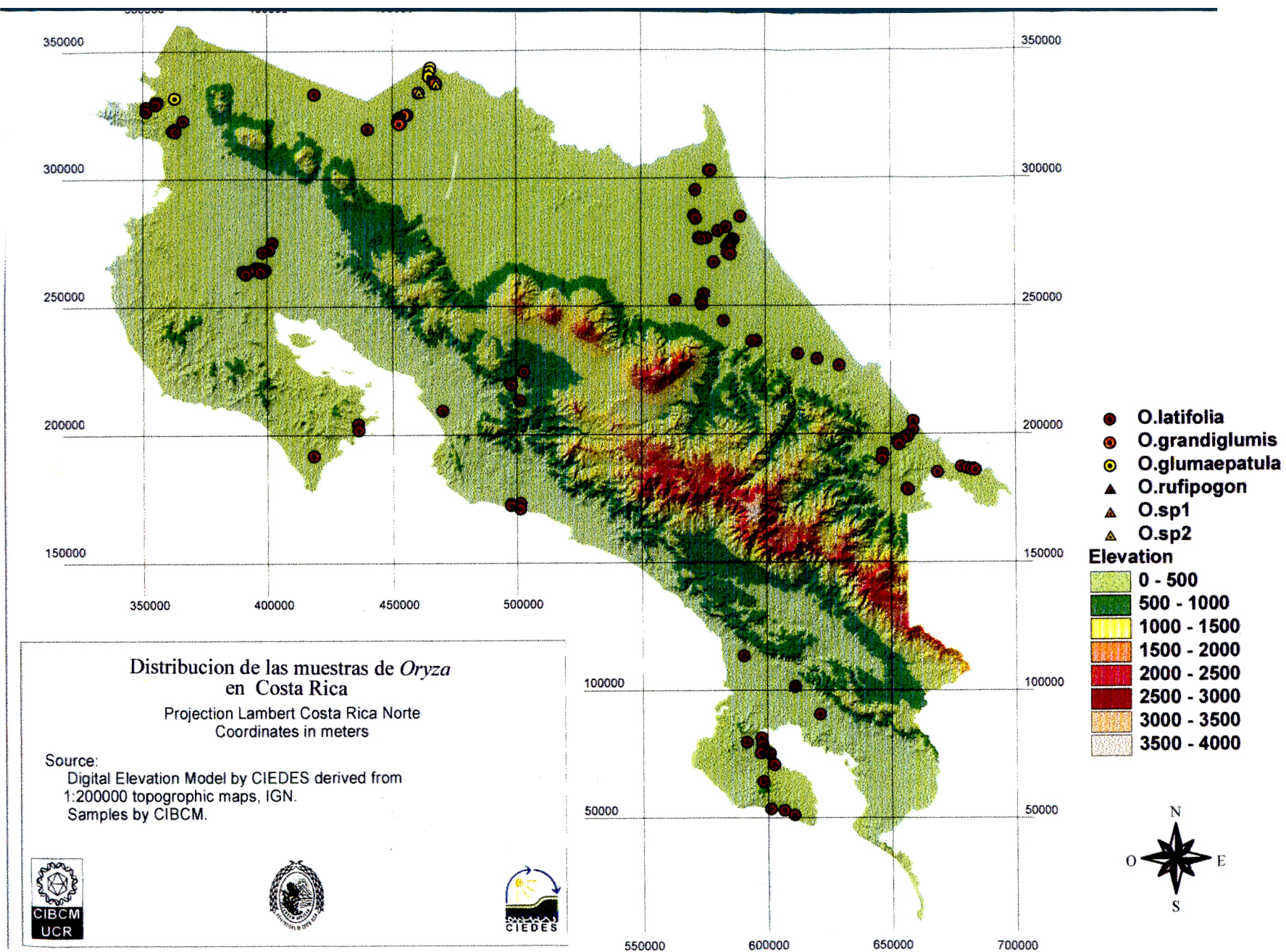


Fig. 1. Distribucion de las localidades de muestreo donde se encontraron poblaciones de *Oryza* durante el inventario realizado entre 1997-99

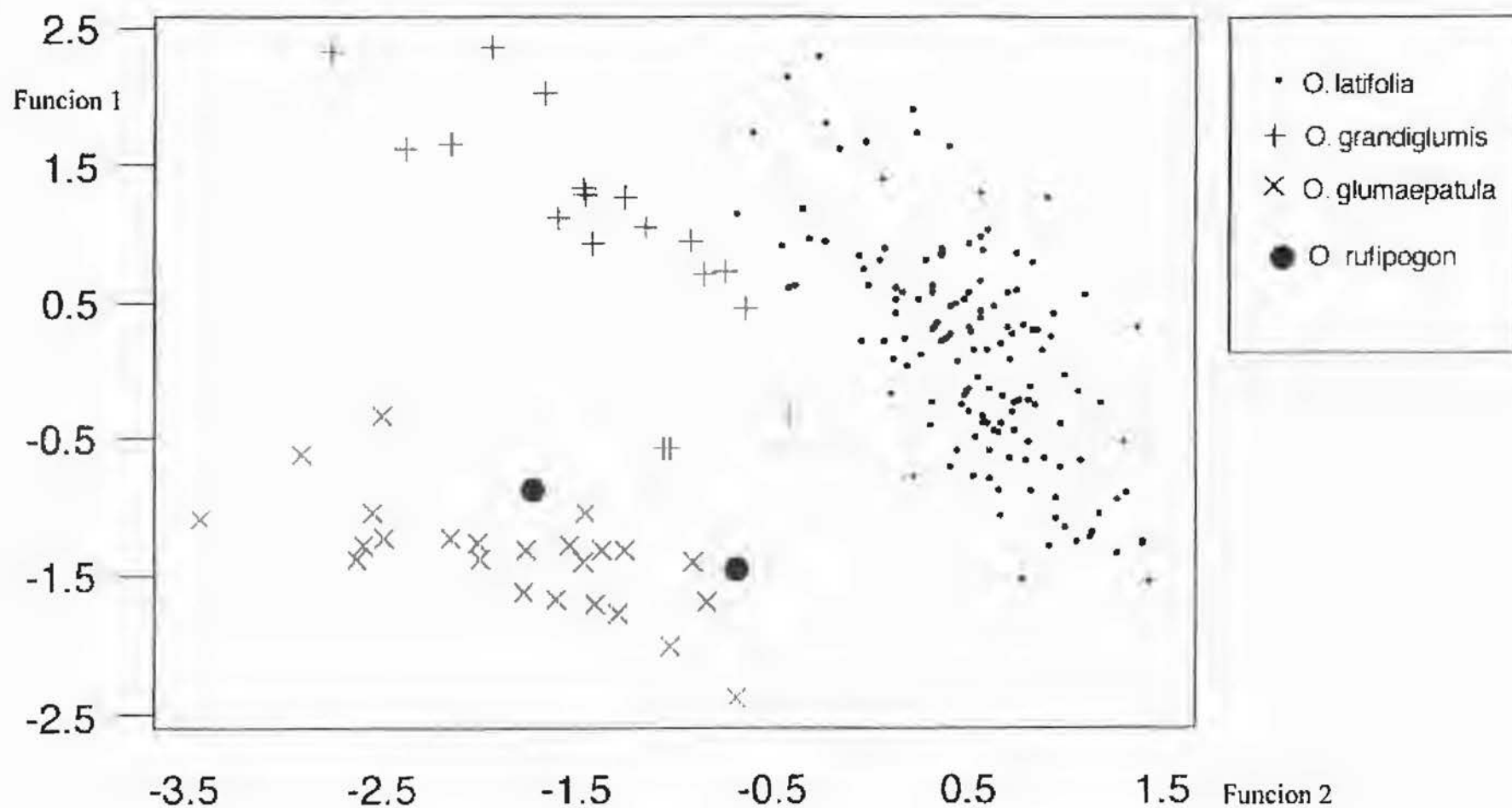


Fig. 2. Grafico de dispersion de los individuos de todas las poblaciones de *Oryza*, segun sus valores para los dos primeros autovalores calculados en el analisis de componentes principales.

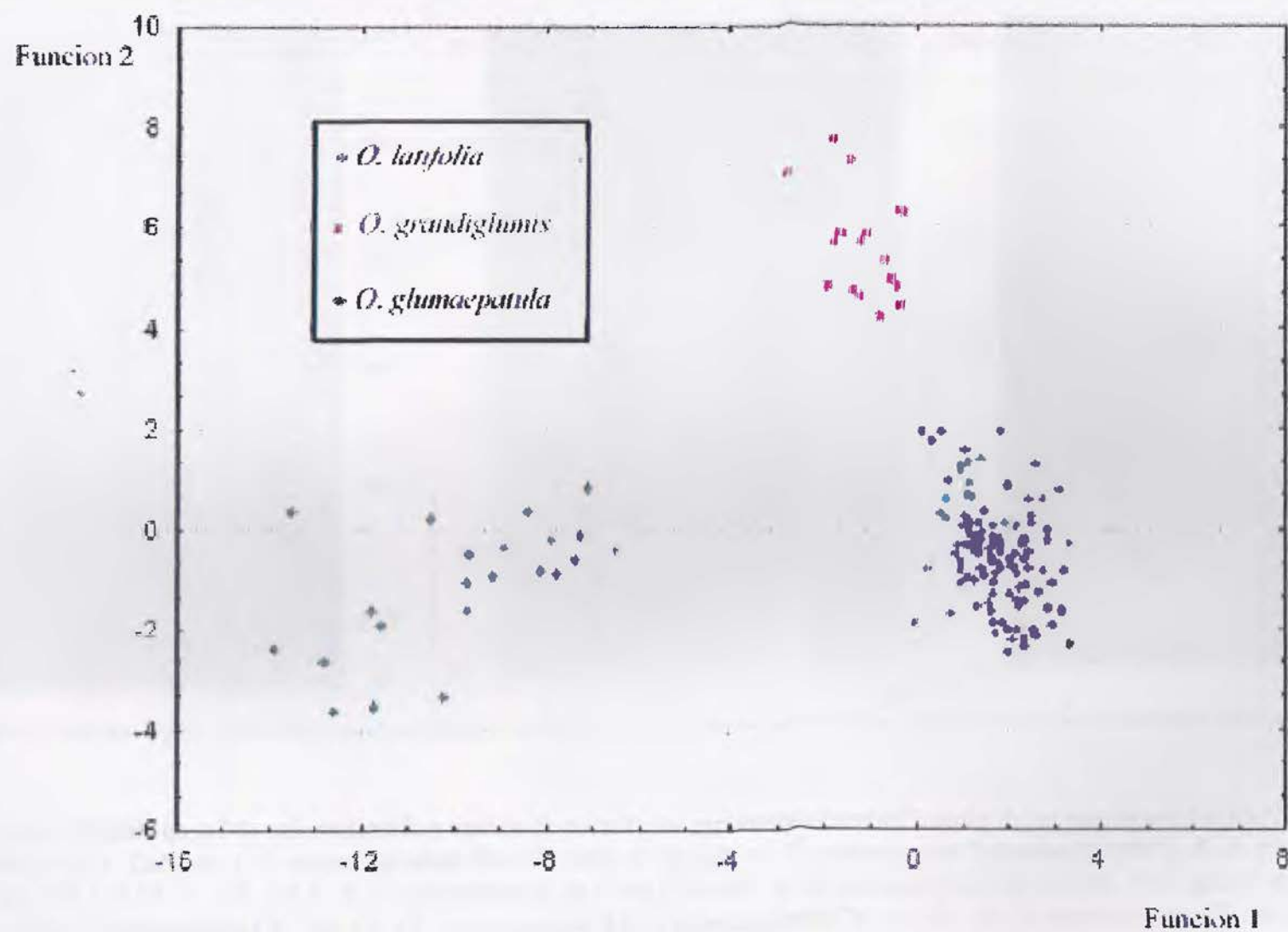


Fig 3. Distribucion de los individuos de cada especie de acuerdo a las funciones discriminantes 1 y 2.

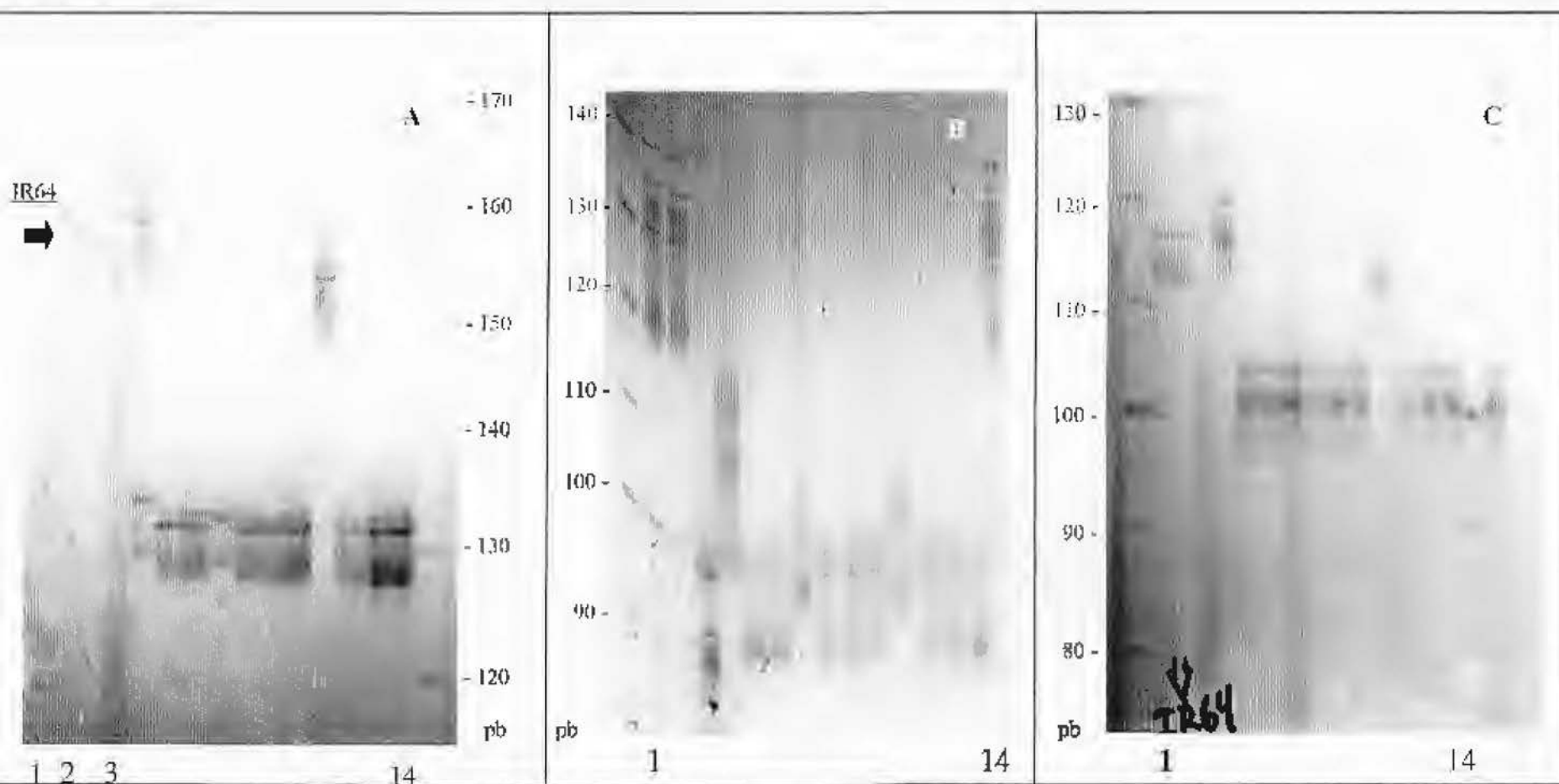


Fig. 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción de plata de los productos de amplificación de los microsatélites RM224 (A), RM256 (B) y RM229 (C). Carriles. 1. *O. sativa* variedad IR64. 2. IR64. 3. *O. sp1*. 4. *O. rufipogon* de Tailandia (W1927). 5. *O. glumaepatula* de Costa Rica CR 163.12. 6. CR 163.5. 7. *O. glumaepatula* de Cuba (W1169). 8. *O. glumaepatula* CR 163.33. 9. *O. glumaepatula* CR 189.1.3. 10. *O. glumaepatula* CR 300.14. 11. *Aroz* maleza 12. *O. glumaepatula* CR 260.12. 13. *O. glumaepatula* CR 188.3.18. 14. *O. glumaepatula* CR cf11.

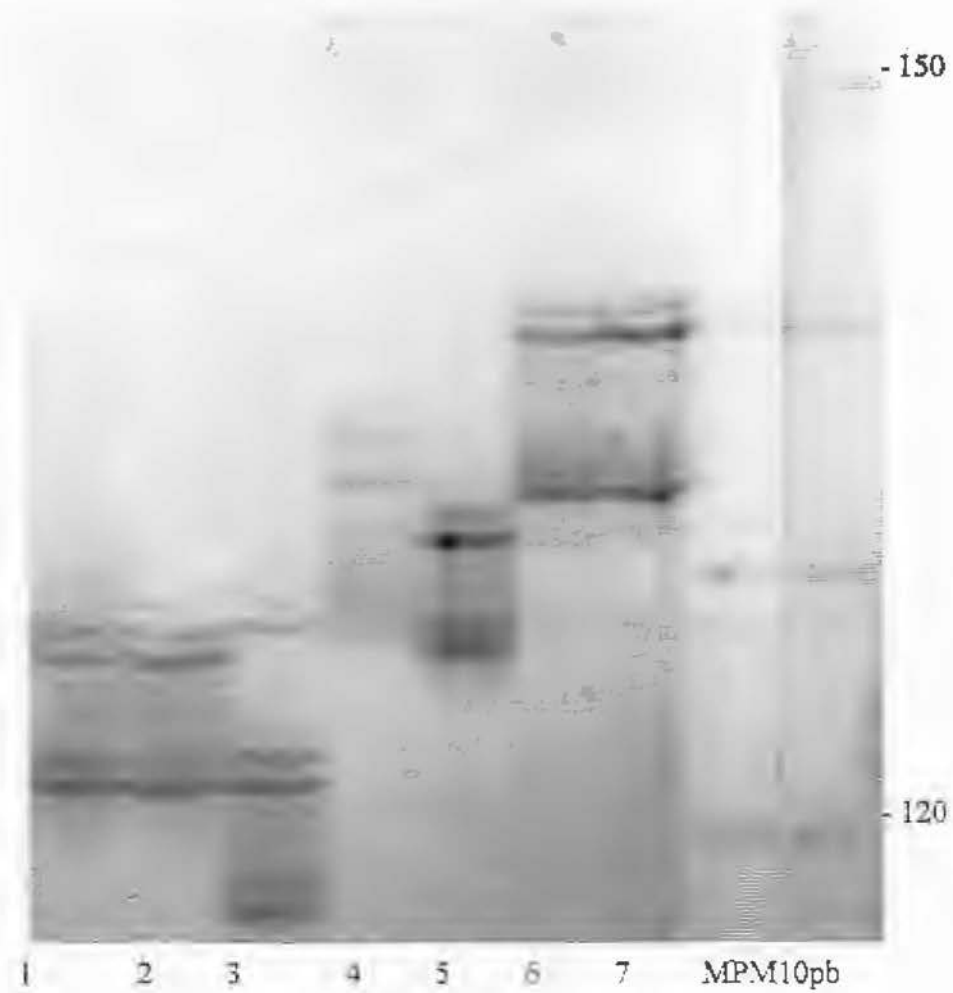


Fig. 5. Gel de poliacrilamida y tinción con plata de los productos de amplificación del microsatélite RM224. El peso molecular de los alelos de *O. latifolia* de Costa Rica (1,2,3) es muy diferente a los de *O. grandiglumis* (6,7) y *O. glumaepatula* (5)



Fig. 6. Semillas de las especies de *Oryza* de Costa Rica.
1-4 *O. latifolia*; 5,6 *O. grandiglumis*; 7,8 *O. glumaepatula*;
9,10 *O. rufipogon*.

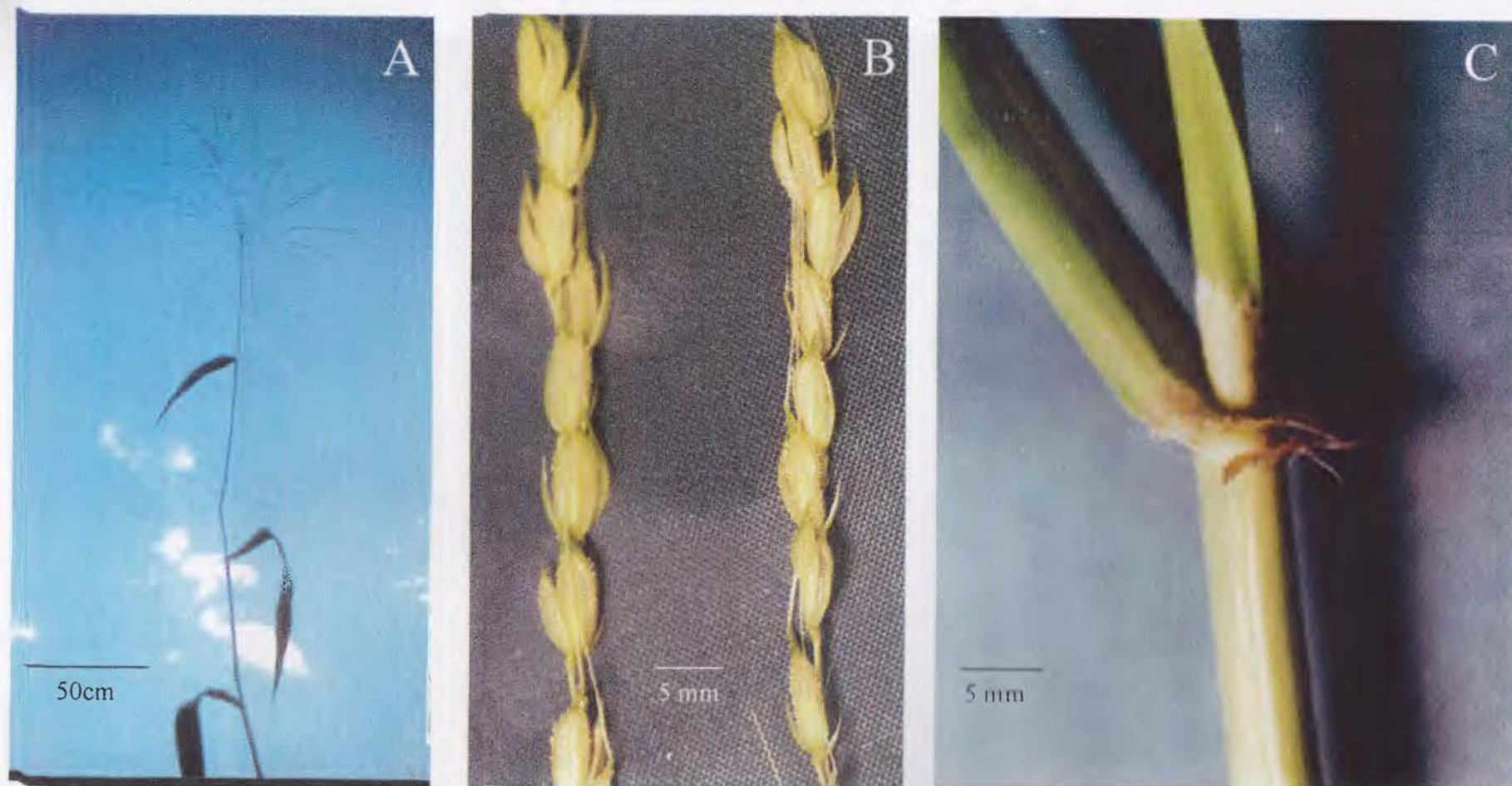


Fig. 7. (A) Panícula, (B) Diferentes tamaños de lema estéril, (C) Lígula y aurículas de *O. grandiglumis*.

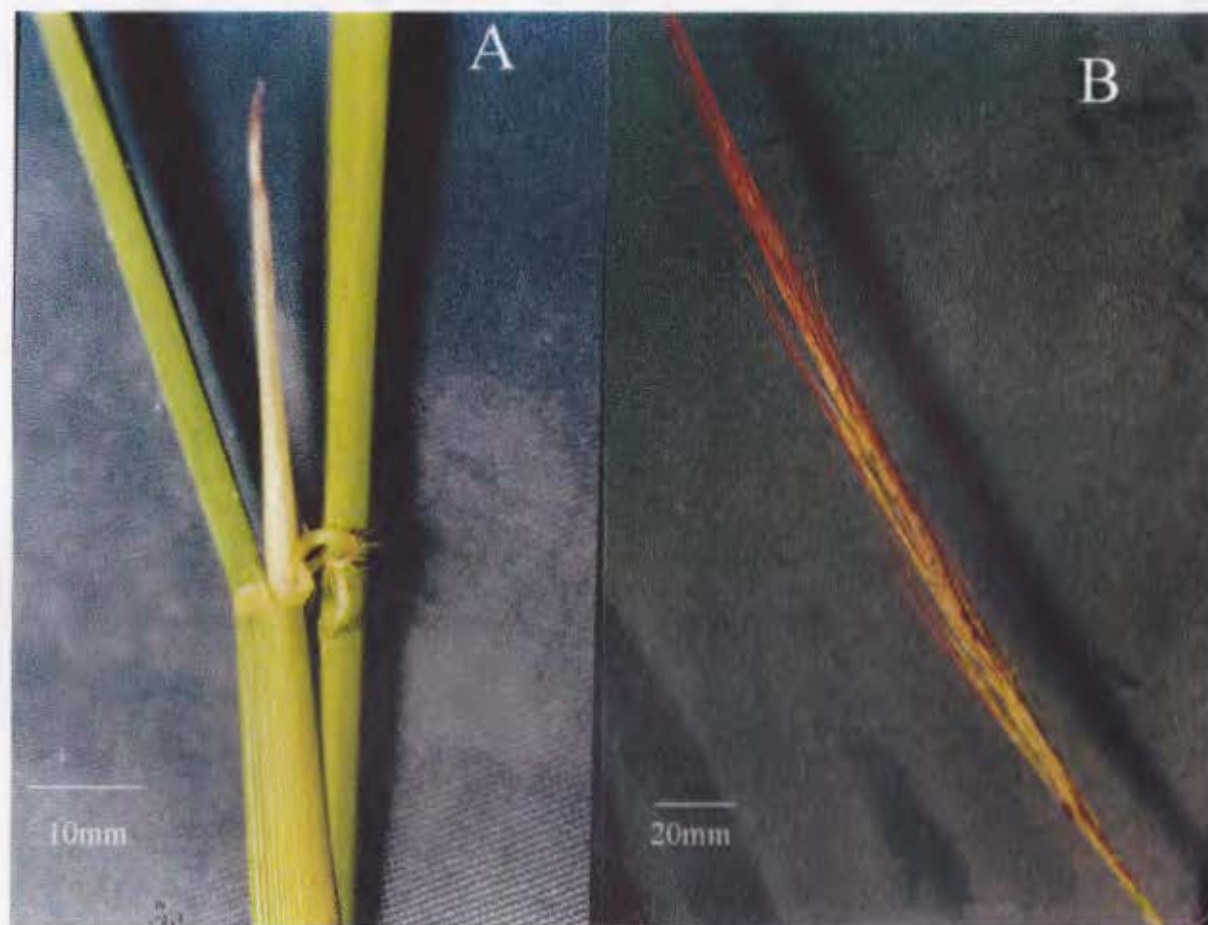


Fig. 8. (A) Lígula y aurículas de *O. glumaepatula*. (B) Panícula de *O. glumaepatula* mostrando el color rojo de la arista.

Capítulo 3

Hibridización natural entre especies silvestres de arroz (*Oryza*) en Costa Rica

Alejandro Zamora-Meléndez¹, Jorge A. Lobo², Susan McCouch³, Ana M. Espinoza¹.

1. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica.
2. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Costa Rica.
3. Plant Breeding Department, Cornell University.

Abstract.

Hybridization has been reported previously in the genus *Oryza* L., but hybridization between different species groups such as the *O. sativa* group and the *O. officinalis* complex, has occurred only artificially requiring embryo rescue and *in vitro* culture. During a wild rice inventory research in Costa Rica, two different hybrid forms were found. One of these is here shown to be a hybrid between *Oryza glumaepatula* (2n=24) and *O. grandiglumis* (2n=48). Its morphology is significantly different and intermediate to that of the parental lines. The isozyme pattern of these plants at several loci is different from both parent species, resulting from a combination of their bands. Also, microsatellites revealed that these hybrids share some bands typical of either parent species and in some cases the hybrid shows exactly the bands from both parents. These hybrid plants occur only in the bank of the Medio Queso river, Los Chiles, Alajuela and perpetuate reproducing asexually by fision of the culms and hydric dispersion. The second hybrid is proposed to be a cross between *O. latifolia* and *O. grandiglumis*. It is also intermediate in its morphology, but tends to resemble *O. latifolia* plants from the rain forest. Although its habit fits the description of *O. alta*, due to its seed size and flag leaf

width, it is highly sterile. Microsatellite markers for this hybrid showed that it shares some alleles with the putative parental species and that it shows variability suggesting either de novo mutations or backcrossing. The occurrence of two different hybrid populations opens the possibility to study the effect of inter specific crosses on genotype environment interactions including resistance to pathogens and to use genes of two species at the same time in crosses with elite varieties. It is also important in understanding the role of mating systems and hybridization in the evolution of *Oryza*.

Introducción

La hibridización natural en plantas fue por algún tiempo considerada como uno de los procesos importantes de formación de especies y naturalistas como Linneo y Mendel creían firmemente que la hibridación llevaba al desarrollo de una nueva especie (Rieseberg, 1997). Sin embargo, se produjo gran escepticismo cuando se descubrió la esterilidad híbrida y los botánicos se dieron cuenta de lo común que era este fenómeno. Más aún, la formación de nuevas especies con reproducción sexual requiere el aislamiento de las especies progenitoras, ya que de otra manera un híbrido fértil se retrocruzaría con sus padres formando una mezcla de formas entre estos.

Esta mezcla de formas entre las líneas parentales es lo que se conoce como enjambre híbrido y carece de la cohesión que caracteriza los grupos taxonómicos con estatus de línea evolutiva independiente (sensu Templeton 1985). En Asia (Morishima *et al.*, 1992) y Estados Unidos de América (Langevin *et al.*, 1990), se ha reportado el caso del enjambre híbrido entre *O. sativa* y *O. rufipogon*, donde estas especies son interfértiles y los cruces ocurren comúnmente, sin que se produzca una especie nueva.

Esta visión cambió nuevamente cuando la alopoliploidía y recombinación fueron propuestos como mecanismos que pueden corregir los problemas de apareamiento cromosómico anormal en la meiosis (Rieseberg 1997), restaurando la fertilidad y permitiendo así la especiación instantánea (según Avise, 1994).

De acuerdo a los estudios de hibridización en cinco floras en el mundo, un promedio de 11% de las especies de plantas pueden ser de origen híbrido, sugiriendo que un estimado de 27500 especies híbridas podrían existir en el mundo si la frecuencia de éste fenómeno es regular en diferentes partes del mundo (Rieseberg, 1997).

Más aún, los estudios filogenéticos realizados con ADNcp sugieren que la evolución reticulada es común en varios grupos de plantas (Avice, 1994). Lewis (1980, citado en Avice, 1994, p 258) indica que un 70-80% de las angiospermas puede ser de origen poliploide y las isoenzimas han sido marcadores útiles para determinar las líneas parentales ancestrales. Por ejemplo, en la "barba de chivo" (*Tragopogon spp.*), los poliploides que se produjeron de combinaciones de juegos cromosómicos diferentes, expresan aditivamente todos los loci examinados, mostrando los alelos heredados de las respectivas líneas progenitoras (Lewis, 1980).

Sin embargo, hay una distribución desigual de las especies de origen híbrido en las familias de plantas, donde un máximo de 34% de todas las familias y 16% de los géneros presentan especies híbridas. De la misma manera, la frecuencia de hibridización está asociada a la historia de vida y particularmente al tipo de sistema de apareamiento con tendencia al exocruzamiento, perennialidad de la planta y modos de reproducción asexual que permiten la perpetuación de la planta hasta que se produce una planta fértil (Rieseberg, 1997).

Muchas especies de arroz presentan características que permiten la hibridización natural como polinización eólica (inespecífica) y falta de impedimentos a la fecundación por polen de otra especie. Algunos de estos eventos de hibridación entre arroz cultivado y especies silvestres han sido reportados para Asia, África y América (Oka and Chang, 1961, Chu and Oka, 1970; Langevin et al., 1990). Muchos de estos fenómenos de hibridación entre especies cultivadas y silvestres producen híbridos fértiles, especialmente cuando pertenecen al grupo AA (Morishima et al., 1992), y esta propiedad

determina la existencia de poblaciones con diferentes grados de hibridización y retrocruzamiento ("enjambres híbridos")

Los enjambres híbridos entre *O. rufipogon*, *O. nivara* y el cultígeno (*O. sativa*) pueden encontrarse en India, Tailandia y Taiwan. Estas poblaciones mantienen un alto nivel de variación genética, que puede cubrir todo el ámbito de variación desde la especie silvestre hasta la cultivada (Oka y Chang, 1961). Estos enjambres pueden proveer nuevas variantes al arroz cultivado, o pueden producir formas que pueden coexistir con las plantas cultivadas como malezas. En los cultivares americanos, los híbridos naturales son plantas generalmente robustas, demostrando heterosis y expresando características morfológicas de ambos padres (Langevin *et al.*, 1990). La proporción de hibridización entre arroz cultivado y maleza en Estados Unidos se relaciona al tiempo de floración. Las variedades de ciclo largo tienen una coincidencia mayor con los arrozces maleza, lo que aumenta la incidencia de hibridización y retrocruces (Langevin *et al.*, 1990).

Por otro lado, una característica importante del germoplasma de *Oryza* es la esterilidad híbrida que se produce algunas veces incluso dentro de la misma especie como es el caso de la barrera genética entre las subespecies de *O. sativa*: *japonica* e *indica*. Esta esterilidad se da como resultado de un apareamiento cromosómico anormal o por una interacción desorganizada entre los genes de las líneas parentales (Chu *et al.*, 1969; Rieseberg, 2000).

La hibridización entre especies de *Oryza* de diferentes complejos de especies y tipos de genoma también es posible y se ha hecho en el laboratorio en varias ocasiones (Brar *et al.*, 1991). Es posible obtener una progenie en cruces entre *O. officinalis* (CC) y *O. sativa* (AA) usando a la última como madre, aunque el porcentaje de éxito es de 4% o menos (Jena and Khush, 1988). Las plantas F1 se obtienen en algunos casos sólo mediante rescate de embriones y muestran características intermedias entre las especies originales. Estas plantas son a menudo altamente estériles de polen y óvulos. Aun así,

mediante retrocruces con plantas de *O. sativa* se ha logrado introducir genes de *O. officinalis* de interés agronómico, como resistencia a insectos (Jena y Khush, 1990).

Posiblemente debido a que naturalmente se produce un alto porcentaje de aborto de embriones, no se ha reportado hasta ahora ningún caso de hibridación natural entre especies de *Oryza* de diferentes grupos cromosómicos. Aún más, Akimoto (1998) mencionó que no es posible que *O. glumaepatula* forme híbridos con *O. grandiglumis* debido a las diferentes ploidias, aún cuando son simpátricos en una gran área en el Amazonas.

En un inventario de especies del género *Oryza* realizado en ecosistemas naturales en Costa Rica (Capítulo 2) se encontraron tres especies nativas y endémicas de América, a saber la especie diploide de genoma tipo AA *O. glumaepatula* ($2n=24$) y las especies alotetraploides de genoma CCDD, *O. grandiglumis* ($2n=48$) y *O. latifolia* ($2n=48$). Además, se detectaron dos poblaciones de plantas altamente estériles y con características diferentes, pero también intermedias entre las especies reconocidas por la literatura y descritas anteriormente.

El estudio de la hibridación se ha llevado a cabo principalmente mediante el Este artículo describe morfológica y genéticamente estos dos tipos de plantas y da evidencia de su origen híbrido, el cual en uno de los casos parece haber ocurrido entre especies de diferente ploidia y tipo de genoma. Se discute también la implicación de estos eventos en la evolución del género *Oryza* y las posibilidades que estas plantas brindan para estudiar la interacción de dos genomas diferentes y su utilidad como recursos genéticos para el arroz.

Material y Métodos

Morfología

Durante el inventario de especies silvestres de arroz, se identificaron dos tipos de plantas híbridas que diferían de las especies reconocidas en varias características morfológicas como el tamaño de la lígula, de las lemas estériles y ancho de las hojas, además de que mostraban una clara esterilidad.

El primero que se encontró se denominó *O. sp 1* y se colectó en el Río Medio Queso únicamente. Este correspondió a una planta estéril con morfología intermedia entre *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis*. El segundo híbrido se denominó *O. sp 2* y se encontró en las mismas localidades en donde se encuentra *O. grandiglumis*, Caño Negro, Lagartera y Río Medio Queso.

Las plantas identificadas como supuestos híbridos se colectaron enteras y se secaron para las mediciones morfológicas y para guardarlas como especímenes de herbario. Otras plantas se trajeron vivas para sembrarlas en el invernadero para tomar material fresco para la extracción de enzimas y de ADN. Cada planta fue evaluada para 33 características morfológicas como se describió en el capítulo 2.

Para probar el carácter morfológicamente intermedio de las supuestas plantas híbridas, se utilizaron dos metodologías de análisis estadístico multivariado. Se realizó un análisis de Componentes Principales para conocer si las plantas supuestamente híbridas se diferenciaban significativamente de las especies reconocidas. Además, utilizando las dos mejores funciones discriminantes obtenidas para la separación de las especies (capítulo 2), se calcularon los valores de las respectivas funciones en las muestra híbridas. Bajo la hipótesis de hibridización y herencia aditiva de los caracteres, se espera que los híbridos se posicionen en nivel intermedio entre las especies parentales. Además, este procedimiento se realizó así para no alterar las funciones con la variancia de los híbridos y así tener una estimación más conservadora y objetiva de la diferenciación de éstos dos grupos con respecto a las especies verdaderas.

Estudio de isoenzimas

Se colectó hojas maduras frescas de las plantas sembradas en el invernadero. Estas fueron usadas para evaluar los patrones con los sistemas de isoenzimas GPI, ICD, MNR, MDH, EST y AKP. Se tomó una porción de tejido de 0.3g y se cortó en pequeños fragmentos, los cuales se pulverizaron en morteros de porcelana usando nitrógeno líquido. El buffer de extracción (Buffer Tris HCl 50mM, pH 7,5; sacarosa 5%, mercaptoetanol 14mM) se añadió y se mezcló bien con el pistilo. Dos pedazos de papel absorbente se usaron para separar las moléculas solubles de los detritos y varios pedacitos de 3x7mm de papel filtro (Whatman No. 2) se usaron para colectar y guardar el sobrenadante. Los pedacitos de papel filtro se congelaron inmediatamente y se guardaron a -40°C.

Microsatélites

Con el fin de tener mayor evidencia acerca del origen híbrido de éstas plantas, también se realizó un estudio con microsatélites. Un total de 15 plantas de *O. sp1* y 3 de *O. sp2* se utilizaron en este estudio. Se extrajo ADN mediante el protocolo de Lohdi *et al.* (1994), sin PVP. Se utilizaron los microsatélites RM14, RM21, RM31, RM48, RM208, RM215, RM224, RM229, RM234, RM235, RM237, RM240, RM256, AG 275, AG206, WX, GA309, y GA550. La reacción de PCR se realizó con un volumen total de 12 µL en termocicladores DNA Engine Tetrad de MJResearch. Este estudio de microsatélites se llevó a cabo en una pasantía en el laboratorio de Susan McCouch, en la Universidad de Cornell (Ithaca, Nueva York).

Resultados

Carácter intermedio de la morfología de los híbridos

El grupo de plantas proveniente de la margen del Río Medio Queso (Fig. 1a.), denominado *O. sp1*, mostraron valores intermedios entre *O. glumaepatula* y las especies del tipo de genoma CCDD para las características de longitud de la lígula (Fig. 1b), ancho de hoja bandera, ancho de la segunda hoja, tamaño de la panícula, tamaño de la arista y

tamaño de la semilla. El carácter intermedio en la mayor parte de los caracteres también se observó en la *O. sp 2*, donde algunas de las características mostraron ser intermedias entre *O. latifolia* y *O. grandiglumis* (Fig. 2).

Análisis discriminante multivariado de las especies de *Oryza* de Costa Rica incluyendo las poblaciones de híbridos.

Los dos análisis multivariados, tanto el de Componentes Principales (Fig. 3), como el Análisis Discriminante Multivariado (Fig. 4) indican que las plantas consideradas híbridos se separan de las especies reconocidas y forman dos grupos discretos. Uno de estos grupos, está formado exclusivamente por plantas que provienen del Río Medio Queso, denominadas *O. sp1*, mientras que el otro grupo está conformado por plantas que vienen de tres sitios, el Río Medio Queso, Lagartera, y Caño Negro, denominadas *O. sp2*. El sitio llamado Lagartera está en medio de los otros dos, a 10 Km de éstos (Ver Mapa de la zona de Río Frío, Fig. 5).

La longitud de la lígula, el tamaño de la semilla, el ancho de la hoja bandera, la longitud de la lema, la altura total y la distancia del 2do al 3er nudo, fueron las variables de mayor poder discriminante entre la especie, como se deduce del valor de los coeficientes de esas variables en las funciones discriminantes 1 y 2. Un análisis de variancia multivariado de estas variables resultó en un valor de Wilks Lambda de 0.1447 ($F(28,344) = 89.841, p < 0.000$)).

El análisis discriminante multivariado muestra los grupos discretos de individuos híbridos en una posición intermedia entre sus propuestos padres (Fig. 4). En éste análisis, el *O. sp2* aparece también en una posición intermedia pero más cercana a los individuos de *O. latifolia*, con los que tiene un ligero traslape.

El análisis de componentes principales muestra también a los híbridos como grupos discretos, pero no muestra una localización claramente intermedia entre las supuestas líneas parentales, especialmente en lo que se refiere a la *O. sp. 1* (Fig. 3).

En el análisis discriminante, la longitud de la lígula es la característica más importante que separa a las especies con distintos tipos de genoma, i.e. *O. glumaepatula* vs. *O. grandiglumis* y *O. latifolia*. Por otro lado, el tamaño de la semilla es uno de los factores más importantes en separar a las especies con genoma CCDD. Además la longitud de la lígula, el número de ramificaciones en la panícula, alto de la planta y la longitud de la lema esteril, son en ese orden los rasgos que más influenciaron la separación.

O. sp2 se propone como un híbrido entre *O. latifolia* y *O. grandiglumis*, debido a su tamaño total, número de ramificaciones en la panícula, longitud de la lema estéril, ancho de las hojas y longitud de las espiguillas. Todas estas características lo posicionan como intermedio entre los propuestos padres.

Algunos individuos de *O. latifolia* tienen rasgos similares a los de *O. sp2*. Esto puede deberse a que en *O. latifolia* hay correlaciones entre la altura total y el número de ramificaciones ($r = 0,68$), altura total y longitud de la lígula ($0,41$), ancho de la hoja bandera y número de ramificaciones en la panícula ($0,55$) y altura total y tamaño de la semilla ($0,27$) (todas $p < 0,05$, $N:146$). Esto indica que en condiciones apropiadas las plantas de *O. latifolia* pueden desarrollarse tanto que llegan a parecerse al híbrido, que es más grande que el promedio de *O. latifolia*, pero más pequeño que *O. grandiglumis* debido a la aditividad de la herencia de estas características.

Sin embargo, la diferencia definitiva entre *O. sp2* y *O. latifolia* es la alta esterilidad de la primera y su reproducción por fisión y dispersión hídrica de los culmos.

Estudio isoenzimático del origen de los híbridos

Se analizaron diez loci, de seis enzimas (GPI, AKP, EST, MDH, ICD, MNR). En todos estos casos los híbridos *O. sp1* tuvieron diferentes patrones de los de las especies válidas y las bandas en el zimograma de los híbridos se encontraban siempre en alguno de las especies parentales (Fig. 6).

Aún más, los individuos de *O. sp1* mostraron un patrón típico de un individuo heterocigoto para una enzima monomérica en tres loci, EST, MDA y AKP, teniendo un alelo de cada uno de los propuestos padres *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis*. Los individuos de *O. glumaepatula* mostraron variación para los loci EST y MNR, pero se encontró que los híbridos *O. sp1* (n=15) tienen en estos loci, el alelo típico de la *O. glumaepatula* de Medio Queso.

Evidencia de hibridación según el experimento con microsatélites

Los microsatélites también brindaron información importante. En primer lugar todos los individuos híbridos *O. sp1* colectados a lo largo del Río Medio Queso son idénticos para todos los loci estudiados, lo que indica una posible propagación vegetativa clonal a partir de un sólo evento de hibridación, dado que estos marcadores son variables dentro de las poblaciones de las especies parentales *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis*.

Los marcadores RM 208, RM 224, RM 234, indicaron que las líneas parentales de *O. sp1* son *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis* debido a que los híbridos tienen un patrón aditivo de los alelos de las líneas parentales (Fig 7). Especialmente importantes son los marcadores RM208, RM224 (Fig. 7) y RM234 debido a que en éste el peso molecular de los alelos de *O. grandiglumis* es muy diferente a los de *O. latifolia* e indica que *O. sp1* es descendiente de *O. grandiglumis*.

Por otro lado el marcador RM 234 indica que *O. sp2* se originó de un cruce entre *O. grandiglumis* y *O. latifolia* debido a que muestra los alelos típicos de cada especie en forma heterocigota. Notablemente, a diferencia de *O. sp1*, *O. sp2* muestra diferentes patrones en varios marcadores lo que sugiere mayor variabilidad genética dentro de este híbrido, posiblemente debido a recombinación del híbrido o retrocruces con líneas parentales.

Además, algunas de las plantas de Lagartera que estaban identificadas como *O. grandiglumis* fueron reidentificadas como *O. sp2* debido a su patrón de microsatélites para los loci. Estas plantas no habían florecido por lo que su identidad estaba basada en la morfología de las partes vegetativas.

En algunos casos sin embargo, los patrones de bandas de los híbridos no fueron informativos con respecto a su origen. Los marcadores RM48 y 235 indicaron que tenían relación con uno de los padres y no con respecto al otro. En *O. sp 1*, varios microsatélites amplificaron el locus correspondiente al genoma A del híbrido pero no amplificaron el complemento CD, lo que se dedujo del hecho de que amplificaban bien todas las plantas AA y no así las CCDD (RM 235, RM 237, RM 229, RM 256, GA 206).

Descripción de los híbridos

O.grandiglumis x O. glumaepatula (O. sp1)

Este es un híbrido natural, confinado al margen del Río Medio Queso, Los Chiles, Alajuela. Es muy abundante, particularmente en la margen oeste del río. Es una planta estéril, que produce una inflorescencia de apariencia normal, con una fenología normal, pero sus anteras están a menudo reducidas y malformadas. Además, tienen poco polen que se ve blanco transparente.

No se ha podido encontrar semillas llenas y maduras de estas plantas aún cuando se dedicó un esfuerzo importante en este sentido. A veces se ven semillas negras que parecen maduras pero están vacías (abortos?). La reproducción de ésta planta es asexual, produciendo numerosos tallos que pueden fragmentarse y ser llevados por la corriente a otras partes del río para empezar una nueva colonia.

Las características diagnósticas de éstas plantas son el tamaño de la lígula ($\bar{x}=10.7\pm 7.2\text{mm}$), el tamaño de la semilla ($\bar{x}=8.1\pm 0.4\text{mm}$), el tamaño de la lema estéril ($\bar{x}=2.8\pm 0.4\text{mm}$) y el ancho de la hoja bandera ($\bar{x}=12.6\pm 4.2\text{mm}$). Estos rasgos de éstas plantas son intermedios entre los de las líneas parentales propuestas, *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis*, pero algunas características son menores en el híbrido que en los padres como la distancia de la hoja bandera a la base de la panícula (DBB), la longitud de la semilla (LSEM) y la longitud de la hoja bandera y segunda (LBAN y L2A).

El hábito de *O. sp1* es similar al de *O. grandiglumis* especialmente con respecto a los rasgos vegetativos, al microhabitat que utilizan y a la capacidad de dispersión hídrica de sus tallos, pero se parece más a *O. glumaepatula* en la inflorescencia y las características florales. (Fig 2).

Ambas especies parentales de este híbrido se encuentran actualmente en el Río Medio Queso, en la zona de el Muro y su floración ocurre en la misma época, entre setiembre y noviembre. De hecho se puede ver a *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis* y *O. sp1* en flor al mismo tiempo y lugar en El Muro (orilla del río entrando por Finca Las Cubas).

Las dos especies parentales tienen una gran capacidad de reproducción vegetativa mediante la producción de brotes en sus nudos, sin embargo se encuentran en diferentes microhábitats. *O. grandiglumis* se encuentra en la orilla del río, mientras que *O. glumaepatula* crece en el llano. Ambos sitios tienen una gran fluctuación en el nivel del agua, pero las plantas a la orilla del río tienen una disponibilidad de agua mucho mayor a

través del año. La capacidad de dispersión de los culmos también es mayor en las plantas de la orilla del río.

O. latifolia x *O. grandiglumis* (*O. sp2*)

Este híbrido es muy similar a *O. latifolia*, con la que comparte varios rasgos morfológicos, diferenciándose únicamente en el ancho de la hoja bandera ($x: 29.4 \pm 9.8 \text{ mm}$), el tamaño de la semilla ($x: 6.9 \pm 0.4 \text{ mm}$) y la altura total ($x: 237 \pm 89 \text{ cm}$). Además, éste híbrido tiene las ramificaciones de la panícula más grandes de todas las especies de *Oryza* de Costa Rica ($x: 32 \pm 5.1 \text{ cm}$), lo que se debe a un posible efecto de heterosis, donde la planta híbrida tiene características superiores a las de ambos padres (Fig. 2). Su población principal se encuentra en el Refugio de Vida Silvestre Caño Negro, donde es simpátrico con *O. grandiglumis*, de la que se diferencia rápidamente por el tamaño de la semilla y por tener estigmas morados. *O. grandiglumis* tiene estigmas blancos.

Estas plantas (*O. sp2*) además producen normalmente ramificaciones intravaginales y se encuentran exclusivamente a la orilla del río. Todas las poblaciones de éste tipo de híbrido son estériles, pero una vez se encontró una semilla en proceso de maduración normal. Se espera que este tipo de híbrido tenga un nivel mayor de fertilidad debido a que proviene de un cruce natural entre dos especies un poco más relacionadas y con un mismo nivel de ploidía. De la misma manera, retrocruces podrían ocurrir también con las especies padres, aunque *O. latifolia* no se ha encontrado en ninguno de los sitios en que éstos híbridos se encuentran. Este híbrido se encuentra en tres sitios, lo que sugiere que ha tenido oportunidad de migrar más, posiblemente mediante grandes inundaciones. Otra explicación es que el mismo tipo de hibridación ha ocurrido repetidamente en ésta región. *O. sp2* también florece al final del año.

Discussion

Hibridización en el género Oryza

Ge *et al.* (1999) obtuvieron evidencia del origen híbrido de varias especies del género *Oryza* mediante la secuenciación de los genes ADH1 y ADH2, revelando que 6 de las 23 especies del género son muy posiblemente el producto de eventos de hibridación.

Sin embargo, hasta ahora se han descrito detalladamente pocos casos de híbridos entre dos especies silvestres y menos aún cuando se trata de híbridos naturales entre especies con genomas diferentes.

Vaughan (1994) se refiere a un híbrido estéril triploide relacionado a la especie diploide AA *O. rufipogon* de Tailandia (Morishima *et al.*, 1987 citado por Vaughan, 1994) pero no sugiere cual podría ser la otra línea parental.

En Bangkok, Tailandia, Akimoto *et al.*, (1996) encontraron una población de plantas estériles triploides ($2n = 36$) creciendo en simpatría con *O. rufipogon* y *O. officinalis*. Dicha población crece a la orilla de un canal del río Chao Phraya y las plantas eran más abundantes que las especies fértiles reconocidas. La morfología de las plantas y la semejanza de su ADN de cloroplasto sugieren, según Akimoto *et al.* (1996), que éstas plantas podrían haber tenido un padre de otro tipo de genoma, aunque no indica cual.

El descubrimiento de éstos híbridos nativos de Costa Rica, particularmente el de *O. glumaepatula* x *O. grandiglumis*, revela que éstas dos especies pueden hibridizar naturalmente. Esto indica también, que podría haber ocurrido lo mismo en otras regiones, como el Amazonas, donde éstas especies son simpátricas en una gran área (Akimoto,

1998) y sin embargo no se han podido detectar. Sin embargo, es posible también que esto no haya ocurrido nunca o que haya ocurrido pero las plantas se extinguieron en un período de sequía, en el cual solamente las especies fértiles con semilla son capaces de dejar progenie para la próxima generación.

Wang, (1992) y Provan et al. (1997), propusieron la poliploidización como el origen de las especies CCDD americanas. Sin embargo, no especificaron si esta poliploidización es el producto de hibridación, aunque si indicaron que a diferencia del genoma BBCC, el CCDD se habría originado en un sólo evento de poliploidización.

Ge *et al.* (1999) mostró como el genoma DD está más relacionado al actual genoma EE de *O. australiensis*. De manera que la hibridación que produjo al ancestro de las especies americanas CCDD, ocurrió cuando el ancestro de *O. australiensis* se encontró en simpatria con el ancestro de las actuales especies de genoma CC, talvez en lo que hoy día es América del Sur

Del estudio de Ge *et al* (1999) se puede inferir que las especies que más claramente se han producido por hibridación son alotetraploides, ya que 6 de las 23 especies presentan esa característica. No se conocen especies hexaploides (triploides duplicadas) como el trigo que resultó del cruce de una especie tetraploide y una diploide (Doebley, 1989).

La producción de planta híbridas es muchas veces frenada por el aborto de embriones, del que hay gran evidencia en la experimentación en cruces artificiales (Brar *et al.*, 1991), y por la esterilidad de los híbridos F1 (Naredo *et al.*, 1998). Por ejemplo, en cruces entre *O. sativa* y *O. latifolia* el porcentaje de embriones que se producen es bajo (10%) y éstos deben ser cultivados *in vitro* para producir plantas híbridas (Brar *et al.*, 1991). Por otro lado, en cruces de *O. rufipogon* x *O. glumaepatula* se obtienen híbridos fácilmente pero éstos son altamente estériles (Naredo *et al*, 1998).

Historia natural y hibridación entre especies silvestre de *Oryza*

Los dos híbridos naturales entre especies nativas del género *Oryza* en Costa Rica, revelan la importancia que tiene el sistema de apareamiento y la historia de vida de dichas especies de plantas en la probabilidad de hibridación y en la evolución en el género. La polinización por viento, sincronía en floración, carencia de barreras pre-cigóticas, facilitan la formación de plantas híbridas. Estas características, comunes a las especies del género *Oryza*, pueden haber jugado un papel fundamental en su diversificación (Ge *et al.*, 1999).

El establecimiento de la planta híbrida depende de que tenga las características apropiadas y de que germine en la orilla del río, de manera que pueda reproducirse asexualmente. Es posible que se hayan producido plantas híbridas que germinan en zonas que no se inunda o en las que los híbridos están aislados y no se pueden propagar vegetativamente, como por ejemplo en sitios del humedal que no están a la orilla del río. En estos sitios sólo pueden sobrevivir a largo plazo las especies que se reproducen por semilla, ya que cualquier sequía acaba con las plantas estériles y su potencial evolutivo.

Estas poblaciones híbridas pueden ser el resultado de miles de generaciones de flujo de polen entre las especies simpátricas de estos humedales, que pareciera ocurrir con relativa facilidad entre estas especies. Es posible suponer que entre multitud de intentos fallidos, en algunos casos ocurrieron los arreglos genéticos o cromosómicos necesarios para impedir el aborto embrionario, permitiendo el desarrollo de plantas estériles. La existencia de un ambiente favorable a la reproducción clonal, favoreció su multiplicación y sobrevivencia. Es importante señalar que en los dos casos, una de las especies parentales (*O. grandiglumis*) ocupa este hábitat y practica este modo de reproducción.

De manera que, como lo indica Rieseberg (1997) aún los eventos más raros de hibridación son evolutivamente importantes ya que un sólo individuo híbrido tiene el potencial para dar origen a una nueva línea evolutiva. Ambos híbridos naturales costarricenses de arroz podrían eventualmente llegar a convertirse en una nueva especie

fértil. Además, uno podría considerar que el híbrido *O. sp1*, dada su homogeneidad genética, es ya una línea evolutiva independiente, aislada de las especies que le dieron origen y que tiene la capacidad de perpetuarse mediante la reproducción asexual. Por lo tanto éste linaje debería tener el estatus de especie.

Por el otro lado, el híbrido *O. sp2*, presenta una distribución geográfica mayor, es común en tres localidades y presenta algo de variación genética, lo que podría indicar que es un híbrido recurrente, o que ha tenido retrocruces o que se han dado mutaciones en él. Si ocurren cualquiera de los dos primeros casos, ésta planta no está reproductivamente aislada de sus progenitores y no se puede argumentar un estado de especie en su favor.

La existencia de ambos híbridos en Costa Rica y los reportes de hibridación en la literatura sugieren que éste fenómeno es común en *Oryza*, lo que aparentemente tiene relación con algunas características ecológicas y reproductivas de éste género.

La historia de vida de *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis*, en especial su sistema de apareamiento, se ajustan a lo que Rieseberg (1999) describe como características que promueven la hibridación interespecífica. Las poblaciones de estas especies parecen ser al menos facultativas con respecto al apareamiento, debido a que se encuentran heterocigotos en la población de *O. glumaepatula* (Zamora *et al*, Capítulo 6) y al gran tamaño relativo de las anteras de ambas especies con respecto a la espiguilla, lo que indica un esfuerzo mayor en exocruzamiento. También tienen poblaciones perennes en el Río Medio Queso, con una gran capacidad de reproducción vegetativa en ambas especies. Además, como se describió antes, éstas especies coinciden en la floración al final de la época lluviosa y se encuentran muy juntas en la población del Muro. Debido a que el híbrido *O. sp1* crece solamente a la orilla del río, se esperaría que hubiera germinado ahí también. Si esto es así, la especie madre podría ser *O. grandiglumis*, lo que se comprobaría fácilmente utilizando marcadores de cloroplasto.

Hibridación interespecífica y fertilidad en especies de arroz silvestre.

La alopatria de la especie de arroz silvestre de C.R., en especial de *O. latifolia* en relación a las otras dos especies, puede ser producto de la relativa facilidad de flujo de polen entre especies y el consecuente aborto embrionario. Podría suponerse que este fenómeno produciría una considerable pérdida de fertilidad en las plantas, especialmente en aquellas especies menos frecuentes. La comprobación requeriría un estudio de la germinación de polen entre especies silvestres de *Oryza* de Costa Rica, así como el efecto de este fenómeno sobre su fertilidad en condiciones naturales.

Debido a la existencia de estos híbridos, y a evidencia obtenida de otras especies de arroz, es de esperar que las poblaciones *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis* y *O. latifolia* de las localidades estudiadas practiquen el exocruzamiento como sistema de apareamiento al menos de forma alternativa. Análisis de variación genética en progenies permitiría definir claramente esta posibilidad. En el género *Oryza*, la autofecundación se presenta fundamentalmente a especies anuales y asociada a procesos de domesticación (Morishima *et al.*, 1992). Dada la posibilidad de que el cruzamiento libre pueda dar como resultado pérdida de fertilidad por cruzamientos interespecíficos, como discutido anteriormente, es posible que la aparición de autofecundación en *Oryza* haya aparecido también como barrera a flujo de polen interespecífico.

En los pares de especies *O. longistaminata* -*O. barthii* y *O. rufipogon*-*O. nivara*, la primera especie es una perenne altamente alógama, incluso autoincompatible en el caso de *O. longistaminata*, y la segunda es una especie anual autofecundada. La autofecundación se ha considerado como una característica derivada, y su fijación se ha explicado como un sistema alternativo que se da cuando sus ventajas reproductivas superan los costos producidos por la carga genética asociada a este sistema de cruzamiento (Lande y Schemske, 1985). Hay que suponer entonces que la disminución en el valor adaptativo de las plantas debido a los abortos producto de los apareamientos interespecíficos, es tan grande que supera los costos genéticos y reproductivos de la autofecundación.

Hibridización y mejoramiento con especies silvestres de arroz

El estudio más detallado de estos híbridos puede ser interesante además para obtener información acerca de los posibles resultados de cruces interespecíficos artificiales. La fertilidad de los híbridos, la expresión de los genes en un genoma mixto, su regulación, silenciamiento, sinergismo, epistasia, así como también el efecto de un genoma heterocigoto en la tolerancia y plasticidad respecto a presiones selectivas como por ejemplo el reconocimiento por patógenos.

El carácter intermedio, tanto a nivel univariado como multivariado, de la mayor parte de los caracteres estudiados en los híbridos, permite suponer efectos aditivos promedios en los genes responsables de estos caracteres en las especies parentales. Sin embargo, algunos caracteres no se ajustan a este patrón de herencia aditiva, como el hábito robusto del híbrido *O. sp2* *O. sp2* y la adaptación a reproducción asexual en condiciones riparias de ambos híbridos, que se parecen más a *O. grandiglumis*.

Algunos rasgos pueden no presentar una herencia aditiva, sino más bien pueden ser afectados por la epistasia. Rieseberg (2000) describe como en la interacción entre dos genomas se puede presentar silenciamiento de algunos genes y solamente los de un complemento se expresan. Por otro lado, la interacción entre los genomas también puede provocar la variación introgresiva en la que alguna característica muestra valores no encontrados en ninguno de los padres, como se observa en la longitud de las ramificaciones (BRA) del híbrido *O. sp2*, que son las más grandes de todas. Es este tipo de variación la que los mejoradores de plantas cultivadas esperan obtener en sus cruces interespecíficos, con el fin de aumentar la producción más allá de los valores de las líneas parentales (Tanksley y McCouch, 1997).

Estas interacciones genéticas en el nuevo genoma son la clave para el desarrollo de una planta de características ideales (Tanksley y McCouch, 1997). Mediante los cruces

interespecíficos, éstas nuevas combinaciones genéticas pueden lograrse, para ser seleccionadas y purificadas, eliminando otras características no deseadas por retrocruces y selección asistida mediante marcadores.



Fig. 1. (A) Plantas del híbrido *O. spl* en la margen del Río Medio Queso. (B) Lígulas de *O. glumaepatula*, *O. spl* y *O. grandiglumis* que muestran el tamaño intermedio de la lígula de *O. spl* con respecto a las supuestas líneas parentales.

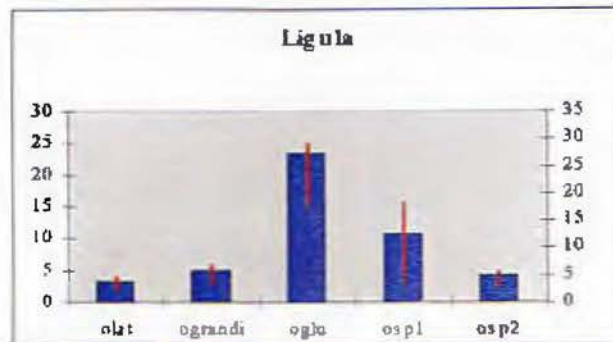
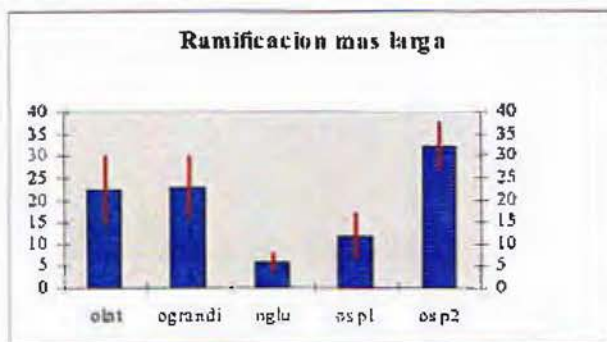
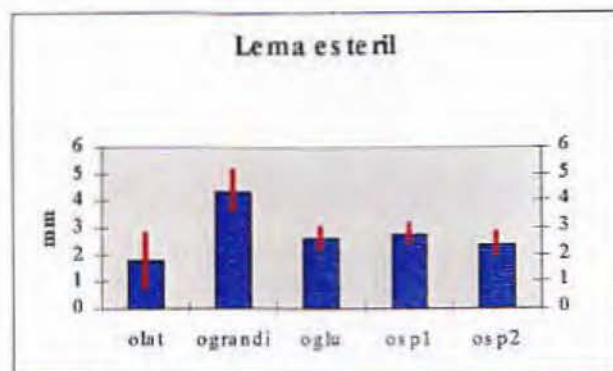
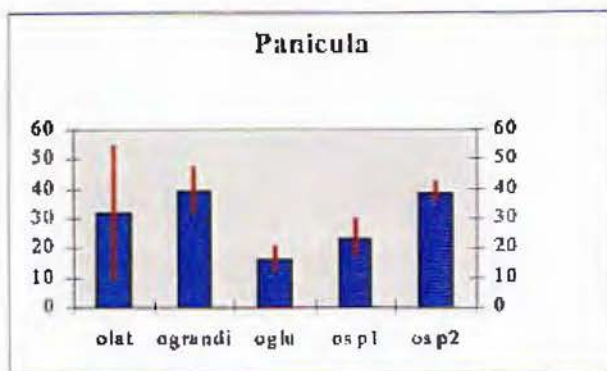
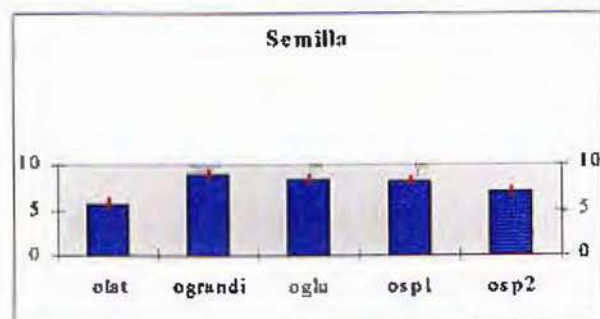
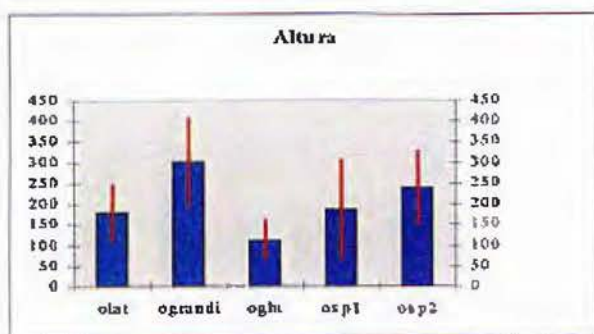


Fig. 2. Promedio y desviación estandar de algunas características diagnosticas que muestran el carácter intermedio entre los valores de las líneas parentales de los híbridos *O. sp 1* (*O. glumaepatula* x *O. grandiglumis*) y *O. sp 2* (*O. grandiglumis* x *O. latifolia*).

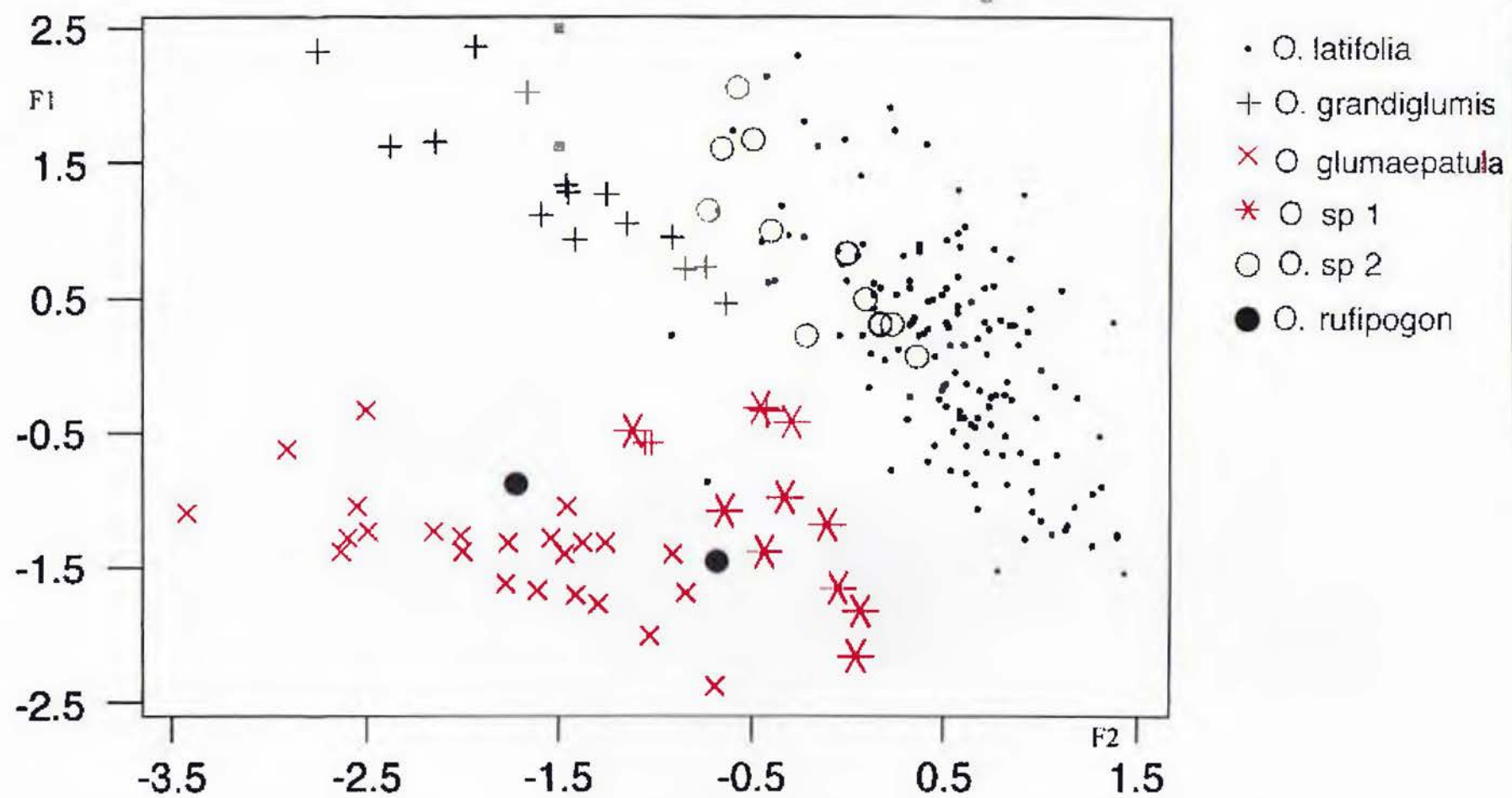


Fig. 3. Análisis de factores mediante componentes principales de las plantas de *Oryza* de Costa Rica incluyendo las plantas híbridas.

Analisis discriminante de plantas del género *Oryza*
de Costa Rica

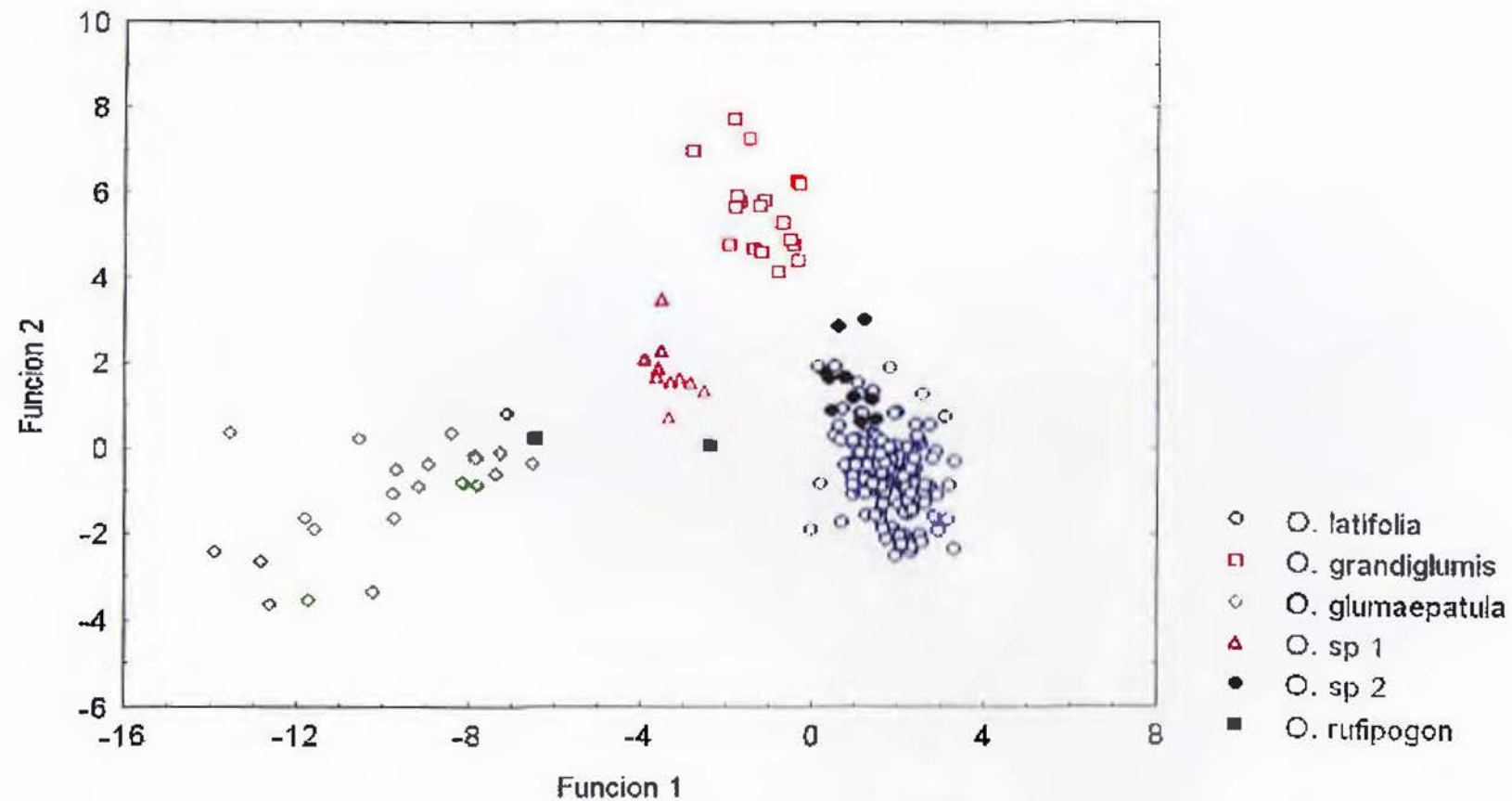


Fig. 4. Distribución de los individuos de las dos formas híbridas encontradas (*O. sp 1* y *O. sp 2*) con respecto a las especies reconocidas, según las funciones calculadas únicamente con los datos de las especies reconocidas.

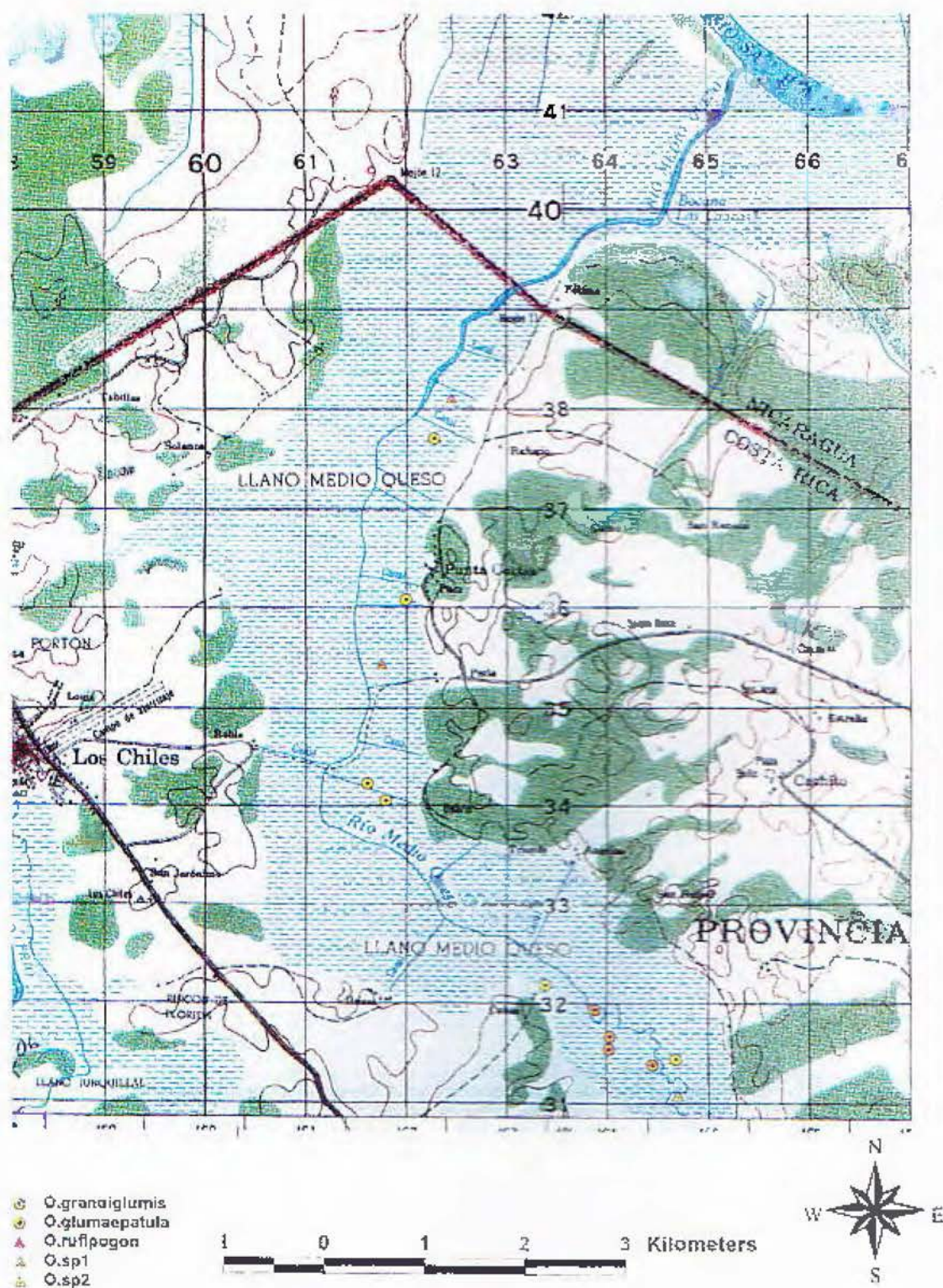
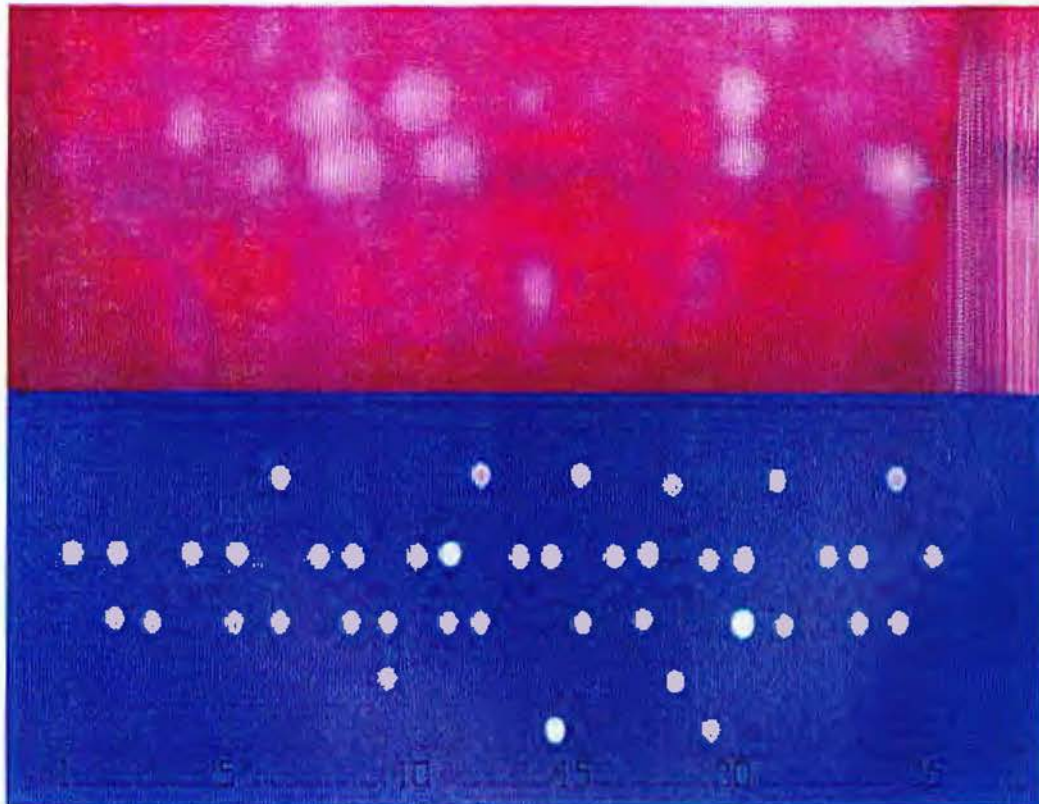


Fig. 5. Llanos del Río Medio Queso, Los Chiles, Alajuela, Costa Rica. Nótese que el Río Medio Queso desemboca en el Río San Juan y que una gran parte del humedal se encuentra en Nicaragua.

Esterasa fluorogénica



1. 297 *O. grandiglumis*
2. Osp1H Híbrido 1
3. cf10 *O. glumae patula*
4. 299 *O. grandiglumis*
5. 306 Híbrido 1
6. 300.4 *O. glumae patula*
7. 295 *O. grandiglumis*
8. 307 Híbrido 1
9. 189.2.4 *O. glumae patula*
10. 193 *O. grandiglumis*
11. 304 Híbrido 1
12. 260 *O. glumae patula*
13. 169c *O. grandiglumis*
14. 280 Híbrido 2
15. 300.6 *O. glumae patula*
16. 266.1 *O. grandiglumis*
17. Osp1A Híbrido 1
18. 188.3.16 *O. glumae patula*
19. 169g Híbrido 2
20. Osp1F Híbrido 1
21. 256.2.17 *O. glumae patula*
22. 294 *O. grandiglumis*
23. 311 Híbrido 1
24. 189.1.6 *O. glumae patula*
25. 169h *O. grandiglumis*

Fig. 6. Gel de almidón y tinción de esterasa fluorogénica y su correspondiente zimograma donde se muestra como los híbridos presentan un patrón heterocigoto formado con los alelos de las supuestas líneas parentales.

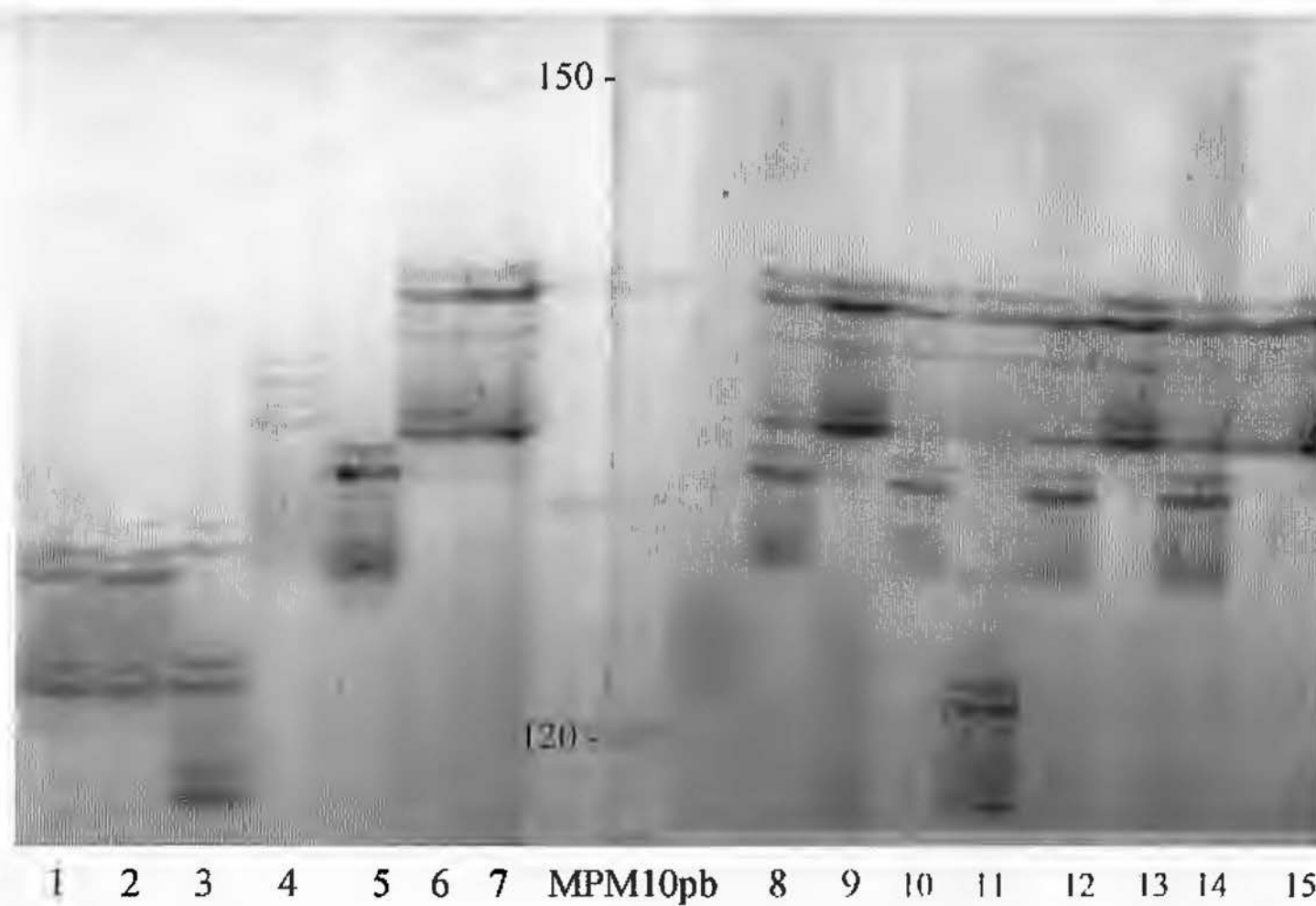


Fig. 7. Gel de poliacrilamida y tinción con plata de los productos de amplificación del microsatélite RM224. El peso molecular de los alelos de *O. grandiglumis* (6,7,9,13,15) es diferente a los de *O. latifolia* (1,2,3) e indica que *O. sp1* (8,10,12,14) es descendiente de *O. grandiglumis* y *O. glumaepatula* (carril 5). *O. sp2* (11) tiene un alelo de *O. latifolia* (3) y los de *O. grandiglumis*.

Capítulo 4

Biogeografía y ecología de las especies silvestres de arroz (Poaceae: *Oryza*) de Costa Rica

Alejandro Zamora¹, Carlos Quesada, Ana M. Espinoza^{1,3}.

1. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
2. Centro de Investigación en Desarrollo Sostenible (CIEDES), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
3. Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Abstract

Populations of the three Costa Rican species of *Oryza* are found in wetlands throughout the lowlands of the country. *O. glumaepatula* was found in two localities: a perennial population of hundreds of thousands of plants in the Medio Queso River marshes and a population of a few, apparently annual, individuals in a seasonal pond in the Santa Elena Península, Guanacaste. *O. grandiglumis* occurs only in the wetlands of the Río Frío region, to the north of Costa Rica. It is found in three localities: Medio Queso River, Lagartera, and its main population located in Caño Negro Wildlife Refuge. *O. latifolia* is a common species in lowlands below 700m in several life zones and climatic regions. It is also the only species found in places that do not flood, even in slopes. The ample variability of *O. latifolia* in Costa Rica may be correlated to its distribution in different climatic regions. Two natural hybrids between native species (*O. sp1* and *O. sp2*) are found in the same localities where their hypothetical parental species occur. The hybrid *O. sp1* is found only in the banks of the Medio Queso River, while *O. sp2* is found in the same localities as *O. grandiglumis*. Both hybrids are sterile and propagate asexually by fision of the culms and hydric dispersion. The species *O.*

glumaepatula and *O. grandiglumis* occur in restricted geographical areas where there is a marked seasonality in the freatic level. This suggests that these species may have particular habitat requirements, perhaps related to germination and it also makes them vulnerable to extinction due to the fragility of these ecosystems. It seems that the diversity of life zones and microhabitats available in Costa Rica allows for the development of viable populations of species with particular habitat requirements.

KEYWORDS: rice, wild rice, *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis*, *O. latifolia*, phylogenetic resources, biodiversity, biogeography, conservation, Costa Rica, biotechnology.

La distribución geográfica de las plantas está a menudo determinada de una manera muy marcada por factores ambientales como la temperatura, la precipitación y las condiciones del suelo concentración de metales pesados en el suelo. De la misma manera, al ser las plantas la base de la mayoría de las cadenas alimenticias su distribución y abundancia puede estar determinada por los organismos que la depredan o parasitan, así como también los que la polinizan o dispersan sus semillas (Krebs, 1985; Linhart y Grant, 1996).

La inmovilidad de las plantas, una vez germinada la semilla, hace que ésta tenga obligatoriamente que vivir en las condiciones ambientales en donde germinó, por lo que generalmente se presenta una gran mortalidad de plantas recién germinadas. Por esta razón, algunas plantas desarrollan mecanismos, tales como la dormancia, para germinar en el momento y en el sitio adecuados, como claros en el bosque, o después de un incendio o cuando las condiciones climáticas son favorables, i.e. después del frío del invierno en las zonas templadas, o del calor del verano en las zonas tropicales más secas o desérticas.

En *Oryza* se ha descubierto que existe una relación entre el genotipo de las plantas de una población y el microhábitat en que se encuentran. Así, un individuo tiene la

opción de tener descendencia con diferentes características genéticas que puedan germinar y desarrollarse en microhábitats diversos (Morishima *et al.*, 1992).

De la misma manera, es posible que diferentes condiciones ambientales a una mayor escala geográfica afecten la morfología y la composición genética de una especie, provocando la diferenciación de sus poblaciones y aumentando así la diversidad genética de la misma (Linhart y Grant, 1996).

El género *Oryza* está distribuido pantropicalmente y en América sus cuatro especies tienen ámbitos de distribución amplios, abarcando toda la América tropical en *O. glumaepatula* y *O. latifolia*, y una gran parte de América del Sur en *O. grandiglumis* y *O. alta* (Vaughan, 1994).

Estas especies son en general plantas palustres y se encuentran generalmente asociadas a humedales (Vaughan, 1994), siendo abundantes las poblaciones *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis* en el Río Amazonas (Vaughan, 1994; Akimoto, 1998) y en el Orinoco (Vaughan *et al.*, 2000), así como en otros ríos grandes de América (Vaughan, 1994). Sin embargo, *O. latifolia* es reconocida por su presencia en hábitats muy diversos (Vaughan, 1994).

En Costa Rica se encuentran tres especies silvestres del género *Oryza* (Zamora *et al.*, capítulo 2), así como también dos híbridos naturales interespecíficos (Zamora *et al.*, capítulo 3). Además se ha observado que *O. latifolia* se encuentra ampliamente distribuida en el país y que presenta una amplia variación en su morfología (Capítulo 5).

La exhuberante diversidad biológica de Costa Rica es el resultado de la conjunción de biotas de origen norte y sur americano que se diferenciaron en alopatria y se congregaron nuevamente en esta región geográfica, siendo Costa Rica el límite norte o sur de la distribución de muchas especies (Hartshorn, 1983).

Esta diversidad se debe en parte también a procesos endógenos de especiación, en los que la variada geomorfología, la zona de convergencia intertropical y las 22 glaciaciones que han ocurrido en los últimos 2 millones de años, han jugado un papel fundamental en la separación y diferenciación de las poblaciones dentro de Costa Rica.

La interacción de estas variables geológicas y climáticas permite la existencia de 12 zonas de vida (Holdridge, 1972), las cuales albergan a los millones de especies que conforman la biodiversidad de Costa Rica. Estas zonas de vida no son fijas en el tiempo, y varían en área y posición de acuerdo a los cambios climáticos globales. Así, especies propias de Norte o Suramérica han tenido la posibilidad de dispersarse hasta lo que hoy es Costa Rica cuando las condiciones climáticas permitieron que su hábitat se ampliara. De manera que el clima y la historia geológica han dado las condiciones para que un gran número de formas de vida puedan coexistir y aumentar en diversidad en un área relativamente pequeña.

Este trabajo describe las características de los sitios donde se encuentran las especies silvestres del género *Oryza* dentro del territorio de Costa Rica. Además se presentan algunas observaciones sobre la distribución geográfica, fenología y ecología de las especies silvestre de *Oryza* de Costa Rica.

Material y Métodos

Colecta de las muestras. La colecta de muestras se describe en el capítulo 2 de esta tesis. Cada población encontrada, con una separación al menos de 1 km de la más cercana, recibió un número de herbario y sus coordenadas geográficas fueron registradas con un sistema de posicionamiento global. Estos datos se utilizaron posteriormente en el sistema de información geográfico (GIS), donde la posición de cada población se asoció a diferentes categorías biogeográficas.

El tamaño de las poblaciones se estimó como múltiplos de diez. En cada

población se estimó el porcentaje de individuos en cada categoría fenológica. Estas categorías fueron: germinación, crecimiento, floración, fructificación, propagación vegetativa. Se anotó la vegetación asociada. Además, se anotaron las variables más importantes que determinan los niveles de agua en el suelo (grado de fluidez del agua, profundidad) y la fluctuación del mismo a lo largo del año.

Los especímenes de herbario fueron depositados en los herbarios de la Universidad de Costa Rica (USJ), Museo Nacional de Costa Rica (MNCR) e Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).

Para determinar si la distribución espacial de *O. glumaepanula* en es aleatoria dentro de una población específica en los llanos del Río Medio Queso en Los Chiles, se contó las plantas dentro de 40 cuadrículas de 10m², y se calculó el índice de dispersión (Gutiérrez-Espelcta, 1995), que se basa en la igualdad del promedio y la variancia de una serie de Poisson, es decir, cuando los individuos están distribuidos al azar en el tiempo o el espacio. La fórmula usada es $I: s^2/\bar{x}$ (donde s^2 es la variancia y $\bar{x}$ es el promedio aritmético). Se determinó si el alejamiento de este índice calculado es estadísticamente significativo de la unidad, usando valores críticos de Chi-cuadrado, usando la fórmula $X^2: I(n-1)$, que se ajusta a una distribución de Chi-cuadrado con $n-1$ grados de libertad, donde n es el número de unidades de muestreo.

Para determinar el microhábitat en que *O. latifolia* es más abundante se anotó el tamaño de la población en múltiplos de diez y el microhábitat se describió en detalle. Estos microambientes fueron posteriormente agrupados en categorías que tienen relación principalmente con la disponibilidad de luz y de agua, a saber: 1. área abierta a orilla de río, 2. claro a orilla de río, 3. área abierta inundada, 4. área abierta no inundada, 5. pendiente, 6. sotobosque. La densidad de plantas fue calculada como la suma de las categorías de magnitud de orden de todas las poblaciones en un microhábitat particular y luego dividido entre 100 para ajustar a la misma escala del número de poblaciones.

Análisis Biogeográfico. Las poblaciones de especies silvestres fueron georeferenciadas usando un sistema de posicionamiento global (GPS). Utilizando el sistema de información geográfico Arc View version 3.1, estas localidades se correlacionaron con mapas temáticos (1:200.000) de clima (Herrera, 1995), zona de vida (Bolaños and Watson, 1993), tipo de suelo (Consultora Acon y Asociados S.A. 1991). Además para determinar la elevación a la que se encontraron las muestras se creó un Modelo de Elevación Digital (González, unpub. data) a partir de mapas topográficos 1:200.000 (IGN).

RESULTADOS

Tres de las cuatro especies de *Oryza* registradas para América se encuentran en Costa Rica, a saber: *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis* y *O. latifolia*, como se describe en el capítulo 2. También se encontraron dos híbridos naturales estériles con poblaciones extensas y perennes (Capítulo 3).

De todas las poblaciones (312), un 75% corresponden a *O. latifolia*. Las restantes corresponden a *O. grandiglumis* (10.6%), *O. glumaepatula* (3.1%) y dos tipos de híbridos estériles (4.9%). Otras poblaciones (6.4%), corresponden a muestras de arroz rojo colectadas en arrozales. Algunas de las plantas de arroz rojo o maleza fueron identificadas como *O. rufipogon* por Akimoto (com. pers.) mediante la comparación de su patrón enzimático con especies de referencia sus isoenzimas (Cuadro 1).

Distribución geográfica de las poblaciones

Todas las poblaciones de plantas de *Oryza* fueron localizadas en las tierras bajas del país, bajo los 700 m.s.n.m. y un 90% de estas se encontraron bajo los 100 m de elevación. *O. latifolia* fue la única especie que se encontró en elevaciones superiores a los 350 m. La población de *O. glumaepatula* de Murciélagos, Península de Santa Elena, Guanacaste se encuentra a 300 m.s.n.m., mientras que la población más grande de esta

especie se encuentra en los llanos de inundación estacional del Río Medio Queso a 30 m.s.n.m. *O. grandiglumis* se encuentra a ca. 50 m de elevación en el Refugio de Vida Silvestre Caño Negro, siendo esta su principal población y la que se encuentra a una mayor elevación. *O. grandiglumis* se encuentra también en el Río Medio Queso a 30 m.s.n.m. (Mapa de Modelo de Elevación Digital, Figura 1 Capítulo 2)

La mayoría de las poblaciones de *Oryza* se encontraron en humedales registrados en el Mapa de Humedales de UICN, siendo el humedal herbáceo abierto el principal tipo de humedal en el que las poblaciones de arroz silvestre en general se localizan (Figura 2)

La abundancia de estas especies varía localmente de poblaciones de pocos individuos, como se puede observar a veces para *O. latifolia*, hasta poblaciones de cientos de miles, como en las poblaciones de *O. glumaepatula* del Río Medio Queso (Los Chiles, Alajuela) u *O. latifolia* en las lagunas del Parque Nacional Palo Verde (Cuadro 1).

La distribución de las especies de *Oryza* en Costa Rica es alopátrica. En la mayoría de los sitios en que se localizaron poblaciones de *Oryza* sólo una especie estaba presente. Únicamente en el humedal del Río Medio Queso se encontraron dos especies juntas *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis*. Aún así, las poblaciones de cada especie se encuentran en microhábitats distintos y con una proporción de al menos 10⁵ a 1 favorable a *O. glumaepatula*. Ahí, *O. glumaepatula* se encuentra en el llano de inundación estacional, mientras que *O. grandiglumis* se encuentra en la orilla lodosa del río. *O. latifolia* se encontró siempre sola en todos los sitios estudiados y *O. glumaepatula* se encontró sola en la población de Murciélagos, Guanacaste. *O. grandiglumis* es la única especie fértil en Caño Negro y Lagartera.

Es importante notar que lo anterior es válido para las especies fértiles y reconocidas, ya que los híbridos si se encuentran en simpatria con las especies

progenitoras. En Medio Queso, *O. glumacepatula* y *O. grandiglumis* se encuentran además con los dos híbridos estériles (descritos en el capítulo 3), así como también en Lagartera y Caño Negro *O. grandiglumis* se encuentra en simpatria con el híbrido *O.sp 2*.

De esta manera, el humedal del Río Medio Queso es la localidad más diversa en lo que se refiere a el género *Oryza* en Costa Rica, con cuatro diferentes líneas evolutivas. *O. glumacepatula*, es dominante en el llano de inundación cubriendo bloques de varias hectáreas y con una población estimada en varios cientos de miles de plantas, mientras que *O. grandiglumis*, tiene tres pequeños focos de población en el extremo sur del área abierta del llano en el margen del río. Además, uno de los híbridos (*O. sp1*), es dominante en la margen del Río Medio Queso, con una población estimada en miles de plantas. Finalmente está el segundo híbrido (*O. sp2*), con algunas plantas distribuidas principalmente en la zona con mayor cobertura boscosa en las margenes en el extremo sur del Río Medio Queso (Fig. 1). El tamaño real de dichas poblaciones se puede ver claramente sólo durante el período de floración, entre el final de Setiembre a Noviembre, debido a que en otros momentos las poblaciones se confunden con la vegetación herbácea asociada.

Biogeografía de las especies

Oryza latifolia Desv.

Esta es la especie más ampliamente distribuida y morfológicamente variable de Costa Rica. Las plantas de esta especie tienen 178 cm de altura en promedio pero varían entre 50 cm y 400 cm, incluyendo la panícula, dependiendo de la zona de vida y el clima. El tamaño de varias de sus estructuras vegetativas y reproductivas varía notablemente en diferentes zonas geográficas y climáticas (ver capítulo 5)

O. latifolia se encuentra en las tierras bajas de Costa Rica, muy asociada a humedales, sin embargo, no se le encontró en los humedales de Caño Negro o el Río

Medio Queso. Esta especie se encuentra en una serie de zonas de vida desde el bosque seco (1200 mm de lluvia anual) hasta el bosque tropical lluvioso (4000 mm de lluvia anual) (Fig. 3) y en elevaciones de 0 a 650 m.

Los humedales son los principales sitios en que *O. latifolia* se encuentra, aunque en ocasiones se localiza en sitios con diferente disponibilidad de agua, incluso con pendiente pronunciada (1.7% de las poblaciones), tal como una población en Picagres de Mora, San José (CIBCM 167). Se encuentra en claros en bosques riparios (10.1%), en bancos lodosos de ríos deforestados o canales (49.15%), en llanos herbáceos de inundación estacional (35.6%) o cualquier depresión con tendencia a inundarse incluyendo orillas de caminos (3.45%). El tamaño de las poblaciones varía ampliamente, de una planta a cientos de miles de ellas, lo cual está relacionado al tipo y tamaño del hábitat en que se encuentran. Las poblaciones más grandes se hallan en áreas abiertas de inundación estacional, siendo ejemplos importantes las lagunas del Parque Nacional Palo Verde. Posteriormente, márgenes abiertas de ríos, riachuelos y canales artificiales. (Fig. 4).

Algunas poblaciones de *O. latifolia* se encontraron a 50 m del océano a la orilla de un pequeño riachuelo con gran influencia de las mareas, en el Refugio de Vida Silvestre Gandoca Manzanillo (CIBCM 230). Esta especie también se ha registrado anteriormente para manglares y estuarios (Museo Nacional No. 93344 en Isla de Pájaros y 061485 en Playa Conchal). Además, el Estero Chamorro, en el Parque Nacional Palo Verde, donde se encuentra una de las poblaciones más grandes de *O. latifolia* es inundado por el Río Tempisque, durante la marea más alta de Marzo, por lo que podría tener un alto grado de salinidad. Esta inundación ocurre en medio del verano, cuando resta al menos un mes para que comience a llover. En ese momento ocurre una germinación masiva y las plantas que no se habían secado producen nuevos brotes.

La habilidad de estas plantas de crecer y florecer, parece depender exclusivamente de la disponibilidad de agua, debido a que las plantas de sitios cercanos a P. N. Palo

Verde, que crecen cerca de sitios irrigados florecen incluso en el verano. Se observó que algunas plantas de ésta zona parecen ser capaces de sobrevivir a ciertos periodos de sequia formando un brote muy compacto y protegido por muchas capas de hojas, anclado al suelo por raíces secas.

En ecosistemas lluviosos, como el bosque tropical muy húmedo en el Parque Nacional de Tortuguero, se encuentran numerosas poblaciones de *O. latifolia*. Estas se dan en sitios abiertos en los bancos lodosos de los canales angostos, aunque también se encuentran en los canales principales, cerca de la desembocadura de los rios donde el agua trae materia orgánica y sedimentos en suspensión y se ve gris o rojiza. En los sitios donde el agua se ve negra debido a la falta de nutrientes y el alto nivel de ácidos húmicos no se observaron poblaciones de *O. latifolia*. Esta especie tampoco se observó en lagunas ni en otros tipos de cuerpos de agua estancada en ningún lugar del país. Algunas lagunas que se visitaron incluyen la laguna Chocuaco en la Península de Osa y Laguna Escondida en la Reserva Absoluta de Cabo Blanco. *O. latifolia* se encontró en los alrededores de la Laguna de las Camelias en Upala, pero lejos del espejo de agua, en el sotobosque.

La deforestación en la vertiente Atlántica podría estar favoreciendo a esta especie, debido a que las plantas crecen muy bien en áreas abiertas donde la lluvia es abundante. Ahí, las plantas alcanzan 4 m de alto en terrenos no inundados, como se puede ver en Guácimo, Tortuguero y el camino hacia el Valle de la Estrella. Esto es contrario a lo que ocurre en el bosque seco, donde *O. latifolia* es mas abundante en el sotobosque de especies como *Crescentia alata*, *Bactris major* y *Metanodendron* sp. (Polygonaceae), donde las plantas podrían sobrellevar mejor la época seca o donde son mejores competidores en condiciones limitadas de luz durante el invierno. La asociación de *O. latifolia* con *Crescentia alata*, en el bosque seco habia sido reportada por Vaughan (1994) para Honduras y Nicaragua, y es muy clara en el Parque Nacional de Palo Verde.

En Palo Verde, las plantas de *O. latifolia* se encuentran también asociadas a *Mimosa pigra* (Fabaceae, Mimosoideae), que debido a su hábito arbustivo y sus espinas

protege a las plantas de *O. latifolia* del ganado. Aún cuando el ganado es un factor selectivo introducido artificialmente en éste ecosistema, es posible que la relación sea provechosa para *O. latifolia* dada la presencia de otros artiodáctilos como el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en este ambiente.

O. latifolia no está amenazada por la acción humana en este momento. Muchas de las poblaciones se encuentran en Parques Nacionales (34.5%) y muchas otras se localizan en áreas ya perturbadas como orillas de camino y áreas dedicadas a la agricultura (Fig. 5). De hecho, los agricultores consideran a esta especie como una maleza difícil de eliminar, debido a que es resistente a la corta y quema, y de acuerdo con algunos agricultores incluso a herbicidas (CIBCM 91). Esta especie se encuentra comúnmente en arrozales donde se conoce como arroz pato y forma parte de lo que se conoce como "arroz rojo", un problema serio para la producción debido a que se penaliza el valor de la producción según el porcentaje de arroz rojo.

La fenología de *O. latifolia* varía un poco dependiendo de la región geográfica y es mucho más sincronizada en las regiones más secas. En Palo Verde, se da un pico de floración muy marcado en setiembre-noviembre, al final del invierno cuando se dan las condiciones más apropiadas para la dispersión eólica del polen sin que este se deshidrate demasiado rápido. La fenología depende de cuando se inundan las lagunas ya que de esto depende la germinación. En experimentos en invernadero las plantas de *O. latifolia* de todo el país, incluyendo muestras de Palo Verde, empezaron a florear a los tres meses de plantadas, sin embargo el pico de floración se produce en Palo Verde alrededor de 7 meses después de la germinación. Las plantas de *O. latifolia* producen tallos fértiles cada vez más grandes a partir de su germinación, hasta llegar a un máximo relacionado a la zona geográfica en que se encuentran. En las zonas menos estacionales de Costa Rica, como en la zona Atlántica la floración ocurre durante un periodo de tiempo mucho más extenso debido a que las poblaciones son perennes.

Oryza grandiglumis (Doell) Prod.

O. grandiglumis se encuentra principalmente en bancos lodosos a la orilla de los ríos Frío y Medio Queso. Esta es una planta robusta, con culmos de hasta 7.60 m de largo, parte del cual está anclado al suelo y sumergido durante la estación lluviosa, con unos dos metros sobre el agua. Algunas veces el tallo crece entre la vegetación circundante como una liana, apoyándose en los arbustos y árboles. Las plantas están frecuentemente ancladas en bancos de lodo en las orillas o en la parte superior de las paredes a la orilla del río. Todos los grupos de plantas vistos se localizan en sitios donde el agua fluye constantemente, y pareciera ser lo mismo para todas las especies de *Oryza* de Costa Rica, ya que no se observó ninguna población en sitios con agua estancada.

El culmo de *O. grandiglumis* tiene un aerénquima conspicuo que probablemente le permite a la planta flotar y mantenerse erguida durante la subida gradual del nivel del agua, así como también acomodarse al nivel cambiante. Cuando el nivel del agua decrece, los tallos flotan en el agua con la parte distal erecta aún en floración o fructificación.

Distribución geográfica

O. grandiglumis está restringida a la región de Río Frío, San Carlos, provincia de Alajuela, en el Área de Conservación Huétar Norte. Las tres poblaciones encontradas están separadas 10 km. Todas las poblaciones se encuentran en histosoles, bosque húmedo tropical y a una elevación entre 30 y 50 m.

La población más grande se encuentra en el Refugio de Vida Silvestre Caño Negro, donde muchos demes o grupos de plantas aislados se localizan en bancos lodosos en las orillas o al centro del Río Frío. Un 75% de las muestras fueron tomadas de Caño Negro, que tiene un tipo de clima D3, definido como húmedo, muy caliente y con un pequeño déficit de agua. Tiene una precipitación media anual de 2400-2740 mm y

temperatura media anual de 25-27 °C.

Las otras dos poblaciones, Lagartera (una llanura en la margen este del Río Frío) y la margen del Río Medio Queso (cerca de Los Chiles), tienen un clima húmedo subhúmedo (tipo B3). Este tipo de clima se caracteriza por ser muy caliente, con un déficit de agua pequeño, una precipitación media anual de 1710-2052 mm. La temperatura y evapotranspiración potencial son la misma en estos dos tipos de climas.

Ecología de *O. grandiglumis*

Esta especie se encuentra en áreas abiertas en los bancos lodosos del río, a menudo asociada a el saragundi (Fabaceae: *Cassia reticulata*) en sitios poco perturbados como claros naturales en regeneración. En sitios altamente perturbados se le encuentra mezclada con otras gramíneas. Esta especie tiene la habilidad de elongar sus entrenudos, alcanzando varios metros de altura y por lo tanto puede crecer en sitios donde otras plantas no pueden debido a la magnitud del cambio en el nivel del agua. De esta manera se observa en grupos grandes dominantes en ciertos sitios muy cercanos al cauce del río, que pueden ser bancos lodosos y también en el borde superior de paredes verticales producto de la erosión del río.

Cuando el nivel del agua disminuye en la época seca, alrededor de enero o febrero, y los bancos lodosos quedan expuestos, los largos culmos de las plantas quedan postrados en el suelo húmedo, e inmediatamente empiezan a producir raíces y muchos nuevos brotes extravaginales en los nudos. Estas son las primeras plantas que empiezan a crecer en los bancos lodosos, y ocurre tanto por culmos de plantas enraizadas allí mismo, como por culmos separados de la planta madre y dispersados por el río. El reclutamiento de plantas provenientes de semilla podría ser hasta de un 25%, ya que en un banco lodoso con una población grande se contaron 57 plántulas y 160 brotes de los nudos de estolones.

Poco después de la producción de nuevos brotes, se da la germinación de las semillas en los bancos lodosos. El intenso calor que puede llegar a calentar el suelo hasta ca. 40°C, con 160.000 lux a mediodía, hace que el agua se evapore del suelo el cual se quiebra en la superficie produciendo grietas. Es en estas grietas en las que se observan muchas plántulas de *O. grandiglumis* desarrollándose. Por otro lado el suelo tiene una acidez elevada (pH 3,8-4,8), posiblemente por la fermentación de desechos orgánicos.

Oryza glumaepatula Steud.

Las plantas de *O. glumaepatula* se identifican por la larga y apergaminada lígula (20-40mm) y por las delgadas e hirsutas aurículas. Tienen aristas largas (60-90 mm) de color rojizo. Sus hojas son delgadas y erectas y sus tallos pueden llegar hasta 2m de alto durante la primera floración. Otras plantas de la subfamilia Oryzoidea, que se encuentran en el mismo hábitat, como *Luziola subintegra* y *Leersia hexandra*, tienen lígula pero no tienen aurículas. Esto es importante porque las plantas sin flor de *Luziola subintegra* son muy similares a las plantas jóvenes de *O. glumaepatula*. Cuando tienen flor es fácil distinguirlas porque *L. subintegra* tiene flores unisexuales en panículas separadas.

O. glumaepatula tiene una gran población hasta ahora no registrada, en los llanos del Río Medio Queso, en Los Chiles, provincia de Alajuela. Esta población se extiende hasta Nicaragua junto con los llanos de dicho río, según los pobladores locales (Fig. 3). Estas planicies de inundación estacional, a 30 m de elevación, se extienden por varios kilómetros, hasta unirse al Río San Juan en Nicaragua. Esta población está situada en la zona de vida de bosque tropical húmedo y un clima muy caliente con un déficit pequeño de agua. Los suelos de la zona son, en general, de tipo histosol, aunque en el humedal el suelo tiene una capa superior de materia orgánica en descomposición, y una gruesa capa de más de 1.5m, de un color negro oscuro, formado por partículas muy finas de sedimento, con un alto porcentaje de materia orgánica (19.41%). El análisis de la textura

del suelo indica que es un suelo de tipo franco-arenoso, formado por arena, limo y arcilla (61%, 28% y 11% respectivamente). Es un suelo rico en hierro con 1361 miligramos por litro. El Río Medio Queso, en Los Chiles, que inunda los llanos donde crece *O. glumaepatula*, acarrea sedimento en suspensión, lo que le da un tono amarillento turbio y su pH es neutro.

Una población más pequeña se encuentra en el camino a Murciélagos, en la Península de Santa Elena, Guanacaste, (N10°57'06.8'' W85°36'57.9''), a 200 m del cruce con la carretera Panamericana, a una elevación de 300 m. Esta población había sido encontrada con anterioridad por Davidse (Herbario de la Universidad de Costa Rica, colecta de 1970) quien la identificó como *O. latifolia*. Otras plantas de esta población se encuentran en el Museo Británico (BM 23283) clasificadas como *O. rufipogon* por Davidse (Vaughan, 1994). Esta es una población muy pequeña, de ca. 50 plantas, con un ciclo de vida anual, debido a la estacionalidad del hábitat en esa zona de Guanacaste. Otras poblaciones como esta posiblemente existen en esta zona, según las etiquetas de las muestras que se encuentran en el herbario de la Universidad de Costa Rica, pero son difíciles de encontrar debido a su tamaño y a que se encuentran mezcladas con otras gramíneas, por lo que sólo son evidentes durante la floración.

Ecología

La población de *O. glumaepatula* del Río Medio Queso es perenne y consiste en cientos de miles de plantas (lo cual es evidente sólo durante el primer pico de floración entre setiembre y noviembre, ver Fig. 6). Estas plantas tienen un patrón agregado, de acuerdo al índice de dispersión (X^2 : 2402.4, $p < 0.005$, g.l.:39), con grupos muy grandes hasta de varias hectáreas, como en Puerto Domingo, El Muro o Puerto Cortez, en los que la densidad de plantas puede llegar a 25 plantas por metro cuadrado. En otros sitios se observan grupos de diversos tamaños. Durante la estación seca se puede ver que las plantas producen tallos largos decumbentes con muchos brotes en los nudos, por lo que forman grupos densos de plantas de forma alargada en donde todas las plantas son producto de la reproducción asexual.

La floración ocurre de forma altamente sincronizada, con una distribución en el tiempo asimétrica y leptocúrtica, con un pico de floración muy marcado en el que todas las plantas realizan un gran esfuerzo reproductivo que se concentra en quince días, alrededor de la última semana de setiembre y la primera de noviembre. En este momento los llanos parecen una plantación de arroz rosada, debido al color de la arista, que es único entre las especies de *Oryza* de Costa Rica. Posteriormente, hacia el final de Noviembre, se produce un pico menor de floración debido a que algunas plantas producen tallos intravaginales, que son de menor altura y tamaño de panícula que en la primera. También se pudo observar cualitativamente que hay un mayor grado de infertilidad en la segunda floración que en la primera. Algunas plantas continúan floreciendo en diciembre, enero y febrero de acuerdo a la disponibilidad de agua.

La producción de tallos vegetativos es una forma de reproducción y dispersión asexual que estas plantas utilizan cuando apenas queda una película de agua en los llanos sobre el nivel del suelo, durante los meses de marzo, abril y mayo. En esta época las plantas producen largos culmos decumbentes, con numerosos brotes en los nudos. Estos brotes tienen raíces y dan origen a gran cantidad de plantas individuales que son genéticamente idénticas, i.e. reproducción clonal.

En años en que el llano se seca completamente, como en 1998, debido al efecto de El Niño, la germinación de las semillas es numerosa, y las plantas que sobreviven son principalmente las que se encuentran en la orilla de los canales o en las zonas más bajas. Sin embargo, la tierra conserva hasta un 100% de humedad en algunos sitios no inundados, por lo que las plantas pueden sobrevivir, aunque casi sin crecer, en lo que se denominó nivel basal (Fig. 6). En estas condiciones las plantas se ven atacadas por ácaros y son también comidas por el ganado. En otros años, como en 1999 y 2000, los llanos no se secan completamente permitiendo que las plantas crezcan perennemente y produzcan brotes extravaginales (en los nudos) y estolones decumbentes que se pueden elongar por varios metros.

O. glumaepatula crece asociada con *Cyperus articulatus* y *Eleocharis elegans* (Juncaceae), pero hay algunas otras especies importantes en la flórmula del humedal del Río Medio Queso, tales como *Leersia hexandra* y *Luziola subintegra*, miembros de la subfamilia Oryzoidea que son communes ahí. *Thalia geniculata* (Maranthaceae), *Nymphaea ampla*, *Eichornia crassipes*, varias especies de *Ludwigia* spp. (Onagraceae), y varias *Rhynchospora* spp. (Cyperaceae), son abundantes.

Todas estas son especies herbáceas y su distribución espacial en el humedal parece estar determinado por los extremos mínimo y máximo del nivel del agua a través de los años. Más aún, se observó una secuencia de crecimiento y floración en las especies dominantes del llano durante la estación lluviosa, donde las especies de *Oryza*, especialmente *O. glumaepatula*, florecen al final de la estación lluviosa cuando el nivel de agua es el máximo.

En abril la mayoría de las raíces de las plantas de *O. glumaepatula* están secas y funcionan principalmente para anclaje al suelo, y las plantas apenas se mantienen vivas y no crecen mucho. En mayo o junio, con las primeras lluvias las plantas empiezan a crecer de nuevo activamente. La estación seca de 1998 fue especialmente seca y larga debido al efecto de El Niño, y la superficie del suelo se secó completamente en el humedal del Río Medio Queso, lo que facilitó los incendios que ocurrieron ese año.

Parece que la distribución de las plantas en el humedal esta determinada a largo plazo por los valores extremos de humedad. En mayo de 1998, el nivel del agua en el humedal estaba a 30 cm bajo el nivel del suelo, y casi no llovió. Sin embargo, el suelo retiene agua y la medición de la humedad relativa en el suelo varió entre 70 y 100% en ese período. Esta humedad del suelo permite a las plantas desarrollar pequeñas raíces y sobrevivir. La mayoría de las plantas en éste momento tenían 10 cm de altura o menos, y no fue sino hasta junio en que se observaron plantas de 20 cm. El nivel del agua en junio era aún de 30 cm bajo el suelo, pero la lluvia era más abundante. Normalmente, durante

los siguientes meses los llanos se inundan y el nivel del agua alcanza más de un metro sobre el suelo antes de noviembre. En 1998, debido al Huracán Mitch, en octubre, el nivel del agua subió hasta 2 metros y se mantuvo así hasta Diciembre. Luego, el nivel del agua empezó a descender continuamente hasta marzo de 1999, en que estaba a nivel del suelo. En febrero, cuando todavía hay agua sobre el suelo, las plantas de *O. glumaepatula* producen estolones largos decumbentes con muchos brotes en los nudos. Los estolones de una sola planta pueden extenderse hasta 5 m en el suelo produciendo gran cantidad de tallos que sobresalen entre la vegetación herbácea, simulando ser plantas independientes (Fig. 7).

En la estación lluviosa, las plantas desarrollan raíces largas (22cm) y gruesas (1.6mm) que probablemente le permiten a la planta absorber más nutrientes del rico suelo tipo vertisol en que estas plantas se encuentran. Sin embargo, este suelo es muy rico en hierro, y éste se deposita en las raíces como una película de herrumbre dentro del suelo. Las plantas también producen raíces delgadas en los nudos que se encuentran bajo el agua, las que le podrían permitir a las plantas absorber nutrientes disueltos en el agua.

Las plantas de *O. glumaepatula* muestran muy pocos daños debido a enfermedad durante la estación lluviosa. No se ha detectado virus de hoja blanca en las plantas en el campo. La piricularia (*Magnaporthe grisea*) si se ha encontrado en *O. glumaepatula* de Medio Queso, donde las lesiones eran muy pequeñas y sugerían tolerancia (R. Ziegler, com. pers).

Varias especies de aves granívoras pueden observarse en el llano del Río Medio Queso, donde forman el tercer gremio de aves en términos de número de especies. El “sargento” (***Agelaius phoenicius***) es el más abundante de los depredadores de semillas de éste ecosistema y es reconocido por los vecinos del llano como comedor de las semillas de *O. glumaepatula*. Esta ave se congrega en grandes números en los parches de *O. glumaepatula* en fructificación, especialmente en sitios donde hay *Thalia geniculata* (Maranthaceae) cuyos robustos tallos usa como perchas para tomar con facilidad los

granos maduros de las panículas de *O. glumaepatula*.

Discusión

La riqueza biológica de Costa Rica es el resultado de varios procesos biológicos y ambientales. Estos incluyen la migración de organismos desde Norte y Sur América, así como también eventos de especiación in situ, debido al aislamiento de poblaciones en zonas de vida o hábitats particulares. Por otro lado, la quebrada topografía del país, debida al vulcanismo y la tectónica de placas, combinada con los diferentes patrones climáticos, producto de la zona de convergencia intertropical, han formado varias zonas de vida diferentes, en las que hay diferentes regímenes de precipitación, elevación y temperatura media anual y evapotranspiración. De esta manera, diferentes especies de plantas se encuentran distribuidas en distintas zonas de vida y tienen adaptaciones estructurales y fisiológicas que les permiten propagarse en un ambiente determinado.

Por lo tanto la presencia de tres de las cuatro especies de *Oryza* registradas para América en Costa Rica, se debe posiblemente a la migración de las especies de éste grupo taxonómico desde el sur y el norte hacia Costa Rica, debido a que es un grupo antiguo y distribuido pantropicalmente, y a que se encuentran en Cuba y otras islas del Caribe (*O. glumaepatula* y *O. latifolia*) por lo que la migración hacia el norte puede haber ocurrido durante la formación del primer puente entre Norte y Sur América. Por otro lado, la variabilidad morfológica de *O. latifolia*, puede explicarse por los procesos previamente mencionados de diversificación, recolonización y de adaptación a muy variados patrones ambientales en distintos ecosistemas (ver capítulo 5).

Por otro lado, es notoria la distribución discontinua que se conoce para especies como *O. grandiglumis*, con poblaciones en Ecuador, la parte sur de Colombia, Amazonas en Brazil y ahora en Costa Rica, o la de *O. alta* con una distribución principalmente suramericana con una población registrada en Belice (Vaughan, 1994). Este patrón fragmentario sugiere eventos de extinción de poblaciones en grandes regiones

geográficas, los cuales son probablemente el resultado de los grandes cambios climáticos en el tiempo geológico, y que son comunes en ecosistemas normalmente fragmentarios como humedales y páramos subalpinos. De la misma manera, la extinción de las poblaciones indica la existencia de estrictos requerimientos de hábitat por parte de algunas de las especies de *Oryza*, que se observan en su limitada distribución actual.

Otras posibles causas de este patrón de distribución geográfica incluyen errores en la identificación y el desconocimiento de la existencia de una especie para la flora del país, que se muestran como espacios de discontinuidad en la distribución macrogeográfica de las especies como lo era el caso de *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis* en Costa Rica.

Otro factor importante es la muy limitada capacidad de dispersión y recolonización de algunas de éstas especies. El gran tamaño de la semilla de las especies del complejo *O. sativa*, probablemente favorece la germinación y el rápido desarrollo de la plántula, lo que conduce a una dominación del hábitat en que se encuentran en forma de densos parches, pero a la vez actúa de forma antagónica en la capacidad de dispersión a larga distancia de la planta.

La morfología de la semilla de las especies de *Oryza* de Costa Rica no se ajusta a ningún síndrome de dispersión conocido, y más aún sus estructuras y fenología sugieren un diseño para dificultar su aprehensión por depredadores y para hundirse rápidamente en el agua.

Caso aparte es *O. grandiglumis* en Amazonas, ya que sus grandes lemmas estériles le permiten flotar y dispersarse. Las observaciones realizadas en este estudio sugieren que las lemas estériles grandes tienen un efecto positivo en la flotabilidad de las semillas ya que atrapan aire y aumentan el área de la semilla. Por el contrario, las semillas de *O. grandiglumis* a las que se les remueven las lemas grandes y las que tienen lemas pequeñas, así como las semillas de todas las otras especies costarricenses, caen

perpendicularmente al agua dirigidas por la arista y penetran la superficie hundiéndose también verticalmente hasta el fondo.

Es posible entonces que existan presiones selectivas que hacen que en algunas poblaciones de *O. grandiglumis* el rasgo de lema grande favorezca a los individuos de alguna manera, mientras que en otras no. La razón podría ser una mayor abundancia de sitios donde germinar en la región del Amazonas, por lo que una mayor capacidad de dispersión favorecería a los individuos. Aún en Caño Negro, donde se encuentra la población más importante de *O. grandiglumis*, las plantas se encuentran en un microhábitat muy definido en los bancos lodosos y muros en zonas abiertas (claros) en la margen del río y no en el resto de la laguna. Además, las semillas de *O. glumaepatula* en Amazonas tienen una parte que no se llena completamente y que les permite flotar. (Morishima, 1994) De manera que en un río como el Amazonas donde en el verano quedan expuestas grandes áreas de bancos lodosos, la dispersión de las semillas parece tener una ventaja (Morishima, 1994).

Sin embargo, las plantas de *O. grandiglumis*, tienen un sistema de dispersión alternativo, que consiste en la hidrocoria, al darse la ruptura de los culmos y su posterior acarreo por la corriente del río. Este sistema de dispersión podría ser especialmente útil para las plantas en épocas de grandes inundaciones, en las que los tallos podrían llegar a cauces de agua normalmente distantes y sin comunicación, como es el caso del Río Frío y el Río Medio Queso. La dispersión de los híbridos estériles costarricenses dentro de sus ríos de origen y a otros ríos comprueba este modo de dispersión asexual.

La variabilidad en cuanto a la longitud de las lemas estériles de *O. grandiglumis* que ocurre en Amazonas, podría deberse a un proceso de selección estabilizadora, producto de el nivel de ventaja que brinden las lemmas grandes en un sitio en particular para dispersarse flotando. Las semillas de *O. grandiglumis* desprovistas de lemas grandes se hunden rápidamente en el agua, al igual que las de las otras especies de *Oryza* americanas. Cuando la semilla cae de la planta al agua la arista funciona también como

un timón aerodinámico que dirige la semilla en una caída perfectamente perpendicular al agua, de acuerdo al eje longitudinal de la semilla de manera que cae y se hunde de una vez, lléndose de manera igualmente vertical hasta el fondo lodoso (Observaciones de campo y experimentos personales).

Diversidad de especies y ambientes en la región de Río Frío

La Región de Río Frío, incluyendo al humedal de Medio Queso (Los Chiles), el humedal de Caño Negro (Refugio Nacional de Vida Silvestre), es el sitio dentro de Costa Rica, de mayor diversidad en lo que respecta al género *Oryza*, ya que dentro de esa region se encuentran *O. glumaepatula*, *O. grandiglumis* y los dos híbridos naturales. Si además se incluyen otros humedales cercanos como la Laguna de las Camelias y el Río San Juan, donde se encuentra también *O. latifolia*, se tiene que la zona norte de Costa Rica es la zona de mayor diversidad de éste género en nuestro país.

Cada una de las especies se encuentra en un humedal distinto con una simpatría mínima, y ocupando microhábitats distintos. Cada especie parece tener características que le permiten desarrollarse mejor en un tipo de microhábitat particular, lo que podría explicar en parte por que no se encuentran las especies en las mismas localidades. También como se discutió en el capítulo 3, la esterilidad de los híbridos interespecíficos podría provocar una separación de las especies hasta llegar a tener una distribución parapátrica. En el humedal del Medio Queso lo que se observa es una distribución de tipo parapátrico en pequeña escala, donde las especies no están mezcladas, sino que se encuentran en microhábitats específicos: *O. glumaepatula* en el llano de inundación y *O. grandiglumis* en el borde del río.

Es posible que las especies *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis* no hubieran sido detectadas antes en Costa Rica, debido a que sus poblaciones están restringidas a zonas de difícil acceso y también a que la mayor parte del año, cuando es más fácil llegar a estos sitios, las plantas están mezcladas con otras hierbas y son indetectables.

Otros humedales en el norte de Costa Rica, al este y al oeste del Río Medio Queso, han sido explorados y hasta el momento no se ha encontrado ninguna otra población de *O. glumaepatula* u *O. grandiglumis*. La reducida capacidad de dispersión de estas plantas mediante sus semillas, la escasez de otros hábitats similares, o talvez incluso la exclusión competitiva de éstas especies por otras hierbas o por *O. latifolia*, podrían ser factores que limitan la distribución de éstas especies a los humedales de la región de Río Frío. Ciertas zonas del Río San Juan sufren cambios drásticos en el nivel del agua, y podrían ser apropiados para el desarrollo de las plantas de *O. glumaepatula* u *O. grandiglumis*, sin embargo solamente se encontraron grandes poblaciones de *O. latifolia*. Sería muy importante recorrerlo en su totalidad para determinar si además de *O. latifolia*, hay otras poblaciones de las especies de *Oryza*, en especial *O. alta*.

Adaptación a ambientes cambiantes

La capacidad de elongación de los tallos y la separación de los tallos de la planta principal son rasgos de la morfología de las plantas de *Oryza* estudiadas, que les permiten sobrevivir en ambientes donde la dinámica normal es el cambio estacional. En ese sentido tienen características propias de plantas pioneras. El gran tamaño de su semilla, en comparación con otras gramíneas, sugiere que estas plantas invierten mucho en cada embrión para que sea capaz de desarrollarse rápidamente tan pronto germine, quizás para aprovechar mejor nuevos espacios abiertos.

En *O. grandiglumis* se observó que todas las plántulas se encuentran en grietas en el barro y no germinando sobre el barro. Es posible que las grietas proporcionen a las plántulas un microambiente especial en el que la planta obtiene suficiente humedad en la raíz y suficiente luz en las hojas. No queda claro si algunas semillas germinan en la superficie y después mueren por desecación y tampoco es conocido si la formación de una grieta es necesaria para la germinación de la semilla. Si esto es así, podría ser que las semillas que germinen provengan de un banco de semillas de varios períodos de

fructificación. Tampoco se sabe cuanto tiempo permanece una semilla de estas en un banco de semillas, solo unos meses, de un año para otro, varios años?

Además las semillas germinan rápidamente en medios de cultivo después de la escarificación, pero no se conoce si las semillas de especies costarricenses tienen algún tipo de dormancia física o fisiológica. Quesada (com. pers.) indica que las semillas de *O. latifolia* de Palo Verde duran más en germinar que las de localidades en la zona Atlántica de Costa Rica. No es claro tampoco si la alta acidez del suelo tiene algún efecto en la germinación o establecimiento de las plántulas.

La reproducción vegetativa que presentan estas plantas parece darle una ventaja a estas plantas como un mecanismo de dispersión alternativo y de rápida colonización del nuevo hábitat disponible, que puede favorecer a estas especies en el microhábitat del borde de los bancos lodosos.

La relación filogeográfica entre las dos poblaciones de *O. glumaepatula*: vicariancia vs dispersión

La población de *O. glumaepatula* de Murciélagos, pareciera ser un reducto de una población original antigua de la que también se originó la de Medio Queso y no un producto de un evento de colonización a partir de la de Medio Queso, debido a que la distancia de 100 km que las separa sugiere que el evento de la dispersión de semillas es poco probable, principalmente por el tamaño de estas semillas. Otras semillas de plantas de humedales, como las de *Typha*, son muy pequeñas y pueden ser llevadas enredadas en las plumas de las aves cientos de kilómetros (Darwin, 1859, Pohl, 1980), pero éste no es el caso de las semillas de *O. glumaepatula*. Por otro lado, la población de Murciélagos está a 300 m.s.n.m. por lo que eventos de inundación llevando estolones a esa altura y distancia son muy improbables. Sin embargo, la adaptación aparente de la población de Murciélagos a un hábitat más estacional, así como cualquier diferenciación morfológica o

genética entre estas dos poblaciones, podría ser el resultado de cualquiera de los dos procesos.

Estrategia reproductiva de las especies de *Oryza* de Costa Rica

Las especies costarricenses de *Oryza* se reproducen sexual o asexualmente según les sea conveniente en relación a las condiciones ambientales. Es posible que la reproducción asexual de *O. glumaepatula* sea predominante en los años en el que el llano no se secó del todo, como en el 2000, ya que las semillas no germinan en condiciones de inundación continua. Por el contrario, cuando el llano se seca completamente como en 1998, la germinación es muy abundante y posiblemente la mayoría de las plantas de ese año provienen de semilla. De manera que estas plantas tienen una estrategia combinada de reproducción sexual y asexual que le permite propagarse tanto por semilla como por estolones.

Los tallos de las plantas de *O. grandiglumis* del Amazonas pueden tener hasta 10 m de largo, y en Costa Rica se han medido hasta de 8m. La capacidad de las plantas de *O. grandiglumis* de elongar los entrenudos y crecer mucho y rápidamente parece ser una adaptación para utilizar el banco lodoso, donde estas plantas son las primeras que germinan, así como también producen los nuevos brotes en los nudos de los viejos estolones tan pronto como queda descubierta la tierra.

Uno de los aspectos más notorios en la comparación de las tres especies costarricenses de arroz silvestre es la distribución de éstos en el país. *O. latifolia* se encuentra ampliamente distribuida mientras que las otras dos especies están restringidos unos pocos humedales de la zona norte de Costa Rica.

Oliveira (1994) indica que *O. grandiglumis* crece en depósitos de sedimento del cuaternario (i. e. los últimos 10.000 años), que forman las islas y bancos lodosos de los ríos, lagos y planicies de inundación estacional, llamados “várzea” en el Amazonas. Más aún, aunque su distribución no está limitada a ríos de aguas blancas, es más abundante ahí. Esta descripción concuerda con la distribución de *O. grandiglumis* en Costa Rica, donde esta especie es principalmente abundante en los bancos lodosos e islas de sedimento en el cauce principal del Río Frío. Tanto el Río Medio Queso como el Río Frío acarrean partículas muy finas de sedimentos y material orgánico, por lo que es posible catalogarlos con el nombre genérico de ríos de agua blanca, en los que hay una alta productividad primaria y gran diversidad de organismos (Morishima y Martins, 1994).

El suelo en los llanos del Río Medio Queso concuerda con el descrito para la “várzea” Amazónica, donde *O. glumaepatula* se encuentra en Sur América. Estas son planicies de inundación estacional, con suelos formados durante el Holoceno, i.e. durante los últimos 10.000 años (Morishima, 1994). Este tipo de suelos muy ricos en sedimentos muy finos y materia orgánica son típicos de las partes bajas de cuencas de ríos grandes. Estos sitios son propensos a inundaciones periódicas en las que el nivel del agua varía grandemente (0-2m en Costa Rica y hasta 10 m en Amazonas). Las plantas herbáceas propias de éstos ambientes, como *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis* tienen la capacidad de crecer rápidamente elongando sus tallos. De esta manera las hojas de éstas plantas no son cubiertas por el agua durante los meses de inundación y pueden sobrevivir.

Por lo tanto, parece haber una relación estrecha entre el tipo de hábitat en que éstas plantas se encuentran y sus características morfológicas y fisiológicas, lo que les impide a *O. glumaepatula* y *O. grandiglumis* desarrollarse apropiadamente en otro tipo de ambientes, como si lo logra *O. latifolia*. Sería muy interesante estudiar más en detalle la historia evolutiva de *O. latifolia* y las condiciones históricas y genéticas que han permitido que esta especie se encuentre en hábitats tan diversos.

Las condiciones ecológicas normales podrían favorecer la homeostasis de las plantas de arroz silvestre

La ausencia de síntomas del virus de la hoja blanca del arroz es generalizada en las plantas de todas las especies silvestres de arroz. Observaciones preliminares indican que el vector del virus *Tagosodes orizicolus*, no se alimenta de las plantas de *O. latifolia* ni de *O. grandiglumis*, lo que sugiere que no las reconoce como plantas hospederas o a que estas plantas tienen genes antixenóticos que evitan que el insecto se alimente de ellas. Sin embargo, este insecto se alimenta bien en *O. glumaepatula* y aparentemente le puede transmitir el virus en condiciones de invernadero (Espinoza, com. pers.). El que no se observen plantas de *O. glumaepatula* con síntomas de hoja blanca en el campo podría entonces ser el resultado de que el virus de la hoja blanca del arroz sea poco común en las poblaciones de *O. glumaepatula* debido a que organismos depredadores y parasitoides mantienen las poblaciones del vector *-Tagosodes orizicolus-* en niveles bajos.

Vertebrados como golondrinas e invertebrados como chinches (Reduviidae) y arañas (Oxiopidae y Salticidae), y parasitoides como avispa (Dryinidae y Mymaridae) y otros insectos parasitoides como algunas especies del orden Strepsiptera (Mora y Mora, en preparación), pueden mantener las poblaciones de *T. orizicolus*, en niveles suficientemente bajos. Además, el virus también afecta el valor adaptativo del insecto induciendo efectos deletéreos en la fecundidad, número de huevos puestos, viabilidad de las ninfas y longevidad, por lo que en poblaciones naturales se favorecen los individuos libres del virus (Galvez, 1969; Jennings y Pineda, 1970). Aún más, gran proporción de los individuos de una población son resistentes al virus debido a un gen dominante que limita la replicación del virus (Zeigler y Morales 1989). Por otro lado, la estacionalidad en el llano en años secos puede impedir el aumento desproporcionado de las poblaciones virulíferas del vector, y el tipo de crecimiento perenne de las plantas en años húmedos impide que el virus afecte plantas pequeñas.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Instituto Internacional de Investigaciones en Arroz (Filipinas) por el financiamiento del proyecto y en especial al Dr. Michael T. Jackson por su apoyo y comentarios a los manuscritos. También agradecemos a Javier y Audi de la Sección de Transportes, Universidad de Costa Rica, por su ayuda en todas las ocasiones que necesitamos transporte. Rafael Palacios nos alquiló su bote en numerosas ocasiones en el Río Medio Queso. Edwin Villagra, de la Estación de Parques Nacionales en Caño Negro, ayudó en la colecta de plantas y semillas en varias ocasiones. Franklin Nájera ofreció asistencia en el campo repetidamente. También deseamos agradecer al Dr. Rodrigo Gámez, director del Instituto Nacional de Biodiversidad por su colaboración, así como también a Barry Hammel, Quirico Jiménez y Nelson Zamora por la identificación de las plantas del humedal del Río Medio Queso.

Cuadro 1. Especies de *Oryza* encontradas en Costa Rica durante un inventario de arrozales silvestres y algunas de sus características relevantes

Especies	Tipo de Genoma	Origen	Simpatría	Diversidad Intraespecífica	Rasgos Diagnósticos	Análisis Realizados	Pico de Floración	Poblaciones Principales y hábitat	Características potencialmente útiles
1 <i>O. glumaepatula</i>	AA	Nativa	3,5,6	Dos poblaciones bien diferenciadas genéticamente. Seis subpoblaciones diferenciadas en la población de Medio Queso	Lígula 20-40mm bífida, Arista 80 mm rosada, semilla 8.5mm	Morfología, Microsatélites	Sept-Nov	Humedal Río Medio Queso, Los Chiles, Alajuela (10 ⁵ -10 ⁶); Murciélagos, Guanacaste (10). Área abierta de inundación estacional.	Cruces interespecíficos para introgresión de QTL.
2 <i>O. latifolia</i>	CCDD	Nativa	7	Cientos de poblaciones, muchas diferenciadas morfológica y genéticamente.	Lígula 4 mm, lema estéril 1.2mm, semilla 4.8-7mm	Morfología, Microsatélites	Sept-Nov	P.N. Palo Verde (10 ⁵); P.N. Tortuguero (10 ⁴). Áreas abiertas inundadas y orillas de ríos.	Resistente a deficiencias, tolerante a desecación y salinidad, cruces interespecíficos y clonaje de genes
3 <i>O. grandiglumis</i>	CCDD	Nativa	1,5,6	Tres poblaciones, diferenciación genética	Lígula 5 mm, lema estéril 4.5 mm, semilla 9.2 mm.	Morfología, Microsatélites	Sept-Nov	Caño Negro (10 ²); Lagartera (10 ²); Medio Queso (10). Orilla de río, banco lodoso	Aparentemente tolerante a hongos, resistente a deficiencias, planta robusta, vigorosa, panícula y semilla grandes.
4 <i>O. rufipogon</i>	AA	Maleza introducida	2,7	Muchos morfotipos posiblemente enjambre híbrido con arroz cultivado	Similar a <i>O. glumaepatula</i> pero semilla mayor 2.5mm encontrado sólo en arrozales	Morfología, Microsatélites	Todo el año	En arrozales <1% to 50% parte del complejo arroz rojo	Cruces interespecíficos
5 <i>O. glumaepatula</i> x <i>O. grandiglumis</i>	ACD	Híbrido nativo	1,3,6	Altamente homogéneo	Lígula 15 mm, lemas estériles 2.5 mm, plantas estériles en el margen del Río Medio Queso, Los Chiles	Morfología, Microsatélites e isoenzimas	Oct-Feb	Río Medio Queso, Los Chiles, Alajuela (10 ³). Solo orilla de río	Cruces interespecíficos, producción de arroz hexaploide por duplicación
6 <i>O. grandiglumis</i> x <i>O. latifolia</i>	CCDD	Híbrido nativo	1,3,5	Algunas variantes, tal vez varios eventos de hibridación o retrocruces	Plantas muy robustas, hoja bandera ancha > 50mm, panículas > 50 cm	Morfología, microsatélites	Sept-Nov	Caño Negro (10); Lagartera (10); Medio Queso (1). Orilla de río, bancos lodosos, áreas inundadas	Cruces interespecíficos
7 <i>O. sativa</i>	AA	Cultígeno introducido	2,4	4 variedades élite y muchas variedades criollas	Semilla persistente, típicamente sin arista.	Usado como testigo	Todo el año	70.000 Ha plantadas anualmente	Cruces intraespecíficos con variedades criollas y razas

U, C, D son los tipos de genoma de acuerdo a Tateoka (1962). Simpatría: los números indican las especies con las cuales es simpátrica según el orden en este cuadro. El tamaño estimado de las poblaciones aparece como potencias (e.g. 10⁵ = 100.000).

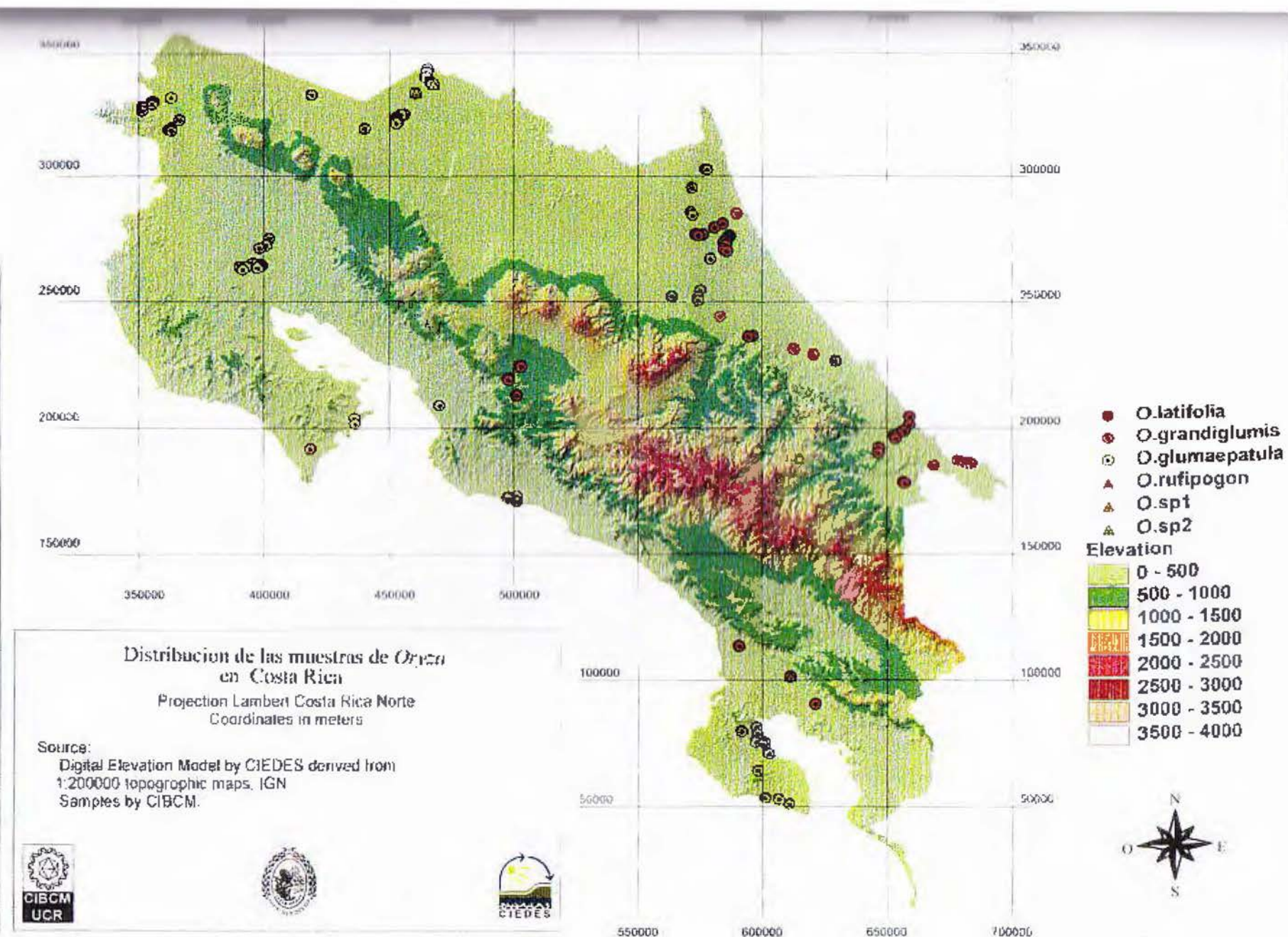


Fig. 1. Distribucion de las localidades de muestreo donde se encontraron poblaciones de *Oryza* durante el inventario realizado entre 1997-99

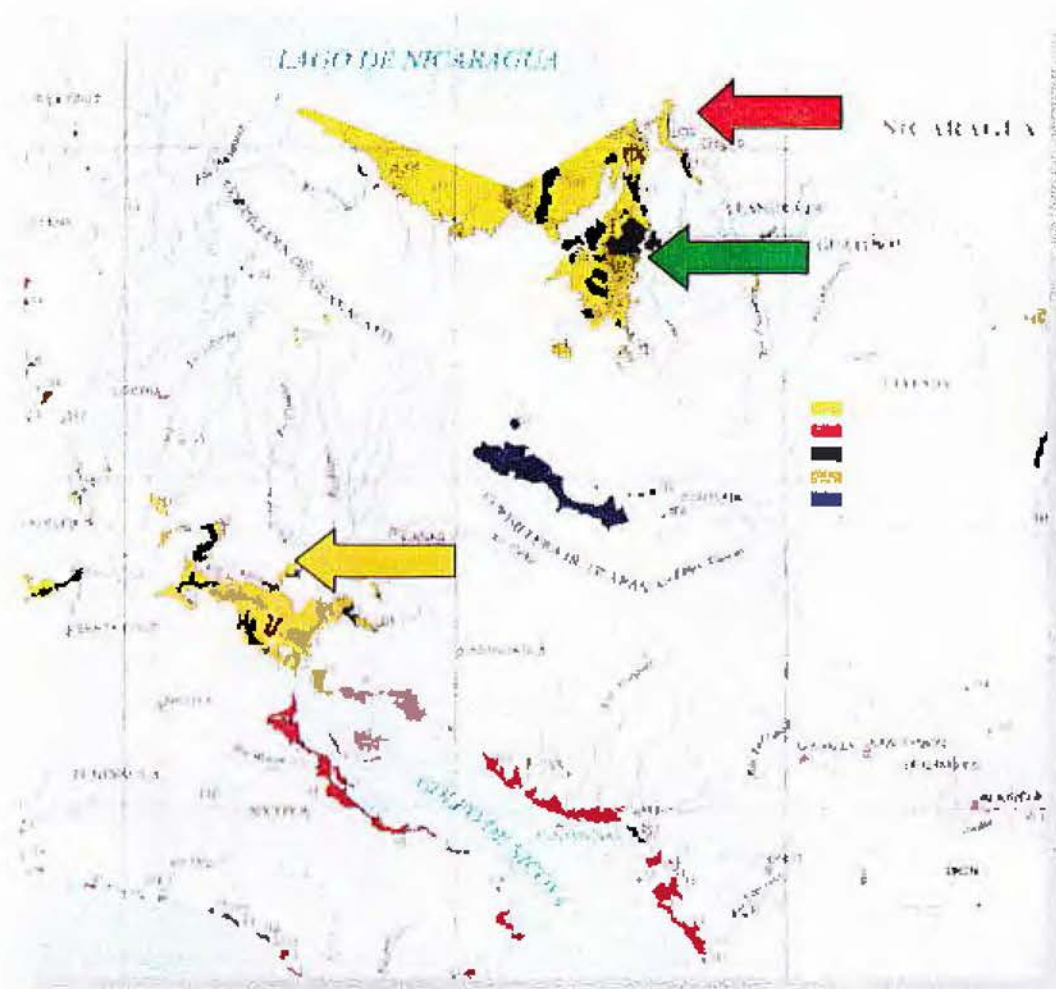


Fig. 2. Distribución de las principales poblaciones de las especies de *Oryza* en los humedales de Costa Rica

Flecha roja: *O. glumaepatula* en humedal del Río Medio Queso, Flecha Verde: *O. grandiglumis* en Caño Negro. Flecha amarilla: *O. latifolia* en humedal del Parque Nacional Palo Verde

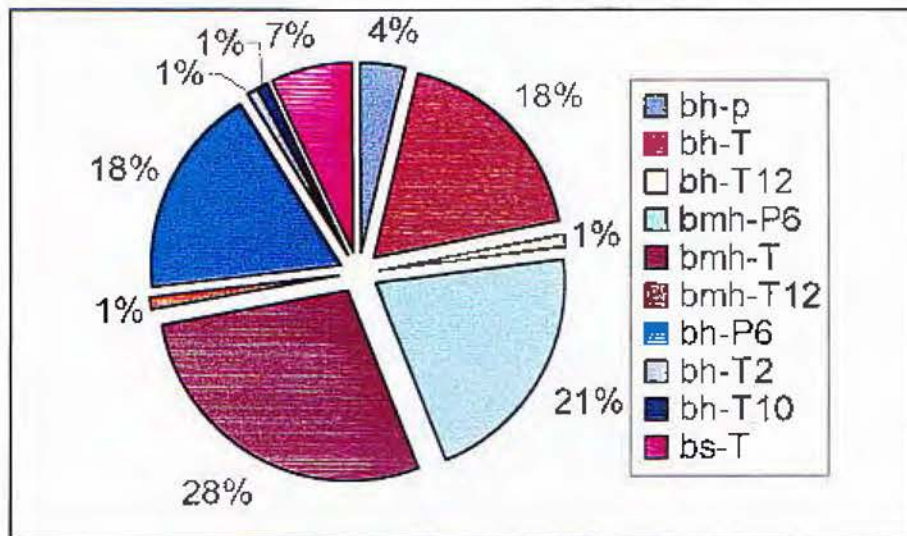


Fig. 3. Proporción de las poblaciones de *O. latifolia* por tipo de zona de vida. Código: bh-MB: bosque húmedo montano bajo; bh-P: bosque húmedo premoantano; bh-T: bosque húmedo tropical; bh-T_Tpremontano: bosque húmedo tropical transición a premontano; bh-T: bosque seco; bmh-MB_Thumedo: bosque muy húmedo montano bajo transición a húmedo; bmh-P: bosque muy húmedo premontano; bmh-P_Tbasal: bosque muy húmedo premontano transición a basal; bmh-P_Tpluvial: bosque muy húmedo premontano transición a pluvial; bmh-T: bosque muy húmedo tropical; bmh-T_Premontano: bosque tropical premontano muy húmedo; bmh-T_Tpremontane: bosque muy húmedo tropical transición a premontano

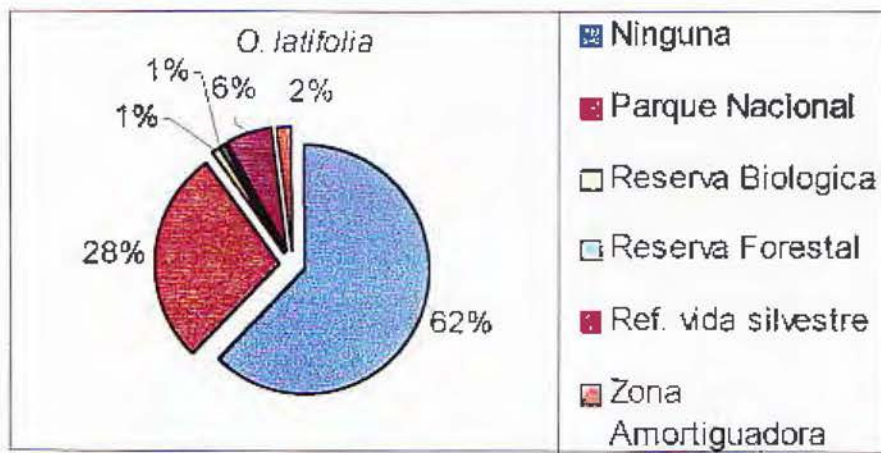


Fig. 4. Proporción de las poblaciones de *O. latifolia* de Costa Rica según la categoría de protección del sitio en que se encontraron.

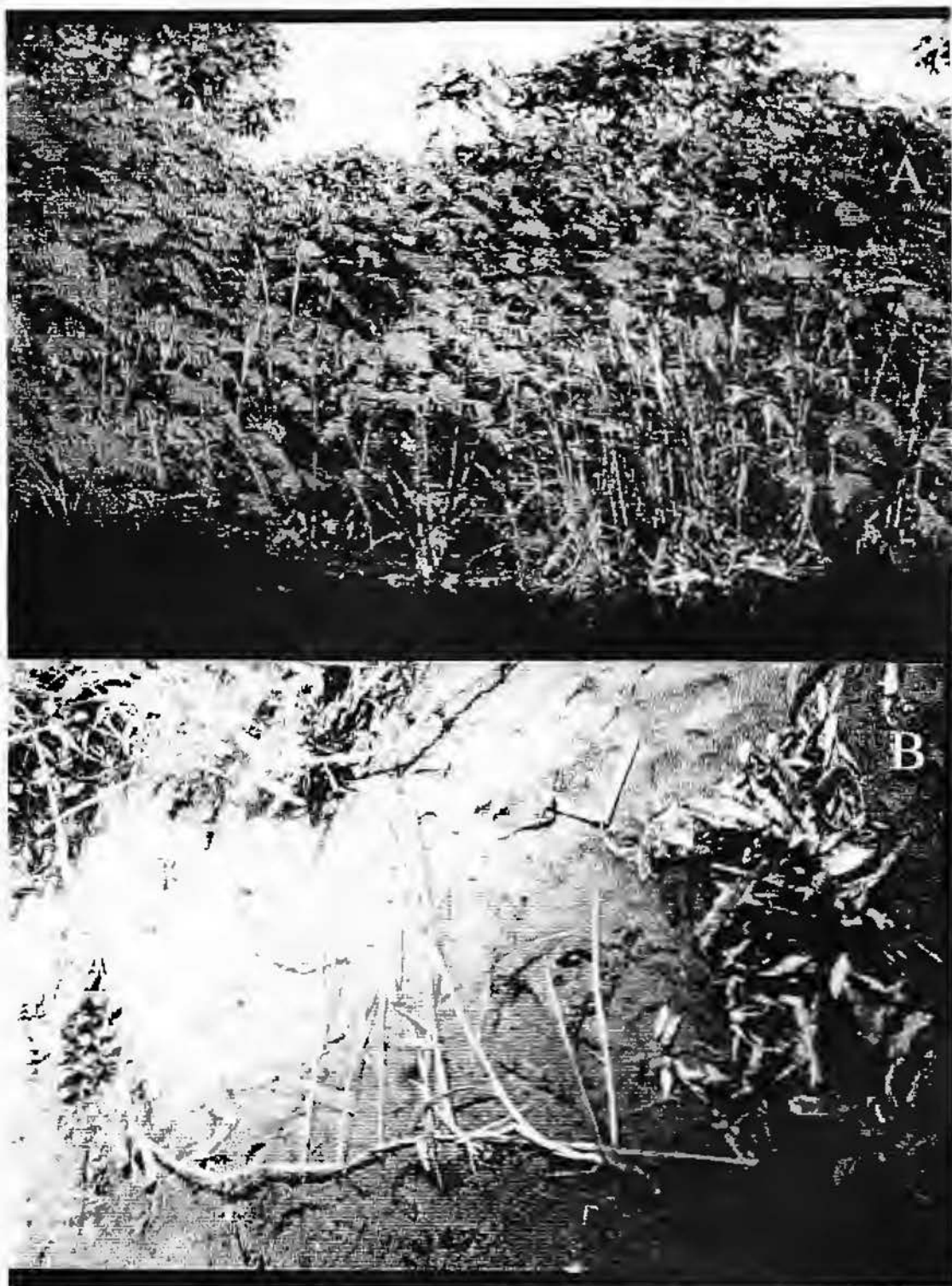


Fig. 5. (A) *O. grandiglumis* en R.V.S Caño Negro a la orilla del Río Frío, creciendo en áreas abiertas junto con *Cassia reticulata*. (B) Culmo de *O. grandiglumis* con varios brotes que salen de los nudos cuando el tallo queda postrado sobre el banco lodoso.

Fenograma de *Oryza glumaepatula* de Costa Rica

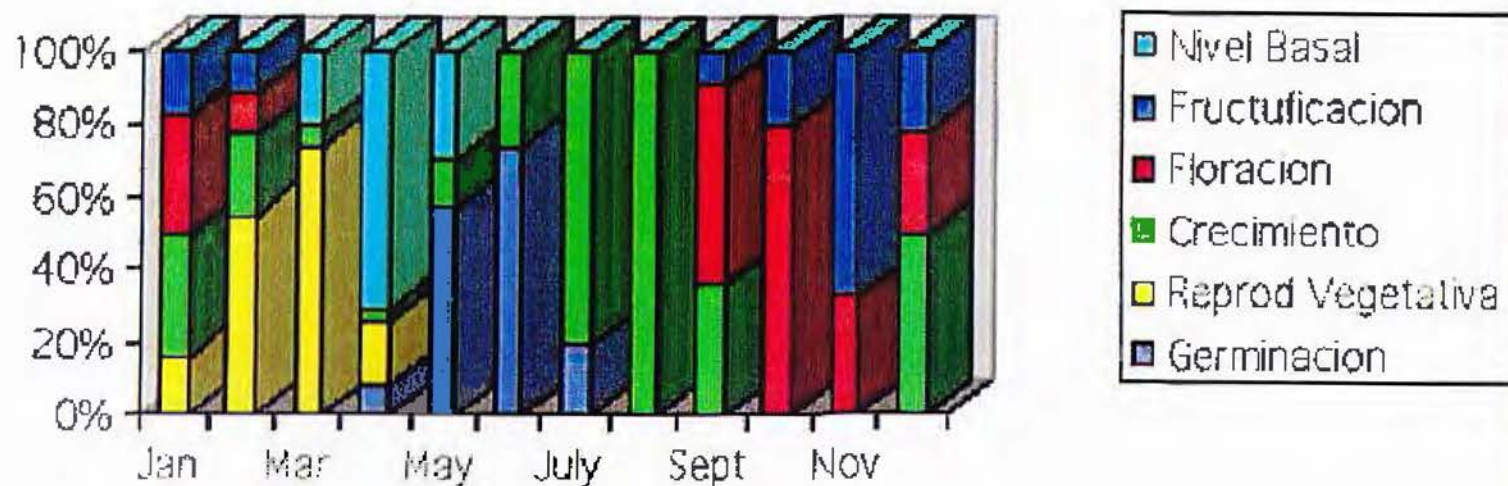
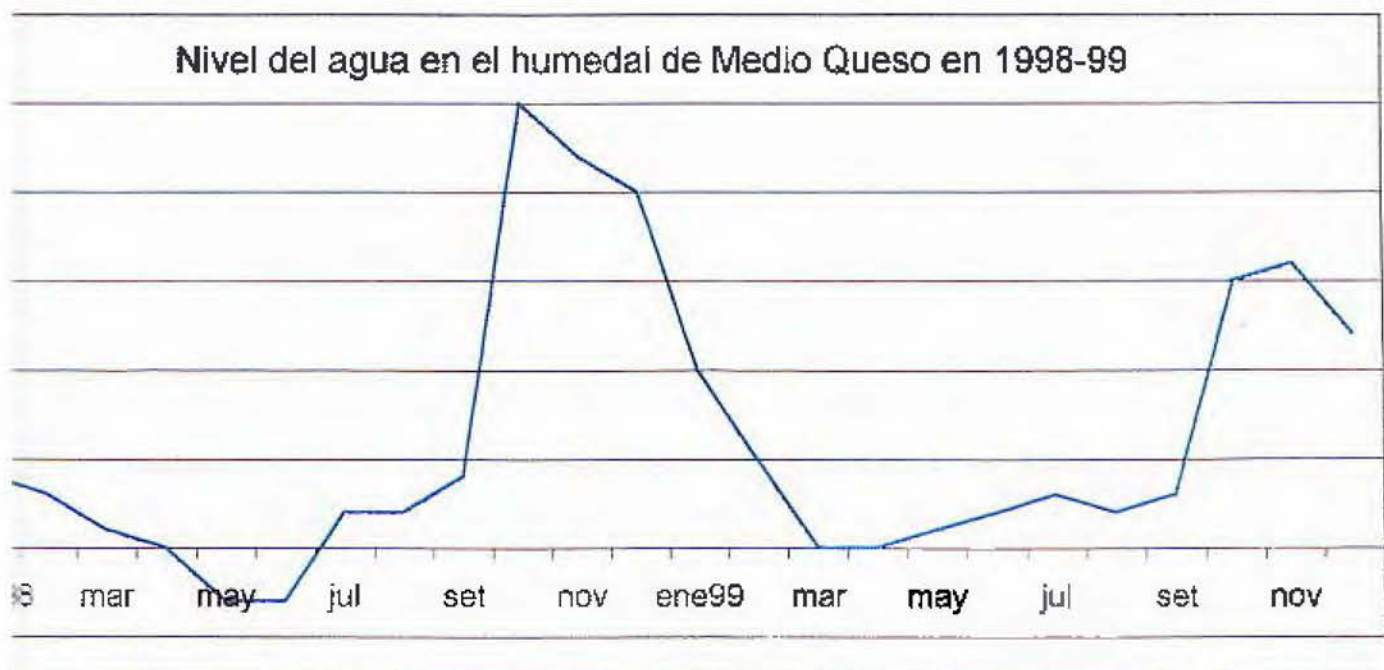


Fig. 6. Porcentaje de cada estadio fenológico observado en *O. glumaepatula* del humedal del Río Medio Queso, Los Chiles. Este patrón es válido para *O. grandiglumis* y las poblaciones de *O. latifolia* del Pacífico.



Fluctuación en el nivel del agua en el humedal del Río Medio Queso, Los Chiles, Costa Rica, años 1998 y 1999.

Capítulo 5

Diferenciación intraespecífica de *O. latifolia* en Costa Rica

Alejandro Zamora^{1§}, Jorge Lobo², Pablo González⁴, Ana M. Espinoza^{1, 3}.

1. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
2. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
3. Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
4. Centro de Investigación en Desarrollo Sostenible (CIEDES), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

§Email: azamoram@cariari.ucr.ac.cr

Abstract

The populations of *O. latifolia* from Costa Rica show extensive variation and plants from different geographic regions, climatic areas and microhabitats possess significantly different habits as assessed by ANOVA and principal component analysis (PCA). The ANOVA showed that populations of the Pacific Slope are significantly smaller than those of the Atlantic slope for total plant height, flag leaf width and panicle. Also, the PCA showed that plants of San Carlos and Pacífico Central were distinct from the populations of the Atlantic slope, and there was also a differentiation of the Guanacaste and Estrella population. A two way ANOVA separated the effects produced by climate and microhabitat. This analysis showed that variation in 11 traits like total height, leaf width and seed length is due to the different climatic regions where plants occur, incrementing along with the precipitation. It also showed that plants from microhabitats with less availability of water and light, such as understory, clear in the forest or slope, are smaller in plant height, panicle size, width of the leaves and awn than those of open flooded

areas. The frequency of purple color in structures of *O. latifolia* such as ligule, auricles, nodes, panicle branches and awns is higher in the Pacific slope than in populations from the Atlantic. However selective pressures might have some effect in traits like height, panicle size, seed size, awn size, and leaf width. The color variation could be associated with tolerance to fungi but may also reflect neutral variation. Costa Rican wild rice species are important genetic resources that should be thoroughly preserved, studied and used for the benefit of rice growers in Costa Rica and the world.

KEYWORDS: wild rice, genetic resources, biodiversity, biogeography, morphology, Costa Rica, *O. latifolia*.

Las poblaciones de plantas frecuentemente muestran una alta variación entre sus poblaciones. Esto se observa en plantas ampliamente distribuidas pero también a escalas mucho más pequeñas, hasta de 10 a 100 m. Debido a su sesilidad, posición basal en cadenas alimenticias, flexibilidad cromosómica, sistemas de apareamiento facultativo, capacidad de hibridización y plasticidad fenotípica, las plantas tienen presiones y capacidades particulares que facilitan la diferenciación de sus poblaciones. A esto se suma el efecto que tiene la diferenciación por aislamiento y la deriva genética que también puede explicar el origen de la variación para muchas características (Linhart y Grant, 1996).

Oryza latifolia es una especie ampliamente distribuida en América y se le encuentra en muchos diferentes ecosistemas, lo que se refleja en su variabilidad morfológica (Vaughan, 1994). En Costa Rica, *O. latifolia* es la especie más abundante y de mayor distribución de su género, encontrándose en las dos vertientes por debajo de los 650 m.s.n.m. y en zonas de vida desde el bosque seco hasta el bosque tropical lluvioso (ver capítulo 4).

Esta especie presenta una notabla variabilidad morfológica, tanto entre poblaciones de distintas regiones geográficas de Costa Rica, así como también dentro de

una misma población. Esta variabilidad es particularmente grande en las poblaciones de Guanacaste, donde incluso sugería la presencia de dos especies (capítulo 2). Dicha diversidad puede deberse a una gran plasticidad fenotípica o a una diferenciación genética de las poblaciones. Así mismo, es importante conocer la verdadera magnitud de la variación intrapoblacional que se observa en Guanacaste y tratar de entender sus causas.

Es también importante determinar, usando morfología como un primer acercamiento, el nivel de la variación genética presente en las poblaciones encontradas, así como la diferenciación de éstas poblaciones. Es esencial determinar de ésta manera cuáles son las accesiones más diferenciadas y que tienen la mayor representatividad de la variabilidad genética original de las poblaciones para ser incluidas en la colección principal de un banco de germoplasma (Vaughan, 1994, Ford-Lloyd et al. 1997).

El objetivo de este capítulo es cuantificar la variabilidad morfológica de *O. latifolia* tanto entre como dentro de poblaciones y analizar las posibles causas de esta variación.

Material y Métodos

Las muestras utilizadas son las mismas descritas en el capítulo 2 y corresponden a plantas colectadas en el campo, seleccionadas de manera que tuvieran al menos un grano maduro y únicamente durante la estación lluviosa para disminuir el efecto de la edad y del ambiente en el desarrollo de las plantas. Las variables morfológicas utilizadas fueron 20, según lo descrito en el capítulo 2, a saber: Características vegetativas: ALT, LHBAN, ABAN, LBAN2A, L2A, A2A, DIA, L1-2, L2-3 y LIG; Características florales: PAN, DBB, DBP, RAQ, LSINSEM, NORAM, LSEM, ASEM, LEMA, y ARI.

Los individuos de *O. latifolia* se agruparon a priori en 7 poblaciones: San Carlos en la Subvertiente Norte; Guanacaste, Pacífico Central, Península de Osa, en la Vertiente

del Pacífico y Tortuguero, Limón y Valle de la Estrella en la Vertiente Atlántica (Fig. 1).

Todas las localidades de muestreo se georeferenciaron usando un sistema de información geográfica y se clasificaron con éste sistema por región geográfica y climática con el programa Arc View version 3.1, relacionando las coordenadas de cada muestra al mapa digital de clima (Herrera, 1995). Posteriormente se incluyó esta categorización en la matriz de datos y se agruparon algunas categorías climáticas por tener pocos datos. Los tipos de clima subhúmedo A y B se agruparon como B, los climas húmedos C, D, E y F, se agruparon como D y las muestras de climas muy húmedos formaron la categoría G (Fig. 1, ver también mapa de climas en Capítulo 4). Para cada población muestreada se registró también el microhábitat en que se encontraba y se clasificaron en (1) área abierta a la orilla de un río, (2) claro a la orilla de río, (3) área abierta de inundación estacional, (4) sotobosque, (5) área abierta no inundada y (6) pendiente.

Se realizaron dos análisis de variancia. Para determinar si existían diferencias significativas en las características de las plantas de diversas regiones geográficas se realizó un análisis de variancia de una vía para cada característica estudiada.

Las diferentes regiones geográficas en Costa Rica también corresponden a diferentes zonas climáticas y a veces un mismo tipo de clima se encuentra en dos regiones geográficas, como ocurre con el tipo de clima muy húmedo que se encuentra en la Península de Osa y en Tortuguero. Para determinar el efecto individual de región climática y microhábitat en la variación de *O. latifolia* se hizo un análisis de variancia de dos vías, tomando como efectos principales del modelo a la región climática y al microhábitat. Se analizaron todas las variables cuantitativas descritas en el capítulo 2 sin transformaciones. El tamaño de la muestra es de 146 plantas de todas las poblaciones.

Se realizaron dos análisis de componentes principales (ACP) con el fin de determinar si poblaciones de diferentes regiones geográficas son diferentes en su forma

general, según el conjunto de características usadas, así como también para determinar si el hábito general de las plantas de diferentes microhábitats varía. Los primeros dos componentes principales de cada análisis fueron usados para obtener gráficos de la dispersión de los individuos de las diferentes agrupaciones de muestras. Se utilizó la elipse que marca el 90% del intervalo de confianza para los gráficos.

Resultados

Diferenciación geográfica de las poblaciones de *O. latifolia*

El análisis de variancia univariado probó diferenciación interpoblacional significativa para 10 variables de un total de 20 variables comparadas (Cuadro 1). Las variables asociadas a la parte vegetativa fueron significativamente diferentes entre poblaciones en 5 de 10 variables, y las variables que miden estructuras reproductivas fueron significativamente diferentes en 5 de 10 variables comparadas. En general, hay diferencias significativas en varias características morfológicas, donde las plantas de Guanacaste, en el Pacífico Norte, son significativamente más pequeñas que las de la vertiente Atlántica. Las otras regiones geográficas de la Vertiente del Pacífico, como la Península de Osa, no fueron significativamente diferentes de las poblaciones del Atlántico.

Tanto las variables asociadas al tamaño de la parte vegetativa (altura, ancho y largo de las hojas, y longitud de la lígula) como las de estructuras reproductivas (tamaño de la panícula, número de ramificaciones, longitud de la semilla y arista) las plantas de Guanacaste resultaron ser significativamente más pequeñas que las de la región Atlántica, en particular con la región de Tortuguero (Cuadro 1).

Análisis de Componentes Principales de las poblaciones de O. latifolia

Las plantas de *O. latifolia* de la vertiente Atlántica de Costa Rica son más

robustas que las de las poblaciones de la vertiente del Pacífico. Las plantas de estas poblaciones forman grupos con un traslape importante pero que muestran una tendencia a ser distintos cuando se grafican de acuerdo a las primeras dos funciones del análisis de componentes principales (Fig. 3).

En éste análisis, los primeros tres autovalores o componentes principales explican un 46% de la variancia presente en las muestras de todas las poblaciones. El primero es el más importante ya que comprende un 31% de la variación total, mientras que los otros dos explican 8% y 7% respectivamente.

El primer factor está principalmente influenciado por la altura de la planta (ALT), la distancia de la base a la punta de la panícula (DBP), la longitud de la parte sin semillas de la ramificación (LSINSEM), el número de ramificaciones en la panícula (NORAM), el ancho de la hoja bandera (ABAN) y el ancho de la segunda hoja (A2A). La longitud de la segunda hoja (L2A) y el tamaño de la lígula (LLIG) también influenciaron el primer componente principal.

Debido a la correlación de la altura con muchas de las otras variables, tanto vegetativas como reproductivas (Cuadro 2), el primer autovalor es un componente asociado a la robustez general de la planta. Los valores altos en el factor 1 corresponden a las plantas más altas. Las poblaciones de Tortuguero, Limón y Valle de la Estrella, tienen valores altos para el primer componente, lo que hace que éstas poblaciones se separen de la población del Pacífico Central. Esto quiere decir que las plantas de la zona Atlántica tienen un hábito más robusto que las del Pacífico Central, aunque ésta diferencia no es tan grande con respecto a las plantas de la Península de Osa.

La influencia del primer componente principal se nota en la dispersión de las muestras a lo largo del eje X, aunque algo de dispersión en el eje Y también es notable (Fig. 2). La población de Guanacaste tiene individuos con valores muy dispersos para los primeros dos componentes, mientras que la población del Pacífico Central está agrupada

debido a valores bajos en el primer componente.

La longitud de las ramificaciones de la panícula (RAQ), la distancia entre nudos 2 y 3 (L2_3) y la longitud de la arista (LAWN) afectaron grandemente el segundo componente.

La población del Valle de la Estrella tiende a tener valores más altos del segundo componente cuando el valor del primer componente aumenta. Es ésta población la que más claramente se diferencia de la de Guanacaste, particularmente debido a los valores bajos del segundo factor. Las diferencias morfológicas entre éstas poblaciones han sido también corroboradas mediante estudios de la variabilidad de marcadores isoenzimáticos (Quesada, en preparación).

Las poblaciones de Osa, Limón y San Carlos están distribuidos homogéneamente con respecto a ambos factores, con una distribución mayor en el primer factor, mostrando que éstas plantas tienen un hábito similar en general.

Efecto del clima en el hábito de O. latifolia

El análisis de variancia de dos vías indica que existen diferencias significativas entre plantas de diferentes tipos de climas para la altura, ancho de la hoja bandera y de la segunda hoja, longitud entre la hoja bandera y la Segunda, diámetro del culmo y longitud de la semilla (Cuadro 1). También las características de las estructuras reproductivas son afectadas por el clima, siendo superior la panícula, parte sin semillas del raquis, número de ramificaciones, longitud de la semilla y el raquis más largo de la panícula de las plantas de clima tipo G, es decir, clima muy húmedo. Este tipo de clima se encuentra en la zona del Atlántico norte de Costa Rica (e.g. Tortuguero), así como también en la Península de Osa en la vertiente del Pacífico (Fig. 1).

Las diversas condiciones que se presentan en los diferentes microhábitats también

tienen un efecto significativo sobre algunas de las estructuras estudiadas. Las plantas de áreas abiertas a orillas de río o inundadas son en general más robustas que las de sotobosque y pendiente, lo que se manifiesta en la altura, el tamaño de la panícula, la longitud del raquis, el ancho de las hojas, el diámetro del culmo y la longitud de la arista (Cuadro 1). Esta última es mayor en áreas abiertas a orillas de río ($\bar{X}$: $21,4 \pm 11$ mm) que en otros microhábitats y es interesante debido a que es la única de las características influenciadas por el microhábitat que no está correlacionada con la altura.

El efecto del microhábitat en la morfología de las plantas de *O. latifolia* parece ser menor que el del clima o la región geográfica ya que un menor número de características mostraron diferencias significativas. Tampoco se observaron diferencias a nivel multivariado en el análisis de componente principales agrupando las plantas por microhábitat.

Variación intrapoblacional

El tamaño de la semilla fue una de las variables que mostró mayor variabilidad intrapoblacional. Las plantas de *O. latifolia* de una sola población pueden tener semillas de diferentes tamaños y éstas pueden estar en el mismo sitio, como se observó especialmente en el Parque Nacional de Santa Rosa y en P.N. Palo Verde (Fig. 6 capítulo 2). Aún más, la desviación estándar del tamaño de la semilla de *O. latifolia* en Guanacaste es de 0,7 mm, mientras que para las poblaciones de *O. latifolia* de otras regiones del país es de 0,32-0,57 y la de otras especies de *Oryza* está en el rango de 0,13-0,39 mm. Además, la panícula de *O. latifolia* es también muy variable (X_{DBP} : $31,7 \pm 22,7$ cm).

Las poblaciones de *O. latifolia* en general tienen una alta variación en el color de la arista, ramificaciones de la panícula, lígula, aurículas y nudos, con colores desde completamente verdes a morado o rojo vino (Fig. 3). Esto es particularmente evidente al

principio de la estación seca en Palo Verde, en donde se observan parches de plantas de *O. latifolia* con diferentes colores. Esto es claro en Estero Chamorro y en algunos potreros antes de la entrada del parque, que están conformados casi exclusivamente por *O. latifolia*. Aún cuando la variación en éstas características ocurre en las poblaciones en todo el país, hay una mayor abundancia de plantas con coloración morada en la vertiente del Pacífico, especialmente en las áreas abiertas de la región baja del Río Tempisque. La observación de las poblaciones en áreas abiertas de Palo Verde sugiere que las plantas con coloración morada son más comunes ahí que en la población general de Guanacaste, que también incluye plantas de pequeños claros y sederos en el bosque. La población de San Carlos es similar a la de Guanacaste en cuanto a la coloración ya que el color morado es común en las estructuras de esas plantas (Fig. 3).

Los colores de los nudos, arista y ramificaciones de la panícula son principalmente verdes en otras poblaciones como las del Valle de la Estrella. La arista es verde en todas las poblaciones de la Vertiente Atlántica, mientras que en Guanacaste ésta varía de verde a morado. En la Península de Osa hay algunos individuos con coloración morada en la arista, mientras que en San Carlos hay una mezcla de colores (Fig. 3).

Discusión

La gran variabilidad morfológica de las plantas de *O. latifolia* en Costa Rica parece deberse a diversos procesos. La variación neutra de características debido a la deriva genética y al flujo limitado de genes entre las poblaciones estudiadas; la variación interpoblacional debida a la adaptación a diferentes regiones climáticas; y la variación intrapoblacional debida a selección en diferentes microhábitats.

La variación neutra podría ser la causa de la variación en características como la longitud de la lema estéril (LLEMA) y la longitud entre los nudos (L1_2 y L2_3). Estas características presentan una variación que no es explicada por patrones geográficos,

climáticos o ecológicos. Estos rasgos medidos en las poblaciones de *O. latifolia* de todo el país tienen una variación un tanto aleatoria y no responden a una correlación con factores ambientales. En estos rasgos se notó que poblaciones adyacentes pueden mostrar características muy diferentes sin una razón obvia.

Por otro lado, la selección divergente podría ser la razón de que plantas de localidades con diferentes climas y microhábitats sean significativamente diferentes para varias características. La adaptación a distintos tipos de climas y microhábitats podría haber llevado entonces a la especie a tener una gama de variantes con distintas características morfológicas y evidentemente genéticas.

La población de Guanacaste parece tener una mayor variabilidad general que las otras poblaciones estudiadas. Esto puede deberse a las diferentes situaciones en las que las plantas se pueden encontrar en ésta región con respecto a la disponibilidad de agua y luz. Estas incluyen zonas que no se inundan y que sólo reciben agua de lluvia, hasta zonas que se inundan periódicamente, así como también márgenes de ríos donde la disponibilidad de agua es mayor a través del año. De igual manera, en Guanacaste las plantas se pueden encontrar en sitios que difieren sustancialmente en cuanto al efecto de la iluminación a través del año. Es posible que esta sea la causa de la relación entre el jícaro (*Crescentia alata*) y *O. latifolia* en el bosque seco. De hecho, la mayor densidad observada de *O. latifolia* en el bosque seco se da bajo la copa de *Crescentia alata*, *Melanodendron sp.* y *Bactris major* (Zamora *et al.*, capítulo 4).

Aún cuando en la vertiente del Atlántico hay una notable fluctuación en la precipitación, la estacionalidad es mucho mayor en la vertiente del Pacífico, y ciertas zonas como el Parque Nacional Palo Verde se caracterizan por su bosque seco donde la disponibilidad de agua y luz varía drásticamente a través del año.

La asociación del color púrpura con áreas más secas Guanacaste (aunque también en San Carlos) sugiere algún tipo de relación con la protección contra luz solar, sin

embargo no hay evidencia al respecto. Por otro lado, se ha demostrado que flavonoides como la flavona, chalcona, kaempferol y cianidina, subproductos de la vía biosintética de la antocianina, incrementan la resistencia de plantas transgénicas a hongos como *Magnaporthe grisea*, o muestran actividad antimicrobiana contra *M. grisea*, *Rhizoctonia solani* y *Xanthomonas oryzae* (Reddy, 1999). Esto sin embargo, no explica porqué en la zona seca y estacional es donde predomina el color morado, mientras que en la zona Atlántica donde la diversidad de hongos es mayor la coloración morada es escasa.

La población de Guanacaste es también muy variable en rasgos cuantitativos como el tamaño de la planta y la semilla. En este estudio se encontraron diferencias significativas para el tamaño de la semilla de poblaciones de diferentes climas y no de microhábitats, por lo que la mayor parte de la variación de la población de Guanacaste se da posiblemente por la diversidad de climas muestreados dentro de esta población.

Los individuos agrupados como Guanacaste pertenecen a regiones distantes de toda la provincia, desde la Península de Santa Elena hasta Cóbano en la Península de Nicoya. Más aún, las muestras fueron colectadas en muchos microhábitats diferentes, todo lo cual puede influenciar el hábito de la planta, tanto por la interacción genotipo ambiente así como también por la selección de genomas específicos en algunos microhábitats. Así, la variación presente en la población de Guanacaste tiene un componente de selección divergente para tener el hábito óptimo en diferentes localidades con características ambientales variadas. Tiene también un componente de variación dentro de cada localidad, ya que plantas de la misma localidad y microhábitat pueden tener variación.

Morishima sugirió que la selección estabilizadora podría mantener un polimorfismo en el tamaño de la semilla de *O. glumaepatula* debido a que semillas de diferentes formas germinan en momentos diferentes (1994). Tal vez una semilla de una forma particular puede favorecerse en un microhábitat determinado, o en un tiempo dado después del inicio de las lluvias o de la inundación. Esto le daría a la planta una mayor

probabilidad de que parte de su progenie germine en el momento indicado. Esto es particularmente importante cuando el clima es inestable o impredecible. Además, Morishima *et al.*, (1992) encontraron diferencias genéticas entre subpoblaciones de *O. rufipogon* localizadas en microhábitats diferentes, por lo que la variabilidad encontrada en Guanacaste podría estar causada por selección natural.

Las poblaciones de la Península de Osa y Tortuguero se encuentran separadas por la cordillera de Talamanca. Estas poblaciones presentan diferentes alelos para microsatélites y también presentan la máxima distancia genética entre poblaciones de *O. latifolia* de Costa Rica según un estudio con isoenzimas de Quesada (en preparación). De esta manera es evidente que la convergencia que presentan en cuanto a su hábito robusto es debido al efecto del clima que ejerce una presión selectiva favoreciendo las plantas más grandes y que tienen un mayor esfuerzo reproductivo.

La arista presentó una mayor longitud en microhábitat de áreas abiertas a orillas de río o inundadas. Esto es interesante debido a que esta característica no está correlacionada a la altura y una mayor longitud en este tipo de microhábitat sugiere entonces un efecto de la selección. Es posible que la función de la arista sea más importante en dichos microhábitats. En estos microhábitats es también en los que se observa la mayor densidad de plantas por área, por lo que las plantas de estos sitios pueden tener una presión de depredación mayor por parte de aves que las de otros sitios. Si la arista impide la depredación por aves, entonces una arista larga sería útil cuanto mayor es la presión de depredación. Aunque esta función hipotética de la arista no se ha comprobado la morfología de esta estructura sugiere que sirve para repeler y no para sostenerse (ver capítulo 4). Además, observaciones de los agricultores también indican que las variedades de arroz con arista sufren menos depredación por aves.

Es evidente que esta especie ha tenido una capacidad extraordinaria para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y su morfología así lo demuestra.

Además, la variabilidad morfológica de *O. latifolia* en Costa Rica es reflejo de su variabilidad genética por lo que ésta especie es tan abundante como diversa. Si bien no es extraño que una especie tenga variantes morfológicas asociadas a diferentes regiones geográficas, si es especial que *O. latifolia* tenga grandes poblaciones en diversas zonas de vida mientras que otras especies de *Oryza* de Costa Rica, parecen estar muy limitadas a una región climática y a microhábitats muy particulares dentro de éstas (Capítulo 4).

Grupos diferentes (G D): los números indican los grupos que son significativamente diferentes del resto.
Regiones geográficas: 1 Guanacaste, 2 Pacífico Central, 3 Península de Osa, 4 Tortuguero, 5 Limón, 6 Valle de la Estrella, 7 San Carlos
Tipo de clima: 7=G: muy húmedo: Limón, Tortuguero, San Carlos, Osa; 2=B: Subhúmedo húmedo: Curu (Guanacaste), Palo Verde (Guan.), Santa Rosa (Guan.), Balsa (Pacífico Central); 4=D y E: Húmedo: Pto. Cortez (Pacífico Sur), V. Estrella (Atlántico Sur), Sixaola (Atlántico sur), Cobano (Península de Nicoya), Camélias (San Carlos), and Limón. **Microhábitat:** 1. Área abierta a orilla de río, 2. Claro en la orilla de río 3. Área abierta inundada, 4. Área abierta, 5. Pendiente, 6. Sotobosque. Valores significativos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s.: no significativo.

Cuadro 2. Matriz de correlaciones (Pearson) entre todas las características de *O. latifolia* de Costa Rica. Los valores por encima de 0.40 son significativos (p 0.05).

	alt	pan	dbb	dbp	raq	lsinsem	noram	lban	aban	lban2a	l2a	a2a	dia	l1-2	l2-3	lsem	asem	lema	ari
pan	0.669																		
dbb	0.350	0.744																	
dbp	0.685	0.720	0.304																
raq	0.144	0.083	-0.060	0.277															
lsinsem	0.629	0.581	0.265	0.749	0.211														
noram	0.668	0.506	0.257	0.690	0.184	0.606													
lban	0.215	0.320	0.240	0.468	0.077	0.401	0.354												
aban	0.486	0.506	0.246	0.595	0.143	0.497	0.544	0.605											
lban2a	0.194	0.244	0.161	0.187	0.066	0.136	0.094	0.163	0.059										
l2a	0.397	0.371	0.063	0.497	0.121	0.435	0.408	0.651	0.619	0.181									
a2a	0.632	0.495	0.223	0.659	0.100	0.573	0.686	0.444	0.835	0.054	0.600								
dia	0.241	0.240	0.149	0.221	0.039	0.246	0.239	0.088	0.020	0.076	0.154	0.096							
l1-2	0.299	0.237	0.101	0.284	0.083	0.117	0.248	0.366	0.406	0.128	0.369	0.333	0.140						
l2-3	0.494	0.349	0.159	0.408	0.245	0.251	0.309	0.074	0.070	0.190	0.068	0.084	0.195	0.214					
lsem	0.276	0.330	0.188	0.328	-0.092	0.264	0.302	0.201	0.269	0.058	0.205	0.197	0.160	0.025	0.127				
asem	-0.102	-0.117	-0.113	-0.062	-0.050	-0.069	-0.095	-0.074	-0.034	-0.034	-0.100	-0.074	-0.012	-0.038	0.025	0.121			
lema	-0.015	-0.008	-0.003	-0.030	-0.011	-0.054	-0.015	-0.012	-0.023	-0.001	-0.083	-0.041	-0.008	0.031	0.024	0.003	-0.033		
ari	0.161	0.056	-0.025	0.156	0.533	0.108	0.207	0.063	0.107	0.019	0.139	0.158	0.090	0.030	0.070	0.123	-0.063	0.017	
lig	0.407	0.483	0.388	0.543	0.173	0.455	0.462	0.459	0.469	0.077	0.523	0.473	0.187	0.245	0.124	0.188	-0.099	0.051	0.246

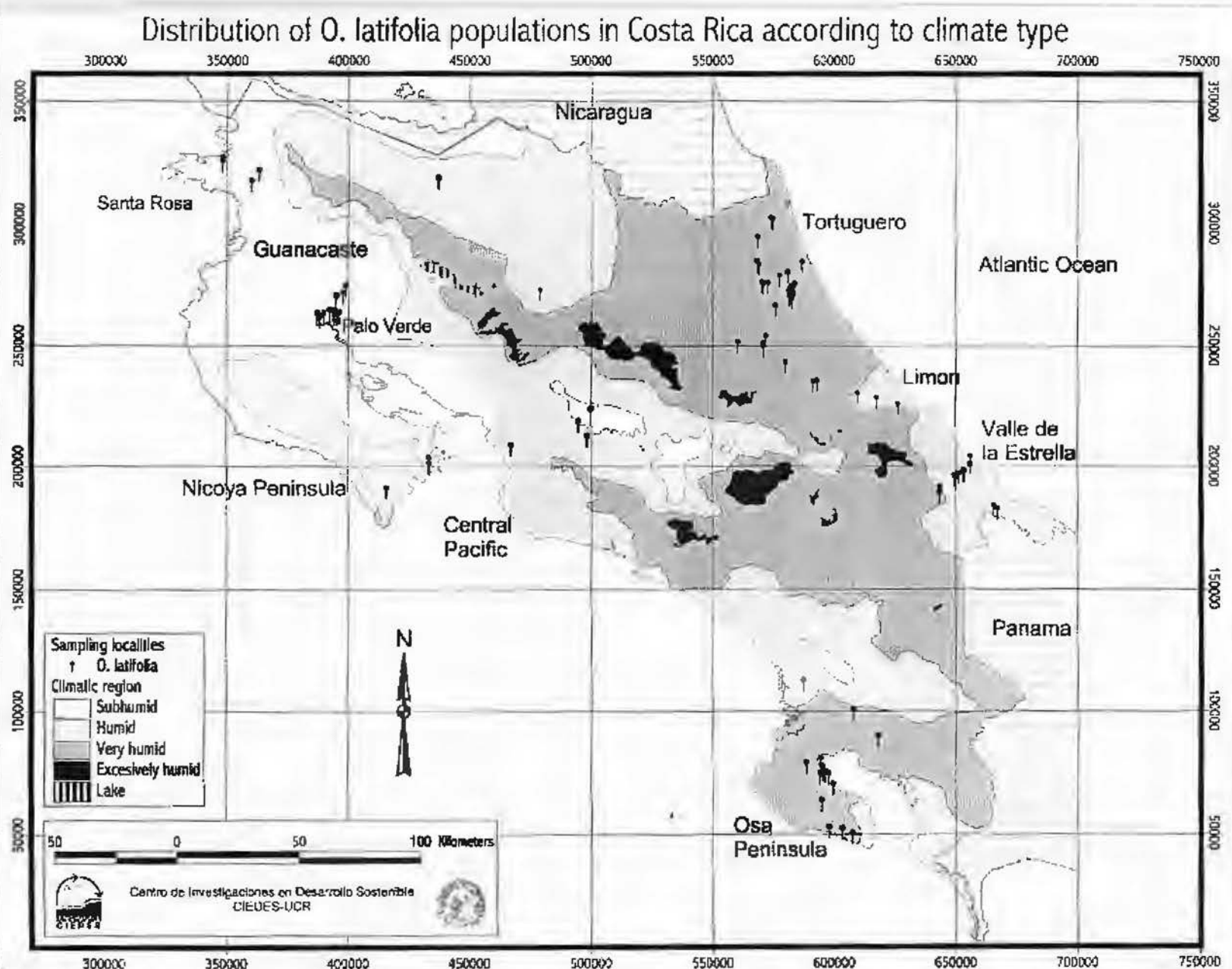
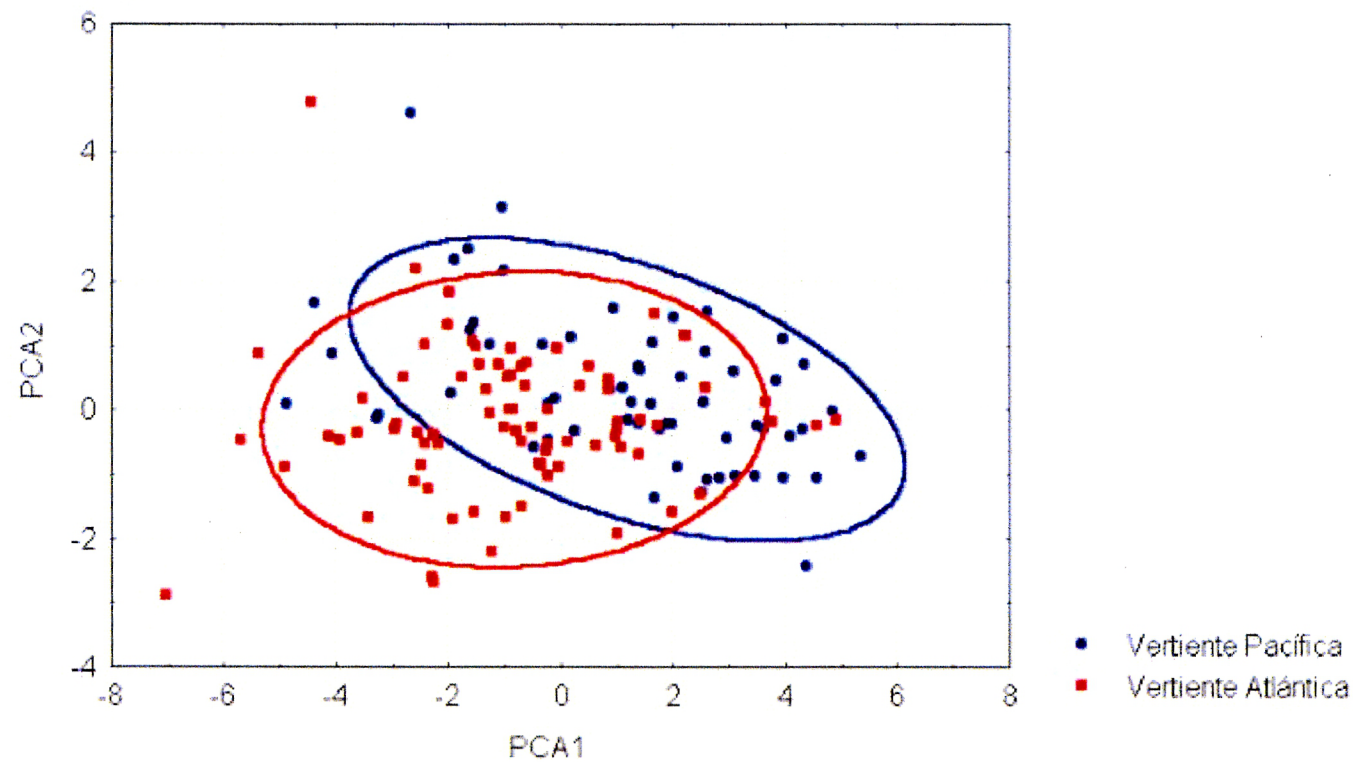


Fig. 1 Mapa de tipos de clima agrupados por tipo principal y distribución de las muestras de *Oryza latifolia*.

Fig. 2. Análisis de componentes principales de poblaciones de *Oryza latifolia* agrupadas por vertiente con elipses de confianza de 90%



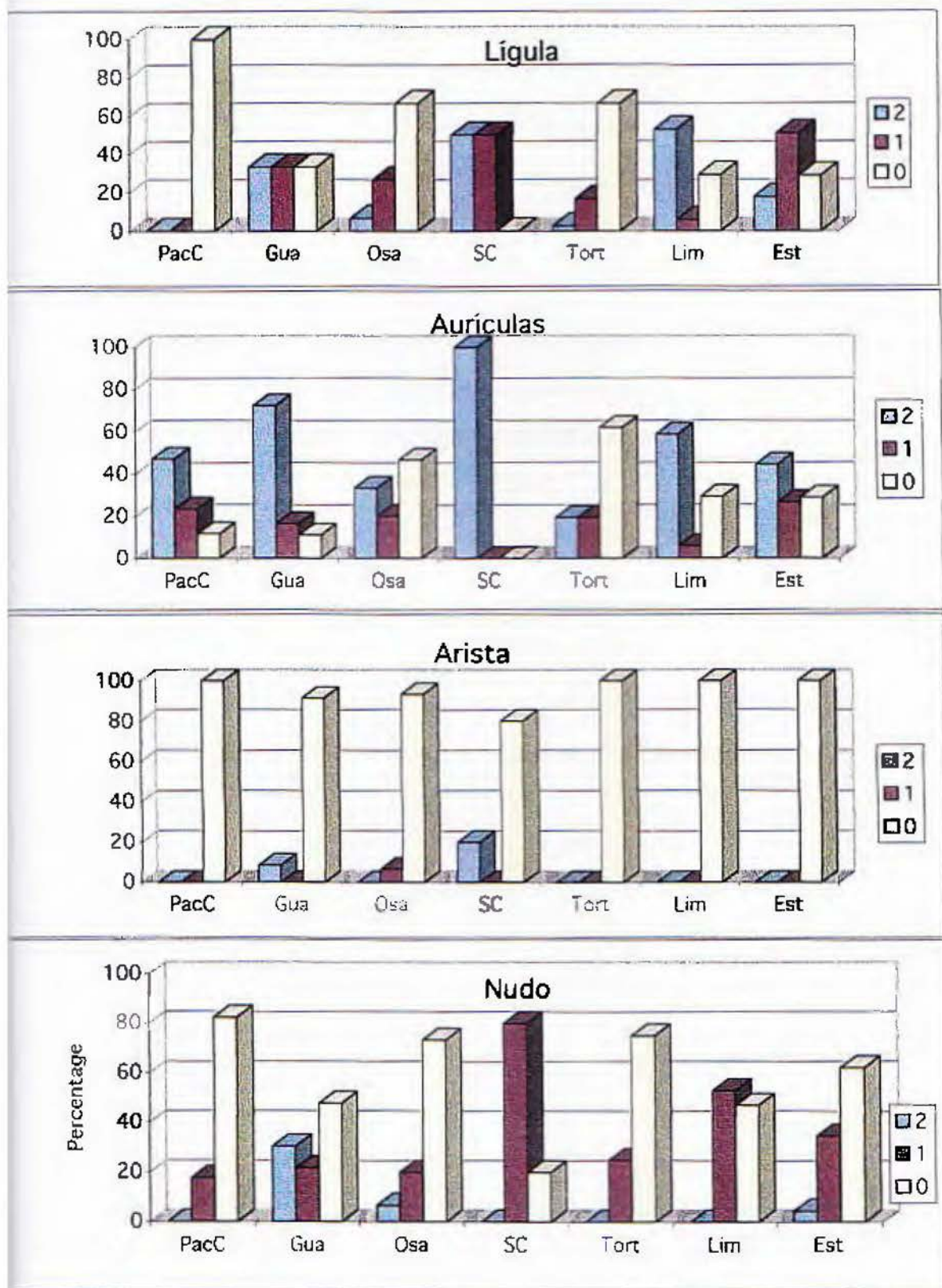


Fig. 3. Frecuencia de individuos de *O. latifolia* con coloraciones diferentes en algunas estructuras por población de origen. 2 morado, 1 rojo medio, 0 blanco.

Capítulo 6

Estructura genética de las poblaciones de arroz silvestre *Oryza glumaepatula* Steud (Poaceae) de Costa Rica evaluada mediante microsatélites

Alejandro Zamora-Meléndez^{1@}, Ana M. Espinoza^{1,2} y Jorge Lobo³

1. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica.
2. Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.
3. Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica.

Email: azamoram@cariari.ucr.ac.cr

ABSTRACT

The genetic structure of two populations of *O. glumaepatula* from Costa Rica was assessed using microsatellite primers designed for cultivated rice. Seven loci were examined and six were polymorphic (RM5, RM13, RM22, RM38, RM255, RM17), all of them consisted of dinucleotide repeats. There is a high degree of structuring in the population ($F_{IT}=0.866$), attributed to a high differentiation of the populations ($F_{ST}=0.713$) and to a moderate degree of inbreeding ($F_{IS}=0.453$). This may be the result of selfing or crosspollination with related plants in the near vicinity. The differentiation of the populations is mainly due to variations in the frequency of alleles, although different alleles also contribute. Private alleles were found for the populations of Guanacaste and Medio Queso situated 100 km apart. A cline was observed to occur (RM5 and RM38) at the Medio Queso River wetlands population, which may be formed by the limited but constant flow of genes between adjacent populations. Both limited seed dispersal (as inferred from the phenology and the morphology of the seed, and the reduced gene flow via pollen (due

to its short viability and dispersal) can explain the limited gene flow estimated to occur in this species. According to an AMOVA, most of the variation (71.3%) is due to differentiation of the populations, 4.23% is explained by the differentiation of the subpopulations, but 23% of the variation is found in the different genotypes of individuals within subpopulations. Also, there seems to be a correlation between size of the patch and the genetic diversity it holds. The genetic diversity and structuring of the Medio Queso wetland population indicates that Costa Rica *O. glumaepatula* is a unique and highly valuable genetic resource of rice, thus it is fundamental to preserve it *in situ*.

Keywords: Rice, germplasm, *Oryza glumaepatula*, genetic resources, genetic structure, reproductive biology.

Introducción

La historia de vida de las plantas juega un papel crucial en la determinación de la estructura genética de las poblaciones (Hamrick, 1989). El flujo de genes, determinado por los sistemas de apareamiento y la migración tienen una gran influencia en este sentido (Hamrick, 1989; Hamrick *et al*, 1993).

Estudios con isoenzimas han demostrado que las especies predominantemente autopolinizadas tienen valores más altos de diversidad media entre poblaciones que las plantas exocruzadas (Loveless and Hamrick 1984). De esta manera, la limitación al flujo de polen causada por la autofertilización es una causa importante de la diferenciación entre y dentro de las poblaciones de plantas, posiblemente más determinante que cualquier otro rasgo de la historia de vida de las plantas.

Sin embargo, otras características de como los mecanismos de dispersión de semillas, la anualidad versus perennialidad en los ciclos de vida, los sistemas de propagación (vegetativa o mediante semilla) y la dinámica de extinción y recolonización pueden también influenciar decisivamente los patrones de agrupamiento de la diversidad genética (Hamrick 1989).

Aún más, rasgos como la tasa de exocruzamiento, esfuerzo reproductivo, producción de semillas y frecuencia de extinción son altamente dependientes del contexto ecológico de cada población particular e individuo. Por ejemplo, la densidad de plantas (o mejor aún, de flores) tiene una gran influencia en la tasa de exocruzamiento en especies de autopolinización facultativa (Brown *et al.* 1989).

Los pastos anuales están adaptados a una frecuente extinción y recolonización, lo cual podría disminuir la variabilidad en poblaciones pequeñas donde hay un efecto mayor de la deriva genética (McCauley 1991). La reproducción clonal y la autofecundación, comunes en estas especies de plantas, son otros factores que tenderían a reducir la heterocigosidad promedio de estas plantas comparadas a plantas con otro estilo de vida, aunque no necesariamente la cantidad de variación genética total.

En el género *Oryza*, la variación genética entre y dentro las especies de genoma tipo AA ha sido estudiada con la esperanza de dilucidar sus relaciones filogenéticas (Ge *et al.*, 1999), el efecto de la domesticación y la historia de su cultivo (Tanksley y McCouch, 1997) y la estructura genética de las poblaciones naturales (Morishima *et al.*, 1992).

Estos estudios han incluido un amplio ámbito de marcadores morfológicos y moleculares como características morfológicas y fisiológicas (Morishima *et al.* 1992), isoenzimas (Barbier 1989), ADN de cloroplasto (Provan *et al.*, 1997). Recientemente, un gran número de microsatélites se han hecho disponibles para arroz (Chen *et al.* 1997) y permiten también estudiar especies silvestres de *Oryza* (Panaud *et al.*, 1996, Cho *et al.*, 2000).

Las especies de *Oryza* son particularmente apropiadas para estudios de genética ecológica porque sirven como modelos para otras especies de gramíneas que no cuentan con una buena cantidad de marcadores moleculares, así como también por la importancia

de preservarlos como recursos genéticos para el arroz cultivado, el principal cultivo del mundo.

En un inventario de especies silvestres de arroz llevado a cabo en Costa Rica, Zamora *et al* (Capítulo 2) encontraron tres especies, dos híbridos naturales, dos especies introducidas y varias variedades criollas de arroz. Entre las especies nativas se encontró *O. glumaepatula*, cuyas poblaciones tuvieron una distribución restringida a humedales en la región fronteriza norte de este país. Este artículo describe la variación alélica y genotípica para diferentes microsatélites en las poblaciones de *O. glumaepatula* de Costa Rica con el fin de realizar inferencias sobre su estructura genética y su relación con la historia natural.

Material y Métodos

Muestreo del material vegetal. Con el fin de estudiar la diferenciación genética de las poblaciones de *O. glumaepatula*, se tomó muestras de las dos poblaciones principales de Costa Rica, a saber, Murciélagos, en la Península de Santa Elena, Guanacaste y el Humedal del Río Medio Queso, en Los Chiles, Alajuela. Estas poblaciones están localizadas a 100 km de distancia y separadas por la Cordillera de Guanacaste (ver descripción ecológica en Capítulo 3). La población de *O. glumaepatula* de Medio Queso tiene cientos de miles de plantas distribuidas en parches de diversos tamaños en todo el humedal sobre un área total de ca. 20 Km². Este humedal es un área plana a 30 m.s.n.m., en la que el nivel freático varía entre los 30 cm bajo el nivel del suelo (verano 1998 con una sequía prolongada por efecto de El Niño) hasta más de 2 m sobre el suelo. Se encuentra localizado a los lados del Río Medio Queso, que desemboca en el Río San Juan, muy cerca del Lago de Nicaragua. No hay en Costa Rica ningún otro humedal con las características edáficas y florísticas de éste.

Evaluación de la estructura genética. Para evaluar si existe una subdivisión de la variabilidad genética dentro de la población del humedal del Río Medio Queso se tomaron muestras a lo largo de un transecto en dirección Norte-Sur en cinco localidades situadas a

lo largo del humedal, con una distancia cercana a los 2 Km de separación entre cada una de ellas. Estas poblaciones se denominan Refugio, Cortez, Delirio, Muro y Puerto Domingo, situadas en ese orden de norte a sur. Las poblaciones de Refugio y Cortez son un poco más pequeñas que las otras tres y están conformadas por parches de diversos tamaños, algunos hasta de ca 200 m². Las poblaciones de Delirio, Muro y Domingo tienen parches hasta de varias hectáreas de área. En Refugio, Cortez y Puerto Domingo, se colectaron plantas en dos diferentes zonas separadas al menos 100 m y denominadas subpoblaciones. Las plantas dentro de dichas zonas estaban separadas al menos 5 m una de otra. En la población de Delirio se ~~utilizaron~~ plantas colectadas en 40 cuadrículas de 10 m², separadas en dos grupos de 20 cuadrículas. Estos dos grupos se encontraban separados 200 metros. En la población de el Muro solo se colectó en una subpoblación.

La población de Murciélagos se ubica a 100 m oeste del cruce de la carretera Panamericana hacia la Península de Santa Elena, al norte de Guanacaste. Esta población es muy pequeña, estando conformada por alrededor de 50 plantas que crecen en una laguna estacional que se seca completamente y que está amenazada por diversas actividades humanas.

Se colectó plantas enteras de *O. glumaepanula* y se llevaron al invernadero donde se sembraron en potes con su número de identificación individual. Para extraer ADN se tomó tejido fresco de hojas jóvenes en elongación (0.3 g), que se envolvieron en un papel con su número de identificación escrito con marcador indeleble y manteniéndolos en una helera durante el proceso. Las hojas se cortaron en pedazos finos usando una tijera y se pulverizaron en morteros Coors de 50mm de diámetro, usando nitrógeno líquido para congelar el tejido. La tijera debe ser limpiada cada vez utilizando HCl o cloro para destruir restos de ADN. La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo de Lohdi *et al.* (1994), que utiliza un buffer CTAB precalentado (60°C). Después de varias pruebas para observar el efecto en la amplificación y la calidad del producto amplificado se eliminaron los pasos con proteinasa K y ARNasa, así como también la adición de PVP. Este último

es importante en plantas que tienen fenoles y otros compuestos oxidantes. Se realizó siempre dos extracciones con cloroformo: octanol (24:1) para mejorar la calidad del ADN. El ADN extraído se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada y autoclavada.

Los microsatélites utilizados (Research Genetics) fueron desarrollados para *O. sativa* por Panaud *et al.* (1996) y Chen *et al.* (1997), y se encuentran distribuidos por todos los cromosomas de esta especie, incluyendo locus con repeticiones di y trinucleotídicas. Se seleccionaron los microsatélites de *O. sativa* de forma que estuvieran localizados en cromosomas diferentes con el fin de estudiar la diversidad de *O. glumaepatula* de una forma representativa de todo el genoma. Los genomas de las especies AA son esencialmente idénticos (Bao, 1998) por lo que se supone que éstos microsatélites también se encuentran en diferentes cromosomas en *O. glumaepatula*. También se escogieron microsatélites compuestos de repeticiones dinucleotídicas porque estos se han reportado como más variables. El único microsatélite de repeticiones de trinucleótidos es el RM 19.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en termocicladores Perkin Elmer 9600 y PTC 100 (MJ Research). El perfil de temperaturas para la amplificación fue el recomendado por Research Genetics, i.e. 1min a 95°C, luego 30 ciclos de 1min a 95°C, 15s a 55°C, 30s a 72°C, con una extensión final de 7min a 72°C. La electroforesis de los amplicones se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea al 4% y teñidos con plata (Johansson y Skoog, 1987; Vari y Bell, 1996). Los geles se secaron a temperatura ambiente, se determinaron los alelos de cada individuo y se guardó una imagen digital de cada gel para registro.

La matriz de genotipos para todos los individuos y marcadores moleculares se analizó con el programa BIOSYS (Swofford and Selander 1981). Se calculó el porcentaje de loci polimórficos (P), la frecuencia alélica para cada marcador y población, el número promedio de alelos por locus por población y para todas las poblaciones (A). Un locus se

consideró polimórfico si tenía más de un alelo. Se calculó también la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) según las siguientes fórmulas:

$$H_o = 1 - \sum_{j=1}^r \left(\sum_{i=1}^{m_j} X_{ji} \right)^2 / r$$

$$H_e = 1 - \sum_{j=1}^r \sum_{i=1}^{m_j} X_{ji}^2 / r$$

donde r es el número de loci y m_j los alelos en el j -ésimo locus. X_{ji} y X_{ji}^2 indican la frecuencia observada del genotipo X_iX_i y la frecuencia estimada del i -ésimo alelo según lo esperado por el modelo de Hardy-Weinberg para el j -ésimo locus, respectivamente.

Se calcularon las estadísticas F de Wright (1965) o coeficientes de endocruzamiento. Estos son índices con un ordenamiento jerárquico de la distribución de la variación genética en las poblaciones. El coeficiente de endocruzamiento total F_{IT} puede descomponerse en las contribuciones del endocruzamiento F_{IS} y los efectos semejantes al endocruzamiento producidos por la estructuración genética de la población F_{ST} (Hartl, 1989).

Además, utilizando el programa ARLEQUIN (Arlequin 2.0, 2000) se calculó los valores de R_{ST} para todos los pares de poblaciones y promediados para todos los loci. El estadístico R_{ST} es más apropiado para el cálculo de la subdivisión de poblaciones cuando se usan microsatélites como marcadores, ya que toma en cuenta el proceso bidireccional de mutación que ocurre frecuentemente en los microsatélites, según el modelo de mutación por pasos (Slatkin, 1995; Provan *et al.*, 1997). Se calculó la probabilidad de que las frecuencias de los alelos para las subpoblaciones estuvieran significativamente desviadas de lo esperado según el modelo de Hardy-Weinberg mediante la prueba exacta de la cadena de Markov con 100000 pasos. También con el ARLEQUIN se realizó un análisis molecular de variancia (AMOVA) para conocer como se distribuye la variancia

genética entre poblaciones, entre subpoblaciones y dentro de subpoblaciones. Con el programa TREEVIEW se editó el dendrograma producido por el ARLEQUIN.

Con el programa RSTCALC se calculó también los valores R (ρ) para todos los pares de poblaciones y por gen individual. Se realizaron 1000 permutaciones distribuyendo los genotipos al azar para calcular un R_{ST} promedio bajo la hipótesis nula de que las poblaciones son iguales. Se realizaron 1000 bootstrap para calcular los intervalos de confianza al 95% de los valores R_{ST} .

Con el programa RELATEDNESS (Queller y Goodnight, 1989) se calculó el grado de parentesco entre los individuos de toda la población, entre las subpoblaciones y dentro de las subpoblaciones, esto último con el objetivo de evaluar la probabilidad de ocurrencia de reproducción vegetativa (clonal). Este algoritmo calcula el parentesco genético entre y dentro de grupos definidos demográficamente y brinda una medida basada en la regresión entre una población de referencia y la población con la que se desea calcular el parentesco.

Resultados

De los siete loci de microsatélites analizados para las poblaciones de *O. glumaepatula*, seis fueron polimórficos. El microsatélite trinucleotídico RM 19 fue monomórfico para todas las subpoblaciones de *O. glumaepatula*, aún cuando muestra variación entre especies de genoma AA (obs. pers.). Los loci polimórficos fueron RM5, RM13, RM17, RM22, RM38 y RM255, todos estos compuestos de repeticiones de dinucleótidos (Cuadro 1).

Los microsatélites RM5, RM13, RM17 y RM38 mostraron variación dialélica, con la excepción de un individuo heterocigota (300.13) que mostró un tercer alelo para RM38 en la población del Muro (Fig. 1 y 2).

Los marcadores RM22 y RM255 tenían cuatro alelos, en ambos casos uno de estos era un alelo privado para la población de Murciélagos, Guanacaste, mientras que los otros variaban en frecuencia en las diferentes subpoblaciones de Medio Queso (Fig. 1 y 2, Cuadro 2).

Las frecuencias alélicas varían notablemente de una subpoblación a la siguiente en Medio Queso (Cuadro 2). Aún cuando las poblaciones de Muro y Domingo se encuentran solamente a 2 Km de distancia presentan fuertes diferencias en las frecuencias alélicas. Sin embargo estas poblaciones comparten alelos que no se encuentran en otras poblaciones, tal como RM17.2, o alelos que no son comunes en otras poblaciones como RM13.2. En algunos marcadores como RM5, RM22 y RM38, las frecuencias alélicas varían gradualmente del extremo norte al sur de Medio Queso, formando un clino (Fig 1).

La población de Murciélagos está fijada para todos los loci estudiados. Esta fue la población más pequeña y aislada, con una población estimada de ca. 50 plantas distribuidas en un área reducida del humedal. De los 5 loci estudiados, dos (RM22 y RM255) muestran alelos privados para la población de Murciélagos. Esta población muestra además alelos diferentes a los de Medio Queso en varios otros microsatélites que se describen en el capítulo 2.

Todas las poblaciones en Medio Queso tienen variación genética por lo menos en un locus. La población de Refugio es la menos variable, con variación solamente en RM22, con un número medio de alelos por locus de 1.14. Sin embargo, tiene un exceso de individuos heterocigotos significativamente diferente a lo esperado por Hardy-Weinberg ($p=0.034$). Por el contrario, la población más variable es la del Muro, con polimorfismo en todos los loci excepto en RM19 y con un número medio de alelos de 2.14 alelos por locus. La población de Delirio también obtuvo el segundo valor más alto con 2.0 alelos por locus. (Cuadro 3)

Las poblaciones estudiadas tienen un exceso de homocigotos, posiblemente como producto del endocruzamiento ($F_{IS}=0.463$), posiblemente como consecuencia de un alto porcentaje de autopolinización. Si se considera que la autopolinización es la única causante del alto valor de F_{IS} calculado y que la población se encuentra en equilibrio, la proporción de selfing, sería $s=2f/(1+f) = 0.63$. Refugio es también la población más pequeña en Medio Queso, seguida por Cortez. Las otras tres poblaciones son mucho más grandes, comprendiendo varias hectáreas de población continua de *O. glumaepatula*. Esto puede apreciarse bien solamente durante el pico de la floración entre setiembre y noviembre.

En todas las poblaciones se observó una marcada asociación de alelos homólogos con una consecuente reducción en la heterocigosidad observada, que fue menor que la heterocigosidad esperada en todos los casos excepto para RM22 en Refugio (Cuadro 3).

Hay una clara diferenciación genética entre poblaciones a lo largo del humedal, de *O. glumaepatula* en Medio Queso, ($F_{CT}=0.601$). Esta diferenciación ocurre en la forma de nuevos alelos y diferencias en la frecuencia de los alelos compartidos entre las poblaciones.

Las estadísticas F de Wright para los marcadores RM5 y RM38, sugieren que el endocruzamiento es el principal agente causal para la diferenciación de las poblaciones. Esto se debe a que estos dos marcadores se presentan en forma homocigota en la mayoría de los individuos pero para diferentes alelos en diferentes poblaciones (Cuadro 4).

Contrariamente, los marcadores RM13, RM17 y RM22 indican que las nuevas variantes alélicas o las diferencias en las frecuencias alélicas provocan la diferenciación. La endogamia afecta a todos los loci por igual pero la historia de dispersión y mutación de los alelos en la población puede variar en el tiempo para diferentes loci. En dichos loci se observa que las poblaciones adyacentes comparten los mismos alelos, mientras que en las distantes hay otros diferentes (Cuadro 4).

El análisis de variancia molecular (AMOVA) realizado mostró que la diferenciación entre las poblaciones es grande y corresponde a un 71,31% de la variancia total. Por el contrario las subpoblaciones dentro de cada población tienen alelos y frecuencias de alelos semejantes por lo que la variancia debida a la diferenciación de éstas es baja (4,23%). Notablemente, la variancia debida a diferencias en los genotipos de individuos de la misma subpoblación resultó ser importante, explicando el 11,9% de la variancia total (Cuadro 5).

La población del Muro fue la que más diversidad de genotipos diferentes presentó, ya que había 11 genotipos en los 12 individuos. Por el contrario, en Murciélagos todos los individuos tienen el mismo genotipo. En promedio las subpoblaciones mostraron 5,3 genotipos diferentes (3,4 Desv. Estándar)

La filogenia calculada usando el método del vecino más cercano ("neighbor joining", Nei, 1973) con las distancias de RST (Fig. 3) muestra como la población de Murciélagos tiene una mayor separación respecto a las poblaciones de Medio Queso. Es evidente también como hay poca diferencia entre las subpoblaciones y como la población del Muro tiene una posición central y prácticamente indiferenciada con respecto al resto. Esta diferenciación de las subpoblaciones muestra a Refugio más cerca del Muro que de Cortez, lo cual no concuerda con la distancia geográfica, lo que puede deberse al efecto del azar provocado por la deriva genética en ésta población, la más pequeña de las muestreadas en Medio Queso.

Discusión

En las plantas, la agrupación espacial de los genes y genotipos es el resultado de las diferentes fuerzas como heterogeneidad ambiental, sistema de apareamiento, flujo de genes (mediante polen o semillas) y patrones de colonización. La interacción entre estos factores en el pasado evolutivo de una especie determina el patrón actual de la distribución geográfica de su variabilidad, tanto a nivel macro como microgeográfico.

El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de *O. glumaepatula* brinda información importante para entender la evolución de esta especie silvestre de arroz. Existe una estrecha interacción entre las características morfológicas, la historia de vida de las plantas y su estructura genética. Además, la cantidad y distribución de la variabilidad genética determinará la habilidad de la especie de responder a cambios en el ambiente, ya sean de origen natural o antropogénico.

En este estudio se consiguió la amplificación de microsatélites en *O. glumaepatula* con marcadores originalmente desarrollados para su pariente cultivada *O. sativa* var. IR64. Otras especies americanas *O. latifolia* y *O. grandiglumis* también pueden estudiarse con estos marcadores aunque con un menor porcentaje de éxito en la amplificación, debido posiblemente a la diferenciación genética producida por mutaciones en los sitios donde deberían unirse los imprimadores.

Esta es la primera vez que se estudia la estructura genética de una especie silvestre de arroz utilizando microsatélites. Otros estudios de este tipo han sido realizados mediante isoenzimas (Barbier, 1990; Akimoto, 1998) y RAPDs (Buso *et al.*, 1998), o han involucrado variedades del arroz cultivado o pocas muestras de especies silvestres (Cho *et al.*, 2000).

El índice de fijación para la población costarricense (0.453) es sustancialmente menor que el calculado por Akimoto (1998, $F_{IS}=0.931$) o Buso *et al.*, (1998, $F_{IS}=0.93$) para la población de *O. glumaepatula* del Amazonas. Esto podría ser un efecto del marcador utilizado, ya que estos dos grupos utilizaron isoenzimas y además la heterocigocidad observada es muy baja en los marcadores que usaron, siendo los máximos observados $H_o=0.007$ (Akimoto *et al.*, 1998) y $H_o=0.025$ (Buso *et al.*, 1998). Los F_{st} no son comparables cuando hay mucha diferencia en los niveles de heterocigocidad de cada marcador, como puede ocurrir cuando se comparan isoenzimas y microsatélites, ya que los valores de F_{st} tienden a ser menor en marcadores más polimórficos (Hedrick,

2000). Por lo tanto por el momento no es posible comparar objetivamente estas poblaciones y habrá que esperar a que se presenten datos con microsatélites de otras poblaciones naturales de *O. glumaepatula*.

En algunos casos la estructura genética de la población es causada por un gradiente ambiental, que inclusive han sido propuestos para diversas especies de arroz. Por ejemplo, Morishima *et al.* (1984) encontraron una tendencia a la diferenciación intrapoblacional en características adaptativas de una especie silvestre de arroz en hábitats con una marcada heterogeneidad ambiental. Este podría ser el caso de la alta variabilidad morfológica (capítulo 5) y genética de *O. latifolia* en Palo Verde (Quesada, en preparación), debido a que se le encuentra en sitios abiertos o con diversos grados de cobertura boscosa, así como también en sitios que se inundan mucho, que no se inundan o a la orilla de ríos donde la humedad se mantiene durante más tiempo.

En el caso de *O. glumaepatula* de Medio Queso las diferencias ambientales no son obvias. Se puede notar que en Refugio, Cortez y Delirio, *O. glumaepatula* se encuentra principalmente rodeada de *Cyperus articulatus*, mientras que en Muro y Domingo hay gran cantidad de *Thalia geniculata*. Esto a su vez indica que hay un gradiente en elevación y que la población de Domingo que se sitúa más al Sur está situada a una elevación levemente superior que la de Refugio, localizada en el extremo norte del humedal y más cerca del Río San Juan.

Sin embargo, la diferenciación genética en las poblaciones que se presenta aquí es el resultado de la variación en marcadores teóricamente neutrales y que además están localizados en diferentes cromosomas por lo que no es probable que un proceso de selección este afectando la variación en todos los loci utilizados. De manera que la estructura genética observada parece ser el resultado de fuerzas diferentes a la selección natural.

Puede ser por lo tanto un resultado combinado de la capacidad de migración y flujo de genes de la planta, de los procesos estocásticos típicos de la deriva genética y de la producción de nuevos alelos por mutación. Este proceso es predicho por modelos de migración donde hay un efecto de aislamiento por distancia, donde la probabilidad de migración entre dos poblaciones es una función de la distancia geográfica. En esos casos, la formación de "clinos" de frecuencias alélicas es probable, debido a la interacción de la deriva genética y la migración. En el caso de *O. glumaepatula* de Medio Queso, es probable que la existencia de clinos sea beneficiada por tasas de migración génica muy bajas.

Algunas características de la dispersión de semillas y de polen de esta especie, como la dispersión de semillas por gravedad y polinización eólica, parecen concordar con una estructura de migración a corta distancia. La eficiencia de la polinización eólica es inversamente proporcional a la distancia y por lo tanto los cruces entre plantas diferentes son más probables en plantas cercanas. Además, el polen tiene una viabilidad de apenas unos 5 a 9 minutos debido a la deshidratación, por lo que debe llegar a un estigma rápidamente (Roberts *et al.*, 1961; Oka y Morishima, 1967). Estas características del polen y su dispersión posiblemente han llevado a algunas de las especies de *Oryza* a ser autógamas o alógamas facultativas.

Morishima y Oka (1970) mostraron en *O. rufipogon* de Asia, que la cantidad de variabilidad dentro de la población en relación al componente interpoblacional es un parámetro dependiente de la historia de vida de cada especie y que es fundamental para obtener una muestra de germoplasma representativo. Los cultivares *O. sativa* y *O. glaberrima* son predominantemente autógamos, mientras que las especies silvestres de genoma AA tienen variación en cuanto a su sistema de apareamiento. Según las estimaciones de Morishima *et al.* (1992), las especies silvestres tienen más granos de polen en sus anteras, estigmas más grandes y un tiempo mayor entre la apertura de la flor y la liberación del polen, características que aparentemente promueven la alogamia. Los cálculos realizados por Oka y Morishima (1967) indican que *O. glumaepatula* tiene al

menos un nivel medio de alogamia, entre un 20-60 por ciento, comparado con *O. barthii* (5-20%) y *O. longistaminata* ca. 100%.

En las poblaciones naturales de la especie silvestre asiática *O. rufipogon*, así como también en los cultivares de arroz comercial (*Oryza sativa*), se ha observado una alta variación intrapoblacional y diferencias geográficas (Morishima *et al.*, 1992). Además, se ha determinado que las poblaciones perennes de *O. rufipogon* tienen una variabilidad genética mayor dentro de las poblaciones que aquellas que son anuales, según lo estimado por Morishima y Oka (1970) con características morfométricas e isoenzimas. Por otro lado, el cultivar de arroz africano *O. glaberrima*, así como su predecesor silvestre *O. barthii*, tienen una diversificación menor y muestran una variación genética reducida en comparación con la contraparte asiática, tal y como se esperaría para especies predominantemente autopolinizadas (Morishima *et al.*, 1992).

En una población intermedia entre anual y perenne Morishima *et al.*, (1992) no encontraron dicha tendencia hacia estructura geográfica familiar. La diferencia en la distribución microgeográfica de genes neutrales puede ser explicada por diferencias en el comportamiento reproductivo de las dos poblaciones (producción de semillas vs propagación vegetativa). Sin embargo, ambas poblaciones (perenne e intermedia) mostraron diferenciación intrapoblacional en sus características de historia de vida (Morishima *et al.* 1984)

Las tasas de exocruzamiento pueden ser altamente variables entre diferentes especies de arroz. Oka and Morishima (1967) determinaron que poblaciones asiáticas de *O. rufipogon* (= *O. perennis*) tenían entre un 20% a 45% de alogamia, según los resultados de la variación genética en progenies. También, Barbier (1989) estimó las tasas de exocruzamiento de plantas individuales en una población de *O. rufipogon*, que varió entre 11 y 90%, indicando una alta variación dentro de una población, demostrando la alogamia facultativa y siendo probablemente el resultado de factores ecológicos y aleatorios.

Por el contrario, la especies cultivadas *Oryza sativa* y *Oryza glaberrima*, son casi completamente autopolinizadas. Este patrón demuestra una tendencia hacia la autofecundación durante la domesticación de *Oryza*, posiblemente como producto de la selección de plantas con mayor productividad y menor carga genética.

En el caso de *O. glumaepatula* de Costa Rica, las tasas de autofecundación estimadas concuerdan con los datos de Oka y Morishima (1967) y Barbier (1989) ya que la heterocigosis observada (H_o) es cercana a un 10%, y muy superior a las observadas en *O. glumaepatula* de Amazonas donde se ha encontrado entre un 1 a 0,3 % de heterocigosis (Akimoto et al . 1998; Buso et a . 1998)

En relación a la diversidad genética de otras poblaciones de *O. glumaepatula* de América, Akimoto (1998) reportó una variabilidad isoenzimática baja ($H_e = 0.044$) para la población de Amazonas comparada con aquella registrada para otras especies de arroz ($H_e = 0.085-0.350$). Las posibles causas de esta homogeneidad genética propuestas por Akimoto son las siguientes: reducciones significativas en el tamaño de las poblaciones debidas a inundaciones severas; poca oportunidad para el flujo de genes entre especies diferentes; y un flujo de genes a larga distancia debido a el acarreo por la corriente del río de las poblaciones flotantes con la consecuente dispersión de las semillas a lo largo de grandes distancias.

De estas razones, la última es probablemente la más válida y razonable para explicar la homogeneidad genética de *O. glumaepatula* en el Amazonas, así como también la que más contrasta con las observaciones hechas sobre la historia de vida y estructura genética de *O. glumaepatula* de Costa Rica aquí presentadas

En la población costarricense no se forma una pradera flotante de *O. glumaepatula* debido a que el microhábitat de las plantas es el llano y no la orilla del río. También por que el nivel de inundación rara vez sobrepasa los 2 m. por lo que la población costarricense no tiene que recurrir a estrategias como el de la ruptura del tallo para

mantenerse con vida como si lo hacen las plantas de Amazonas. Por esto, las plantas de *O. glumaepatula* de Costa Rica no se dispersan flotando en el río, como sí ocurre con *O. grandiglumis* y los dos híbridos costarricenses, y tampoco su semilla se dispersa de esta manera. De manera que la probabilidad de dispersión a larga distancia de las plantas de Costa Rica es aparentemente menor que la de las poblaciones del Amazonas.

Esto se refleja en diferencias notorias en la estructura genética, con índices de fijación de 0.93 en la población de Amazonas, comparados con 0.453 en Costa Rica. Aún cuando estos valores no son del todo comparables las grandes diferencias en las estimativas sugieren que sí hay una diferencia verdadera y que la población de Costa Rica es más variable y menos endocruzada que las poblaciones del Río Amazonas y del Río Paraguay. De nuevo esto queda sujeto a comprobación, pero esta comprobación debe ser con microsatélites en las poblaciones de América del Sur, debido a que éstos marcadores tienen una mayor capacidad de resolución (Cuadro 6).

Por otro lado, las plantas de la población costarricense de *O. glumaepatula* tienen una alta capacidad de propagarse vegetativamente cuando la disponibilidad de agua así lo permite. Pueden producir estolones decumbentes que se elongan varios metros de los cuales se formarán varias decenas de clones, con lo cual las plantas en un área de varios metros cuadrados pueden ser el producto de la propagación vegetativa de una sola planta. Este tipo de fenómeno podría explicar la abundancia de plantas heterocigotas para los alelos 1 y 3 del marcador RM22, encontradas en la población de Refugio. Refugio es la única población en la que la heterocigosidad esperada es menor que la observada, lo que podría atribuirse a eventos de recolonización y reproducción clonal vegetativa. Un evento aleatorio podría haber favorecido la reproducción clonal de un individuo heterocigota para RM22 en el área de muestreo. Esto además debería haber ocurrido en un tiempo muy reciente debido a que la frecuencia de individuos heterocigotos decrece un 50% en cada generación que se autopoliniza (Hartl, 1989)

Estas características ecológicas de la historia de vida de la planta y morfológicas de la semilla indudablemente influyen en la diferenciación de las subpoblaciones dentro del humedal del Rio Medio Queso y hacen que la población costarricense tenga una variabilidad genética mayor que la de Amazonas.

Akimoto (1998) encontró un alto índice de fijación dentro de poblaciones de *O. glumaepatula* en el Amazonas ($F_{IS}=0.931$) lo que muestra un alto nivel de endocruzamiento, lo cual puede ser el resultado de autopolinización o de apareamiento con parientes cercanos. La población costarricense parece tener un nivel menor de endogamia ya que el índice de fijación fue de ($F_{IS}=0.4781$). Queda la duda de si esta diferencia se debe a las diferencias en los niveles de heterocigosidad de cada marcador. La diferenciación entre las poblaciones de Amazonas fue moderada ($G_{ST}=0.398$) y menor que la encontrada en las subpoblaciones de *O. glumaepatula* de Costa Rica ($F_{ST}=0.5819$). Esto se dio a pesar de que la separación de las poblaciones de Amazonas es del orden de decenas de kilómetros, mientras que la de las poblaciones de Costa Rica es de aproximadamente 2 Km en Medio Queso.

En otro estudio, Buso *et al.* (1998) también calcularon altos valores para los coeficientes de endocruzamiento y diferenciación entre las poblaciones brasileñas de *O. glumaepatula*, usando marcadores isoenzimáticos y RAPDs. Ellos concluyen que en el Amazonas, la baja diversidad genética es el resultado de la historia de vida anual y los eventos repetitivos de extinción y recolonización.

Akimoto (1988) también concluyó que una de las razones por las cuales la diversidad de la población Amazónica es baja es por la falta de hibridización interespecífica en esta especie, en contraposición a lo observado con *O. rufipogon*, *O. nivara* y *O. sativa* en Asia. En efecto, en América no parece que ésta sea una fuente probable de enriquecimiento de la diversidad genética debido a varias condiciones diferentes a las de Asia.

La alta homocigosis observada, así como también la diferenciación interpoblacional parecen existir debido en parte a endocruzamiento, principalmente por autopolinización, pero también a la gran capacidad de propagación vegetativa de éstas plantas perennes en el humedal de Medio Queso y la limitada capacidad de dispersión de polen y semillas (ver Capítulo 3 para una discusión sobre la morfología de la semilla y su función).

Un factor que podría haber influido en la diferencia de frecuencias alélicas entre la población de Domingo y Muro, podría ser que esta última se encuentra al lado oeste del Río Medio Queso, mientras que Domingo está al lado este. A pesar de que éste río tiene apenas unos 15 a 20 m de ancho, ésta distancia es suficiente para hacer más difícil el flujo de genes entre poblaciones adyacentes y es la distancia usada normalmente para mantener lotes de diferentes variedades y asegurar su pureza.

El clino observado puede ser el resultado de la migración del polen a corta distancia, que es en éste caso la principal fuente de flujo de genes, y que produce una correlación entre distancia genética y distancia geográfica entre las subpoblaciones, así como también una estructura familiar dentro de las subpoblaciones (Avice, 1994).

La población de Murciélagos, Guanacaste puede tener una gran influencia de la deriva genética debido a su reducido tamaño. Es por esta razón posiblemente que se muestra fijada para todos los loci. Es interesante notar, sin embargo, que cinco de los loci tienen alelos que también se encuentran en la población de Medio Queso, mientras que dos mutaron a formas diferentes exclusivas de la población de Murciélagos, es decir, alelos privados para ésta población. Los alelos privados que muestra la población de Murciélagos sugieren que ésta población no se originó de un evento reciente de dispersión a partir de la población de Medio Queso.

Uno de los puntos más controversiales en cuanto a la liberación de plantas transgénicas al campo es la posibilidad de que los transgenes puedan pasar por cruzamiento a especies relacionadas. De esta manera, es importante evaluar bien esta posibilidad utilizando diferentes estrategias. En primer lugar es importante conocer la filogenia de las especies involucradas para conocer cuales son las más relacionadas. Posteriormente, se deben realizar pruebas controladas en condiciones de invernadero para saber cual es el potencial máximo de cruzamiento entre la variedad cultivada y las especies silvestres. Por último, se debe conocer si la F1 es fértil y capaz de convertirse en un puente entre la variedad cultivada y la especie silvestre.

Sin embargo, es fundamental conocer la estructura genética y la diversidad alélica de la especie silvestre previo al cultivo de la variedad en la zona, posibilitando la identificación de híbridos interespecíficos que se puedan producir en el futuro. En el caso de *O. glumaepatula* de Costa Rica este objetivo se ha empezado a desarrollar y aunque el número de marcadores utilizados es reducido (25 en total), conocemos que los alelos de las otras especies que se encuentran en Costa Rica (*O. sativa*, *O. rufipogon*, *O. glaberrima*, *O. grandiglumis* y *O. latifolia*) son diferentes (Ver Capítulo 2 y 4). Estos datos permitirían detectar un proceso de introgresión en cualquier dirección, ya sea de la planta cultivada hacia la especie silvestre, como al contrario. Por supuesto que lo que más interesa es el flujo potencial de una especie transgénica hacia la silvestre debido a la incertidumbre del efecto que dicho evento podría tener en la población natural. Además de que en arroz, debido a que las variedades cultivadas se autopolinizan, el flujo de genes de una especie silvestre hacia una cultivada es menos probable aunque no imposible.

Los experimentos de cruces interespecíficos realizados por Sobrizal (1999) entre *O. glumaepatula* y *O. sativa* spp. *japonica* y Chu y Oka (1970) entre *O. glumaepatula* y *O. rufipogon*, parecen indicar que el porcentaje de éxito en obtención de semilla es bajo y que la F1 de cruces es estéril en el polen, aunque en algunos casos no en los óvulos. Por lo tanto, la probabilidad de cruzamiento accidental es baja, pero cuanto mayor es el área de cultivo en contacto con la población natural y el tiempo considerado, esta probabilidad

incrementa. Es por esta razón, que sugerimos que no se siembre arroz transgénico, cuando éste se encuentre disponible, a menos de 20 Km del borde del humedal de Medio Queso. Esta distancia conservadora se calcula de el doble de la longitud del humedal, ya que las poblaciones en sus extremos son más diferentes en sus frecuencias genéticas que la población de Murciélagos a 100 Km de distancia. Incluso, las variantes alélicas en los extremos son diferentes, lo que es notable debido a que ésta es una población casi continua de plantas al menos facultativas en cuanto al exocruzamiento y muestra que el flujo de polen a través de 20 Km es despreciable.

En el caso de los arrozales contaminantes de arrozales, comúnmente llamados arroz rojo, la probabilidad de cruce con el arroz cultivado es grande debido a la cercanía filogenética de las especies y variedades que lo componen (Arrieta *et al.* en preparación) y a la abundancia de éstos en los arrozales. Por lo tanto, es necesario desarrollar variedades transgénicas que tengan un tiempo de días a floración distinto al del arroz rojo. También se debe regular que los sitios donde se cultiven especies transgénicas tengan un mínimo de arroz rojo y que las variedades transgénicas se siembren en la época y la zona geográfica para la que fueron diseñadas. Todas estas regulaciones deben llevarse a cabo para disminuir la probabilidad de que un gen que se introduzca en el arroz cultivado pueda eventualmente pasar a un arroz maleza. A diferencia de las especies silvestres donde en condiciones naturales incluso un gen beneficioso puede desaparecer por procesos meramente aleatorios, un transgen que favorece a las plantas cultivadas también favorecerá a los arrozales malezas.

Conservación del germoplasma y el futuro de los recursos genéticos para el arroz en Costa Rica

La estructura genética, es decir, la distribución geográfica de la variabilidad, es un factor importante en el destino evolutivo de las poblaciones (Hartl, 1989). No sabemos si la estructura genética vista con marcadores moleculares neutros corresponde a una estructura genética de rasgos adaptativos, especialmente debido a que los marcadores usados pueden ser mucho más variables que los genes o que los dominios verdaderamente

importante de los genes. Sin embargo, se puede suponer que una población que muestra variación en diferentes marcadores tiene una probabilidad mayor de tener variación en características adaptativas que una población completamente homogénea. De la misma manera se debe proteger, tanto *in situ* como *ex situ* un conjunto de plantas, poblaciones o accesiones que reflejen el máximo de diversidad de la especie.

La mayoría de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones y no tanto entre las poblaciones, y aparentemente existe una correlación entre tamaño del parche y diversidad genética del mismo. La estructura genética de *O. glumaepatula* indica que aquellas subpoblaciones con la mayor área total, i.e., Delirio, Muro y Domingo, son las mayor diversidad genética. Es posible que éstas sean las que tienen una mayor probabilidad de sobrevivir en el tiempo, si la variación en marcadores neutros refleja también variación en características adaptativas.

Hay una relación causa-efecto entre el tamaño de las poblaciones y su diversidad y es el que produce la deriva genética. Las poblaciones pequeñas sufren una influencia mayor de ésta fuerza que produce un efecto homogenizador. Por esto las poblaciones de Murciélagos especialmente, pero también Refugio y Cortez son menos diversas que las de Delirio, Muro y Domingo. Incluso la población más diversa fue la de Muro, aún cuando el tamaño de la muestra en ésta fue menor que en las otras, debido a que es una de las poblaciones más grandes con varias hectáreas continuas de plantas.

Ahora bien, las poblaciones grandes pueden mantenerse en el tiempo debido a que tienen una variabilidad mayor lo que le permitiera a mas individuos sobrevivir durante epidemias y recolonizar el área rápidamente, mientras que en el caso de las poblaciones homogéneas y pequeñas la extinción puede ser común y la recolonización lenta y con un efecto fundador muy fuerte. La población de *O. glumaepatula* de Medio Queso es un sitio ideal para diseñar experimentos a largo plazo sobre la dinámica de extinción y recolonización debido a la existencia de parches de plantas de diversos tamaños y su relación con la variabilidad genética de éstas.

Interacción entre la ecología y la estructura genética de la población

Como se describió en el capítulo 4, la semilla de *O. glumaepatula* se excluye de todos los síndromes descritos de dispersión. El tamaño de la semilla, la arista de gran tamaño y con espinas retrorsas, i. e. dirigidas hacia afuera del centro de masa; sin arilo, ala o pericarpo carnosos, nula flotabilidad, hacen en conjunto que la semilla lejos de dispersarse, quede en el sitio donde se produjo. De manera que la presión selectiva hacia tener una semilla más grande para competir mejor en la recolonización de el hábitat, también lleva a la planta a encontrarse con la presión de defender mejor sus semillas de los depredadores, lo que hace mediante espinas en la cariopside, en la arista, así como también con una unión débil a la panícula, por lo que son caedizas y en la sincronización para producir un efecto de mayor oferta que demanda de semillas.

La alta estructuración observada en el Medio Queso sugiere un grado muy bajo de migración que está dado por la ineficiencia en la polinización eólica y la incapacidad de dispersión de la semilla. Hamrick *et al.* (1993) encontro que el modo de dispersión de la semilla tiene un papel preponderante en la determinación de la estructura genética de árboles en el trópico, interactuando con la densidad de las plantas. En dicho estudio se determinó que una densidad baja y una capacidad limitada de dispersión son parámetros que producen una alta estructuración genética.

Los eventos de extinción por sequia o inundación excesiva pueden jugar un papel importante en la determinación de la estructura genética, aumentando el papel del efecto fundador en la recolonización del hábitat.

Conservación *ex situ*

Dada la importancia de las especies silvestres como recursos genéticos para el arroz comercial, organismos como el IRRI (Filipinas) se han dedicado a coleccionar semilla en todo el mundo y establecer bancos de germoplasma. Sin embargo, debido a que en los bancos de germoplasma el número de accesiones ha aumentado grandemente, se ha desarrollado una necesidad de discriminar cada vez más eficientemente entre accesiones repetidas y únicas. Con este fin se ha determinado un valor de 60% de similitud como umbral para mantener dos accesiones relacionadas.

De esta manera, según el análisis de RST, las poblaciones que se deberían incluir como accesiones serían Domingo y otra de cualquiera de las otras poblaciones. Sin embargo, como ya se mencionó, la población de Murciélagos tiene alelos privados para varios marcadores lo que la hacen diferente de las de Medio Queso por lo que también debe incluirse como una accesión diferente. Esta población además parece tener características más anuales que la de Medio Queso que es perenne o al menos intermedia. Por lo tanto, debido a la variabilidad genética que contienen, las poblaciones de Domingo, Muro, Delirio y Murciélagos deberían incluirse como accesiones diferentes en bancos de germoplasma. Las poblaciones de Refugio y Cortez podrían excluirse de la conservación *ex situ* debido a que sus variantes alélicas se encuentran incluidas en las demás poblaciones de Medio Queso.

Sin embargo dado que la población de *O. glumaepatula* de Medio Queso es única en sus características y al valor que esta especie tiene como recurso genético para el arroz cultivado, lo óptimo sería que se preservara completa *in situ*. Esto garantizaría no sólo la disponibilidad del recurso para las futuras generaciones de investigadores y fitomejoradores sino que es la única manera en la que se puede dar continuidad al proceso evolutivo en esta especie costarricense. En el campo es posible que se siga dando la mutación, recombinación y otros mecanismos de cambio genético que permiten a los individuos responder a las presiones selectivas impuestas por las presiones ambientales y biológicas. Es decir, la conservación de la población natural es necesaria para que se pueda obtener material resistente a las nuevas variantes de patógenos. Además, es la

única manera de asegurar que se mantiene el máximo de diversidad, sin riesgo de perderlo debido a la pérdida de viabilidad de las semillas. Por otro lado, la conservación de éste recurso *in situ*, permite la conservación del hábitat entero con todas las especies que conforman el ecosistema, que en el caso del humedal de Medio Queso, son muchas y muy valiosas para el desarrollo del ecoturismo y como fuente de padrotes para criaderos o viveros.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a el Instituto Internacional de Investigaciones en Arroz (Filipinas) por el financiamiento y el apoyo a esta investigación. El Centro de Investigación en Desarrollo Sostenible (CIEDES), especialmente a su director Dr. Carlos Quesada, por el apoyo con el sistema de información geográfico. Al Dr. Pedro León por su amabilidad en permitirme aprender y llevar a cabo el análisis de microsátélites en su laboratorio. A Reynaldo Pereira y Andreas Busse, por darme toda la información necesaria para tener éxito muy rapidamente en la electroforesis en acrilamida y la tinción con plata.

o 1. Secuencia de los imprimadores, composición de los microsatélites, número de alelos y tamaño en pares ses.

atélite	Cromosoma	Secuencia del primer	Tamaño en IR36 (pb)	Motivo	Tamaño en O. <i>glumaepatula</i>	Alelos en O. <i>glumaepatula</i>	Referencia
15	1	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA GCATCCGATCTTGATGGG	113	TTAA(GA)14GGCT	ca.100	2	a
113	5	TCCAACATGGCAAGAGAGAG GGTGGCATTTCGATTCCAG	141	ATTA(GA)6TA(GA)T A(GA)16TTGG	125,145	2	a
117	12	TGCCCTGTTATTTTCTTCTCTC GGTGATCCTTTCCCATTTCA	184	CACA(GA)21AGAA	ca. 180	2	a
119	12	CAAAAACAGAGCAGATGAC CTCAAGATGGACGCCAAGA	226	CTGT(ATC)10GTCA		1	a
122	3	GGTTTGGGAGCCCATAATCT CTGGGCTTCTTTCACTTCGTC	194	GAGC(GA)22GTCC	ca. 190	4	a
138	8	ACGAGCTCTCGATCAGCCTA TCGGTCTCCATGTCCAC	250	GA16	ca. 250	3	b
1255	4	TGTTGCGTGTGGAGATGTG CGAAACCGCTCAGTTCAAC	144	(AGG)5(AG)2ATC(A G)(GA)16	132,136,138	4	b

naud et al., 1996; b: Chen et al., 1997.

poblaciones de *O. glumaepatula* de Costa Rica

Loci y alelos	Poblaciones					
	Murcielago	Refugio	Cortez	Delirio	Mura	Domingo
RM5.1	1.000	1.000	0.283	0.577	0.727	0.000
RM5.2	0.000	0.000	0.717	0.423	0.273	1.000
RM13.1	1.000	1.000	1.000	0.962	0.708	0.396
RM13.2	0.000	0.000	0.000	0.038	0.292	0.604
RM17.1	1.000	1.000	1.000	1.000	0.667	0.444
RM17.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.333	0.556
RM22.1	0.000	0.333	0.000	0.192	0.500	0.958
RM22.2	0.000	0.667	0.152	0.019	0.042	0.021
RM22.3	0.000	0.000	0.848	0.788	0.458	0.021
RM22.4	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
RM38.1	1.000	1.000	1.000	0.923	0.792	0.188
RM38.2	0.000	0.000	0.000	0.077	0.167	0.813
RM255.1	0.000	0.000	0.913	0.042	0.000	0.000
RM255.2	0.000	1.000	0.087	0.917	0.250	0.522
RM255.3	0.000	0.000	0.000	0.042	0.750	0.478
RM255.4	1.000	0.000	0.000	0.333	0.000	0.000
n	12	21	20	26	12	24

Cuadro 3. Polimorfismo, diversidad genética (HE) y heterocigosidad observada en *O. glumaepatula* de Costa Rica.

Población	Muestra	A	P	Ho	HE
Murciélago	12	1	0	0	0
Refugio	21	1.1	14.3	0.082	0.065
Cortez	23	1.4	42.9	0.025	0.12
Delirio	26	2	71.4	0.027	0.175
Muro	12	2.1	85.7	0.24	0.375
Domingo	24	1.9	71.4	0.185	0.274
Total	118	1.6*	47.6*	0.0931*	0.168*

A: alelos por locus, un locus se determinó como polimórfico si se encontró más de un alelo. P: porcentaje de loci polimórficos. HE: heterocigosidad esperada (diversidad genética). Ho: heterocigosidad observada.

* Promedio de todas las poblaciones

Cuadro 4. Estadísticas F de Wright (1965), RHO (Rst calc) (Slatkin, 1995) y RST (Arlequin) para cada loci y el promedio calculado para las poblaciones de *O. glumaepatula* de Costa Rica a partir de la frecuencia de alelos de microsatélites.

Locus	Fis	Fst	Fit	RHO (Stcalc)
RM 5	0.8105	0.5469	0.9141	0.65723
RM13	0.2375	0.4241	0.5906	0.50154
RM17	-0.0227	0.4048	0.3913	0.73766
RM22	0.2622	0.6011	0.7057	0.73127
RM38	0.7356	0.6064	0.8959	0.59255
RM255	0.6578	0.6857	0.8925	0.88431
Promedio	0.4781	0.5819	0.7818	0.7628 ± 0.0017EE

Promedio de RHO y error estandar calculados haciendo 1000 bootstrap.

Cuadro 5. Estructura genética de la población de *O. glumaepatula* de Costa Rica entera y sólo para la población de Medio Queso, explicada por la proporción de los componentes de la variancia molecular observada (AMOVA)

	Todas las poblaciones						Sólo Medio Queso					
	R	v	Porc	F	V	Porc	R	V	Porc	F	V	Porc
Entre grupos/total (FCT)	0.713	2.08	71.35	0.588	0.912	58.8	0.601	1.37	60.11	0.55	0.846	55.02
Entre poblaciones/grupos (FST)	0.147	0.123	4.23	0.196	0.125	5.11	0.129	0.118	5.16	0.175	0.121	7.89
Entre individuos dentro de poblaciones (FIS)	0.453	0.323	11.09	0.462	0.237	14.2	0.453	0.36	15.76	0.463	0.264	17.16
Total (FIT)	0.866	2.922		0.822	1.54		0.81	2.288		0.8	1.538	

Todos los valores significativos $p < 0.001$ según la prueba de significancia con 1023 permutaciones

² Rst (Slatkin, 1995); F: F de Wright (1965). V: componentes de variancia; Porc: porcentaje de variancia explicada

Cuadro 6. Grado de parentesco (R) entre los individuos dentro de las poblaciones de *O. glumaepatula* de Costa Rica

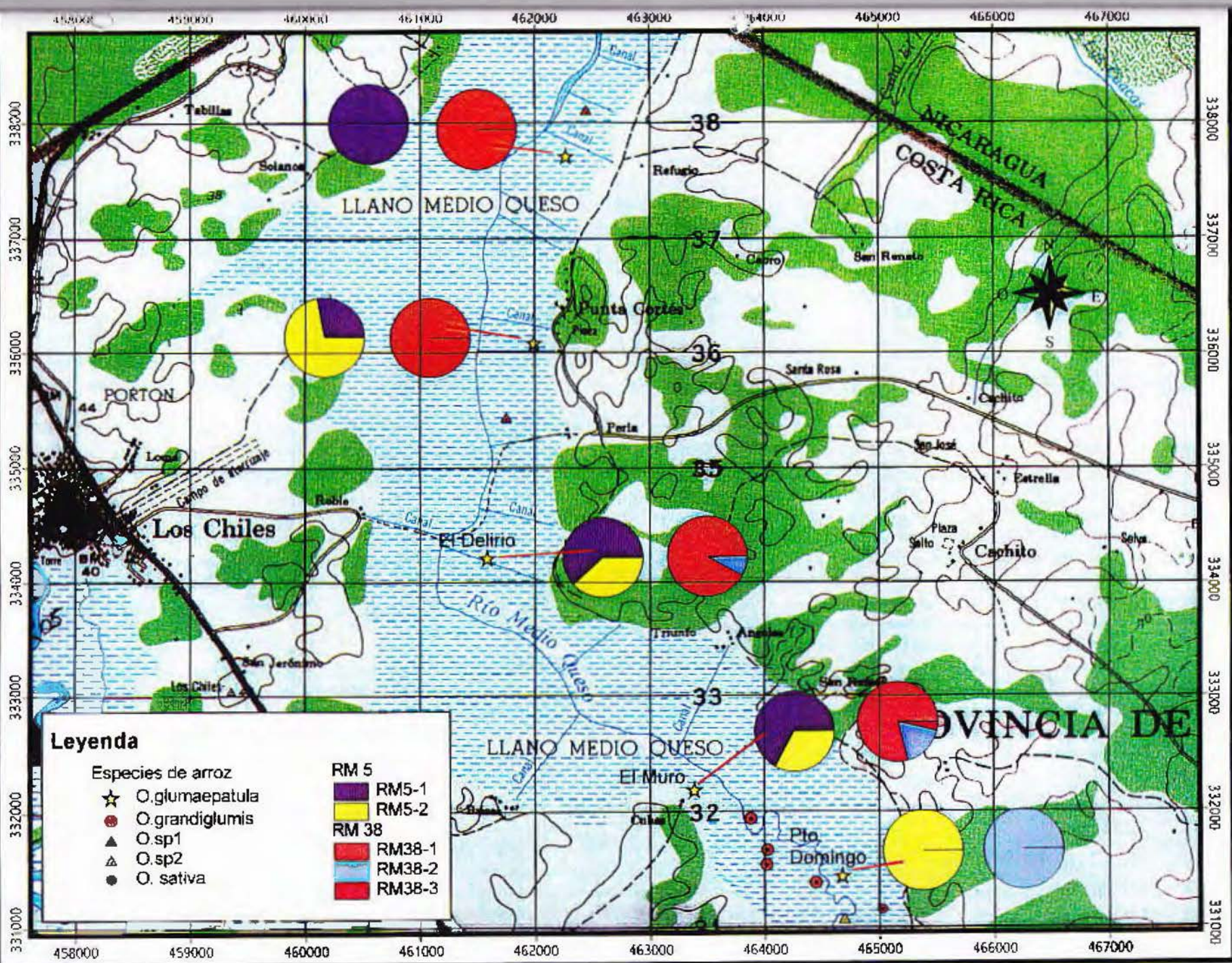
Población	R	EE	IC 95%
Murciélagos	1	0	0
Refugio	0.9327	0.0681	0.1752
Cortez	0.7316	0.1098	0.2822
Delirio	0.5365	0.1486	0.3821
Muro	0.1633	0.1536	0.3949
Domingo	0.6784	0.1173	0.3017
Promedio entre poblaciones	0.1092	0.0176	0.0452
Promedio dentro	0.6593	0.032	0.0822

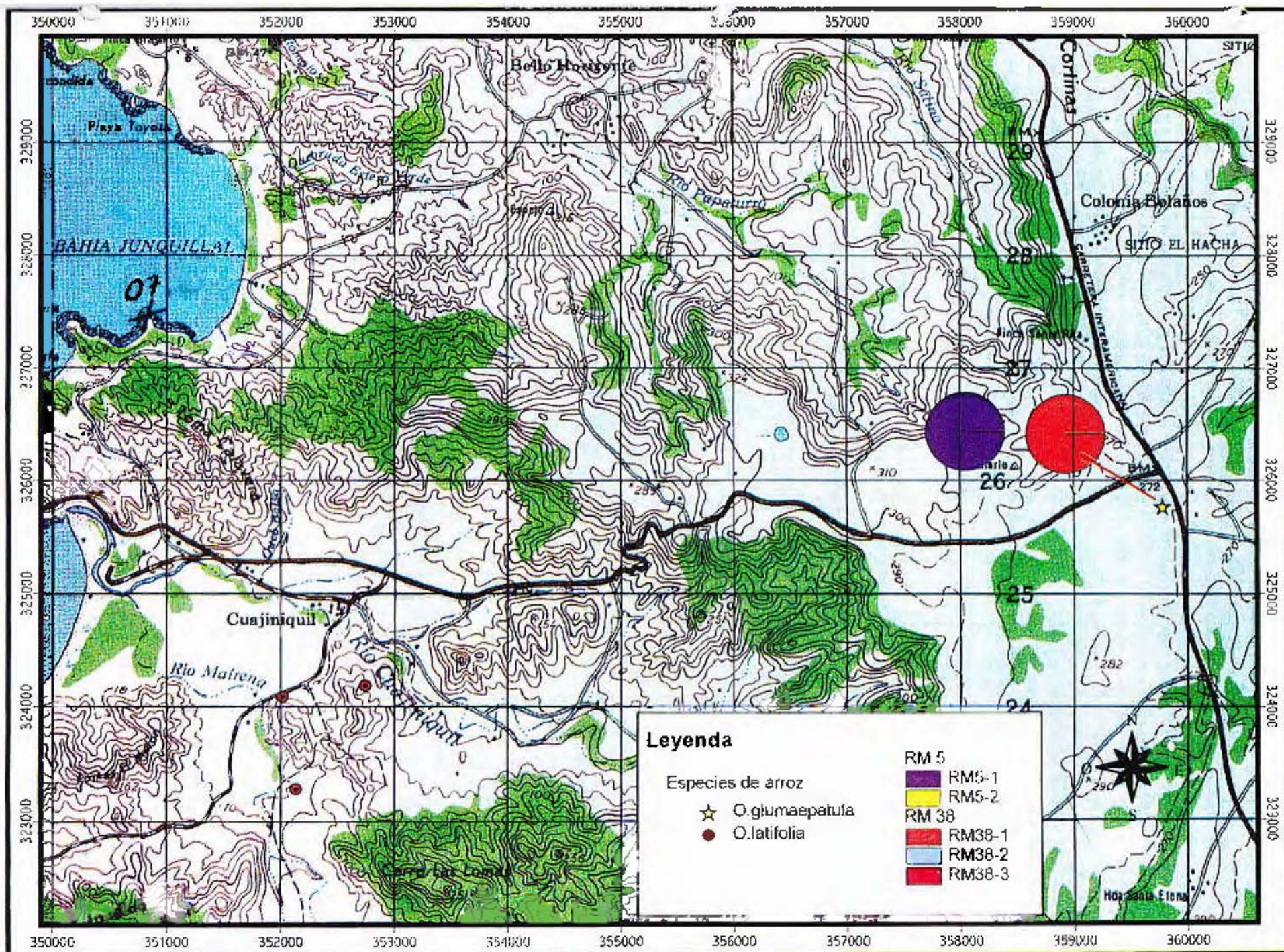
R: grado de parentesco; EE: error estandar; IC95%: intervalo de confianza del 95%

Figura 1. Comparación de los valores de diversidad y estructuración genética de las poblaciones de *O. glumae* de Amazonas y de Costa Rica

Localidad	Pobs	n	P	A	Ho	HE	FIS	FST	FIT
Costa Rica	6	118	0.48	1.6	0.093	0.168	0.453	0.713	0.866
Amazonas	37	1090	0.16	1.18	0.003	0.044	0.931	0.346	0.965
Costa Rica y Amazonas	4	192	0.1875	1.25	0.0125	0.124	0.93	0.31	0.97

Legend: n: número de individuos; P: porcentaje de loci polimórficos; A: alelos por locus; Ho: heterocigotidad observada; HE: heterocigotidad esperada. (a) Akimoto *et al.*, 1998; (b) Buso *et al.*, 1998.





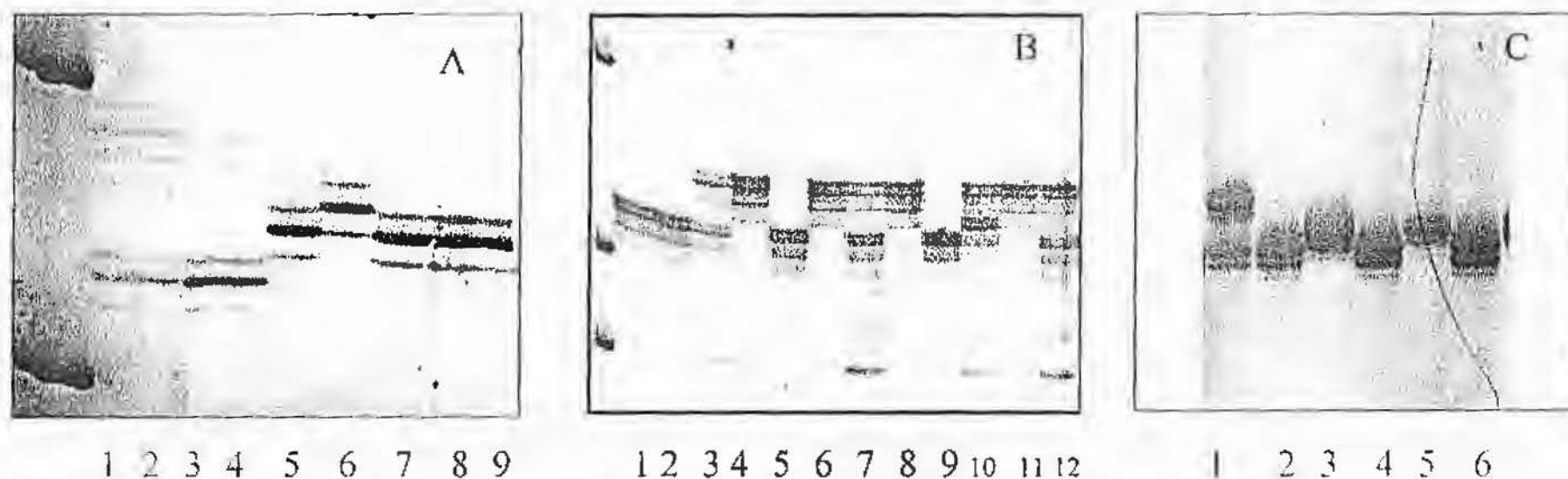


Figura 2. Gel de acrilamida donde se muestran los diferentes alelos encontrados en *O. glumaepatula* de Costa Rica para los microsatélites RM255 (A) RM22 (B) y RM38 (C). Carriles: (A) 1-4 Murcielago, 5-9 Delirio. (B) Todos individuos del muro, 3: heterocigoto 1,3; 10: heterocigoto 2,3 (C) 1 Muro 300.13; 2 Refugio, 3 Domingo, 4 Refugio, 5 Domingo, 6 Refugio.

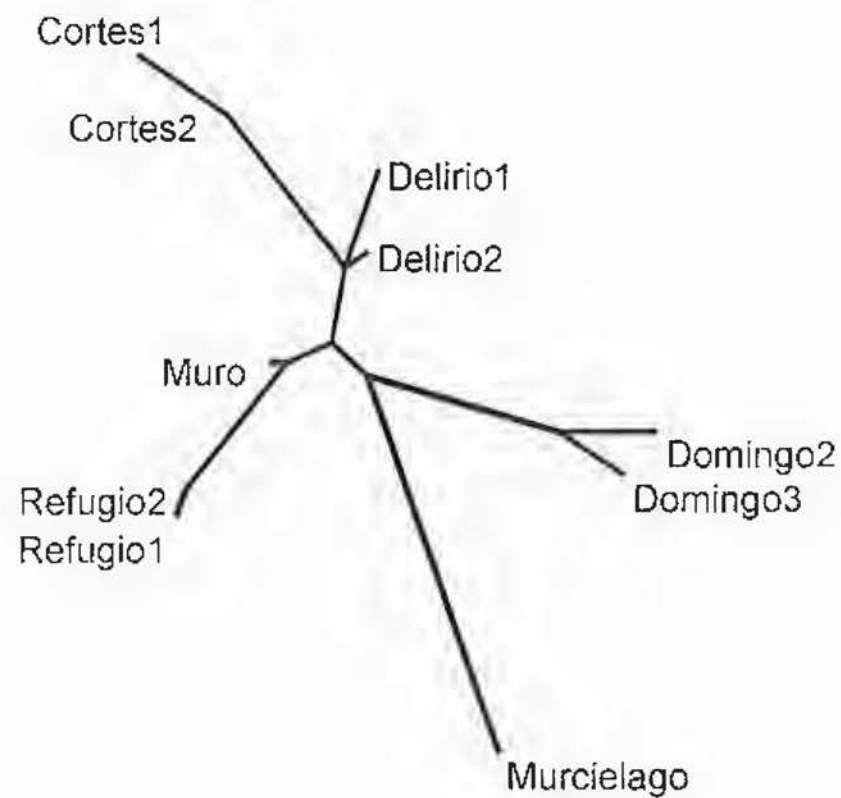


Figura 3. Dendrograma que muestra las distancias genéticas (RST) entre las poblaciones y subpoblaciones de *O. glumaepatula* de Costa Rica.

Capítulo 7

Discusión Final

Este proyecto surgió de la necesidad de encontrar recursos genéticos para su uso posterior en mejoramiento. La competencia por precios en un mundo globalizado tiene relación directa con la eficiencia en la producción, por lo que variedades más productivas, más tolerantes a los patógenos, con un requerimiento menor de agua y agroquímicos, así como también con mejores características nutricionales son el objetivo de todas las empresas agrícolas modernas.

En el caso del arroz, las investigaciones realizadas en el cruce interespecífico de *O. rufipogon* y *O. sativa* por los investigadores de CIAT (Colombia) y de la Universidad de Cornell (Ithaca, NY) han demostrado que se puede aumentar la producción en proporciones sin precedentes y que diferentes cruces entre las mismas especies pueden aportar genes diferentes que inciden positivamente en la producción.

Por lo tanto desde un punto de vista biotecnológico, el resultado de este trabajo es el conocimiento de la abundante diversidad a nivel de especies e intraespecífico que Costa Rica posee y que puede utilizar a continuación para el desarrollo de variedades.

El siguiente paso es factible debido a los precedentes ya antes descritos y sería un desarrollo altamente beneficioso para los agricultores y la economía del país. El papel de la Universidad de Costa Rica en este desarrollo es vital para que el mismo sea accesible a todos los productores.

Uno de los aspectos fundamentales que resultan de esta investigación es que la diversidad encontrada y su potencial es el resultado de la interacción entre las especies y sus respectivos ambientes. Desligar este germoplasma de su ecosistema, conservándolo únicamente en bancos de germoplasma, sería eliminar el proceso evolutivo. Hacer esto eliminaría una gran parte de la variabilidad genética de la especie y le daría la ventaja a

los patógenos. Además de que se corre el riesgo de que los bancos de germoplasma sufran pérdidas debidas a accidentes o falta de presupuesto. Por todas estas razones, es el deber de este país de proteger estos valiosos recursos en sus ambientes naturales.

Los humedales en los que estas especies se encuentran son ecosistemas sumamente diversos pero igualmente frágiles. La mayoría de ellos tienen una presión considerable por parte de comunidades aledañas que utilizan los recursos, en ocasiones de maneras poco viables a largo plazo.

Es nuestro deber informar a las comunidades que tienen relación con estos ecosistemas acerca de los recursos que ahí se encuentran, y de desarrollar una estrategia de uso y conservación de estos recursos que les beneficie a ellos directamente. De esta manera la conservación de los recursos naturales y el desarrollo de las comunidades se daría de forma armoniosa.

Algunos usos de estas especies silvestres involucran el desarrollo de variedades cultivadas directamente a partir de las especies silvestres, mediante cruces y selección, para utilizarlas como productos agronómicos alternativos. Estas variedades podrían ser bien recibidas como "arroz gourmet" en mercados de países desarrollados donde este tipo de productos ya se encuentran a la venta, como es el caso del "arroz silvestre" norteamericano.

Por otro lado, la biotecnología moderna esta regida por los derechos de propiedad intelectual, por lo que las patentes, licencias, contratos de transferencia de materiales, secretos comerciales y derechos sobre obtenciones vegetales son asuntos comunes actualmente. En este mundo de derechos y comercialización tiene la ventaja quien es dueño de la tecnología, pero el conocimiento y la protección de nuestros recursos genéticos, que son la materia prima de la industria biotecnológica, es la vía hacia la negociación y el acceso a recursos genéticos de otros países en igualdad de condiciones, así como a la tecnología y al financiamiento para investigación. La unión de la

tecnología y los recursos genéticos puede realmente hacer que la biodiversidad que Costa Rica ha conservado en sus parques nacionales con tanto ahínco empiece a producir con todo su potencial y promover la calidad de vida del costarricense.

Desde un punto de vista biológico el enfoque integral de éste estudio incluyendo el estudio de la morfología, ecología y estructura genética de las poblaciones, permitió conocer aspectos sutiles de la interacción entre éstas áreas en la evolución de las especies y el género.

Hemos comprobado que la diversidad de ecosistemas de Costa Rica, dada su posición geográfica, orografía y la influencia de la zona de convergencia intertropical juega un papel fundamental en la compartimentalización del país y permite la existencia de una gran variedad de organismos adaptados a diferentes ambientes. El papel de los grandes cambios climáticos y la gran actividad geológica de ésta región de América han permitido que ésta diversidad aumente aún más mediante procesos de especiación de diversas naturalezas.

De la misma manera, organismos como *O. latifolia* han sido capaces de adaptarse a diferentes climas y por lo tanto se encuentran ampliamente distribuidos, presentando además una gran diversidad genética a nivel de especie como un todo. Esta diversidad genética, notable en el fenotipo y en el genotipo, responde al aislamiento de las poblaciones pero también a presiones selectivas, como se infiere de la robustez de las plantas de zonas más lluviosas.

El sistema de apareamiento abierto de éstas plantas es un mecanismo que en teoría debería permitir el intercambio genético entre individuos de una misma especie, pero la presencia de los híbridos nativos en el Río Frío y Río Medio Queso, son la prueba tangible de que la hibridación ocurre en *Oryza* y que como lo indican varios estudios, éste proceso ha tenido un papel relevante en la diversificación del género.

De la misma manera, este sistema de apareamiento y la alta frecuencia de aborto de embriones que se producen en los cruces interespecíficos podrían ser la causa del patrón de distribución parapátrico de estas especies, que es muy claro en Costa Rica.

Por otro lado, las plantas de *Oryza* tienen en general semillas bastante grandes en comparación a otras gramíneas silvestres. Aunque no es claro como se dio el desarrollo de éste tamaño de semilla y debido a que presión selectiva, si es evidente que ha tenido una influencia grande en la morfología de la planta, en función de disminuir la pérdida de embriones y la importante dotación energética que cada uno lleva. Así, aristas largas, espinas córneas, grano caedizo, alta sincronización de floración y producción de semillas durante el periodo de inundación, parecen ser parte de un síndrome antidepredación.

El gran tamaño de la semilla y su mínima capacidad de dispersión, unido a la ineficiencia a largas distancias (más de 20 m) hacen que el flujo de genes sea muy limitado entre las poblaciones. Estas características hacen que tanto *O. latifolia* a nivel del país entero, como en *O. glumaepatula* en un área tan pequeña como 20 Km cuadrados, presenten una marcada estructuración genética.

Esta diversidad genética de las poblaciones de *O. glumaepatula* se debe a diferentes factores como la diferenciación de las poblaciones debida a frecuencias alélicas, a la aparición de diferentes alelos y también a las diversas combinaciones de alelos dentro de los individuos. En la mayoría de los casos hay deficiencias de heterocigotos que indican un efecto de endocruzamiento producto del apareamiento con individuos relacionados así como también por autofertilización. En otros casos hay excesos de heterocigotos que pueden ser explicados únicamente por el efecto de la reproducción clonal que se documentó y que ocurre comúnmente en ésta especie al final y al principio del periodo de inundación.

Referencias

- Aggarwal, R.K., D.S. Brar, N.Huang y G. S. Khush. 1998. Differentiation within CCDD genome species in the genus *Oryza* as revealed by total genomic hybridization and RFLP analysis. *Rice Genetics Newsletter* 13: 54-57.
- Akimoto, M., Shimamoto, Y., Morishima, H. 1998. Population genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by life history traits. *Molecular Ecology*, 7, 1371-1381.
- Akimoto, M. 1999. Biosystematics of the *Oryza* AA genome wild taxa (*Oryza sativa* complex) by morpho-physiological traits, isozyme and RFLPs. Ph. D. Thesis. Hokkaido University. Japan.
- Aldrich, P.R., Hamrick, J.L., Chavarriaga, P., Kochert, G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology* 7: 933-44.
- Ando, A., Rangel, P.H. 1994. Agronomical viewpoints. En: Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with the emphasis on the genus *Oryza*. Eds. H Morishima and P. S. Martins. Report of 1992/93 Amazon Project.
- ARLEQUIN ver 2.000. Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. 2000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. Dept. of Anthropology and Ecology. University of Geneva. <http://anthro.unige.ch/arlequin>.
- Avise, John C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman Hall, New York, pp 511.
- Baker, H.G. 1983. *Ceiba pentandra*. En: Costa Rican natural history. Editado por Daniel Janzen. The University of Chicago Press, Chicago.

Barbier, P. 1989a. Genetic variation and ecotype differentiation in the wild species *Oryza rufipogon*. I. Population differentiation in life-history traits and isozyme loci. Jpn. J. Genet. 64: 259-271.

Barbier, P. 1989b. Genetic variation and ecotype differentiation in the wild rice species *Oryza rufipogon*. II. Influence of the mating system and life-history traits on the genetic structure of populations. Jpn. J. Genet. 64: 273-285.

Bolaños and Watson. 1993. Mapa de zonas de vida de Costa Rica. Instituto Geográfico Nacional.

BOSTID. 1996. Lost Crops of Africa. Volume I. Grains. Board on Science and Technology for International Development. National Research Council. National Academy Press. Washington, D. C.

Brar, D. S., Elloran, R., Khush, G.S. 1991. Interspecific hybrids produced through embryo rescue between cultivated and eight wild species of rice. Rice Genetics Newsletter 8: 91-93.

Buso, G.S.C., Rangel, P.H., Ferreira, M.E. 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. Molecular Ecology 7: 107-117.

Cabezas, E. and Espinoza, A. M. 2000. Introducción del cultivo del arroz en América. Revista de Historia de América. En prensa.

Chen, X., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., McCouch, S.R. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 95: 553-567.

Cho, Y.G., Ishii T., Temniykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S.R., Park, W.D., Ayres, N., Cartinhour, S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 100: 713-722.

Chu, Y.E., y Oka, H.I. 1970. The genetic basis of crossing barriers between *Oryza perennis* subsp. *barthii* and its related taxa. Evolution 24, 135-44.

Chu, Y.E., Morishima, H., and H.I. Oka. 1969. Reproductive barriers distributed in cultivated rice species and their wild relatives. Japan J. Genetics. 44: 207-223.

Consultora Acon y Asociados S.A. 1991. Mapa de suelos de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Correa-Victoria, F. y Zeigler, R. 1993. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot spot". Plant Disease 77: 1029-34.

Doi, K., Yoshimura, A., Nakano, M., Vaughan, D. 1995. Phylogenetic study of A genome species of genus *Oryza* using nuclear RFLP. Rice Genetics Newsletter 12 (1995).

ESRI. 1998. Arc View Geographic Information System, version 3.1

Esselman, E.J., Jianqiang, L., Crawford, D.J., Windus, J.L., Wolfe, A.D. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Molecular Ecology 8: 443-51.

Flores, M. E. 1989. Estructura y función de las plantas. Editorial Instituto Tecnológico de Costa Rica. San José, Costa Rica, 1ra edición. 504pp.

Gadgil, M and O. T. Solbrig. 1972. The concept of r- and K- selection: Evidence from

wild flowers and some theoretical considerations. *Amer. Natur.* 106: 14-31.

Ge. S., Sang, T., Lu, B., Hong D.Y. 1999. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 96. No. 25, 14400-14405.

Goldstein, D.B., Ruiz, A., Cavalli-Sforza, L.L., Feldman, M.W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.

González, P., Quesada, C. 2000. Modelo de Elevación Digital de Costa Rica Centro de Investigacion en Desarrollo Sostenible, Universidad de Costa Rica.

Gutiérrez Espeleta, E. 1995. Métodos estadísticos para las ciencias biológicas. EUNA. Heredia, C.R. p. 48.

Hamrick, J.L., Murawski, D. A., Nason, J.D. 1993. Influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetation*, 107-108, 281-297.

Harrington, S. 1998. M.Sc. Thesis. Cornell University. Ithaca, N.Y.

Hartl, D. L. and A. G. Clark. 1989. Principles of Populations Genetics, 2nd Ed. Sinauer. Sunderland, MA.

Hartshorn, G. 1983. Plants. En: Costa Rican Natural History. Ed. Daniel Janzen. Pp. 118-350. The University of Chicago Press.

Hedrick, P.W. 2000. Genetics of populations. 2nd Edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.

Hinata, K., Oka, H. I. 1962. A survey of hybrid sterility relationships in the Asian forms

of *Oryza perennis* and *Oryza sativa*. Japan Journal of Genetics 37: 314-328.

Huke, R.E., Huke, E.H. 1990. Rice: Then and now. A brief history of rice. International Rice Research Institute, 1990. (<http://www.riceweb.org/>).

IICA. 1993. Agriculture in the Americas at the begining of the 1990s. Costa Rica, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA-OEA, 1:79.

IRRI. 1995. Manual of operations and procedures of the International Rice Research Genebank. Genetic Resources Center, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines.

Jackson, M. 1995. Protecting the heritage of rice biodiversity. GeoJournal 35.3: 267-274.

Jena, K.K, y Khush, G.S. 1988. Cytogenetic relationships among the three species of *Oryza latifolia* complex. Rice Genetics Newsletter 5: 74-75.

Jena, K. K., Kochert, G. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis of CCDD genome species of the genus *Oryza* L. Molecular Biology 16: 831-839.

Jennings, P.R. 1963. Estimating yield loss in rice caused by hoja blanca. Phytopathology 53: 492.

Johansson, S., Skoog, B. Silver staining of nucleic acids in polyacrilamide gels. J Biochem. Biophys. Methods 14, (Suppl.) 33.

Juliano, A. B., Naredo, M. E., Jackson, M.T. 1998. Taxonomic status of *Oryza glumaepatula* Steud. I. Comparative morphological studies of New World diploids and Asian AA genome species. Genetic Resources and Crop Evolution 45: 215-223.

Krebs, Charles J. 1985. Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance. Harper and Row, New York

Langevin SA, Clay K y Grace JB. 1990. The incidence and effects of hybridization between cultivated rice and its related weed red rice (*Oryza sativa* L.). Evolution 44: 1000-1008.

Lande, R., Schemske, D.W. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. Evolution 39: 24-40.

Linhart, Y.B. and Grant, M.C. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. Annu. Rev. Ecol. Syst. 27: 237-77.

Lohdi, M.A., Guang-Ning, Y., Weeden, N.F. y Reish, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Molecular Biology Reporter, 12(1): 6-13.

Lu, B.-R., Ma, Elizabeth B. Narcedo, Amita B. Juliano y Michael T. Jackson. 1998. Taxonomic status of *Oryza glumaepatula* Steud. III. Assessment of genomic affinity among AA genome species from the New World, Asia, and Australia. Genetic Resources and Crop Evolution 45: 215-223.

Manly, B. 1986. Multivariate Statistical Methods. A primer. Chapman and Hall. London and New York. Pp 159.

Mann, C.C. 1999. Crop scientists seek a new revolution. Science. January 1999: 310-314.

McGuire, J.U., McMillian, W.W., Lamey, H.A. 1960. Hoja blanca disease of rice and its insect vector. Rice J. 63: 15-28.

MINITAB 10.51x. 1995. Minitab Inc. 3081 Enterprise Drive, State College, PA.

Morishima H. and H.I., Oka. 1970. A survey of genetic variations in the populations of wild *Oryza* species and their cultivated relatives. Jpn. J. Genet. 45, 371-385.

Morishima, H.; Sano, Y. y Oka, H.I. 1984. Differentiation of perennial and annual types due to habitat conditions in the wild rice *Oryza perennis*. Plant Syst. Evol. 144: 11

Morishima, H.; Sano, Y. y Oka. H.I. 1992. Evolutionary studies in cultivated rice and its wild relatives. Oxford Surveys in Evolutionary Biology. Vol. 8.

Morishima, H. 1994. Background information about *Oryza* species in tropical America. En: Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with the emphasis on the genus *Oryza*. Eds. H. Morishima and P. S. Martins. Report of 1992/93 Amazon Project.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497.

Naredo, M.E.B., Juliano, A.B., Lu, B.R y M.T. Jackson. 1998. Taxonomic status of *O. glumaepatula* Steud. II. Hybridization between New World diploids and AA genome species from Asia and Australia. Genetic Resources and Crop Evolution 45: 205-214.

Nason, J.D., Aldrich, P.R., Hamrick, J.L. 1997. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. En: Tropical Forest Remnants: Ecology, management and conservation of fragmented communities (Eds. William F. Lawrence y Richard O. Bierregard, Jr.). The University of Chicago Press.

Nei, M. 1973. Analysis of diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 70: 3321-3323.

- Neigel, J.E. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 105-28.
- Newbury, H.J., Jackson, M.T., Ford-Lloyd, D. 1997. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. *Molecular Breeding* 3: 115-113.
- Oka, H.I. y Chang, W. 1961. Hybrid swarms between wild and cultivated rice species, *Oryza perennis* and *O. sativa*. *Evolution* 15, 418-30.
- Oka, H.I y Morishima, H. 1967. Variations in the breeding systems of a wild rice, *Oryza perennis*. *Evolution* 21: 249-258.
- Oliveira, G.C.X. 1994. Geographical distribution of wild *Oryza* species in Brazil. En: *Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with the emphasis on the genus Oryza*. Eds. H. Morishima and P. S. Martins. Report of 1992/93 Amazon Project.
- Panaud, O., Chen, X., McCouch, S.R. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 252: 597-607.
- Queller, D.C. y Goodnight, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43(2): 258-275.
- Pohl, R.W. 1980. Family No. 15 Graminae. En: *Flora Costarricensis*. Ed: William Burger. Fieldiana Botany.
- Provan, J., Corbett, G., McNicol, J.W., y Powel, W. 1997. Chloroplast DNA variability in wild and cultivated rice (*Oryza spp.*) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats. *Genome* 40: 104-110.

Reddy, A.R., Vaka, S. Reddy, B. Karunasree, G. Madhuri, M. Padmavathi, K.S. Krishnaveni, B. Chandra Shekar, Nagabhushan Ithal y Ravindra Babu. 1999. Molecular and transgenic approaches to elucidate the role of flavonoids in disease resistance. Abstracts of the general meeting of the International Program on Rice Biotechnology. September 20-24, 1999, Phuket, Thailand.

Rieseberg, Loren H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Eco. Syst.* 1997. 28: 359-389.

Rieseberg, L.H.; Baird, S.J.E. y Gardner, K. 2000. Hybridization, introgression, and linkage evolution. *Plant Molecular Biology* 42: 205-224.

Roberts, E.H.; Craufurd, R.Q. y Le Cochet, F. 1961. Estimation of percentage of natural cross-pollination: experiment on rice. *Nature* 190: 1084-1085.

Ronald, P.C. 1997. Making Rice Disease Resistant. *Scientific American*, November 1997.

Roschevich, R. J. 1931 A contribution to the knowledge of rice. *Bull. Appl. Bot Genet. Plant Breed.* 27(4): 1-133 (Translated from Russian).

Rubim, M.A.L. (1994) A case study on life history of wild rice. From germination to emergence of inflorescence. En: *Investigations of plant genetic resources in the Amazon basin with the emphasis on the genus *Oryza** Eds. H. Morishima and P. S. Martins. Report of 1992/93 Amazon Project.

Sano Y., Sano R. 1990. Variation of the intergenic spacer region of ribosomal DNA in cultivated and wild rice species. *Genome* 33: 209-218.

Sánchez, Ethel. 1998. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica.

Shimamoto, Y., Ohara, M., y Akimoto, M. 1994. Habitat conditions and plant characters of wild rice in the Central Amazon. En: Investigations of-plant genetic resources in the Amazon basin with the emphasis on the genus *Oryza*. Eds. H. Morishima and P. S. Martins. Report of 1992/93 Amazon Project.

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-62.

Stout, J. 1983. Rice. En: Costa Rican natural history. Editado por Daniel Janzen. The University of Chicago Press, Chicago.

Swaminathan, M. S. 1986. Plant research and world agriculture. *Plant Mol. Biol. Rep.* 4: 1-17.

Swofford, D.L. and R.K.Selander. 1981. BIOSYS-1 A FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J Heredity* 72:281-283.

Tanksley, S.D., y McCouch, S. 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, vol. 277: 1063-1066.

Tateoka, T. 1962a. Taxonomic studies of *Oryza*. I. *O. latifolia* complex. *Bot. Mag. Tokyo* 75: 418-427.

Tateoka, T. 1962b. Taxonomic studies of *Oryza*. II. Several species complexes. *Bot. Mag. Tokyo* 76: 455-461.

Temnykh, S., Park, W.D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y.G., Ishii, T., McCouch, S.R. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 697-712.

Vari, F., Bell, K. 1996. A simplified silver diammine method for the staining of nucleic acids in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 17, 20-25.

Vaughan, D.A. 1994. The wild relatives of rice: a genetic resources hand book. International Rice Research Institute.

Vaughan, D.A. y Tomooka, N. 1999. Wild rice in Venezuela. *Rice Genetics Newsletter* 16: 15-17.

Virk, Parminder S., Brian V. Ford-Lloyd, Michael T. Jackson, Harpal S. Pooni, Tomas P. Clemen, y John Newbury. 1996. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity* 76: 296-304.

Wang, Z. Y., Second, G., y Tanksley, S.D. 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 83: 565-581

Warwick, S. I. 1997. Use of biosystematic data, including molecular phylogenies, for biosafety evaluation. En: *The 3rd JIRCAS Symposium: The 4th International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*. Eds.: S. Matsui, S. Miyazaki and K. Kasamo. Japan International Center for Agricultural Sciences (JIRCAS). Japan.

Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19: 395-420.

Xiao, J., Li, J., Grandillo, S., Nag Ahn, S., Yuan, L., Tanksley, S.D. y McCouch, S.R. 1998. Identification of trait-improving Quantitative Trait Loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. *Genetics*: Vol. 150, 899-909.

Yang, S. J., Jin, Y. D., Lee, S.K., Chung, G.S. 1991. Interspecific F1 hybrids resistant to rice black streaked dwarf virus through embryo rescue. Research Reports of the Rural Development Administration (SUWEON) 33 (2 Rice). 1991. 1-5.