



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización genética y patotípica del hongo *Magnaporthe oryzae* en cultivos de arroz en Colombia

Gustavo Adolfo Prado Patiño

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2016

Caracterización genética y patotípica del hongo *Magnaporthe oryzae* en cultivos de arroz en Colombia

Gustavo Adolfo Prado Patiño

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencia Agrarias con énfasis en Protección de Cultivos

Director

Ph.D. Gloria María Mosquera

Codirector

Ph.D. Eyder Gómez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Posgrados
Palmira, Colombia

2016

(Dedicatoria)

Quiero dedicar este esfuerzo y logro a todos aquellos seres que han aportado en mi vida mucho más que un grano de arena para mi crecimiento personal y profesional.

A Dios por su infinito amor y misericordia. Por darme la vida que me ha dado, fortaleza y sabiduría para sobreponerme ante las adversidades.

A mi amada esposa Ana, por su infinito amor e incondicional apoyo en este proceso.

A mis hijos: Lina Marcela, Gustavo Jr, Sofía y Lucho por ser mi fuente de aliento para retomar fuerzas y continuar adelante.

A mis padres: Pedro Nel y Alba Ruby por su amor, apoyo e invaluable consejos.

A mis hermanos: Pedro, Martha y Carlos por su incondicional apoyo, amor y afecto durante todos los días de mi vida.

A mis sobrinos: especialmente a Katherine por ser un ejemplo de fortaleza y vida.

A mi mentor Fernando Correa, a quien le agradeceré toda mi vida la excelente orientación que siempre me ha dado tanto en aspectos personales como profesionales y por todas las oportunidades que me ha brindado para crecer profesionalmente.

A María Girena Aricapa, por ser una excelente maestra y amiga.

A Luis Eduardo Osorio, amigo de siempre y por siempre.

Al grupo de patología de arroz del CIAT por su amistad e incondicional apoyo en las actividades de este trabajo.

Agradecimientos

Expreso mis más sinceros agradecimientos a todo el grupo de personas que de una u otra forma apoyaron en la realización de este trabajo.

A Gloria María Mosquera por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado y haber participado como directora de este trabajo.

A Eyder Gómez por haber aceptado participar como director de este trabajo y por la orientación que siempre me dio en la realización de mi trabajo de grado.

A todo el equipo de patología de arroz del CIAT por su gran apoyo en la realización de las actividades de este trabajo.

A Fabio Escobar, quien incondicionalmente me brindó todo su apoyo para la lectura de los geles obtenidos en las pruebas moleculares.

A Juan Cuasquer por su gran disposición e incondicional ayuda en los análisis estadísticos de esta investigación.

Al Dr. Fernando Correa, quien me animó a terminar este proceso.

Al CIAT por todas las oportunidades que me brindó para mi desarrollo profesional.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira por abrimme las puertas para realizar mis estudios de Doctorado.

Resumen

El arroz (*Oryza sativa* L), es alimento básico para las dos terceras partes de la población del mundo. El añublo del arroz causado por *Magnaporthe oryzae* (Hebert) es la enfermedad más limitante en su producción. La resistencia genética es una de las principales formas de controlar esta enfermedad. Sin embargo, el patógeno tiene la capacidad de superar la resistencia de las variedades dos a tres años después de su liberación. A nivel internacional, los centros de investigación como el CIAT, han desarrollado estudios sobre las poblaciones de este patógeno y sus interacciones con genes de resistencia presentes en diferentes grupos de variedades diferenciales, generando así diversos tipos de información para los programas de mejoramiento. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar una nueva población de *M. oryzae* de Colombia tanto patotípicamente como genotípicamente, el cual se propuso debido a que hace más de diez años no se tiene información precisa de la estructura poblacional de este hongo en Colombia, siendo esta información de gran importancia para los programas de mejoramiento de arroz de América Latina y el Caribe. Este estudio se realizó en la Estación Experimental del CIAT-Palmira, con 114 aislamientos del hongo colectados en siete departamentos del país entre los años 2008-2012 y provenientes de 99 materiales diferentes de arroz. La caracterización patotípica de esta población del hongo se realizó utilizando un nuevo grupo de líneas diferenciales monogénicas, las cuales representan 25 genes de resistencia, y la metodología desarrollada por Hayashi y Fukuta (2009), mediante lo cual se logró determinar el número de razas de esta población; también se hicieron análisis mediante el índice de similaridad de Sokal & Michener (1958), análisis de correspondencia múltiple, frecuencias de compatibilidad, distribución geográfica e índice de diversidad patotípica. Los análisis genéticos se realizaron utilizando la técnica rep-PCR *POT2* propuesta por Hamer *et al* (1992). Se analizó la estructura genética de esta población mediante el índice de similaridad de Nei-Li, análisis de correspondencia múltiple e índice de diversidad genética. De los 114 aislamientos caracterizados patotípicamente, se encontraron 61 razas o patotípos, donde la gran mayoría de estos (89%) fueron representativos del departamento del Meta, siendo el 62% de este 89% total provenientes de la estación experimental de Santa Rosa (EESR), el cual es un sitio "HOT SPOT" para

este patógeno. Los análisis de clúster indicaron la presencia de siete grupos patotípicos, estando los grupos 1, 2, 3 y 4 representados por los aislamientos más virulentos de la población y siendo el grupo 3 en el que se encuentran los aislamientos que superaron la resistencia de los 25 genes de resistencia. Esta población mostró una diversidad patotípica del 97.5%, lo cual indica que es altamente diversa. Las menores frecuencias de virulencia de la población del hongo se presentaron frente a los genes de resistencia *Pi-9(t)*, *Pita-2(1)*, *Pita-2*, *Pik-m*, *Pik-h*, *Pi20(t)* y *Piz-t*, siendo estos genes los que en este momento deberían ser utilizados en programas de mejoramiento de la resistencia al patógeno. Para la caracterización genética se utilizaron 95 aislamientos del total de los 114, debido a que de 19 de ellos no se logró obtener DNA; de estos 95 aislamientos se obtuvieron 67 haplotipos que expresaron un índice de diversidad genética global de la población del 98.7%, indicando esto la alta diversidad genética de este hongo en Colombia. Al igual que para los análisis patotípicos, el mayor número de haplotipos se encontró en el departamento del Meta (74.6%), siendo el 72% de estos haplotipos representativos de la EESR, corroborando nuevamente este resultado la gran diversidad genética y patotípica de este hongo en este sitio, el cual sigue siendo de gran importancia para la selección de germoplasma por resistencia a *M. oryzae*. La población se estructuró en siete grupos genéticos, cuatro de los cuales (1, 3, 5 y 6) presentaron similitud con los grupos genéticos SRL-1 a SRL-6 y ALL-7, reportados previamente por Levy *et al.*, 1993 y los grupos 2, 4 y 7 se reportan como grupos genéticos nuevos, debido a que no presentaron similitud alguna con los grupos antes reportados por Levy *et al.*, 1993. No se observó ninguna correlación entre los grupos patotípicos y los grupos genéticos encontrados.

Palabras clave: Añublo, Patotipo, Haplotipo, Grupo patotípico, Grupo genético, Gen de resistencia.

Abstract

Rice (*Oryza sativa* L) is a staple food for two-thirds of the world's population. Rice blast caused by *Magnaporthe oryzae* (Hebert) is the most limiting disease for rice production. Genetic resistance is one of the main ways to control this disease. However, the pathogen has the ability to overcome the resistance of varieties two to three years after their release. Internationally, research centers as CIAT, have developed studies on populations of this pathogen and its interactions with resistance genes present on different groups of differential varieties, thus generating information for breeding programs. The objectives of this investigation were to characterize a new population of *Magnaporthe oryzae* of Colombia both pathotypically and genotypically, which was proposed because it has been more than ten years that there is no accurate information on the population structure of this pathogen in Colombia, being this information of great importance for rice breeding programs in Latin America and the Caribbean. This study conducted at the Experimental Station of CIAT-Palmira, included 14 pathogen isolates collected in seven departments of the country between the years 2008-2012 and from 99 different rice materials. The pathotype characterization of this population was conducted using a new group of monogenic differential lines, which represent 25 resistance genes, and the methodology developed by Hayashi and Fukuta (2009) to determine the number of races of the pathogen in this population; analysis was also performed for the similarity index of Sokal and Michenner, multiple correspondence analysis, compatibility frequency, geographic distribution and pathotype diversity index. Genetic analysis was performed using the rep-PCR *POT2* technique, proposed by Hamer *et al* (1992). The genetic structure of this population was analyzed by similarity index of Nei-Li, multiple correspondence analysis and genetic diversity index. The pathotype analysis showed 61 races or pathotypes within the 114 blast isolates, where 89% of these races were representative of the Meta department and 62% of this 89% were found on the Santa Rosa Research Station (SRRS), which is a "HOT SPOT" for this pathogen. The cluster analysis indicated the presence of seven pathotype groups; the groups 1, 2, 3 and 4 were represented by the most virulent isolates of the population, with group 3 including blast isolates that overcame the resistance

of the 25 resistance genes used in the study. This population showed a 97.5% pathotype diversity, which indicate that it is highly diverse. The lower frequencies of virulence in the pathogen population were presented against the resistance genes *Pi-9(t)*, *Pita-2*, *Pik-m*, *Pik-h*, *Pi20(t)* and *Piz-t*; these resistance genes should be used in rice breeding programs. 95 isolates of a total of 114 were used to characterize genetically the pathogen population; it was not possible to extract DNA of the remaining 19 isolates. These 95 isolates were grouped into 67 haplotypes, expressing a diversity genetic index of 98.7%, indicating the high genetic diversity of this pathogen in Colombia. As the pathotype analysis, the largest number of haplotypes were found in the Meta department (74.6%) and 72% of these haplotypes were representatives of the Santa Rosa Research Station, corroborating again that this site has the highest for both pathotype and genetic diversity in Colombia. This finding corroborates the great importance of this research station to select resistant germplasm to *Magnaporthe oryzae*. The blast population studied was set in seven genetic groups, four of which (1, 3, 5 and 6) are highly similar with the genetic lineages SRL-1 to SRL-6 and ALL-7, reported by Levy *et al* (1993); the groups 2, 4, and 7 are reported here as new genetic groups because have not similarity with the groups reported before by Levy *et al* (1993) or any other study. No correlation between the pathotype and genetic groups was observed.

Key words: Rice blast, Pathotype, Haplotype, Pathotype group, Genetic group, Resistance gene.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XVII
Lista de tablas	XVIII
Lista de gráficos.....	XX
Introducción	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	3
1. Problemática.....	5
2. Marco de Referencia	15
2.1 El arroz.....	15
2.1.1 Origen, tipos y distribución.....	15
2.1.2 Importancia económica y social	16
2.2 Generalidades del añublo del arroz.....	19
2.2.1 Importancia de la enfermedad	19
2.2.2 Agente causal.....	20
2.2.3 Clasificación taxonómica	20
2.2.4 Morfología.....	21
2.2.5 Sintomatología.....	22
2.2.6 Epidemiología.....	23
2.2.6.1 Ciclo de vida	23
2.2.6.2 Ambientes.....	24
2.2.6.3 Esporulación	24
2.2.6.4 Diseminación	25
2.2.7 Variabilidad patotípica.....	25
2.2.8 Diversidad genética	28
3. Materiales y Métodos	33
3.1 Caracterización patotípica	33
3.1.1 Colección de muestras afectadas con <i>Magnaporthe oryzae</i>	33
3.1.2 Obtención de aislamientos monospóricos del hongo	34
3.1.3 Almacenado de los aislamientos en papel filtro	35
3.1.4 Siembra y multiplicación del hongo.....	36

3.1.5	Multiplicación de aislamientos	36
3.1.6	Preparación del inóculo	36
3.1.7	Siembra de líneas monogénicas en invernadero	37
3.1.8	Inoculación de plantas.....	38
3.1.9	Evaluación.....	39
3.1.10	Diseño experimental.....	39
3.1.11	Análisis estadístico	39
3.1.11.1	Índice de concordancia simple de Sokal & Michener	41
3.1.11.2	Frecuencias de compatibilidad y virulencia	41
3.1.11.3	Análisis de correspondencia múltiple (ACM)	41
3.1.11.4	Índice de diversidad patotípica.....	41
3.2	Caracterización genética.....	41
3.2.1	Preparación del hongo para la extracción de ADN	42
3.2.2	Extracción de ADN	42
3.2.3	Rep-PCR <i>Pot2</i>	43
3.2.4	Lectura de bandas.....	44
3.2.5	Análisis estadístico	45
3.2.5.1	Análisis de correspondencia múltiple (ACM)	46
3.2.5.2	Índice de similaridad de Nei-Li	46
3.2.5.3	Índice de diversidad genética	46
4.	Resultados	47
4.1	Obtención de aislamientos.....	47
4.2	Caracterización patotípica.....	49
4.2.1	Identificación de razas bajo la metodología de Hayashi y Fukuta (2009).....	49
4.2.2	Análisis de correspondencia múltiple.....	56
4.2.3	Índice de similaridad de Sokal & Michener (1958)	59
4.2.4	Índice de diversidad patotípica	65
4.2.5	Distribución geográfica de grupos patotípicos	66
4.3	Caracterización genética.....	67
4.3.1	Resultados obtenidos con el análisis de correspondencia múltiple (ACM).....	67
4.3.2	Resultados obtenidos con el índice de similaridad de Nei-Li	69
4.3.3	Índice de diversidad genética por haplotipos	73
4.3.4	Distribución geográfica de haplotipos	74
4.3.5	Correspondencia entre grupos genéticos y grupos patotípicos.....	76
5.	Discusión.....	77
5.1	Caracterización patotípica.....	77
5.1.1	Aislamientos obtenidos.....	77
5.1.2	Patotípos	78
5.1.3	Análisis de correspondencia múltiple (ACM)	79
5.1.4	Índice de similaridad de Sokal & Michener	81
5.1.5	Frecuencias de compatibilidad	82
5.1.6	Índice de similaridad patotípica	83
5.1.7	Distribución geográfica de patotípos.....	83
5.2	Caracterización genética.....	84
5.2.1	Análisis de correspondencia múltiple (ACM)	84
5.2.2	Índice de similaridad de Nei-Li.....	84
5.2.3	Índice de diversidad genética	85
5.2.4	Distribución geográfica de haplotipos	86

5.2.5 Correspondencia entre grupos genéticos y patotípicos.....	86
6. Conclusiones y Recomendaciones.....	87
6.1 Conclusiones.....	87
6.1.1 Estructura patotípica.....	87
6.1.2 Estructura genética.....	88
6.2 Recomendaciones.....	89
A. Anexo: Variedades de origen de los 114 aislamientos utilizados en este estudio	91
B. Anexo: Aislamientos obtenidos de las muestras tomadas en campos y procesados en el laboratorio (101), más 13 aislamientos previamente caracterizados por el grupo de patología de arroz del CIAT en los años 90.....	95
C. Anexo: Total de razas encontradas e identificación de las mismas	99
D. Anexo: Razas con el respectivo número de aislamientos que las conforman.	101
E. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo patotípico 1.	103
F. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo 2.....	105
G. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo 3.....	107
H. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo 4.....	109
I. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo 5.....	111
J. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo 6.....	113
K. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo 7.....	115
L. Anexo: Razas comunes y no comunes entre los departamentos de origen de los aislamientos.	117
M. Anexo: Aislamientos que no se analizaron molecularmente.	119
N. Anexo: Reacción de genes de resistencia frente al grupo genético 1.....	121
O. Anexo: Reacción de genes de resistencia frente al grupo genético 2.....	123
P. Anexo: Reacción de genes de resistencia frente al grupo genético 3.....	125
Q. Anexo: Reacción de genes de resistencia frente al grupo genético 4.....	127
R. Anexo: Reacción de genes de resistencia frente al grupo genético 5.....	129
S. Anexo: Reacción de genes de resistencia frente al grupo genético 6.....	131
T. Anexo: Reacción de genes de resistencia frente al grupo genético 7.....	133
Bibliografía	135

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2.1. Esporas de <i>Magnaporthe oryzae</i> (Fase asexual).....	21
Figura 2.2. Lesiones iniciales y típicas causadas por <i>M. oryzae</i> en hojas de arroz.....	22
Figura 2.3. Lesión en cuello de panícula causada por <i>M. oryzae</i>	23
Figura 2.4. Esquema del ciclo de vida de <i>M. oryzae</i> en su fase asexual (Pinzón, 2003)	24
Figura 3.1. Sitios de colección de muestras afectadas por <i>M. oryzae</i>	34
Figura 3.2. Proceso para la obtención de aislamientos de <i>M. oryzae</i> . a. Cámara húmeda; b. siembra de conidios en agar-agua. c. Siembra de conidias en Salvado de arroz.	35
Figura 3.3. Almacenado de aislamientos en papel filtro	35
Figura 3.4. Preparación de inóculo de <i>Magnaporthe oryzae</i>	36
Figura 3.5. Siembra de líneas a inocular.....	37
Figura 3.6. Inoculación e incubación de plantas	38
Figura 3.7. Tipos de lesión para categorizar las reacciones de las líneas evaluadas.....	39
Figura 3.8. Patrones de bandas de 19 aislamientos de <i>M. oryzae</i> de Colombia obtenidas mediante la técnica rep-PCR Pot2: 20283(a), 20335(b), 20249(c), 20201(d), 20288(e), 20282(f), 20221(g), 10683(h), 20647(i), 20257(j), 20278(k), 20519(l), 20508(m), 20212(n), 20534(o), 20888(p), 21340(q), 20522(r), 20501(s). G=grupo genético.	45
Figura 4.1. Dendograma de la estructura patotípica de 114 aislamientos de <i>Magnaporthe oryzae</i>	58
Figura 4.2. Dendograma de la estructura genética de 95 aislamientos de <i>Magnaporthe oryzae</i>	68

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Diferenciales internacionales para las razas fisiológicas de <i>Magnaporthe oryzae</i>	8
Tabla 1-2. Variedades diferenciales utilizadas para la identificación de razas de <i>M. oryzae</i> en Japón.....	8
Tabla 1-3. Líneas isogénicas (NIL's) del cultivar CO39, donantes del gen de resistencia y genes de resistencia identificados.....	9
Tabla 1-4. Líneas isogénicas de LTH, genes de resistencia y donante de resistencia....	10
Tabla 1-5. Nuevo grupo de líneas diferenciales internacionales, constituido por líneas monogénicas, cada una posee un solo gen de resistencia	12
Tabla 2-1. Frecuencias de virulencia en una población de <i>M. oryzae</i> en Colombia	27
Tabla 2-2. Acumulación de factores de virulencia en aislamientos de <i>M. oryzae</i> , colectados en un sitio de evaluación y selección por resistencia al añublo del arroz en Colombia....	27
Tabla 2-3. Espectro de virulencia de seis linajes genéticos de <i>M. oryzae</i> hallados en Colombia, inoculados en cultivares de arroz con genes de resistencia conocidos.	29
Tabla 2-4. Resistencia complementaria a <i>M. oryzae</i> en líneas progenitoras de la variedad Oryzica Llanos 5 en Colombia.	32
Tabla 3-1. Metodología desarrollada por Hayashi y Fukuta (2009) para la designación de razas de <i>M. oryzae</i>	40
Tabla 4-1. Aislamientos representativos de siete grupos genéticos reportados previamente por el grupo de patología de arroz de CIAT.	48
Tabla 4-2. Número de aislamientos obtenidos por departamento, Incluidos los caracterizados previamente por el grupo de patología de arroz del CIAT	49
Tabla 4-3. Número de aislamientos colectados en la estación experimental de Santa Rosa (EESR)	49

Tabla 4-4. Aislamientos pertenecientes a la raza U00-i0-k000-z00-ta000 sin capacidad infectiva.....	51
Tabla 4-5. Aislamientos pertenecientes a la raza U73-i7-k177-z17-ta733 con el mayor espectro de virulencia en la población evaluada en este estudio.....	52
Tabla 4-6. Espectros de virulencia de aislamientos recuperados de variedades altamente susceptibles y variedades altamente resistentes a <i>M. oryzae</i>	54
Tabla 4-7. Comparación de espectros de virulencia de dos aislamientos colectados de la variedad <i>Oryzica</i> Llanos 5.....	55
Tabla 4-8. Grupos patotípicos obtenidos a través del ACM, con su respectivo número de razas y aislamientos.....	57
Tabla 4-9. Similaridad global y similaridad de grupos patotípicos.	59
Tabla 4-10. Similaridad entre grupos patotípicos.	62
Tabla 4-11. Diversidad patotípica total de la población estudiada.....	65
Tabla 4-12. Diversidad patotípica dentro de grupos.....	65
Tabla 4-13. Distribución geográfica de grupos patotípicos.	66
Tabla 4-14. Número de aislamientos y razas del Meta.....	67
Tabla 4-15. Similaridad global y similaridad dentro de grupos genéticos.....	69
Tabla 4-16. Número de aislamientos y haplotipos por grupo genético.....	72
Tabla 4-17. Similaridad entre grupos genéticos.	72
Tabla 4-18. Índice de diversidad genética por haplotipos entre y dentro de grupos.....	73
Tabla 4-19. Diversidad genética por haplotipos dentro de grupos genéticos.....	74
Tabla 4-20. Distribución geográfica de los grupos genéticos obtenidos.	75
Tabla 4-21. Correspondencia entre grupo genéticos y grupos patotípicos.	76

Lista de gráficos

Pág.

Gráfico 4-1. Porcentaje de incompatibilidad de 25 genes de resistencia frente al grupo de 114 aislamientos inoculados	64
--	----

Introducción

El arroz es importante como alimento básico, y los sistemas agrícolas de producción son esenciales para la seguridad alimentaria, la disminución de la pobreza y el mejoramiento del estilo de vida de una población (Sanint, 2010).

El arroz es un cultivo semestral tropical y subtropical, que a pesar de que la mayor producción a nivel mundial se concentra en los climas húmedos tropicales, también se puede cultivar en las regiones húmedas de los subtrópicos y en climas templados (Agrocadenas, 2010).

Este cereal es cultivado en 113 países de todos los continentes del mundo con excepción de la Antártida. De esos países, los 26 que pertenecen a la región de América Latina y el Caribe (ALC) producen 25 millones de toneladas de “paddy” (arroz con cáscara) que representa el 4% de la producción mundial de arroz (Sanint, 2010), que equivale a 592 millones de toneladas (promedio del año, periodo 2000-2002). El área cultivada de arroz en ALC es de 5.9 millones de hectáreas, aproximadamente, región en la cual, el aumento del rendimiento fué de 51% entre 1995 y 2005. La producción total del arroz en ALC mejoró un 1.9% y un 1.3% en Asia, mientras que los rendimientos por hectárea aumentaron 3.8% por año en ALC y 1.0% en Asia (Sanint, 2010; Khush and Jena, 2009)

Colombia ocupa el puesto 21 en la producción mundial de arroz, participando con menos del 1%. Sin embargo, en la región latinoamericana es el tercer productor, después de Brasil y Perú. Los principales productores de arroz a nivel global son China e India, que concentran en conjunto el 51% de la producción mundial. Sin embargo, estos países no comercializan volúmenes importantes de arroz en el mercado internacional (Sanint, 2010; GRISP, 2013).

A pesar que nuestro país no es reconocido como gran aportador en materia de este cereal en términos internacionales, internamente, el arroz es uno de los cultivos de mayor importancia económica para Colombia.

Este cereal se considera como una de las principales fuentes de alimento para la mitad de la población mundial (Fischer *et al.*, 1997; Khush and Jena, 2009).

El arroz, es colonizado por gran cantidad de agentes fitopatógenos entre los que se encuentra el hongo *Pyricularia grisea*, estado asexual del ascomiceto *Magnaporthe oryzae*, agente causal de la *Pyricularia*, añublo o quemazón del arroz, siendo esta la enfermedad más limitante del cultivo en todo el mundo, ocasionando grandes pérdidas en producción, tanto en arroz de riego como de secano. Este patógeno es capaz de infectar todos los estados de desarrollo de la planta y se adapta fácilmente a los hospederos, debido a la inestabilidad de los genes de avirulencia (AVR) (Valent, 1997; Dai *et al.*, 2010).

El uso de variedades resistentes al hongo ha sido el método más utilizado, junto con el control químico, para combatir la enfermedad; es por esto que los programas de mejoramiento además de enfocar sus estudios de investigación al incremento en los rendimientos de las nuevas variedades, también se enfocan en la búsqueda de resistencia durable a *M. oryzae*. Es decir, se busca la obtención de materiales con altos potenciales de rendimiento, a su vez deben poseer una resistencia durable al hongo para que dichos rendimientos se materialicen y el uso de químicos se disminuya (Correa, 1997b).

La obtención de materiales con resistencia durable a *M. oryzae* requiere de estudios amplios a nivel genético tanto de la planta como del patógeno, integrando el fitomejoramiento, la fitopatología y la biología molecular para tratar de entender la dinámica de la población de este patógeno. Dentro de estas áreas, es indispensable caracterizar la efectividad de los genes de resistencia de acuerdo a la frecuencia de los genes de avirulencia presentes en las poblaciones del hongo, permitiendo así determinar las mejores combinaciones de genes de resistencia en un sitio geográfico específico para la obtención de materiales con resistencia durable al hongo (Levy *et al.*, 1993; Fukuta *et al.*, 2009).

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar genética y patotípicamente la población del hongo *M. oryzae* en cultivos de arroz en Colombia.

Objetivos específicos

1. Caracterizar patotípicamente parte de la población del hongo *M. oryzae* en Colombia.
2. Caracterizar genéticamente parte de la población del hongo *M. oryzae* en Colombia mediante estudios de dactiloscopia.
3. Estudiar los espectros de virulencia existentes dentro de los grupos patotípicos y genéticos obtenidos en los objetivos 1 y 2.

Hipótesis

La población de *M. oryzae* en Colombia es altamente variable tanto en su estructura patotípica como en su estructura genética.

1. Problemática

A nivel mundial el cultivo del arroz se ve drásticamente afectado por el hongo *Magnaporthe oryzae*, debido a que se presenta en cualquier región, adaptándose a los más diversos ecosistemas. En regiones donde las condiciones ambientales son favorables, es frecuente observar variedades susceptibles en la fase de plántula o macollamiento totalmente destruidas (Guzmán, 2000, www.tecnicoagricola.es, 2012) ocasionando pérdidas hasta del 100% (Correa, 1997b; Khush and Jena, 2009), dependiendo de varios factores:

- a) La variedad sembrada.
- b) La etapa de desarrollo del cultivo en que se presenta la infección.
- c) Variables ambientales como la humedad, la temperatura y el período de rocío.

Cuando no hay destrucción total del cultivo, es bastante difícil estimar las pérdidas causadas por el añublo de la hoja. La producción por ejemplo puede disminuir en un porcentaje aproximadamente igual al del área foliar afectada, según la variedad de que se trate. Las pérdidas causadas por el añublo del cuello de la panícula son generalmente altas, observándose que el porcentaje de estas pérdidas es similar al porcentaje de incidencia alcanzado por la enfermedad en el campo (Correa, 1997a).

Prácticas culturales tales como, uso de fungicidas y la resistencia genética han sido los métodos más utilizados para el control del hongo. El extensivo e incontrolable uso de fungicidas afectan la salud humana y la seguridad del medio ambiente; por esta razón, se considera que la utilización de múltiples genes con amplio espectro de resistencia, es una de las estrategias más efectivas para el manejo de esta enfermedad (Wang *et al.*, 2010; RoyChoudhury *et al.*, 2012a); sin embargo, la alta variabilidad del patógeno hace que esa resistencia sea poco durable (Correa y Zeigler, 1993a). Una de las posibles razones para

la pérdida de la resistencia es el surgimiento de nuevos patotipos o razas del hongo, compatibles con los genes de resistencia liberados (Correa, 1997 y 1997a).

La resistencia a *Magnaporthe oryzae*, se basa en la hipótesis gen x gen (Flor, 1971; Chen *et al.*, 2006, citados por Wang *et al.*, 2013), donde los genes mayores de resistencia (R) son efectivos para el control de razas del hongo que posean los correspondientes genes de avirulencia (AVR) (Jia *et al.* 2000). Para el control de este patógeno, hasta el momento se han identificado y mapeado más de 80 genes de resistencia (R) y seis de ellos han sido clonados (McCouch *et al.*, 1988, 1994; Yu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Bryan *et al.*, 2000; Gowda *et al.*, 2003; Qu *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007. Citados por Jia *et al.*, 2009; Ballini *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2006, citado por Wang *et al.*, 2013).

En el patógeno se han descrito 25 genes AVR y algunos de ellos se han clonado *ACE1*, *Avr-CO39*, *Avr-Piz-t*, *Avr-Pia*, *Avr-Pita1*, *Avr-Pij*, *Avr-Pik/km/kp* (Fudal *et al.*, 2007; Farman and Leong, 1998; Li *et al.*, 2009; Miki *et al.*, 2009; Yasuda *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2009). *ACE1* es reconocido por el gen de resistencia *Pi-33*, y los otros por los genes *Piz-t*, *Pi-a*, *Pita1*, *Pi-i*, *Pi-k*, *Pi-km*, y *Pi-kp* respectivamente. Estudios recientes han demostrado que los genes AVR en *M. oryzae* son muy inestables (Valent, 1997, citado por Wang *et al.*, 2013) y los cambios rápidos en las razas ya han cuestionado la efectividad de los genes R (Correll *et al.*, 2000).

El proyecto de patología de arroz del CIAT, al igual que otros centros internacionales dedicados a la investigación en arroz, ha desarrollado diferentes metodologías orientadas a la obtención de materiales de arroz con resistencia durable a *M. oryzae*. Entre ellas, se encuentran técnicas moleculares, que permiten tener información sobre la base genética de la diversidad patogénica de las poblaciones del hongo. Por otro lado, estas metodologías siguen necesitando de la información aportada por métodos convencionales, como los estudios a nivel de invernadero, para establecer relaciones de asociación. Siendo esta última metodología indispensable en la identificación de patotipos del hongo, lo que permite estimar el repertorio de genes de avirulencia encontrados en una población determinada. Estos patotipos a su vez, también han permitido la caracterización de genes de resistencia presentes en un genotipo de arroz determinado, lo cual representa una herramienta de validación útil para los programas de mejoramiento enfocados a la

búsqueda de resistencia durable a la enfermedad (Correa y Zeigler, 1993; Levy *et al.*, 1993).

A nivel mundial, la identificación de razas de *M. oryzae* se ha hecho bajo el modelo gen x gen de Flor (1971), basado en la utilización de un grupo de variedades diferenciales internacionales que han servido como base para los estudios de especialización patogénica y de la relación hospedero-patógeno (Kiyosawa, 1972, citado por Prabhu y Philippi, 2006; Odjo *et al.*, 2014).

Las primeras variedades diferenciales utilizadas, estaban constituidas por ocho genotipos seleccionados en estudios cooperativos entre Japón y Estados Unidos; estos genotipos poseen de uno a dos genes de resistencia al patógeno (Tabla 1-1) (Atkins *et al.*, 1967, citados por Prabhu y Philippi, 2006; Odjo *et al.*, 2014). El uso de estas variedades no permitía describir adecuadamente la estructura de razas en muchas regiones y los investigadores de diferentes países comenzaron a utilizar nuevamente diferentes series de diferenciales (Ou, 1972, citado por Prabhu y Philippi, 2006).

Diez años después en Japón se sugirieron nueve variedades diferenciales con genes de resistencia vertical conocidos (Tabla 1-2). Sin embargo, la información obtenida de razas aplicaba solamente para los genes de resistencia en la serie diferencial y como estas variedades no son isogénicas, otros genes de resistencia desconocidos pueden estar presentes en estos cultivares, lo cual podría generar confusión en los resultados finales (Yamada, 1976, citado por Prabhu y Philippi, 2006; Odjo *et al.*, 2014).

Tabla 1-1. Diferenciales internacionales para las razas fisiológicas de *Magnaporthe oryzae*

Grupo ¹	Variedad diferencial	Gen de resistencia	Origen
A	Raminad Str. 3	-	Filipinas
B	Zenith	<i>Pi-a, Pi-z</i>	E.U.A
C	NP-125	-	India
D	Usen	<i>Pi-a</i>	China
E	Dular	<i>Pi-k</i>	Paquistán
F	Kanto 51	<i>Pi-k</i>	Japón
G	Sha-tiao-tsao	<i>Pi-k^s</i>	China
H	Caloro	<i>Pi-k^s</i>	E.U.A

¹ Las razas comparativas para las variedades diferenciales respectivas son clasificadas en grupos que van de la letra A hasta la H.

Fuente: Atkins *et al.*, 1967; citados por Prabhu y Philippi, 2006 y Odjo *et al.*, 2014.

Tabla 1-2. Variedades diferenciales utilizadas para la identificación de razas de *M. oryzae* en Japón.

Consecutivo	Variedad diferencial	Gen de resistencia
1	Shin 2	<i>Pi-k^s</i>
2	Aichi Asahi	<i>Pi-a</i>
3	Ishikari-shiroke	<i>Pi-i</i>
4	Kanto 51	<i>Pi-k</i>
5	Tsuyuake	<i>Pi-k^m</i>
6	Fukunishiki	<i>Pi-z</i>
7	Yashiromochi	<i>Pi-ta</i>
8	Pi N° 4	<i>Pi-ta²</i>
9	Toride 1	<i>Pi-z^t</i>

Fuente: Yamada, 1976; citado por Prabhu y Philippi, 2006 y Odjo *et al.*, 2014.

Mackill y Bonman (1992) desarrollaron cinco líneas isogénicas del cultivar CO39, cada una con un gen de resistencia conocido, las cuales han sido utilizadas por muchos investigadores, añadiéndolas a su grupo de variedades diferenciales para estudios de diversidad patotípica del hongo (Tabla 1-3). Estas líneas isogénicas, se utilizaron en

estudios en Colombia, para determinar la importancia de la combinación de los genes de resistencia *Pi-1*, *Pi-2* y *Pi-33* (este último también presente en la línea isogénica C 101 LAC y para la identificación de marcadores moleculares asociados al gen de resistencia *Pi-1* (Prado, 2004; Fuentes *et al.*, 2008).

Tabla 1-3. Líneas isogénicas (NIL's) del cultivar CO39, donantes del gen de resistencia y genes de resistencia identificados

Línea isogénica	Donador	Origen	Gen de resistencia
C 101 LAC	LAC 23	Liberia	<i>Pi-1</i>
C 101 A51	5173	Colombia	<i>Pi-2</i>
C 104 PKT	Pai-Kan-Tao	China	<i>Pi-3</i>
C 101 PKT	Pai-Kan-Tao	China	<i>Pi-4a</i>
C 105 TTP-4L23	Tetep	Vietnam	<i>Pi-4b</i>

Fuente: Mackill y Bonman, 1992.

El uso de variedades diferenciales con genes de resistencia conocidos permite detectar combinaciones de genes de avirulencia en el patógeno, sin embargo, su uso es limitado para la clasificación de razas de *M. oryzae*, por presentar base genética diferente. (Kumar *et al.*, 2000). En cuanto al uso de líneas isogénicas (NIL's) como diferenciadoras, la variedad CO39, utilizada como progenitor recurrente posee genes de resistencia. Para superar este problema, Ling *et al.*, 1995, desarrollaron otro grupo de variedades diferenciales internacionales, cada una con un gen mayor de resistencia, utilizando como "background" susceptible la variedad Lijiangxintuanheigu (LTH). Esta es una variedad japónica oriunda de la provincia de Yunnan, China, que presentó susceptibilidad a 1.739 aislamientos de *M. oryzae* en diferentes partes de China, indicando que posiblemente esta variedad no posee genes de resistencia al patógeno. Utilizando la variedad LTH como progenitor recurrente y algunas diferenciales japonesas de Kiyosawa, con genes conocidos como donadores de resistencia, fueron desarrolladas otra serie de NIL's (Tabla 1-4).

Tabla 1-4. Líneas isogénicas de LTH, genes de resistencia y donante de resistencia.

Consecutivo	NIL ¹	Gen de resistencia	Donante ²
1	F-80-1	<i>Pi-k</i>	Kusabue
2	F-89-7	<i>Pi-k^m</i>	Tsuyuake
3	F-124-1	<i>Pi-ta</i>	K1
4	F-128-1	<i>Pi-ta²</i>	Pi-No.4
5	F-129-1	<i>Pi-k^p</i>	K60
6	F-145-2	<i>Pi-b</i>	BL1

¹ LTH fue utilizado como progenitor recurrente en el desarrollo de estas líneas isogénicas.

² Variedades diferenciales japonesas de Kiyosawa

Fuente: Ling *et al.*, 1995.

Estas líneas isogénicas presentan distinta reacción de resistencia o susceptibilidad y permiten diferenciar las razas patogénicas de *M. oryzae*, en zonas sembradas tanto con cultivares indicas como japónicas (Ling *et al.*, 1995).

Con la ayuda de las herramientas moleculares se ha logrado avanzar más rápidamente en la identificación y caracterización de genes de avirulencia en el patógeno, y de genes de resistencia en el hospedero. Es por esto, que los diferentes grupos de diferenciales utilizados hasta ahora en Colombia no dan información sobre los genes de resistencia identificados recientemente. Por esta razón, a pesar de que siempre ha existido un sistema de monitoreo de razas a nivel fenotípico, se necesita un sistema más preciso en los cuales se puedan evaluar la mayor cantidad de genes de resistencia hasta ahora conocidos, que se encuentren en la misma base genética, y que a su vez se adapte a un sistema más global de evaluación para efectos comparativos.

Recientemente, en un trabajo conjunto entre JIRCAS (Japan International Research Center for Agricultural Science) e IRRI (International Rice Research Institute) se desarrollaron 26 líneas monogénicas utilizándose como progenitor recurrente la variedad japónica (LTH); cada línea posee un único gen de resistencia, con excepción de LTH que supuestamente no posee ningún gen y constituyen el nuevo grupo de variedades diferenciales-monogénicas internacionales que se está utilizando en diferentes sitios,

principalmente de Asia, para estudios de diversidad patotípica de *M. oryzae* de forma más precisa (Tabla 5-5) (Tsunematsu *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007. Citados por Hayashi y Fukuta, 2009 y Odjo *et al.*, 2014). Estas líneas ya están siendo utilizadas por diferentes instituciones a nivel mundial para caracterizar las poblaciones del hongo en sitios específicos de alta producción de arroz (Toung Le *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013).

En los estudios de diversidad patotípica del patógeno, realizados en Colombia con aislamientos colectados en la Estación Experimental de Santa Rosa (EESR), ubicada en el departamento del Meta, donde las condiciones ambientales son altamente favorables para el desarrollo del patógeno, se utilizaron las variedades diferenciales sugeridas por Atkins *et al.*, 1967 y las variedades diferenciales propuestas por Yamada, 1976, citados por Pabhu y Filippi, 2006 y Odjo *et al.*, 2014, (Tablas 1 y 2), detectándose la presencia de 45 razas del hongo. Estos resultados permitieron seleccionar a la estación de Santa Rosa como sitio ideal para evaluar materiales de arroz por su resistencia a pyricularia. En este sitio se concentra la selección de materiales de los programas de mejoramiento del CIAT y de sus colaboradores nacionales debido a la gran diversidad patogénica del hongo (Correa y Zeigler, 1993; Levy *et al.*, 1993; Correa-Victoria, 1997c).

Tabla 1-5. Nuevo grupo de líneas diferenciales internacionales, constituido por líneas monogénicas, cada una posee un solo gen de resistencia

Entrada	Línea monogénica	Gen de Resistencia	Donante
IRBL 1	IRBLa-A	<i>Pi-a</i>	AICHI ASAHI
IRBL 3	IRBLi-F5	<i>Pi-i</i>	FUJISAKA 5
IRBL 5	IRBLks-F5	<i>Pi-ks</i>	FUJISAKA 5
IRBL 6	IRBLk-ka	<i>Pi-k</i>	KANTO 51
IRBL 7	IRBLkp-K60	<i>Pi-kp</i>	K 60
IRBL 8	IRBLkh-K3	<i>Pi-kh</i>	K 3
IRBL 9	IRBLz-Fu	<i>Pi-z</i>	FUKUNISHIKI
IRBL 10	IRBLz5-CA	<i>Pi-z5</i>	C101 A51
IRBL 11	IRBLzt-T	<i>Pi-zt</i>	TORIDE 1
IRBL 12	IRBLta-K1	<i>Pi-ta</i>	K 1
IRBL 14	IRBLb-B	<i>Pi-b</i>	BL 1
IRBL 15	IRBLt-K59	<i>Pi-t</i>	K 59
IRBL 16	IRBLsh-S	<i>Pi-sh</i>	SHIN 2
IRBL 18	IRBL1-CL	<i>Pi-1</i>	C 101 LAC
IRBL 19	IRBL3-CP4	<i>Pi-3</i>	C 104 PKT
IRBL 20	IRBL5-M	<i>Pi-5(t)</i>	RIL 249 (Moro)
IRBL 21	IRBL7-M	<i>Pi-7(t)</i>	RIL 29 (Moro)
IRBL 22	IRBL9-W	<i>Pi-9</i>	WHD-1S-75-1-127
IRBL 23	IRBL12-M	<i>Pi-12(t)</i>	RIL 10
IRBL 24	IRBL19-A	<i>Pi-19</i>	AICHI ASAHI
IRBL 25	IRBLkm-Ts	<i>Pi-km</i>	TSUYUAKE
IRBL 26	IRBL20-IR24	<i>Pi-20</i>	ARL 24
IRBL 27	IRBLta2-Pi	<i>Pi-ta2</i>	Pi No. 4
IRBL 28	IRBLta2-Re	<i>Pi-ta2</i>	REIHO
IRBL 29	IRBLta-CP1	<i>Pi-ta</i>	C 101 PKT
2008DS 32	LTH	<i>Sin gen</i>	

Fuente: Tsunematsu *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2007; citados por Hayashi y Fukuta, 2009 y Odjo *et al.*, 2014.

Con respecto a los estudios de la estructura genética de la población de *Magnaporthe oryzae* en Colombia, con análisis de fingerprinting utilizando la sonda MGR586 basado en RFLP-DNA y rep-PCR *Pot2* (George *et al.*, 1998), se pudo concluir que las 45 razas del hongo se agrupan en seis familias genéticas (Levy *et al.*, 1991 y 1993; Zeigler *et al.*, 1995). Igualmente, estas familias o linajes genéticos están compuestos por aislamientos que infectan un específico y limitado grupo de cultivares, que a su vez representan un grupo específico de patotipos. Se pudo deducir por este estudio que cada linaje envuelve un grupo de patotipos muy relacionados en su espectro de virulencia (Levy *et al.*, 1993).

En Colombia se realizaron estos estudios hasta el año 2004, por esta razón, hoy en día no se sabe con exactitud cómo está conformada la población de este patógeno en nuestro país en relación a su estructura patotípica, la frecuencia de los genes de virulencia/avirulencia y su estructura genética, lo cual hace, que no haya una información actualizada sobre cuáles podrían ser los genes de mayor utilidad en este momento y que combinados entre sí proporcionen una resistencia durable a *M. oryzae*.

El presente estudio se propuso con el objetivo de caracterizar parte de la población del patógeno en Colombia tanto en su estructura patotípica, utilizando la metodología desarrollada por Hayashi y Fukuta, 2009 y el nuevo grupo de variedades diferenciales-monogénicas desarrollado por Tsunematsu *et al.*, 2000 y Kobayashi *et al.*, 2007; citados por Hayashi y Fukuta, 2009; Fukuta *et al.*, 2009 y Odjo *et al.*, 2014. Igualmente se propuso para este estudio caracterizar la estructura genética de esta población del hongo, utilizando la técnica *rep*-PCR fingerprinting (George *et al.*, 1998).

Estos estudios se plantean con el fin de tener información sobre la base de los cambios en la población, ya que no se sabe si el patógeno solo ha cambiado a nivel de virulencia o si ha involucrado todo su genoma. De la misma manera, se podrá tener una visión actualizada de cuál es la variabilidad patogénica dentro de cada linaje y así determinar si hacer mejoramiento basado en exclusión de linajes sigue siendo una buena estrategia, o si por el contrario hay que recurrir a estrategias complementarias como mejoramiento basado en la frecuencia de las razas del patógeno.

Otro de los motivos en realizar esta investigación es la incertidumbre que tienen los mejoradores, puesto que las variedades y líneas avanzadas que se están seleccionando como resistentes a *Magnaporthe oryzae* en un sitio, son susceptibles en otros y variedades que anteriormente eran susceptibles, ahora están presentando resistencia y viceversa. Para dar una explicación a esta situación, se hace necesario comprender la dinámica poblacional de este patógeno en Colombia.

2. Marco de Referencia

2.1 El arroz

2.1.1 Origen, tipos y distribución

Teofrastes lo denominó *Oryza* en su clasificación botánica del siglo IV a. C. (Grist, 1958, citado por Sanint y Gutierrez,, 2001; Franquet, 2004). Las dos especies de arroz comercialmente cultivadas en el mundo provienen de las especie *Oryza sativa* y *Oryza glaberrima*. Esta última solo se cultiva en Africa. En Asia, de donde se presume que es originario *Oryza sativa*, el arroz se encuentra enraizado en los ritos sagrados y de mayor tradición de muchos pueblos (China, India, Tailandia, Indonesia, Filipinas, Japón, etc.) en donde le atribuyen origen divino y lo consideran un regalo de los dioses. Los árabes dicen que el arroz proviene de una gota de sudor de Mahoma caída del paraíso. La más conocida es la legendaria instaurada por el emperador japonés Shen Nung hace casi 5.000 años (en 2.700 a. C) que consistía en que el emperador, que era el único que podía sembrar arroz, lo hacía de mano propia, cada primavera, frente a los miembros de la casa real, a quienes cabía el privilegio de sembrar los otros cereales (trigo, sorgo, millo). Esto le permitió al arroz un prestigio enorme; de allí que se considere el cereal por excelencia. Las excavaciones arqueológicas muestran ya indicios del cultivo del arroz en el norte de Tailandia hace unos 6.000 años (Huke and Huke, 1991, Franquet, 2004; Sanint, 2010).

En Europa, son los compañeros de Alejandro Magno (s. IV a. C) quienes traen la descripción de los arrozales de la India. Los Moros traen el arroz a la península Ibérica en el s. VIII d. C (Sanint y Gutierrez, 2001, Franquet, 2004).

En América, hay referencias del arroz en Sao Paulo (Brasil), en el s. XV. A Estados Unidos llega en 1694 procedente de Madagascar, llevado por el gobernador de California; de allí

paso, en 1781 a, Louisiana y luego a Alabama, Texas, Florida, California, etc (Granato, 1914, Citado por Sanint y Gutierrez, 2001; Franquet, 2004).

La especie de arroz *Oryza sativa*, considerablemente variable, se ha clasificado en dos tipos: **Indica** y **Japónica**. Los arroces cultivados en el mediterráneo, sureste de Asia, sur de China, Corea, Japón y algunas regiones de África, son en general de tipo **japónica** y se caracterizan por ser pequeñas, con hojas angostas y erectas, tolerantes a bajas temperaturas, más resistentes al desgrane y de granos cortos con bajo contenido de amilosa, responden a la fertilización nitrogenada y no sufren volcamiento. Los arroces de tipo **indica** son cultivados en la India, Madagascar, este de África, norte de China, América y también el sureste de Asia y se caracterizan por su rápido y vigoroso crecimiento inicial, poseen hojas largas y anchas, tallos altos y débiles, susceptibles al desgrane, de maduración tardía y no poseen dormancia (Leal, 1990; Chyler, 1979, citado por Tascón, E y Garcia, D, 1985, citados por Flor 1998; Franquet, 2004).

El arroz se cultiva entre los 55° N en China y 36° S en Chile (Khush, 1997, citado por Gallego, 2003; Franquet, 2004).

2.1.2 Importancia económica y social

El arroz está íntimamente involucrado en la cultura, la alimentación y la economía de muchas sociedades y se ha convertido en la base alimenticia de la mayor parte de la población del mundo (Huke y Huke, 1991; Franquet, 2004).

El arroz se produce bajo cuatro sistemas de cultivo: Riego, secano favorecido, secano e inundación. La mayor parte de la producción mundial de arroz se produce bajo riego (93 millones de ha en el mundo) o secano favorecido (52 millones de ha en el mundo). El secano representa cada vez un segmento menor (Pingali *et al.*, 1997; Franquet, 2004; GRISP, 2013).

La producción mundial a inicios del siglo XX era de unos 140 millones de toneladas de arroz cascara, en un área de 80 millones de ha, para rendimiento de 1.75 tons/ha (FAO, 1965, citado por Sanint y Gutierrez, 2001). En los albores del mismo siglo, Asia tenía el privilegio casi exclusivo del cultivo del arroz, pues representaba el 99% de la producción

mundial. En aquel entonces la India y China producían cada una el 40% del total. Hoy, ambos países siguen siendo los principales productores: China representa el 33% y la India el 20%. A mediados del siglo, se producían 168 millones de toneladas en un área de 130 millones de ha con rendimientos alrededor de 1.3 ton/ha. Al finalizar el siglo, se produjeron casi 600 millones de toneladas en 154 millones de ha y los rendimientos se incrementaron a 3.9 ton/ha. En la actualidad la situación es igual (Sanint y Gutierrez, 2001; Franquet, 2004; GRiSP, 2013).

La gran expansión del arroz se produce a raíz del lanzamiento de la variedad IR8 y de otras variedades similares, de alto rendimiento y bajo porte durante la década de los 60s. En las últimas tres décadas, la producción mundial creció 2.6% y los rendimientos 2.0%. Una característica de las nuevas variedades es su eficiencia en la asimilación de nitrógeno (N). En términos de eficiencia de calorías, las nuevas variedades mantienen una alta conversión y altos rendimientos (Sanint y Gutierrez, 2001).

En América Latina se siembran aproximadamente nueve millones de ha y se producen cerca de 20 millones de toneladas de arroz cascara, que representa aproximadamente el 3.6% de la producción mundial de arroz (Sanint y Wood, 1998; GRiSP, 2013).

Colombia en la actualidad ocupa el puesto 25 en la producción mundial de arroz cascara, el tercero en América Latina después de Brasil y Perú, sin embargo, la participación en el mundo es marginal, 0,4% del total (GRiSP, 2013). La producción nacional paso de 2.12 millones de toneladas en 1990 a 2.41 millones de toneladas en 2010. El crecimiento fue constante entre los años 1990 y 1999 y ha sido variable desde entonces. Entre los años 2004 y 2010, la producción de arroz riego cayó de 1.59 millones de toneladas a 1.32 millones y la producción en condiciones de secano cayó de 877,341 a 752,515 toneladas (GRiSP, 2013).

La disminución en la producción de arroz en Colombia se debió parcialmente al decrecimiento en el total del área cultivada que cayó en 56.300 ha desde 1990 (paso de 521.100 ha en 1990 a 464.794 ha en 2010). Sin embargo, los rendimientos de arroz, pasaron de 4.1 t/ha a 6.3 t/ha durante 1990-2008, aunque estos bajaron a 5.2 t/ha en 2010 (GRiSP, 2013). Se estima que para el 2016, el área cultivada se incremente en 38.000 ha,

con lo cual se llegaría a un área cultivada de 500.00 ha, esto debido a las condiciones del mercado y a la oferta agroclimática, especialmente para las zonas de los Llanos Orientales y la Mojana (www.agronet.gov.co, 2016).

El arroz es el cuarto cultivo más importante de Colombia, después de la Caña de azúcar, Palma africana y Plátano, igualmente es el cuarto alimento más consumido (35.2 Kg/capita/año), después del plátano, azúcar y papa; ocupa el tercer lugar en área cultivada en el país, después del café y el maíz, con el 13% del total del área sembrada. La producción de arroz representa el 10% de la actividad agrícola y es alimento para la población más pobre de Colombia (GRiSP, 2013).

Colombia se divide en cinco zonas de producción de arroz a saber: Centro, Oriente, Bajo Cauca, Costa Norte y Santanderes. Los dos sistemas más importantes para la producción son el arroz de riego y el arroz de secano favorecido, utilizando métodos mecanizados y manuales de producción, cerca del 70% del área cultivada de arroz es mecanizado (GRiSP, 2013).

La zona Centro corresponde a los departamentos de Huila, Tolima, Caquetá, Cundinamarca y Boyacá en las zonas aledañas del río Magdalena y a los departamentos del Valle y Cauca. En esta zona predomina el sistema de cultivo bajo riego, es la más tecnificada y en la que se obtiene las mejores producciones por hectárea.

La zona Oriente se encuentra en las postrimerías de la cordillera oriental, predominando el sistema de secano favorecido; las principales áreas arroceras de esta región se encuentran en los departamentos del Meta, Casanare y Arauca.

La zona del Bajo Cauca, corresponde literalmente a la parte baja del valle del río Cauca, comprende parte de los departamentos de Antioquía, Bolívar, Córdoba y Sucre, de los cuales algunos municipios hacen parte de la subregión de la Mojana o Cono del Cauca donde se encuentran tierras muy fértiles.

La zona de la Costa Norte está integrada por las áreas arroceras del Cesar, Guajira y Magdalena, donde generalmente se cultiva arroz de riego, aunque en la parte sur del departamento del Cesar se siembran algunas hectáreas bajo el sistema de secano.

La zona que comprende los departamentos de Santander y Norte de Santander, se presentan los dos sistemas de producción, aunque predomina el sistema de riego (Fondo Nacional del Arroz, 2001; GRiSP, 2013).

El incremento de la temperatura a nivel mundial, ha generado inestabilidad en los rendimientos del cultivo del arroz, pues las altas temperaturas causan efectos directos en la fertilidad de las espiguillas de arroz, presentándose como consecuencia de ello inestabilidad en los rendimientos del cultivo y poniendo en riesgo la seguridad alimentaria del planeta. Además de los efectos directos causados por las altas temperaturas, estas también traen como consecuencia el incremento de plagas y enfermedades que a su vez también deprimen los rendimientos (GRiSP, 2013)

El reto de los fitomejoradores en la actualidad es enfrentar al cambio climático, buscando la manera de desarrollar variedades con resistencia a factores adversos asociados al cambio climático como son la sequía y altas temperaturas, pero a su vez estas variedades deben llevar un componente de resistencia a las principales plagas y enfermedades como es el caso de la resistencia a *Magnaporthe oryzae*, causante de la enfermedad conocida como Añublo del Arroz, la cual ha sido y continua siendo la enfermedad más limitante del cultivo en todo el mundo, pues tiene la capacidad de adaptarse a diferentes agroecosistemas y afectar los cultivos en zonas templadas, tropicales y bajo cualquier sistema de cultivo, bien sea secano, secano favorecido o irrigado (GRiSP, 2013).

2.2 Generalidades del añublo del arroz

2.2.1 Importancia de la enfermedad

El Añublo del arroz causado por *Magnaporthe oryzae* (Anamorfo: *Pyricularia oryzae*), es la enfermedad de mayor distribución y de mayor importancia económica del cultivo, presentándose en zonas templadas y subtropicales y causa pérdidas en productividad que

pueden oscilar entre el 17 y el 52%. Estos porcentajes de pérdidas se han calculado en Asia, África y América Latina (Ou, 1985; Carvalho y Guimaraes, 2003; Wang *et al.*, 2014).

2.2.2 Agente causal

Con respecto a la nomenclatura, este hongo era conocido como *Pyricularia oryzae* Cavara (1891) y su rango de hospederos se limitaba principalmente a especies del género *Oryzae*. *Pyricularia grisea* Sacc (1880), se consideró morfológicamente distinto de *P. oryzae* y se conoce en gran número de malezas (Nishikado, 1917; Sawada, 1917; Ellis, 1971, Citados por Rossman *et al.*, 1990; www.tecnicoagricola.es, 2012). Debido a que no existieron bases para distinguir especies entre cepas que afectaban al arroz y cepas que afectaban las malezas (Crawford *et al.* 1986, citados por Prado, 1994), ambos anamorfos se agruparon bajo el nombre de *Pyricularia grisea* (Rossman *et al.* 1990), puesto que los códigos de la Sidney consideran como regla prioritaria utilizar el nombre más antiguo del patógeno, en este caso *P. grisea* Sacc (1880). Sin embargo en la actualidad los especialistas en este patógeno recomiendan denominarlo como *Magnaporthe oryzae* (Valent comunicación personal), como se denominara en adelante.

2.2.3 Clasificación taxonómica

Este patógeno se encuentra clasificado de la siguiente manera:

Reino: Fungi
Phylum: Ascomycota
Clase: Sordariomycete
Orden: Magnaporthales
Familia: Magnaporthaceae
Género: Magnaporthe
Especie: *Magnaporthe oryzae*

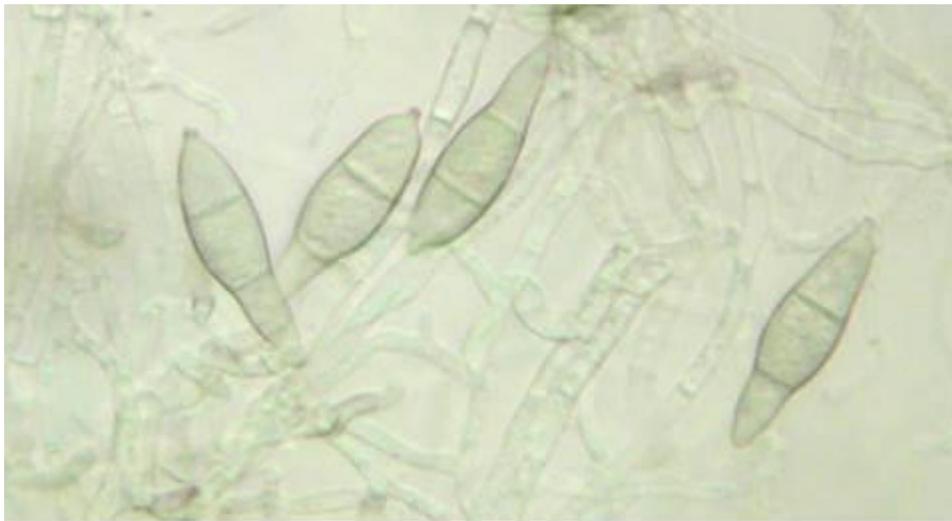
Al existir el estado perfecto de un hongo y siguiendo los códigos de la Sidney, el nombre del hongo en su estado perfecto es el que se debe utilizar para referirse en todas sus formas (ASCOLFI, 1993). En este trabajo se designará al patógeno como *Magnaporthe*

oryzae, pues es la designación que oficialmente se ha sugerido (www.catalogueoflife.org/col/species, 2000; www.tecnicoagricola.es, 2012).

2.2.4 Morfología

En su fase asexual posee conidióforos simples, parduscos y tabicados que nacen solitarios o en grupos de tres, en cuyos extremos llevan las conidias, las cuales son fusiformes, hialinas y divididas en forma equidistante por dos septas (Figura 2-1). Sus medidas son aproximadamente $22-24\mu \times 10-12\mu$. El micelio es tabicado y esponjoso (Ou, 1985; www.tecnicoagricola.es, 2012).

Figura 2.1. Esporas de *Magnaporthe oryzae* (Fase asexual)



En su fase sexual, este hongo posee peritecios que se presentan en forma individual o agrupados, con estromas aparentes y cuello bastante alargado. La base del peritecio es de color pardo oscuro o negro, globoso y tiene 180μ de diámetro. El cuello es hialino, pero puede tornarse oscuro con el tiempo, particularmente en la parte basal; midiendo aproximadamente 90μ de diámetro \times 600μ de largo. Las ascas se forman en la base del peritecio, miden aproximadamente $8,5\mu \times 70\mu$, son de forma cilíndrica, subclavada, unitabuada y presentan un poro en uno de los extremos. Generalmente cada asca contiene 8 ascosporas, las cuales son hialinas, fusiformes, triseptadas, ligeramente curvadas y miden aproximadamente $4,7\mu \times 17-24\mu$ (Hebert, 1971; www.tecnicoagricola.es, 2012).

2.2.5 Sintomatología

Magnaporthe oryzae afecta todas las partes aéreas de la planta de arroz: Hojas, nudos, cuello y panícula. Las lesiones en las hojas se presentan desde pequeños puntos de color café, hasta formar rombos o diamantes de color verde oliva o gris, rodeados por un halo más claro, los bordes de la lesión son de color pardo o pardo oscuro (Figura 2-2). Estas lesiones pueden crecer hasta juntarse y afectar las hojas completamente. La forma, color, tamaño y número de lesiones varía de acuerdo a las condiciones ambientales, a la edad de la planta y al grado de susceptibilidad de la variedad (Ou, 1985; www.tecnicoagricola.es, 2012).

Figura 2.2. Lesiones iniciales y típicas causadas por *M. oryzae* en hojas de arroz



En los tallos, se forman manchas de color café oscuro que rodean los nudos en forma de anillo hasta producir un estrangulamiento de los mismos, este síntoma es observado únicamente en variedades muy susceptibles.

En el cuello de la panícula es donde se produce el daño de mayor importancia económica, inicialmente se forma una mancha de color pardo grisáceo que luego rodea la base de la

espiga y que puede causar vaneamiento total de la panícula cuando el ataque se presenta durante la floración. Si el ataque se presenta cuando el grano está en estado lechoso, la maduración se puede anticipar y en la cosecha resultan granos vanos o parcialmente formados junto con granos normales, siendo estos de baja calidad molinera (Figura 2-3) (Villarraga y Andrade, 1982; Ou, 1985; www.tecnicoagricola.es, 2012).

Figura 2.3. Lesión en cuello de panícula causada por *M. oryzae*.

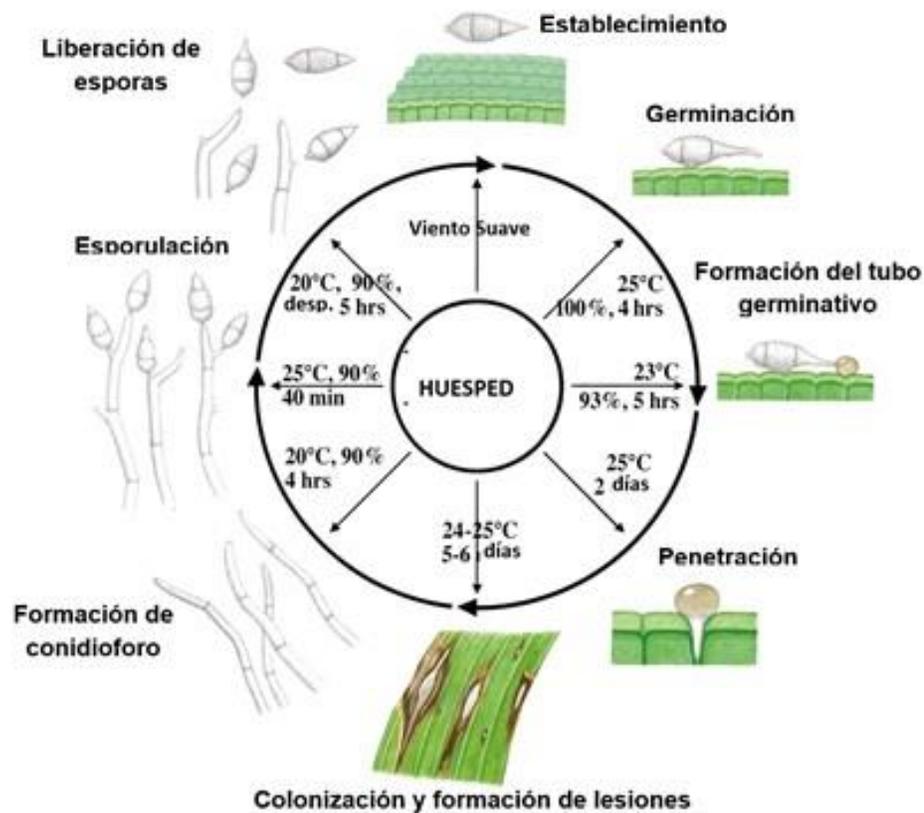


2.2.6 Epidemiología

2.2.6.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida del hongo se repite bajo condiciones favorables y se presenta cuando una conidia se deposita en el tejido de la planta, bien sea hoja, tallo o cuello de panícula. Esta conidia e inicia su proceso de infección, formando el tubo germinativo, luego el apresorio con su respectiva clavija, que penetra a través de la cutícula y de la epidermis. De esta manera se inicia la colonización de las células de la planta (Figura 2-4) (Ou, 1985; Correa, 1997a; Pinzón, 2003; www.tecnicoagricola.es, 2012).

Figura 2.4. Esquema del ciclo de vida de *M. oryzae* en su fase asexual (Pinzón, 2003)



2.2.6.2 Ambientes

Los factores del medio ambiente y de la planta que favorecen el desarrollo del hongo son: Alta humedad relativa, lloviznas prolongadas, vientos suaves, baja luminosidad, periodos de rocío de 12 a 14 horas (Correa, 1997a; www.tecnicoagricola.es, 2012)

2.2.6.3 Esporulación

La tasa de esporulación aumenta cuando hay un incremento en la humedad relativa. La producción de conidias ocurre aproximadamente 6-7 días después de la inoculación. El máximo potencial de esporulación se puede obtener a temperaturas medias (aproximadamente 20°C), aunque se alcanza muy pronto si la temperatura es más alta (Correa, 1997a; www.tecnicoagricola.es, 2012).

2.2.6.4 Diseminación

Las lesiones se forman principalmente cuando la humedad relativa está entre 85% y 93%. La formación de las conidias alcanza su punto máximo de tres a ocho días después de la aparición de las lesiones foliares. La mayoría de las conidias son producidas y liberadas durante la noche, entre las 6:00pm y las 2:00am y se ha calculado que una lesión típica producen entre 2.000 a 6.000 conidias por día, durante 14 días bajo condiciones de laboratorio. Una vez las conidias son producidas, estas se liberan y diseminan por acción del viento y la lluvia en los cultivos de arroz (Ou, 1985; Correa, 1997a; www.tecnicoagricola.es, 2012).

2.2.7 Variabilidad patotípica

Magnaporthe oryzae es una continua amenaza para la producción de arroz (Luo *et al.*, 2005), y pese a los grandes esfuerzos de los mejoradores, este patógeno sigue causando pérdidas considerables en el cultivo, convirtiéndose de igual manera en una amenaza para el suministro global de alimentos, debido a la capacidad que tiene de afectar otros cereales como cebada, trigo y millo (Zeng *et al.*, 2009). El desarrollo de líneas resistentes ha sido el medio más eficaz para el control de este patógeno, sin embargo, los materiales seleccionados pierden su resistencia pocos años después de ser cultivados en zonas con alta incidencia de la enfermedad (Correa y Martínez, 1995; Khush y Jena, 2009; Luo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013).

Existen varias explicaciones posibles a las que se les atribuye la poca durabilidad de la resistencia de las variedades liberadas:

- a. El hongo tiene una gran variación patotípica que está dada por los genes de virulencia/avirulencia, y que se expresa también en la existencia de razas fisiológicas compatibles con genes de resistencia incorporados en nuevas variedades (Hamer *et al.*, 1992; Correa y Zeigler, 1993a; Correll *et al.*, 2000; Koizumi, 2009; Wang *et al.*, 2013).
- b. Selección de líneas en sitios donde no están presentes todas las razas o que las frecuencias de algunas de ellas sean tan bajas que no se puedan detectar. Esto haría que cuando estas líneas sean expuestas a razas nuevas presentes en la

localidad donde se va a sembrar masivamente sea susceptible; de otro lado, podría suceder que las frecuencias de las razas que están bajas en el momento de la selección y que sean capaces de enfermar las líneas seleccionadas, se incrementen y las infecten.

La alta variabilidad del hongo en términos de su composición en razas, es uno de los factores que hacen difícil la obtención de variedades de arroz con resistencia durable a la enfermedad (Valent, 1997. Citada por Jia *et al.*, 2009; Odjo *et al.*, 2014). En estudios realizados en Colombia se encontraron más de 45 razas del patógeno, las cuales presentaron compatibilidad con 13 genes de resistencia conocidos, basados en el sistema de diferenciales tradicional (Tablas 2-1 y 2-2). El rango de las frecuencias de virulencia en 12 variedades de arroz con genes de resistencia conocidos en estudios realizados en CIAT, osciló entre 0.14 y 0.78, ningún material fue susceptible a todos los aislamientos y ningún aislamiento fue compatible con la variedad *Oryzica* Llanos 5 (Tabla 2-1) (Correa y Zeigler, 1993b; Correa *et al.*, 1997). La interacción compatible altamente específica, también observada en estos estudios entre algunos cultivares con genes de resistencia conocidos y aislamientos del hongo recuperados de estas variedades sugirió que, mediante cruzamientos de variedades o líneas que muestren resistencia complementaria, se pueden generar combinaciones potencialmente útiles de genes de resistencia, para las cuales el patógeno no muestra una acumulación de los correspondientes factores de virulencia con dichos genes de resistencia (Tabla 2-2) (Levy *et al.*, 1993; Correa *et al.*, 1997).

Tabla 2-1. Frecuencias de virulencia en una población de *M. oryzae* en Colombia

Variedad	Gen de resistencia	Frecuencia de virulencia	Número de aislamientos
Oryzica Llanos 5	Desconocido	0	250
Fujisaka 5	<i>Pi-i, Pi-ks</i>	0.14	152
Fukunishiki	<i>Pi-z</i>	0.22	135
Tsuyuake	<i>Pi-km, Pi-m</i>	0.25	118
Tetep	<i>Pi-kh</i>	0.26	149
BL-1	<i>Pi-b</i>	0.43	155
K-1	<i>Pi-ta</i>	0.47	138
Shin 2	<i>Pi-ks</i>	0.54	136
Pi No 4	<i>Pi-ta2</i>	0.64	159
Dular	<i>Pi-ka</i>	0.64	154
Kusabue	<i>Pi-k</i>	0.67	141
Aichi Asahi	<i>Pi-a</i>	0.75	145
K-59	<i>Pi-t</i>	0.78	111
Fanny	Desconocido	0.86	167

Fuente: Correa *et al.*, 1997.

Tabla 2-2. Acumulación de factores de virulencia en aislamientos de *M. oryzae*, colectados en un sitio de evaluación y selección por resistencia al añublo del arroz en Colombia.

Variedad	Gen de resistencia	*Compatibilidad según aislamiento					
		1	2	3	4	5	6
Aichi Asahi	<i>Pi-a</i>	+	+	+	+	+	+
BL-1	<i>Pi-b</i>	+	+	+	-	+	-
Shina 2	<i>Pi-ks</i>	+	+	+	+	-	-
Dular	<i>Pi-ka</i>	+	+	+	+	-	-
Fukunishiki	<i>Pi-z</i>	+	-	+	-	-	-
Kanto 51	<i>Pi-k</i>	+	+	-	+	-	+
K-1	<i>Pi-ta</i>	+	+	+	+	-	-
K-59	<i>Pi-t</i>	+	+	+	+	-	-
CICA 9	-	+	+	-	-	-	+

*El signo (+) indica compatibilidad. Fuente: Correa *et al.*, 1997.

La diversidad en virulencia encontrada en la población del hongo en Colombia, sugiere claramente que para el control del añublo del arroz se necesitan nuevos genes de resistencia o combinaciones de estos, los cuales son solamente superados por parte de la población del hongo (Correa *et al.*, 1997).

Con la necesidad de explorar nuevos genes de resistencia que combinados entre ellos proporcionen resistencia durable a *M. oryzae*, es importante tener en cuenta que durante los últimos 25 años se han logrado grandes avances en los estudios de la genética de la resistencia al añublo del arroz. La utilización de análisis genéticos convencionales para la identificación de fuentes de resistencia, la disponibilidad de aislamientos monospóricos del hongo y el uso de técnicas moleculares avanzadas, han permitido identificar a nivel mundial más de 60 genes de resistencia. Los cuales han sido designados como *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-3*, *Pi-4*, *Pi-5*, *Pi-6*, *Pi-7*, *Pi-9*, *Pi-10* y *Pi-11* (Causse *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994), *Pi-a*, *Pi-b*, *Pi-k*, *Pi-t*, *Pi-ta*, *Pi-ta2*, *Pi-12*, *Pi-7*, *Pi-18*, *Pi-19*, *Pi-20*, *Pi-23*, *Pi-57*, *Pi-62* (Nagato y Yoshimura, 1998), *Pi-i* y *Pi-5* (Pan *et al.*, 2003), *Pi-21* (Fukuota y Okuno, 2001), *Pi-25* (Yang *et al.*, 2001), *Pi-27* (Zhu *et al.*, 2004), *Pi-24*, *Pi-25*, *Pi-26*, *Pi-27*, *Pi-28*, *Pi-29*, *Pi-30*, *Pi-31*, *Pi-32* (Sallaud *et al.*, 2003), *Pi-33* (Berruyer *et al.*, 2003), *Pi-sh* (Fukuta *et al.*, 2005), *Pi-38* (Gowda *et al.*, 2006), *Pi-39* (Liu *et al.*, 2007) y *Pi-40* (Jeung *et al.*, 2007).

Hasta ahora en ningún país de América Latina, se han utilizado marcadores moleculares asociados a genes de avirulencia, por lo tanto el estudio poblacional se ha limitado a determinar las variaciones genéticas a lo largo del genoma (linajes o familias genéticas), y a la caracterización de genes de avirulencia mediante evaluaciones en invernadero (Pulgarin, 2005); siendo aún estas técnicas muy utilizadas en diferentes países, pues son un gran apoyo en la identificación de genes de resistencia que podrían ser útiles en ciertos agroecosistemas (Wang *et al.*, 2013; Odjo *et al.*, 2014).

2.2.8 Diversidad genética

En el año 1989 Hamer *et al.*, identificaron una secuencia repetitiva de ADN de *Magnaporthe oryzae*, la cual llamaron MGR586 y que representa aproximadamente 50 copias del genoma de este hongo. Esta secuencia ha sido ampliamente utilizada para el análisis genético de poblaciones de *Magnaporthe oryzae* en diferentes países del mundo a través de la técnica RFLP DNA-Fingerprinting (Levy *et al.*, 1991 y 1993, Correl *et al.*, 2002, Graterol *et al.*, 2010). Años más tarde, en 1998 George *et al.*, utilizaron otro elemento repetitivo del genoma del mismo hongo, el cual comparte una estructura similar con la de MGR586 y Pot1 de *Fusarium oxysporum*. Este elemento conocido como Pot2 posee 1.857 pares de bases y representa una de las mayores secuencias repetitivas del ADN aislada de *Magnaporthe oryzae*, encontrándose en aproximadamente 100 copias del genoma del

hongo, en contraste con la secuencia MGR586 que está presente en 50 copias, como se mencionó anteriormente. Esta secuencia también se ha utilizado en análisis genéticos de poblaciones del hongo (George *et al.*, 1998).

Estudio iniciales, mediante la técnica RFLP DNA-Fingerprinting, (RFLP=Restriction Fragment Length Polymorfism), y empleando la sonda MGR-586 se logró agrupar la población de *M. oryzae* de Colombia en seis familias genéticas estadísticamente diferentes, denominados SRL-1 a SRL-6, existiendo una alta correlación entre la estructura genética de los aislamientos de cada linaje y sus espectros de virulencia, siendo los linajes SRL-4, SRL-5 y SRL-6 los que presentaron el más amplio espectro de virulencia (Tabla 8) (Levy *et al.*, 1993; Correa *et al.*, 1997a,b,c). El espectro de virulencia de las seis familias genéticas en Colombia mostró compatibilidad con todos los genes de resistencia conocidos hasta ese momento (Tabla 2-3) (Correa y Zeigler, 1993b; Correa *et al.*, 1997a,b,c).

En un estudio desarrollado por Flor (1998), se demostró que hasta ese momento no se observaban cambios estructurales en la población del patógeno en Colombia, en cuanto a su espectro de virulencia y su estructura genética, observándose sólo la presencia de un nuevo linaje (SRL-6B), conformado por aislamientos que presentaban algunos patrones de virulencia distintos a los del linaje SRL-6; un trabajo similar fue reportado por Bonman (1987).

Tabla 2-3. Espectro de virulencia de seis linajes genéticos de *M. oryzae* hallados en Colombia, inoculados en cultivares de arroz con genes de resistencia conocidos.

Cultivar	Gen de Resistencia	Reacción ^a según linaje genético					
		SRL-1	SRL-2	SRL-3	SRL-4	SRL-5	SRL-6
Aichi Asahi	<i>Pi-a</i>	+	+	-	+	+	+
BL 1	<i>Pi-b</i>	-	+	-	+	-	+
Caloro	<i>Pi-k^s</i>	-	-	-	+	+	+
Fukunishiki	<i>Pi-z</i>	-	-	-	+	-	+
Fujisaka 5	<i>Pi-i, Pi-k^s</i>	-	-	-	+	+	-
K 1	<i>Pi-ta</i>	-	-	+	+	+	-
K 59	<i>Pi-t</i>	+	-	-	+	+	+
Tetep	<i>Pi-k^h</i>	-	-	-	-	+	-

a. El signo + indica reacción compatible.

Fuente: Correa *et al.*, 1997.

La caracterización patotípica de las poblaciones de *M. oryzae* permiten determinar la frecuencia de genes de avirulencia (Tabla 6), lo cual conlleva a la identificación de las mejores combinaciones de genes de resistencia con el objetivo de piramidarlos tratando de desarrollar variedades con resistencia durable a este patógeno (Khush y Jena, 2009; Correa y Martínez, 2009).

De acuerdo con lo anterior y con la idea de poder generar germoplasma de arroz con resistencia durable al añublo, el CIAT desarrolló una estrategia que consistió en lo siguiente:

1) Evaluar y seleccionar líneas en sitios donde la presión de la enfermedad y la diversidad genética del patógeno sean altas. En Colombia, la estación experimental de Santa Rosa, localizada a 20 Km de Villavicencio-Departamento del Meta, se consideró como el sitio adecuado para realizar este tipo de ensayos de selección, debido a que las condiciones climáticas son propicias para que se presenten altas presiones de la enfermedad y además se ha determinado que allí hay una gran diversidad genética de *M. oryzae* (Correa y Zeigler, 1993a y 1993b; Levy *et al.*, 1993; CIAT informe anual, 1995).

2) Seleccionar progenitores que muestren resistencia sólo a una parte de la población del hongo, pretendiendo obtener resistencia a todas las familias genéticas compatibles mediante la acumulación de genes de resistencia complementarios (Levy *et al.*, 1993; Correa y Martínez, 1995).

3) Estudiar las frecuencias de virulencia/avirulencia del hongo y sus combinaciones para la identificación de genes de resistencia útiles que permitan mejorar las estrategias para el desarrollo de variedades resistentes. Para esto, se deben llevar a cabo estudios permanentes que ayuden a entender la dinámica y los procesos que conllevan a la evolución de este patógeno, mediante la caracterización de la estructura genética y la diversidad en virulencia (Correa y Zeigler, 1993b; Levy *et al.*, 1993; CIAT, informe anual, 2000).

4) Analizar la genética de la resistencia identificando genes de resistencia en las plantas mediante el uso de marcadores moleculares (Correa, 1994; Levy *et al.*, 1991; Tohme *et al.*, 1991).

Una metodología para apoyar esta estrategia, es la selección de fenotipos virulentos identificados y representantes de toda la diversidad de *M. oryzae* en Colombia, bajo condiciones de invernadero. Esto ayudaría a la selección de germoplasma de arroz con resistencia complementaria al patógeno, puesto que es conocido que una sola raza y/o fenotipo de virulencia no es capaz de atacar a todo el grupo de variedades y/o líneas de prueba que posean diversidad genética en sus componentes de resistencia. El germoplasma identificado con resistencia complementaria puede ser incorporado en los programas de mejoramiento para el desarrollo de líneas con resistencia durable al añublo (Correa *et al.*, 1997a,b,c).

La caracterización genética y patotípica del hongo ha sido de gran ayuda para esta estrategia, pues por la especificidad de los factores de virulencia/avirulencia encontrados dentro de cada familia genética se ha podido inferir que líneas o variedades comerciales susceptibles en condiciones de campo, pueden poseer resistencia a parte de la población del hongo y por lo tanto ser usados como fuentes de resistencia complementaria y de esta manera desarrollar nuevas variedades con resistencia durable a *M. oryzae*; siendo la variedad *Oryzica* Llanos 5 un ejemplo de lo planteado, pues presenta resistencia a los aislamientos representativos de las seis familias genéticas desde su liberación en 1985, sin perder su resistencia. Esta variedad fue obtenida a partir de 5 progenitores (Tabla 2-4), cada uno de los cuales presenta susceptibilidad a parte de la población del hongo en Colombia, y por su complementariedad en la resistencia se logró excluir toda la población del patógeno en nuestro país en el tiempo en que se realizó este estudio (Correa *et al.*, 1997a,b,c).

Tabla 2-4. Resistencia complementaria a *M. oryzae* en líneas progenitoras de la variedad Oryzica Llanos 5 en Colombia.

Progenitor	Reacción ^a según familia genética					
	SRL-1	SRL-2	SRL-3	SRL-4	SRL-5	SRL-6
IR 36	R	R	R	R	S	S
CICA 7	R	R	S	S	R	S
CICA 9	S	S	R	R	R	R
5685	R	R	R	R	S	S
COLOMBIA 1	R	R	R	S	R	R

^a R= Todos los aislamientos probados fueron incompatibles; S= Algunos aislamientos fueron incompatibles y otros compatibles.

Fuente: Correa *et al.*, 1997.

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad no se sabe cómo está conformada la población de este patógeno en Colombia, en cuanto a su variabilidad patotípica y su diversidad genética, como tampoco porque la selección de materiales en la Estación Experimental de Santa Rosa (EESR-Meta) no está siendo igual de efectiva que en el pasado. Por esta razón en este estudio se hizo una nueva caracterización patotípica y genética de la población del hongo para tratar de detectar los posibles cambios que se han presentado en ella y así poder plantear una estrategia para desarrollar variedades de arroz resistentes a la población actual del hongo, para lo cual se utilizó el nuevo grupo de líneas monogénicas diferenciales desarrolladas por JIRCAS - IRRI, las cuales están siendo utilizadas en diferentes países de Asia y por primera vez se utilizaron en Colombia para la caracterización patotípica del patógeno. Estas líneas representan un total de 25 genes de resistencia a *Magnaporthe oryzae* (Tabla 1-5).

La caracterización genética se realizó, mediante la técnica rep-PCR *pot2* propuesta por George *et al.*, 1998; esta técnica se utilizó por ser menos laboriosa, requerir menos tiempo y ser igual de confiable que los RFLP.

Finalmente, el uso del nuevo sistema de diferenciales permitió la identificación de los mejores genes de resistencia frente a la población de *Magnaporthe oryzae* estudiada, e igualmente facilitó la identificación de genes de avirulencia en el patógeno ya que permitió seleccionar los aislamientos basados en el agrupamiento de razas para realizar estudios de genética asociativa.

3. Materiales y Métodos

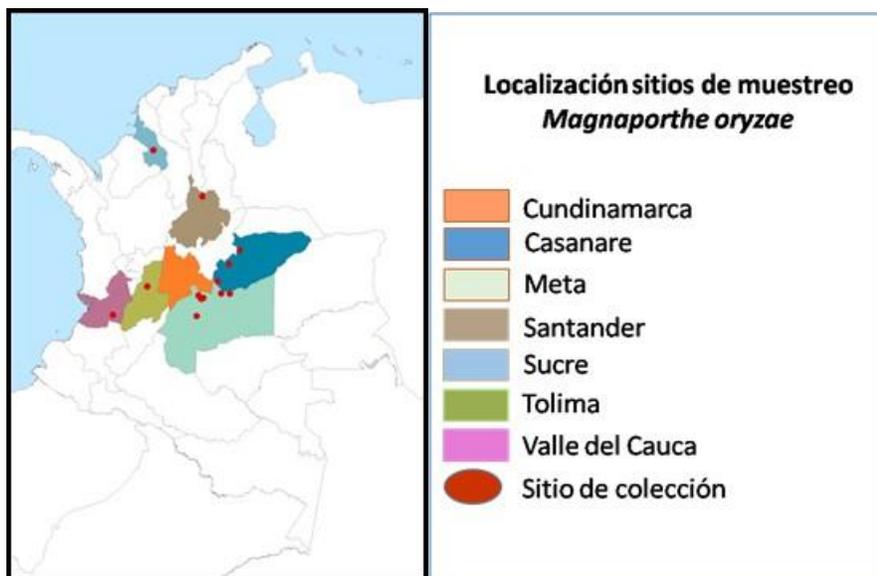
Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología y la casa de malla del proyecto de arroz del CIAT, ubicado en la ciudad de Palmira, Departamento del Valle del Cauca, Colombia a 965msnm, con coordenadas geográficas: Latitud 3° 31 'N y longitud 76° 20'. Condiciones ambientales: temperatura promedio anual de 23.9°C, humedad relativa del 78% y precipitación promedio de 1100mm.

3.1 Caracterización patotípica

3.1.1 Colección de muestras afectadas con *Magnaporthe oryzae*

Se colectaron muestras afectadas con el hongo (hojas y cuellos de panícula) en diferentes sitios de siete departamentos pertenecientes a las zonas productoras de arroz en Colombia (Casanare, Cundinamarca, Norte de Santander, Meta, Sucre, Tolima y Valle) (Figura 3-1), en diferentes años (2008, 2009, 2010, 2011 y 2012) y diversos materiales de arroz (99 en total), entre ellos, variedades comerciales de Colombia, líneas diferenciales-monogénicas y líneas de prueba de los programas de mejoramiento del CIAT y FLAR (Anexo 1). Estas muestras se procesaron en el laboratorio de patología de arroz del CIAT para la respectiva obtención de aislamientos monospóricos, los cuales posteriormente fueron caracterizados patotípicamente mediante inoculaciones sobre las líneas diferenciales-monogénicas desarrolladas por Tsunematsu *et al.*, 2000 y Kobayashi *et al.*, 2007; citados por Hayashi y Fukuta, 2009; Fukuta *et al.*, 2009; Odjo *et al.*, 2014 y genéticamente mediante la técnica rep-PCR *Pot2*.

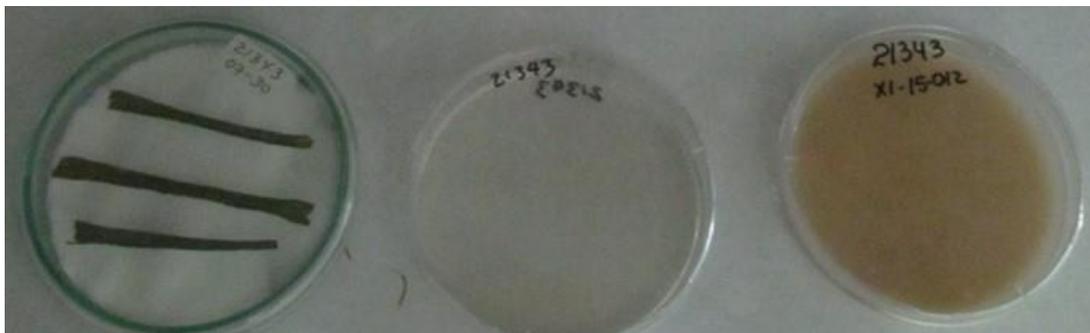
Figura 3.1. Sitios de colección de muestras afectadas por *M. oryzae*



3.1.2 Obtención de aislamientos monospóricos del hongo

Con cada muestra se hicieron cámaras húmedas que se incubaron a 28°C durante 24 horas, tiempo después del cual se observaron a través del estereoscopio y con la ayuda de una aguja de aza se tomaron esporas de las lesiones y se colocaron sobre medio de cultivo agar-agua (agar=20gr; agua= 800ml). Las esporas se esparcieron con la ayuda de un rastrillo de vidrio sobre las cajas con el medio de cultivo, las cuales se incubaron a 28°C durante 24 horas. Posteriormente, se hicieron observaciones en el estereoscopio y las esporas germinadas se transfirieron individualmente a cajas de Petri con agar-salvado de arroz (agar=16 gr; agua=800ml; salvado de arroz= 20gr). Estas cajas se incubaron bajo luz blanca directa durante 8 días a 23°C (Figura 3-2).

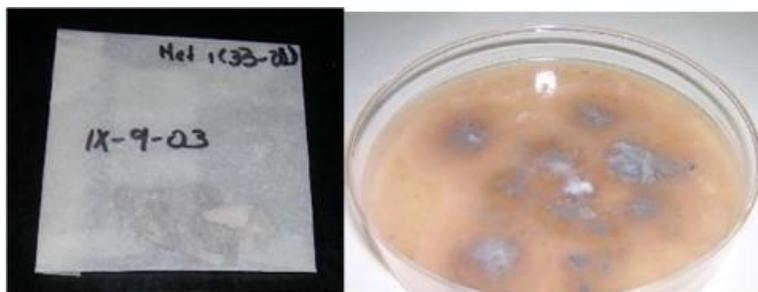
Figura 3.2. Proceso para la obtención de aislamientos de *M. oryzae*. a. Cámara húmeda; b. siembra de conidios en agar-agua. c. Siembra de conidias en Salvado de arroz.



3.1.3 Almacenado de los aislamientos en papel filtro

Trozos de papel filtro estéril de 2 cm², se colocaron sobre medio de cultivo agar-salvado de arroz. Sobre el papel filtro se colocaron pequeños trozos de agar con micelio de las colonias monospóricas obtenidas anteriormente y se incubaron bajo luz blanca directa a 23°C durante 8 días, hasta obtener el crecimiento del hongo en el papel filtro. El papel filtro con el hongo crecido, se colocó en cajas Petri vacías y estériles y se incubaron a 28°C durante 8 días, para el proceso de secado del papel impregnado con el hongo. El papel filtro seco, se empacó en sobres de papel cera estériles y se almacenaron a -20°C (Aricapa y Correa 1994). Este sistema de almacenamiento asegura la sobrevivencia de las colonias durante más de 5 años sin que estas pierdan viabilidad (Figura 3-3).

Figura 3.3. Almacenado de aislamientos en papel filtro



3.1.4 Siembra y multiplicación del hongo

Los aislamientos seleccionados, previamente almacenados en papel filtro, se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo agar-salvado de arroz y se colocaron bajo luz blanca directa durante 8 días a 23°C. Después de este tiempo los aislamientos ya habían crecido lo suficiente para hacer la multiplicación de estos mismos para las respectivas inoculaciones.

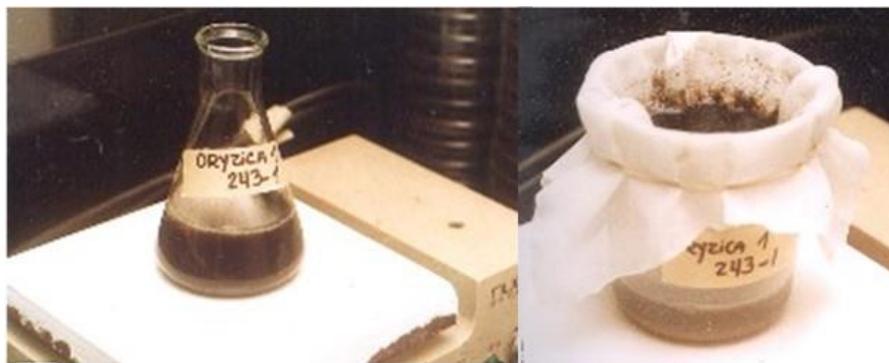
3.1.5 Multiplicación de aislamientos

Con los aislamientos previamente sembrados, se tomaron los de mejor crecimiento y se transfirieron de nuevo a cajas Petri con medio de cultivo agar-salvado de arroz y se colocaron en cámaras de incubación bajo luz blanca directa a 23°C durante 8 días.

3.1.6 Preparación del inóculo

Una vez multiplicado el hongo, se preparó el inóculo, para lo cual, se raspó el micelio y las esporas con la ayuda de una espátula de aluminio estéril, el micelio obtenido se colocó en un erlenmeyer de 200ml con una solución de gelatina al 0.5% y se agitó con la ayuda de un agitador magnético durante 15 minutos, después se hizo un tamizado para obtener la solución sólo con esporas; luego se procedió a realizar el conteo de esporas en un hemacitómetro (AO Bright-Line Hemacytometer counting chamber. AO scientific instruments. DIV of Warner-lambert technologies. INC. Box 123. Buffalo. NY 14240. USA). La concentración de esporas que se utilizó para las inoculaciones fue de 5×10^5 esporas por ml de solución de gelatina (Figura 3-4).

Figura 3.4. Preparación de inóculo de *Magnaporthe oryzae*



3.1.7 Siembra de líneas monogénicas en invernadero

En este estudio se utilizó el nuevo grupo de líneas diferenciales desarrolladas por Tsunematsu *et al.*, 2000 y Kobayashi *et al.*, 2007; citados por Hayashi y Fukuta, 2009; Fukuta *et al.*, 2009; Odjo *et al.*, 2014; el cual consiste de 26 líneas monogénicas que representan 23 genes de resistencia (Tabla 5).

Dentro de este grupo de líneas esta la variedad LTH, la cual se utilizó como testigo susceptible por no poseer ningún gen de resistencia y por ser la variedad que se utilizó como progenitor recurrente para la formación de este nuevo grupo de líneas diferenciales-monogénicas (Ling *et al.* 1995, Hayashi y Fukuta 2009; Odjo *et al.*, 2014).

Cada Línea se sembró en materos de 4 pulgadas de diámetro, colocando ocho semillas por matero y 10 días después de la germinación se hizo un raleo para dejar cinco plantas por matero para ser inoculadas (Figura 3-5).

Figura 3.5. Siembra de líneas a inocular



Las fertilizaciones de las plantas se hicieron en dos aplicaciones y sólo con Nitrógeno en dosis comerciales (180 kg/ha) para favorecer el desarrollo de la enfermedad.

3.1.8 Inoculación de plantas

Para las inoculaciones se utilizaron cámaras de incubación de plástico y dentro de cada cámara se colocaron 10 materos. Estas cámaras proporcionan las condiciones ambientales necesarias para el óptimo desarrollo de la enfermedad (temperatura aproximada de 28°C, humedad relativa >80% y rocío permanente). Al momento de hacer las inoculaciones las cámaras se taparon para evitar el escape de inóculo y para que en la noche se diera la condición y el periodo de rocío necesario. Las plantas se incubaron 8 días, tiempo en el cual, las cámaras se destapaban en la mañana siguiente de la inoculación y durante el día se hacían cuatro riegos por aspersion para mantener una buena humedad dentro de cada cámara y rocío en las hojas; este proceso se realizaba todos los días hasta el día de la evaluación. (Figura 3-6).

Figura 3.6. Inoculación e incubación de plantas

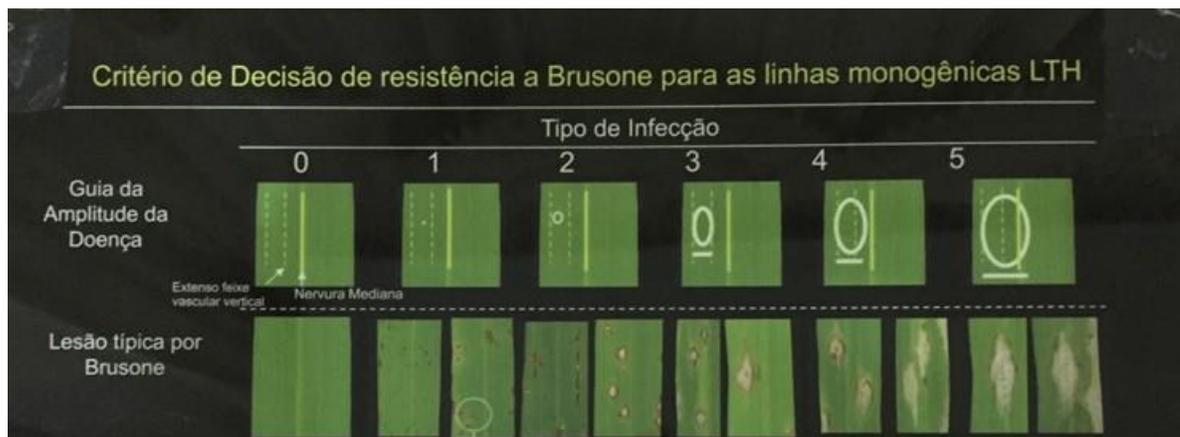


Cada línea se inoculó con todos los aislamientos obtenidos, una vez las plantas tenían cinco hojas desarrolladas, aproximadamente 21 días después de la siembra. Se hicieron dos repeticiones en el tiempo por aislamiento, donde cada repetición estuvo representada por dos materos para tener un total de 10 plantas por repetición; al final se evaluaron 20 plantas por línea inoculada con cada aislamiento. Como testigos susceptibles se utilizaron las variedades LTH y Fanny.

3.1.9 Evaluación

Las evaluaciones se hicieron 8 días después de las inoculaciones, teniendo en cuenta sólo el tipo de lesión, y considerando como **resistentes** aquellas líneas que presentaron tipo de lesión 1 y 2 y **susceptibles** las que presenten tipo de lesión 3, 4 o 5, de acuerdo a lo propuesto por Hayashi y Fukuta 2009 (Figura 3-7).

Figura 3.7. Tipos de lesión para categorizar las reacciones de las líneas evaluadas



Fuente: Hayashi y Fukuta, 2009.

3.1.10 Diseño experimental

Para la caracterización patotípica de la población de estudio, se utilizó un diseño en parcelas divididas, donde la parcela principal estuvo conformada por los aislamientos y la sub-parcela por los genotipos (líneas y/o variedades), arreglado en Bloques Incompletos, debido a la capacidad limitada de poder ubicar todos los genotipos en una misma cámara de incubación. Este diseño permitió controlar el impacto que la cámara pudo haber ejercido sobre la interacción del aislamiento x genotipo. La unidad experimental estuvo conformada por dos materos con 5 plantas cada uno.

3.1.11 Análisis estadístico

Para la designación de razas se utilizó la metodología propuesta por Hayashi y Fukuta (2009), las cuales se estiman a partir de la reacción de los 25 genes de resistencia

presentes en las 26 nuevas líneas diferenciales monogénicas desarrolladas para este fin y para lo cual se procede de la siguiente manera:

Para designar la raza de un aislamiento, se antepone la letra U por ser una raza internacional, seguida de un número de dos dígitos que corresponde al valor de los genes afectados del grupo I; luego se coloca la letra i para hacer referencia a los alelos de los grupo II (*Pii*, ubicados en el cromosoma 9), seguido de un número de un dígito, el cual corresponde a los valores asignados por la afectación de los genes del grupo II; seguidamente va la letra k que hace referencia a los alelos del grupo III (*Pik*, ubicados en el cromosoma 11), seguida de un número de tres dígitos que corresponde a los valores asignados por la afectación de los genes de este mismo grupo III; luego se coloca la letra z, la cual corresponde a los alelos del grupo IV (*Piz*, ubicados en el cromosoma 6), seguida de un número de dos dígitos, el cual corresponde a los valores de afectación de los genes del grupo IV, finalmente se colocan las letras “ta” que corresponden a los alelos del grupo V (*Pita*, ubicados en el cromosoma 12) acompañadas de un número de tres dígitos que hace referencia a los valores de afectación de los genes de este grupo V (Tabla 3-1) desarrollada por Hayashi y Fukuta 2009; Odjo *et al.*, 2014)).

Tabla 3-1. Metodología desarrollada por Hayashi y Fukuta (2009) para la designación de razas de *M. oryzae*.

Grupo de líneas monogénicas	I		II	III			IV		V		
Locus genético	.-		<i>Pii</i>	<i>Pik</i>			<i>Piz</i>		<i>Pita</i>		
Gen R	<i>Pish</i>	.+	<i>Pii</i>	<i>Pik-s</i>	<i>Pik-m</i>	<i>Pik</i>	<i>Pi9(t)</i>	<i>Piz</i>	<i>Pita-2</i>	<i>Pita</i>	<i>Pi19(t)</i>
	<i>Pib</i>	<i>Pla</i>	<i>Pi3</i>	.-	<i>Pi1</i>	<i>Pik-p</i>	.-	<i>Piz-5</i>	<i>Pita-2</i>	<i>Pita</i>	<i>Pi20(t)</i>
	<i>Pit</i>	-	<i>Pi5(t)</i>	.-	<i>Pik-h</i>	<i>Pi7(t)</i>	.-	<i>Piz(t)</i>	<i>Pi12(t)</i>	.-	.-
Línea monogénica	Sh-B	LTH	i-F5	ks-F5	km-Ts	k-Ka	9-W	z-Fu	ta2-Pi	ta-K1	19-A
	b-B	a-A	3-CP4	.-	1-CL	kp-K60	.-	z5-CA	ta2-Re	ta-CP1	20-IR24
	t-K59	.-	5-M	.-	kh-K3	7-M	.-	zt-T	12-M	.-	.-
Código numérico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	.-	2	2	.-	2	2	2	2
	4	.-	4	.-	4	4	.-	4	4	.-	.-
Ejemplo líneas susceptibles	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	S	S	S	.-	S	S	.-	S	S	S	S
	S	.-	S	.-	S	S	.-	S	S	.-	.-
Raza	7	3	7	1	7	7	1	7	7	3	3
ejemplo: U73-i7-k177-z17-ta733											

Fuente: Hayashi y Fukuta, 2009.

3.1.11.1 Índice de concordancia simple de Sokal & Michener

Permitió comparar pares de aislamientos, de acuerdo a sus espectros de virulencia.

3.1.11.2 Frecuencias de compatibilidad y virulencia

Permitió determinar los espectros de virulencia de cada aislamiento, también permitió separar los aislamientos más virulentos de los menos virulentos (Frecuencias de virulencia).

3.1.11.3 Análisis de correspondencia múltiple (ACM)

Permitió representar gráficamente la relación de los individuos de acuerdo a un nivel de distancia y estructurar la población en grupos de patogenicidad, además visualizar estas relaciones en un dendograma (Joseph *et al.*, 1992).

3.1.11.4 Índice de diversidad patotípica

Se determinó teniendo en cuenta los grupos formados por el análisis de ACM.

Estos tipos de análisis se realizaron con el software SAS 9.3, bajo el sistema operativo Linux.

3.2 Caracterización genética

La caracterización genética de la población de *M. oryzae* seleccionada se realizó mediante la técnica rep-PCR *Pot2*, la cual combina una PCR convencional con polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (George *et al.*, 1998). Esta técnica se seleccionó por no requerir enzimas de restricción, no ser radiactiva y porque con ella el máximo de bandas que se logra obtener es de 32, a diferencia de la MGR 586, la cual requiere de enzimas de restricción, es radiactiva y se pueden obtener más de 60 bandas en cada individuo, lo cual hace más compleja la lectura de estas mismas cuando se tienen poblaciones representadas por un gran número de aislamientos.

3.2.1 Preparación del hongo para la extracción de ADN

De cada aislamiento previamente almacenado en papel filtro, se tomaron cuatro fragmentos de 1mm de diámetro cada uno y se sembraron en medio de cultivo Agar - Salvado de arroz (Agar: 16 gr; salvado de arroz: 24 gr; agua destilada: 800 ml) en platos Petri y se incubaron a 23°C bajo luz blanca durante 8 días, tiempo en el que el hongo ha desarrollado bien el micelio, el cual se removió con la ayuda de una pipeta pasteur estéril con 2 ml de medio líquido completo, esta re-suspensión se depositó en un erlenmeyer de 250 ml, el cual contenía 50 ml de medio líquido completo (glucosa: 6gr; peptona: 6gr y extracto de levadura: 6 gr); una vez sembrada la suspensión de micelio en el medio de cultivo completo, los erlenmeyer se incubaron a 27°C durante 7 días en agitación continua en un shaker a 250 RPM. Después de la incubación y agitación, el micelio crecido se filtró y se secó manualmente con la ayuda de una espátula de aluminio estéril y papel toalla estéril, luego se almacenó en papel de aluminio estéril a -80°C en un ultra-freezer (Ultra Low. Isotemp®basic. Kendro Laboratory Products Asheville. NC.USA). El micelio seco de cada aislamiento se maceró en morteros, utilizando nitrógeno líquido y se almacenó -80°C en tubos de centrifuga de 1.5ml de volumen.

3.2.2 Extracción de ADN

La extracción del ADN de cada aislamiento se hizo siguiendo el protocolo CTAB. El buffer CTAB (100mM Tris, 100mM EDTA, 250mM NaCl y 1% de sulfato de sodio peso/vol), se precalentó en baño maría a 65°C durante una hora. Luego los tubos de centrifuga conteniendo el micelio del hongo macerado y almacenado en frío, fueron sacados del freezer y a cada uno se le agregó 700µl del buffer CTAB 2% precalentado a 65°C y 7 µl de 2-mercaptoethanol (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA). Estos tubos fueron agitados en un vortex durante 3 segundos e inmediatamente después se llevaron a incubación durante 10 minutos, después de este tiempo se sacaron del baño maría, se agitaron 3 segundos en vortex y se colocaron de nuevo en baño maría 30 minutos a 65°C. Después de este tiempo se sacaron los tubos del baño maría y en una cámara de flujo laminar se le adicionó a cada uno 300µl de Cloroformo: Iso-amyl alcohol (24:1) (Merck, Merck Millipore Frankfurter Str 20, Germany; Sigma, Sigma-Aldrich, St, Louis, Mo, USA), luego se agitaron suavemente 3 segundos en un vortex. En el siguiente paso cada tubo se centrifugó a 12.000 RPM por 10 minutos y 600µl de la capa superior de la suspensión obtenida, se

tomó con la ayuda de una micropipeta y colocado en otro tubo de centrifuga estéril de 1.5ml de volumen, a esta suspensión se le adicionó 250µl de fenol: cloroformo: iso-amylalcohol (25:24:1 v/v/v) (Merck, Merck Millipore Frankfurter Str 20, Germany), cada tubo se agitó suavemente durante 3 segundos y luego se centrifugó a 12.000 RPM durante 10 minutos, luego se tomaron 500µl de la capa superficial de la suspensión obtenida en cada tubo y se colocaron en otro tubo de centrifuga estéril de 1,5ml de volumen. Se le adicionaron 2µl de RNAsa (Promega, Madison, WI, USA) a cada tubo con la nueva suspensión, estos tubos se incubaron a 37°C durante una hora, después de este tiempo se sacaron de la incubadora y se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos, luego se le adicionó a cada tubo 500µl de iso-propanol (2 propanol) (Sigma.Aldrich, St. Louis, MO, USA), se mezclaron invirtiendo cada tubo manualmente y se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos; después se centrifugó cada tubo a 10.000 RPM durante 5 minutos, una vez centrifugados los tubos, cada uno de ellos se invirtió para decantar la suspensión y se colocó sobre una toalla de papel durante 3 minutos para su respectivo secado. El pellet de ADN obtenido en cada tubo se lavó colocando 1ml de etanol frío al 70% y centrifugándolo nuevamente a 14.000 RPM durante 5 minutos, después de esto se decantó el etanol invirtiendo cada tubo y luego se secó colocando cada tubo invertido sobre una toalla de papel durante 3 minutos. Este procedimiento de lavado del pellet se repitió 2 veces, y para un completo secado del pellet, se incubaron los tubos a 37°C durante una hora. Después de esto se le adicionó a cada tubo 40µl de agua ultra pura (Gifco life technologies, Grand Island, NY, USA) y se almacenaron a 4°C durante 24 horas, tiempo después del cual se leyó la concentración de ADN de cada aislamiento en un Nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000C, Wilmington, DE, USA). Cada muestra se llevó a una concentración de 100ng/µl.

3.2.3 Rep-PCR *Pot2*

Para la PCR se utilizó un par de primers específicos (*Pot2-1* 5' CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT3' y *pot2-2* 5'CCCTCATTCGTCAGACGTTC3' (George *et al* 1998). El volumen final para cada reacción fue de 25µl con 100 ng de ADN genómico de cada aislamiento, 800µM de dNTPs (Takara, Takara Bio Inc, Shiga, Japon), 1X Ex taq buffer (Takara, Takara Bio Inc, Shiga, Japon), 2mM MgCl₂ (Takara, Takara Bio Inc, Shiga, Japon) y 0.625µl de taq DNA polimerasa (Ex taq; Takara, Shiga, Japon). La amplificación de la PCR fue hecha en un equipo Eppendorf Nexus Gradient PCR System (Eppendorf

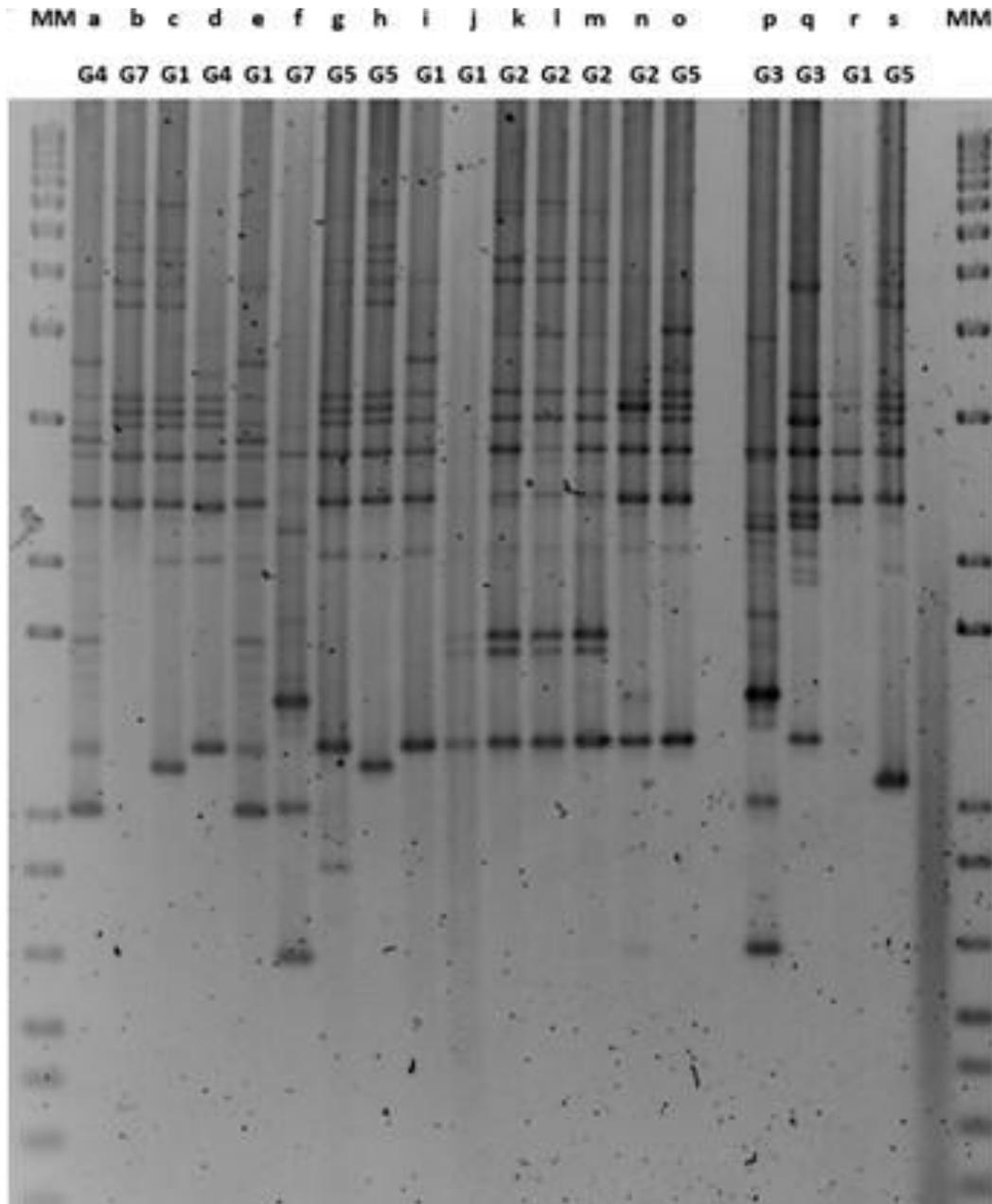
AG, 223331 Hamburg), programado por 4 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 58°C, dos minutos a 72°C y una extensión final por 7 minutos a 72°C y una incubación final 4°C. Los productos de PCR se separaron por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y en un buffer TBE 1X (89mM Tris, 89mM ácido bórico, 2mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)). Los geles se corrieron 12 horas a 50 voltios en una cámara de electroforesis (Gibco BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, Horizon® 20-25, Life Technologies™ Gaithersburg, MD, USA). Para teñir el gel se utilizó 2,5 µl de SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) por 100 ml del gel de agarosa.

3.2.4 Lectura de bandas

La lectura de las bandas se hizo de forma visual (Levy *et al.*, 1993; Flor 1998; Correa *et al.*, 2002) (Figura 3-8).

Se creó una matriz binaria, evaluando cada aislamiento por la presencia y la ausencia de bandas identificadas. El valor uno (1) se asignó a la presencia de cada banda en el aislamiento, el valor cero (0) a la ausencia de la banda. Bandas con poca resolución no fueron tenidas en cuenta. Se consideraron 33 bandas para los análisis de la población, considerando un rango de lectura de bandas entre 650 a 3.500 pares de bases, soportado con el marcador molecular 1Kb plus DNA.

Figura 3.8. Patrones de bandas de 19 aislamientos de *M. oryzae* de Colombia obtenidas mediante la técnica rep-PCR Pot2: 20283(a), 20335(b), 20249(c), 20201(d), 20288(e), 20282(f), 20221(g), 10683(h), 20647(i), 20257(j), 20278(k), 20519(l), 20508(m), 20212(n), 20534(o), 20888(p), 21340(q), 20522(r), 20501(s). G=grupo genético.



3.2.5 Análisis estadístico

Con la matriz de unos y ceros obtenida a partir de la lectura de las bandas, se procedió a realizar los análisis estadísticos en tres etapas:

3.2.5.1 Análisis de correspondencia múltiple (ACM)

Permitió representar gráficamente la relación de individuos de acuerdo a un nivel de distancia y estructurar la población en grupos genéticos, además visualizar estas relaciones en un plano multidimensional y en un dendograma. (Joseph *et al* 1992).

3.2.5.2 Índice de similitud de Nei-Li

También conocida como Similaridad de Dice o Sorensen, el cual permite comparar el perfil genético de pares de aislamientos. Los resultados se representan gráficamente en un dendograma, que se construye mediante el paquete estadístico SAS 9.3.

3.2.5.3 Índice de diversidad genética

Se determinó para la población en general y los grupos formados por el análisis de ACM.

Al igual que para los análisis patotípicos, los análisis moleculares se realizaron mediante el software SAS 9.3 bajo el sistema operativo Linux.

4. Resultados

4.1 Obtención de aislamientos

Del total de muestras tomadas de diferentes materiales de arroz (99 en total) (Anexo 1), diferentes años y departamentos pertenecientes a las zonas arroceras de Colombia, se obtuvieron 101 aislamientos (Anexo 2), con los cuales se inocularon las 26 líneas variedades diferenciales-monogénicas que representan 25 genes de resistencia para hacer los respectivos análisis patotípicos de estos mismos aislamientos.

A este grupo de aislamientos obtenidos, se le sumaron 13 aislamientos que se venían utilizando previamente en el programa de patología de arroz de CIAT para determinar en forma preliminar la reacción (R o S) de las líneas avanzadas de los programas de mejoramiento de arroz de CIAT, FLAR y FEDEARROZ (Anexo 2).

Estos 13 aislamientos habían sido caracterizados en los años 90 por el grupo de patología de arroz de CIAT y representan los siete grupos genéticos encontrados en esa época, además presentan los espectros de virulencia más amplios dentro de cada grupo genético al que pertenecen (Levy *et al.*, 1993; Flor, 1998; Correa *et al.*, 2002) (Tabla 4-1). Estos aislamientos se utilizaron en este estudio como referencia o testigo de los grupos patotípicos y genéticos a los que pertenecen.

Tabla 4-1. Aislamientos representativos de siete grupos genéticos reportados previamente por el grupo de patología de arroz de CIAT.

Consecutivo	Aislamiento	Grupo genético	Año de colección
1	Fanny (54)	SRL-6	1993
2	Selecta 3-20(1)	SRL-6	1994
3	Fanny (47-1)	SRL-5	1990
4	Isolínea 6 (7-1)	SRL-5	1995
5	Isolínea 22 (3-1)	SRL-5	1990
6	Oryzica Caribe 8 (17)	SRL-4	1995
7	Oryzica Caribe 8 (31-2)	SRL-4	1996
8	Metica 1 (33-18)	SRL-3	1993
9	Oryzica Llanos 5 (237-2)	SRL-2	1996
10	Cica 9 (151-1)	SRL-2	1994
11	Cica 9 (15)	SRL-1	1989
12	Cica 9 (52-1)	SRL-1	1989
13	Línea 2 (62)	ALI-7	1993

SRL= Santa Rosa Linaje; ALI= Altillanura
Tomado y modificado de Levy *et al.*, 1993.

Incluidos estos 13 aislamientos, se contó con 114 aislamientos en la población de estudio. La idea de incluir este grupo de aislamientos fue la de determinar si con el nuevo sistema desarrollado para la caracterización patotípica de poblaciones de *Magnaporthe oryzae* (Hayashi y Fukuta, 2009), se conservaba la estructura patotípica previamente determinada por el grupo de patología de arroz del CIAT, bajo el sistema de Mackill and Bonman (1992) (Tabla 1-3) y Ling *et al* (1995) (Tabla 1-4) en el grupo de los 13 aislamientos ya mencionados.

La distribución geográfica de los aislamientos obtenidos e incluidos los 13 de referencia (Tabla 4-1), se presenta en la tabla 4-2, donde se puede observar que la gran mayoría de estos fueron obtenidos en el departamento del Meta, seguido por el departamento de Tolima, Casanare, Valle y Santander, en los departamentos de Sucre y Cundinamarca, sólo se obtuvo un solo aislamiento en cada uno de ellos. Como se observa en esta tabla la gran mayoría de los aislamientos fueron colectados en el Meta, siendo la estación experimental de Santa Rosa, de donde proviene la mayoría de los aislamientos de este departamento (52) que representan el 64.1% de la población del hongo colectada en este departamento (Tabla 4-3).

Tabla 4-2. Número de aislamientos obtenidos por departamento, Incluidos los caracterizados previamente por el grupo de patología de arroz del CIAT

	Departamento							Gran total
	Casanare	Cundinamarca	Meta	Tolima	Santander	Sucre	Valle	
No. Aislamientos	9	1	81	13	2	1	7	114
%	7.89	0.87	71.05	11.40	1.75	0.87	6.14	100

Tabla 4-3. Número de aislamientos colectados en la estación experimental de Santa Rosa (EESR)

Meta	Número de aislamientos	Porcentaje (%)
EESR	52	64.1
Otros sitios	29	35.8
Total	81	100

EESR= Estación Experimental de Santa Rosa.

4.2 Caracterización patotípica

Es necesario aclarar que todos los análisis hechos en este estudio, se basaron en la reacción de los 114 aislamientos sobre las 26 líneas monogénicas que poseen los 25 genes de resistencia y no sobre 23 como lo sugieren los autores de la metodología propuesta (Hayashi y Fukuta, 2009), debido a que las líneas que poseen los genes de resistencia *Pita* (IRBLta-K1, IRBLta-CP1) y *Pita2* (IRBLta2-Pi, IRBLta2-Re), presentaron reacciones diferentes frente a algunos de los aislamientos. La variedad LTH se asume como si no tuviera ningún gen de resistencia (Anexos E al K).

4.2.1 Identificación de razas bajo la metodología de Hayashi y Fukuta (2009)

Los análisis de razas hechos siguiendo la metodología propuesta por Hayashi y Fukuta (2009), indicaron que los 114 aislamientos utilizados, se agrupan en 61 razas o patotipos (Anexo 3). 40 de ellas (65.57%), son razas únicas, representadas por un solo aislamiento y el resto (21 que representan el 34.42% de las razas encontradas) poseen entre 2 a 11 aislamientos (Anexo D). De los 13 aislamientos caracterizados previamente por el grupo de patología de arroz del CIAT en los años 90, se encontró que 10 de estos aislamientos representan cada uno una raza diferente y que solo los aislamientos (Fanny (47-1), Isolinea

6 (7-1) e Isolinea 6 (22-3-1)), pertenecientes al grupo genético SRL-5 representan una misma raza.

Los espectros de virulencia de estas 61 razas, oscilaron entre el 0 % y el 100% de compatibilidad frente a los 23 genes de resistencia utilizados. La raza U00-i0-k000-z00-ta000, conformada por los aislamientos 2950, 20881 y 20889, no infecto ninguno de los genes de resistencia, (Tabla 4-4) y la raza U73-i7-k177-z17-ta733, conformada por los aislamientos 20207, 20228, 20504, 20511, 20536 y 20892, tuvo el mayor espectro de virulencia (100%), afectando todos los genes **R** representados en las líneas diferenciales utilizadas en este estudio (Tabla 4-5).

Los aislamientos 2950, 20881 y 20889 que pertenecen a la raza U00-i0-k000-z00-ta000 y que no infectaron ninguna de las líneas monogénicas que representan los 25 genes de resistencia, fueron colectados uno de la variedad Cica 9 que pertenece al grupo genético SRL2 y es del grupo de los trece aislamientos previamente caracterizados por Correa, 1997 y Correa *et al.*, 2002; el segundo fue colectado de una maleza sin identificar y el tercero de la línea IRBLta-2 que posee el gen de resistencia *Pita-2* (Tabla 4-4).

Tabla 4-4. Aislamientos pertenecientes a la raza U00-i0-k000-z00-ta000 sin capacidad infectiva

Gen R	Raza U00-i0-k000-z00-ta000		
	Aislamiento		
	2950* Cica 9 (52-1) 1989**	20881* Maleza (16-1) 2010**	20889* IRBLTa-2 Pi (1-1) 2011**
<i>Pia</i>	R	R	R
<i>Piz-5</i>	R	R	R
<i>Piz(t)</i>	R	R	R
<i>Pita</i>	R	R	R
<i>Pib</i>	R	R	R
<i>Pit</i>	R	R	R
<i>Pish</i>	R	R	R
<i>Pi1</i>	R	R	R
<i>Pi3</i>	R	R	R
<i>Pi5(t)</i>	R	R	R
<i>Pi7(t)</i>	R	R	R
<i>Pi9</i>	R	R	R
<i>Pi12(t)</i>	R	R	R
<i>Pi19</i>	R	R	R
<i>Pik-m</i>	R	R	R
<i>Pi20</i>	R	R	R
<i>Pita-2</i>	R	R	R
<i>Pita-2</i>	R	R	R
<i>Pita</i>	R	R	R
<i>Pii</i>	R	R	R
-	R	R	R
<i>Pik-s</i>	R	R	R
<i>Pik</i>	R	R	R
<i>Pik-p</i>	R	R	R
<i>Pik-h</i>	R	R	R
<i>Piz</i>	R	R	R

*=Código de registro del aislamiento; **=Año de colección.

Tabla 4-5. Aislamientos pertenecientes a la raza U73-i7-k177-z17-ta733 con el mayor espectro de virulencia en la población evaluada en este estudio

Gen R	Raza U73-i7-k177-z17-ta733					
	Aislamiento (código, nombre y sitio de colección)					
	20207 III-7 (1-1) Tolima 2008	20228 Fortaleza (7-1) SR Meta 2009	20504 CF 205 Casanare 2009	20511 IRBLKP-K60 EESR Meta 2010	20536 LTH EESR Meta 2010	20892 Maleza (17-1) SR Meta 2011
Pi-a	S	S	S	S	S	S
Pi-z5	S	S	S	S	S	S
Pi-zt	S	S	S	S	S	S
Pi-ta	S	S	S	S	S	S
Pi-b	S	S	S	S	S	S
Pi-t	S	S	S	S	S	S
Pi-sh	S	S	S	S	S	S
Pi-1	S	S	S	S	S	S
Pi-3	S	S	S	S	S	S
Pi-5(t)	S	S	S	S	S	S
Pi-7(t)	S	S	S	S	S	S
Pi-9	S	S	S	S	S	S
Pi-12(t)	S	S	S	S	S	S
Pi-19	S	S	S	S	S	S
Pi-km	S	S	S	S	S	S
Pi-20	S	S	S	S	S	S
Pi-ta2	S	S	S	S	S	S
Pi-ta2	S	S	S	S	S	S
Pi-ta	S	S	S	S	S	S
Pi-i	S	S	S	S	S	S
-	S	S	S	S	S	S
Pi-ks	S	S	S	S	S	S
Pi-k	S	S	S	S	S	S
Pi-kp	S	S	S	S	S	S
Pi-kh	S	S	S	S	S	S
Pi-z	S	S	S	S	S	S

- = Línea testigo (LTH), sin ningún gen de resistencia

SR = Vereda Santa Rosa (sitio de colección de aislamientos)

EESR = Estación experimental Santa Rosa (sitio de colección de aislamientos)

*= Código de registro del aislamiento; **=Año de colección.

Entre los aislamientos que pertenecen a la raza U73-i7-k177-z17-ta733 y que superaron la resistencia de todos los genes **R** utilizados en este estudio, se encuentra el aislamiento 20536, colectado de la variedad testigo LTH (**Tabla 4-5**), la cual no posee ningún gen **R**, de acuerdo a lo reportado por Ling *et al.*, 1995; Hayashi y Fukuta, 2009, esto indica que aislamientos provenientes de una variedad o una línea de arroz altamente susceptible a este patógeno, pueden ser tan virulentos como los recuperados de una variedad o línea altamente resistente, pues en el caso particular de este estudio se encontró que el aislamiento 8173 (Fanny-54), proveniente de la variedad Fanny, la cual es altamente susceptible a las poblaciones de *M. oryzae*, mostro un amplio espectro de virulencia frente a los 23 genes, al igual que el aislamiento 20536, proveniente de la variedad LTH, estos aislamientos presentaron espectros de virulencia por encima del 90%, Fanny-54 (91.3%) y 20536 (100%). Estos espectros de virulencia fueron similares a los espectros de virulencia de aislamientos provenientes de variedades comerciales y líneas altamente resistentes a las poblaciones de este patógeno en Colombia, como es el caso de *Oryzica* Llanos 5, Fedearroz 50 la línea 75-1-127, cuyos porcentajes de virulencia fueron del 87, 95.7 y 91.3% respectivamente frente al grupo de los 23 genes de resistencia (**Tabla 4-6**).

Un caso particular ocurrió con el aislamiento 20892 (Maleza 17-1) que fue capaz de superar la resistencia de todos los genes inoculados, pues de acuerdo a los trabajos desarrollados por el grupo de patología de arroz del CIAT en Colombia en los años 90 e inicios del 2000 ningún aislamiento proveniente de malezas era capaz de infectar al arroz.

Tabla 4-6. Espectros de virulencia de aislamientos recuperados de variedades altamente susceptibles y variedades altamente resistentes a *M. oryzae*.

Gen R	Aislamiento (código y nombre)				
	8137* Fanny (54) ^a 1993**	20536* LTH ^a 2010**	20350* Oryzica Llanos 5 ^b 2009**	20648* Fedearroz 50 ^b 2010**	20647* 75-1-127 ^b 2010**
<i>Pia</i>	S	S	S	S	S
<i>Piz-5</i>	S	S	S	S	S
<i>Pi-zt</i>	R	S	S	S	R
<i>Pita</i>	S	S	S	S	S
<i>Pib</i>	S	S	S	S	S
<i>Pit</i>	S	S	S	S	S
<i>Pish</i>	S	S	S	S	S
<i>Pi1</i>	S	S	S	S	S
<i>Pi3</i>	S	S	S	S	S
<i>Pi5(t)</i>	S	S	S	S	S
<i>Pi7(t)</i>	S	S	S	S	S
<i>Pi9</i>	R	S	R	S	S
<i>Pi12(t)</i>	S	S	S	S	S
<i>Pi19</i>	S	S	S	S	S
<i>Pik-m</i>	S	S	R	S	S
<i>Pi20</i>	S	S	S	S	S
<i>Pita-2</i>	S	S	S	S	S
<i>Pita-2</i>	S	S	S	S	S
<i>Pita</i>	S	S	S	S	S
<i>Pij</i>	S	S	S	S	R
-	S	S	S	S	S
<i>Pik-s</i>	S	S	S	S	S
<i>Pik</i>	S	S	S	S	S
<i>Pik-p</i>	S	S	S	S	S
<i>Pik-h</i>	S	S	R	R	S
<i>Piz</i>	S	S	S	S	S

a= Variedad altamente susceptible a *M. oryzae*

b= Variedad altamente resistente a *M. oryzae*

*=Código de registro del aislamiento; **= Año de colección.

Este estudio al igual que el desarrollado por Flor (1998) mostro que aislamientos recuperados de una misma variedad pueden pertenecer a distintas razas, presentando espectros de virulencia diferentes, tal es el caso de dos aislamientos provenientes de la variedad *Oryzica Llanos 5*, donde uno de ellos infectó 14 (53.85%) de los 25 genes utilizados y el otro infectó 23 (88.46%) (Tabla 4-7).

Tabla 4-7. Comparación de espectros de virulencia de dos aislamientos colectados de la variedad *Oryzica Llanos 5*

Gen R	12244* Oryzica Llanos 5 Granada Meta 1996**	20350* Oryzica Llanos 5 EESR Meta 2009**
<i>Pia</i>	S	S
<i>Piz-5</i>	S	S
<i>Piz-t</i>	S	S
<i>Pita</i>	R	S
<i>Pib</i>	S	S
<i>Pit</i>	S	S
<i>Pish</i>	S	S
<i>Pi1</i>	R	S
<i>Pi3</i>	S	S
<i>Pi5(t)</i>	R	S
<i>Pi7(t)</i>	R	S
<i>Pi9</i>	R	R
<i>Pi12(t)</i>	S	S
<i>Pi19</i>	S	S
<i>Pik-m</i>	S	R
<i>Pi20</i>	S	S
<i>Pita-2</i>	R	S
<i>Pita-2</i>	R	S
<i>Pita</i>	S	S
<i>Pii</i>	S	S
-	S	S
<i>Pik-s</i>	R	S
<i>Pik</i>	R	S
<i>Pik-p</i>	R	S
<i>Pik-h</i>	R	R
<i>Piz</i>	R	S

*= Código de registro del aislamiento;

**= Año de colección

***= Sitio de colección.

Con respecto a los espectros de virulencia de los aislamientos representativos de los siete grupos genéticos reportados previamente por el grupo de patología de arroz de CIAT (Tabla 4-1), los cuales presentan espectros de virulencia similares dentro de cada grupo, se observó que frente al grupo de los 25 genes utilizados y bajo la metodología propuesta por Hayashi y Fukuta (2009), ocho de estos aislamientos pertenecientes a los grupos genéticos (SRL1, SRL2, SRL3, SRL4, SRL6 y ALI7), representan cada uno una raza única; uno de los aislamientos perteneciente al grupo genético SRL2 2950 (Cica 9 (52-1)), representa una raza con otros dos individuos de la población total 20881 (Maleza (16-1)) y 20889 (IRBLta-2Pi (1-1)), siendo esta raza la conformada por aislamientos que no infectaron ninguno de los genes de resistencia (U00-i0-k000-z00-ta000) (Tabla 4-4). Otros tres aislamientos 1620 (Fanny (47-1), 9381 (Isolínea 6 (7-1)) y 1628 (Isolínea 6 (22-3-1)) pertenecientes al grupo genético SRL5 representaron una misma raza (U63-i7-k177-z01-ta733), la cual se ubicó en el grupo patotípico 1, estos aislamientos conservaron su similitud en cuanto a sus espectros de virulencia bajo esta nueva metodología para la caracterización patotípica de poblaciones de *M. oryzae*, como era de esperarse.

4.2.2 Análisis de correspondencia múltiple

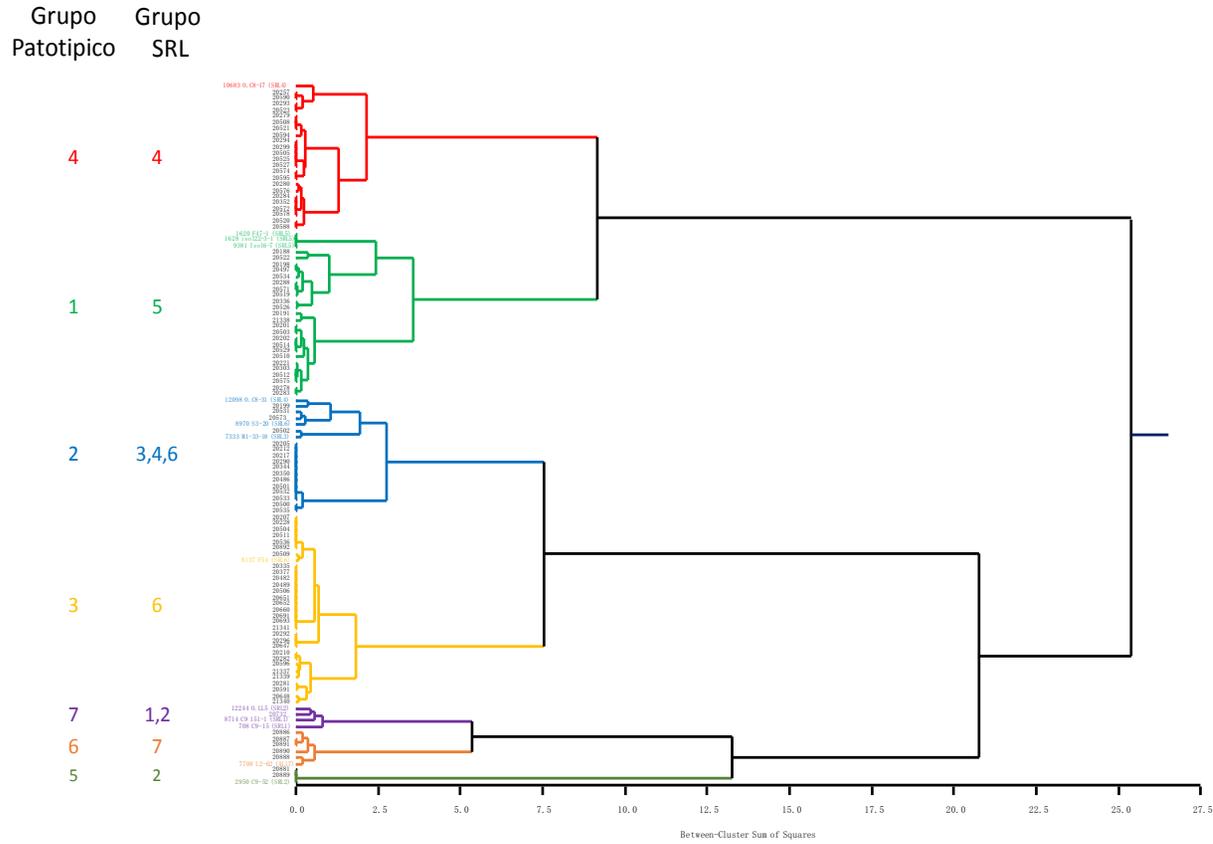
Los análisis de los 114 aislamientos agrupados en 61 razas generados a partir de los patrones de virulencia de cada uno de ellos frente al grupo de los 25 genes de resistencia inoculados (metodología propuesta por Hayashi y Fukuta, 2009), utilizando el método multivariado de correspondencia múltiple (ACM), arrojaron que la población total del hongo estudiada se estructura en siete grupos patotípicos, donde cada grupo está conformado por razas representadas por aislamientos con un porcentaje de similitud ($\geq 78\%$) en sus espectros de virulencia. (Figura 4-1).

El número de grupos obtenido con sus respectivas razas y aislamientos dentro de razas se presentan en el Tabla 4-8; en esta tabla se observa claramente que en los grupos 1, 2, 3 y 4 se encuentran los aislamientos con la capacidad de afectar más del 80% de los genes y que en el grupo 3 están los aislamientos más virulentos de la población, afectando el 95% de los genes; los aislamientos de los grupo 6 y 7 infectaron menos del 60% de los genes y los del grupo 5 no tuvieron ninguna capacidad infectiva.

Tabla 4-8. Grupos patotípicos obtenidos a través del ACM, con su respectivo número de razas y aislamientos

Grupo	No de Aislamientos	No de Razas	% de genes no afectados	% de genes afectados
1	27	18	12,67	87,32
2	19	9	17	82,99
3	31	13	4,71	95,28
4	24	11	19,55	80,44
5	3	1	100	0
6	6	5	41	58,97
7	4	4	46,15	53,84

Figura 4.1. Dendograma de la estructura patotípica de 114 aislamientos de *Magnaporthe oryzae*



4.2.3 Índice de similaridad de Sokal & Michener (1958)

Este análisis permitió calcular la similaridad de los aislamientos dentro y entre grupos obtenidos a partir del análisis de correspondencia múltiple (ACM). Este método permitió comparar pares de individuos de acuerdo a sus espectros de virulencia frente a los 25 genes inoculados, apoyándose en una matriz de variables binarias con dos tipos de reacción: Resistentes (R=0) y Susceptibles (S=1) (Anexos E-K). La población total evaluada (114 aislamientos), se distribuyó en siete grupos (Figura 13), a un nivel del 78% y hasta 100% de similaridad dentro de grupos y del 77% en el global de la población (Tabla 4-9). Los siete grupos obtenidos, están conformados por razas representadas por aislamientos provenientes de diferentes sitios, año y variedad de colección.

Tabla 4-9. Similaridad global y similaridad de grupos patotípicos.

Similaridad global				
Obs	No grupos	Individuos	Comparaciones	Similaridad
1	7	114	6441	0,77
Similaridad dentro de grupos				
Obs	Grupo	Individuos	Comparaciones	Similaridad
1	1	27	351	0,88
2	2	19	171	0,87
3	3	31	465	0,93
4	4	24	276	0,93
5	5	3	3	1,00
6	6	6	15	0,90
7	7	4	6	0,78

El grupo 1 está conformado por 18 razas, representadas por 27 aislamientos colectados en los departamentos del Meta (en su gran mayoría), Casanare, Tolima y Valle. Este grupo se caracteriza porque las razas que lo conforman están representadas por aislamientos que presentaron una similaridad del 88% en sus espectros de virulencia (Tabla 4-9). Respecto al grupo de los 25 genes de resistencia utilizados en este estudio, el 88% de estos aislamientos afectaron el 100% de los genes del grupo I (*Pish*, *Pib*, *Pit* y *Pia*) de la tabla 3-1 desarrollada por Hayashi y Fukuta (2009) para la designación de razas con base al tipo de reacción (R o S) frente al grupo de los 25 genes utilizados en este estudio. De igual manera, el 92% de los aislamientos de este grupo afectaron el 100% de los genes del grupo II (*Pij*, *Pi3* y *Pi5(t)*) de la tabla desarrollada por Ayashi y Fukuta (2009); el 85% de estos aislamientos afecto el 100% de los genes del grupo III (*Pik-s*, *Pik-m*, *Pi1*, *Pik-h*,

Pik, *Pik-p* y *pi7(t)*) de la misma tabla 3-1; el 22% de estos mismos aislamientos afectaron todos los genes del grupo IV (*Pi9*, *Piz*, *Piz-5* y *Piz-t*) de la tabla 3-1 y el 11% de estos mismos aislamientos del grupo I, afectaron el 100% de los genes del grupo V (*Pita-2*, *Pi12(t)*, *Pita*, *Pi19(t)* y *Pi20(t)*) de la tabla 3-1. Aunque ninguno de los 25 genes confiere resistencia a todos los aislamientos de este grupo, se pudo determinar que la combinación de los genes *Pi9(t)+ Pita-2*, confieren resistencia a todos los aislamientos aquí agrupados (Anexo E).

El grupo 2 está conformado por nueve razas, representadas por 19 aislamientos provenientes de los departamentos del Meta, Tolima y Casanare, los cuales presentan una similitud del 87% en sus espectros de virulencia (Tabla 4-9). El 89% de los aislamientos de este grupo afectaron todos los genes del grupo I de la tabla de Hayashi y Fukuta (2009), el 84% afectaron todos los genes del grupo II, de la tabla 3-1, ningún aislamiento afectó el 100% de los genes del grupo III, solo el 10% de los aislamientos de este grupo afectó todos los genes del grupo IV y el 79% de estos mismos aislamientos afectaron el 100% de los genes del grupo V. Al analizar la reacción de cada uno de los 25 genes frente a los aislamientos de este grupo, se determinó que los genes *Pik-m* y *Pik-h* fueron resistentes a todos los aislamientos de este grupo (Anexo F).

El grupo 3 está conformado por 13 razas representadas por 31 aislamientos provenientes de los departamentos del Tolima, Meta, Valle y Casanare. Las razas de este grupo son similares en un 93% en sus espectros de virulencia (Tabla 4-9) y están representadas por los aislamientos más virulentos del grupo estudiado. El 100% de estos aislamientos afectaron el 100% de los genes *Pish*, *Pib*, *Pit* y *Pia* del grupo I de la tabla 3-1; el 74% afectaron el 100% de los genes *Pij*, *Pi3* y *Pi5(t)* del grupo II de la tabla 3-1, el 87% afectó el 100% de los genes *Pik-s*, *Pik-m*, *Pi1*, *Pik-h*, *Pik*, *Pik-p* y *Pi7(t)* del grupo III, el 29% de los aislamientos de este grupo afectaron todos los genes *Pi9*, *Piz*, *Piz-5* y *Piz-t* del grupo IV y el 97% afectó el 100% los genes *Pita-2*, *Pi12(t)*, *Pita*, *Pi19(t)* y *Pi20(t)* del grupo V de la tabla 3-1. En este grupo se encuentra la raza U73-i7-k177-z17-ta733, la cual presentó el mayor espectro de virulencia, afectando el 100% de los genes y está conformada por los aislamientos 20207 (III-7 (1-1)), 20228 (Fortaleza (7-1)), 20504 (CF 205 (1)), 20511 (IRBLKp-k60 (1-1)), 20536 (LTH (1-1)) y 20892 (Maleza (17-1)) (Tabla 4-5). Al analizar la reacción de cada uno de los 25 genes de resistencia frente a este grupo de aislamientos,

se pudo determinar que la combinación de los genes *Pi9(t)+ Pita + Piz-t + Pik-h + Pi5(t)* confieren resistencia al 80% de los aislamientos aquí agrupados (Anexo G).

El grupo 4 lo conformaron 11 razas representadas por 24 aislamientos colectados de los departamentos Cundinamarca, Meta, Sucre y Tolima. Estos aislamientos presentaron una similaridad del 93% en sus espectros de virulencia (Tabla 4-9). Todos los aislamientos de este grupo afectaron el 100% de los genes del grupo I (Tabla 3-1), igualmente afectaron el 100% de los genes del grupo II, el 25% de estos aislamientos afectaron todos los genes del grupo III, igualmente el 25% de los aislamientos afectaron todos los genes del grupo IV y el 100% de los aislamientos afectaron el 100% de los genes del grupo V (Tabla 3-1). De acuerdo, a la reacción de los 25 genes de resistencia frente a los aislamientos de este grupo, se pudo determinar que la combinación de los genes *Pi9(t) + Pita-2*, confieren resistencia al 100% de los aislamientos de este grupo (Anexo H).

El grupo 5 está conformado por una sola raza (U00-i0-k00-z00-ta00), representada por tres aislamientos 2950 (Cica 9 (52-1)), 20881 (Maleza (16-1)) y 20889 (IRBLta-2 (1-1)), colectados todos en el departamento del Meta. Esta raza se caracteriza por no afectar ninguno de los genes de resistencia, es decir su espectro de virulencia es cero, por esta razón este grupo presenta 100% de similaridad (Anexo I).

El grupo 6 lo conforman cinco razas, representadas por seis aislamientos colectados todos en el departamento del Meta. Estos aislamientos presentaron el 90% de similaridad (Tabla 19). El 83% del total de estos aislamientos afectaron el 100% de los genes del grupo I (Tabla 3-1), el 16% afectaron todos los genes del grupo II, ningún aislamiento afecto el 100% de los genes del grupo III, el 16% afectaron todos los genes del grupo IV y ningún aislamiento afecto el 100% de los genes del grupo V. Es de resaltar que el gen *Pik-h* fue resistente al 100% de los aislamientos de este grupo (Anexo J).

El grupo 7 lo conforman cuatro razas, representadas por cuatro aislamientos, colectados dos en el departamento del Meta y dos en el departamento de Santander. Estos aislamientos presentaron un 78% de similaridad en sus espectros de virulencia (Tabla 4-9), siendo este el porcentaje de similaridad más bajo entre los siete grupos conformados por la población total de aislamientos estudiada. El 100% de los aislamientos de este grupo

afectaron todos los genes del grupo I de la tabla 11, el 25% afecto el 100% de los genes del grupo II, ningún aislamiento afecto la totalidad de los genes de los grupos III, IV y V. Analizando el comportamiento de cada uno de los genes de resistencia, se determinó que los genes *Pi9(t)*, *Pita-2* y *Pik-h* fueron resistentes a todos los aislamientos de este grupo (Anexo K).

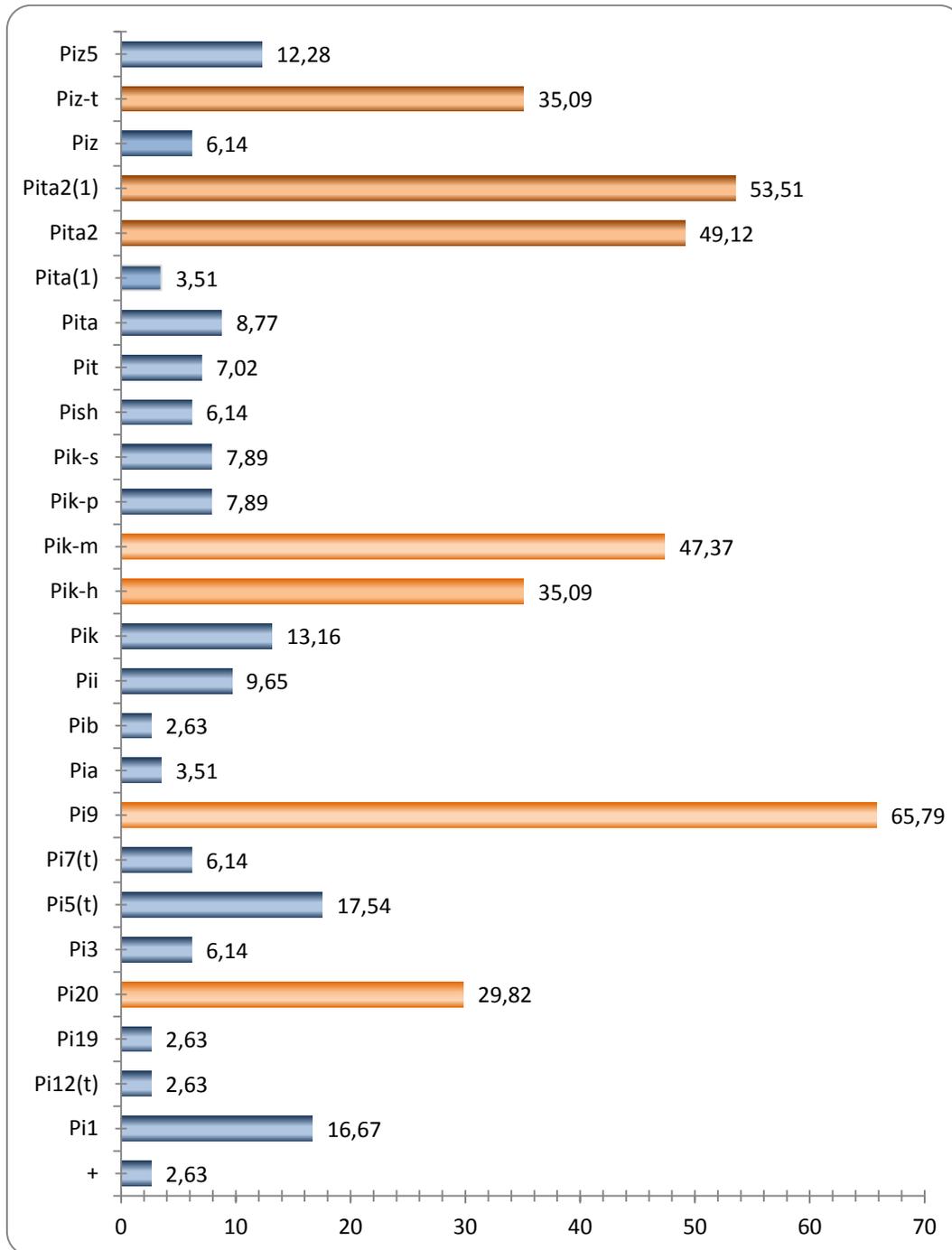
Los análisis de similaridad entre grupos, indican que estas oscilaron entre el 5% (grupos 3 y 5) y el 86% (grupos 1 y 3). Los aislamientos de los grupos 1, 2, 3, y 4 con los espectros de virulencia más amplios presentaron similaridades que oscilaron entre el 78 y el 86%. Los grupos 1 y 2 fueron similares en sus espectros de virulencia en un 78%, los grupos 2 y 4 en un 79%, los grupos 3 y 4 en un 80%, los grupos 3 y 2 en un 83%, los grupos 1 y 4 en un 85% y los grupos 3 y 1 en un 86%. La similaridad de estos grupos (1, 2, 3 y 4) con respecto a los grupos 5, 6, y 7 están por debajo del 71%. La similaridad entre los grupos 5 y 6 fue del 41%, 5 y 7 del 46%, 6 y 7 del 65%. La similaridad entre los grupos menos virulentos estuvieron más bajas que las de los grupos más virulentos (1, 2, 3 y 4) (Tabla 4-10).

Tabla 4-10. Similaridad entre grupos patotípicos.

Obs	Grupo_a	Grupo_b	Comparaciones	Similaridad
1	5	3	93	0,05
2	5	1	81	0,13
3	5	2	57	0,17
4	5	4	72	0,20
5	5	6	18	0,41
6	5	7	12	0,46
7	3	7	124	0,56
8	6	3	186	0,59
9	1	7	108	0,59
10	4	7	96	0,60
11	6	1	162	0,62
12	2	7	76	0,64
13	6	7	24	0,65
14	6	2	114	0,66
15	6	4	144	0,71
16	2	1	513	0,78
17	2	4	456	0,79
18	3	4	744	0,80
19	3	2	589	0,83
20	1	4	648	0,85
21	3	1	837	0,86

Analizando los espectros de virulencia de los 114 aislamientos al interior de cada uno de los siete grupos de genes de resistencia propuestos por Hayashi y Fukuta, 2009 (Tabla 3-1), se observa claramente que el grupo de genes IV de la tabla 3-1, integrado por los genes *Pi9(t)*, *Piz*, *Piz-5* y *Piz(t)* fue el menos afectado en su totalidad. Esto se debió a que el gen de resistencia *Pi9(t)*, fue el que presentó el mayor espectro de resistencia frente a los aislamientos inoculados, este gen fue resistente a 75 aislamientos (65.8%) de los 114 utilizados en este estudio, además el gen *Piz-t* que pertenece a este mismo grupo IV y fue resistente a 40 aislamientos (35%) de la población total del hongo. Otros genes que mostraron buenos niveles de resistencia, fueron el *Pita-2 (1)*, resistente a 60 aislamientos (53.5%) de la población y perteneciente al grupo V (Tabla 3-1), el gen *Pita-2*, resistente a 56 aislamientos (49.12%) del total de aislamientos y perteneciente al grupo V (Tabla 3-1), el gen *Pi20*, resistente a 34 aislamientos (29.8%) de la población y perteneciente al grupo V (Tabla 3-1) *Pik-h*, resistente a 40 aislamientos (35%) de la población y perteneciente al grupo III (tabla 11) y *Pik-m*, resistente a 54 aislamientos (47.3%) de la población y también perteneciente al grupo III (Tabla 3-1) (Gráfico 4-1). Con estos resultados se nota claramente que ninguno de los 25 genes fue resistente a toda la población del hongo estudiada (114 aislamientos), pero que si hubo un grupo de aislamientos que superaron la resistencia de todos los genes (Anexo G). La combinación de los genes *Pi9(t)* + *Pita-2* + *Pik-h* + *Piz-t* confiere resistencia al 94% de los aislamientos utilizados en este estudio.

Gráfico 4-1. Porcentaje de incompatibilidad de 25 genes de resistencia frente al grupo de 114 aislamientos inoculados



4.2.4 Índice de diversidad patotípica

La diversidad patotípica total de la población de aislamientos evaluada fue del 97.5%, esto indica que la población es altamente diversa respecto a los patrones de virulencia que presentaron todos los aislamientos. Por su parte la diversidad dentro de grupos fue del 85.6% y entre grupos fue del 11.8% (Tabla 4-11). Obsérvese que el coeficiente de diferenciación estuvo por debajo de 0.5, lo cual indica que los patotipos fueron más similares dentro de cada grupo que entre grupos.

Tabla 4-11. Diversidad patotípica total de la población estudiada

No. de Aislamientos	No. de Patotipos	Hs	Hst	Ht	Gst
114	61	0.85	0.11	0.97	0.12

Hs = Diversidad dentro de grupos patotípicos

Hst = Diversidad entre grupos

Ht = Diversidad total de la población

Gst = Coeficiente de diferenciación genética

La diversidad patotípica dentro de grupos mostro un valor de cero para el grupo 5, pues tres aislamientos representaron un solo patotipo; los aislamientos de este grupo son los que no infectaron ninguno de los genes de resistencia. Al interior de los demás grupos se observa una alta diversidad, presentándose la más alta en el grupo 7, donde cada aislamiento constituyo un patotipo. (Tabla 4-12).

Tabla 4-12. Diversidad patotípica dentro de grupos

Grupo Patotípico	No. de Aislamientos	No. de Patotipos	H
1	27	18	0.96
2	19	9	0.73
3	31	13	0.84
4	24	11	0.91
5	3	1	0
6	6	5	0.93
7	4	4	1

H = Diversidad dentro de grupos

4.2.5 Distribución geográfica de grupos patotípicos

El análisis por departamento de origen de los aislamientos y la raza que representan, arrojó que en seis de los siete departamentos, se encuentran 50 razas (81.9% del total de las razas), que no son comunes, es decir son únicas de cada departamento de origen y 11 razas (18.02%) son comunes en dos o en tres de los departamentos de origen (Anexo L).

En la tabla 23, se observa que los grupos patotípicos 1, 2, 3 y 4 estuvieron distribuidos en tres (grupo 2) o en cuatro (grupos 1, 3 y 4) departamentos, los grupos 5 y 6 son específicos del departamento del Meta y el grupo 7 estuvo presente en los departamentos del Meta y Santander. El departamento del Meta, está representado por aislamientos de los siete grupos patotípicos obtenidos, seguido del departamento del Tolima con cuatro y el departamento del Casanare con tres. El grupo 3, donde se ubicaron los aislamientos más virulentos de este estudio, se encuentran distribuidos en cuatro de siete de los departamentos, siendo tres de estos departamentos de gran importancia para la producción de arroz en Colombia (Casanare, Meta y Tolima). En el departamento del Meta, se presentó el mayor número de razas, debido a que de este departamento provino el mayor número de aislamientos evaluados (Tabla 4-13).

Tabla 4-13. Distribución geográfica de grupos patotípicos.

Grupo Patotípico	Departamento							Total
	Casanare	Cundinamarca	Meta	Santander	Sucre	Tolima	Valle	
1	2		21			3	1	27
2	3		12			4		19
3	4		19			2	6	31
4		1	18		1	4		24
5			3					3
6			6					6
7			2	2				4
Total	9	1	81	2	1	13	7	114

El total de aislamientos obtenidos en el departamento del Meta fue de 81, de los cuales se detectaron 50 razas, tal como se mencionó anteriormente, de este total de aislamientos, 52 corresponden a la estación experimental de Santa Rosa (EESR) que representan un total de 31 razas, indicando nuevamente esto la gran diversidad en cuanto a términos patotípicos que hay en esta estación. Aunque no todas las razas y grupos patotípicos estén

presentes en este sitio, se sigue considerando como el sitio más importante de Colombia para la caracterización de germoplasma de arroz por resistencia a este patógeno (Tabla 4-14).

Tabla 4-14. Número de aislamientos y razas del Meta

Meta	Aislamientos	Razas
EESR	52	31
Otros sitios	29	19
Total	81	50

4.3 Caracterización genética

Para los análisis moleculares, se utilizaron 95 aislamientos del total de los 114, debido a que de 19 aislamientos no se logró extraer el ADN (Anexo M).

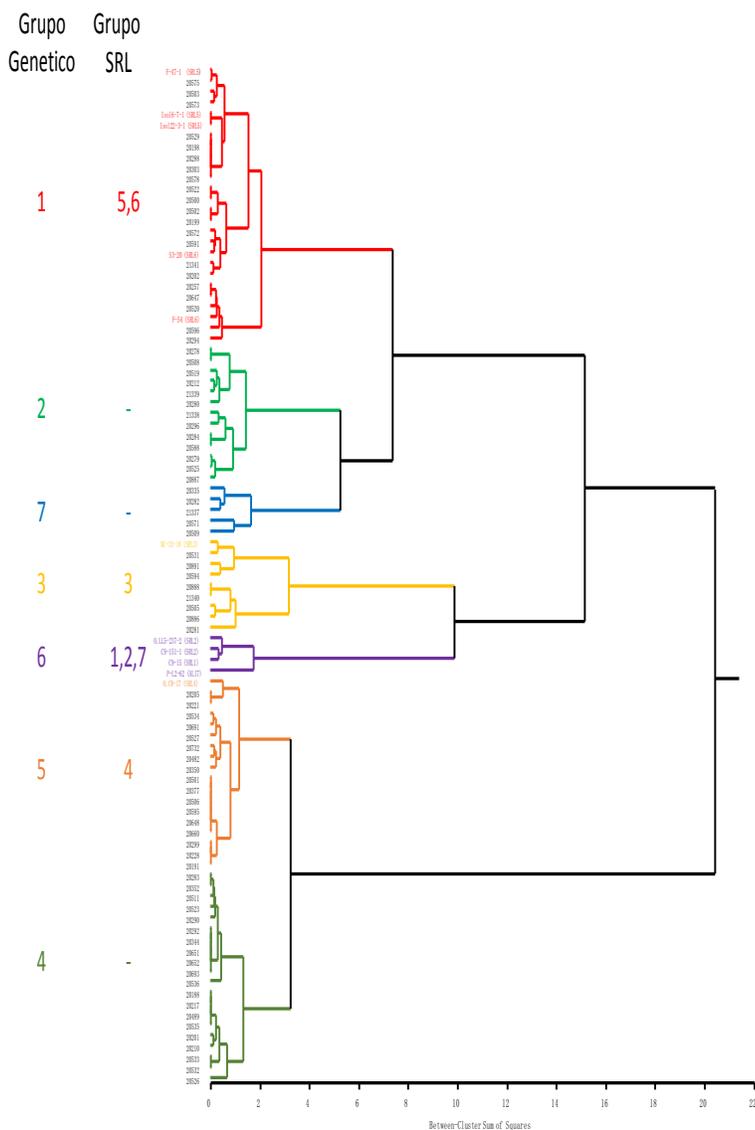
Dentro de estos 95 aislamientos, está incluido el grupo de aislamientos, a los cuales se les conoce el grupo genético al que pertenecen, de acuerdo a estudios realizados previamente por el CIAT (Correa y Zeigler, 1993; Levy *et al.*, 1993; Correa y *et al.*, 1997; Correa *et al.*, 2002; Flor, 1998) y que también fueron utilizados en las caracterizaciones patotípicas de este estudio. Este grupo está conformado por 13 aislamientos (Tabla 4-1), pero para los análisis moleculares solo se utilizaron 11 de ellos, debido a que dos de ellos hacen parte del grupo de aislamientos de los cuales no se le logró extraer el ADN, estos son Oryzica Caribe 8 (31-2) del grupo genético SRL-4 y Cica 9 (52-1) del grupo genético SRL 1 (Tabla 4-1). De esta manera la población total a caracterizar genéticamente por primera vez fue de 84 aislamientos.

4.3.1 Resultados obtenidos con el análisis de correspondencia múltiple (ACM)

El análisis de correspondencia múltiple basado en los patrones de bandas de cada uno de los 95 aislamientos, indicó que esta población estudiada, está representada por 67 haplotipos, los cuales se estructuraron en siete grupos genéticos con el 85% de la varianza explicada de la población total (Figura 4-2). En los grupos genéticos 1, 3, 5 y 6 se ubicaron aislamientos representativos de los grupos genéticos SRL-1 a SRL-6, utilizados como testigos o referencias; en los grupos 2, 4 y 7, se ubicaron únicamente aislamientos de la

nueva colección de estudio. Los aislamientos de los grupos 1, 4 y 5, son aislamientos muy cercanos en su distribución espacial, encontrándose muy cerca de ellos los aislamientos del grupo 2, mientras que los aislamientos de los grupos 3, 6 y 7 estuvieron más alejados de estos grupos (1, 4 y 5) e igualmente más lejanos entre ellos.

Figura 4.2. Dendograma de la estructura genética de 95 aislamientos de *Magnaporthe oryzae*.



4.3.2 Resultados obtenidos con el índice de similitud de Nei-Li

La similitud global de la población total analizada, de acuerdo al patrón de bandeo de cada uno de los aislamientos fue del 58%; dentro de los grupos obtenidos, el porcentaje de similitud osciló entre el 30 y el 84%; encontrándose el mayor porcentaje de similitud en los individuos del grupo cuatro y el menor porcentaje de similitud en los individuos del grupo 3 (Tabla 4-15).

Tabla 4-15. Similitud global y similitud dentro de grupos genéticos

Similitud global				
Obs	No grupos	Individuos	Comparaciones	Similitud
1	7	95	4465	0,58
Similitud dentro de grupos				
Obs	Grupo	Individuos	Comparaciones	Similitud
1	1	26	325	0.76
2	2	13	78	0.72
3	3	9	36	0.30
4	4	20	190	0.84
5	5	18	153	0.80
6	6	4	6	0.80
7	7	5	10	0.69

El grupo 1, lo conformaron 18 haplotipos representados por 26 aislamientos con un porcentaje de similitud en su patrón de bandeo del 76% (Tabla 4-15). En este grupo se ubicaron los tres aislamientos representantes del grupo genético SRL-5 1620 (Fanny 47 (1)), 9381 (Isolnea 6 (7-1)) y 1628 (Isolnea 22 (3-1)), los dos últimos representaron un solo haplotipo y se diferencian del aislamiento Fanny (47-1) por la presencia de una banda de más en ellos. De igual manera, en este mismo grupo se ubicaron los dos aislamientos del grupo genético SRL-6 8137 (Fanny (54)) y 8970 (Selecta 3-20 (1)), los cuales son haplotipos diferentes que se encuentran en subgrupos diferentes dentro de este mismo grupo 1. Aunque los dos aislamientos del grupo genético SRL-6 hayan quedado en subgrupos diferentes y sean haplotipos distintos, estos presentan una alta similitud en sus patrones de bandeo, cuya variación se da por la presencia de una banda en Fanny (54) y ausente en Selecta 3-20 (1) y la presencia de una banda en Selecta 3-20 (1) ausente en Fanny (54), por esta razón quedaron en el mismo grupo 1. De los 18 haplotipos presentes en este grupo, uno estuvo representado por cinco aislamientos, cuatro estuvieron representados por dos aislamientos y 13 son un solo aislamiento (Figura 4-2).

Al analizar la reacción de los 25 genes de resistencia frente a los aislamientos aquí agrupados se logró determinar que la combinación de los genes de resistencia *Pi9(t) + Pita-2 + Pik-h + Pi5(t) + Piz-t*, excluye el 100% de estos aislamientos (Anexo N).

El grupo 2 quedó conformado por 11 haplotipos, representados por 13 aislamientos con un porcentaje de similaridad en su patrón de bandeo del 72% (Tabla 4-15). Dos de los haplotipos estuvieron representados por dos aislamientos cada uno y los 11 aislamientos restantes representaron un haplotipo cada uno. Este aparentemente es un grupo genético diferente a los seis grupos genéticos identificados previamente (Levy *et al.*, 1993), pues ninguno de los aislamientos representantes de estos grupos (SRL-1 a SRL-6) se ubicó aquí (Figura 4-2). El análisis de la reacción de los 25 genes de resistencia frente a este grupo de aislamientos, determinó que la combinación de los genes de resistencia *Pi9(t) + Pita-2 + Piz-t*, confiere resistencia al 100% de los aislamientos de este grupo (Anexo O).

El grupo 3, lo conformaron ocho haplotipos, representados por nueve aislamientos con un porcentaje de similaridad en su patrón de bandeo del 30% (Tabla 4-15). En este grupo, un solo haplotipo estuvo constituido por dos aislamientos, los otros aislamientos representaron un haplotipo cada uno. En este grupo se ubicó el aislamiento 7333 (Metica 1 (33-18)) del grupo SRL-3, caracterizado previamente por Levy *et al.*, 1993 (Figura 4-2). Al analizar la reacción de los 25 genes de resistencia, se determinó que la combinación de los genes *Pi9(t) + Pita-2 + Pi5(t)*, confieren resistencia al 100% de los aislamientos de este grupo genético (Anexo P).

En el grupo 4, estuvo conformado por 11 haplotipos, representados por 20 aislamientos con un porcentaje de similaridad en su patrón de bandeo del 84.8% (Tabla 4-15). Dos de los haplotipos estuvieron conformados por dos aislamientos cada uno, un haplotipo estuvo conformado por cuatro aislamientos y otro estuvo conformado por cinco aislamientos, los otros siete haplotipos estuvieron representados por un solo aislamiento. En este grupo no se ubicó ninguno de los aislamientos utilizados como referencia (Tabla 4-1) (Figura 4-2). El análisis de la reacción de los 25 genes de resistencia permitió determinar que la combinación de los genes *Pi9(t) + Pita-2 + Pik-h + Piz-t*, confieren resistencia al 90% de los aislamientos de este grupo genético, en el cual se ubicaron dos de los seis aislamientos que superaron la resistencia de los 25 genes utilizados en este estudio (Anexo Q).

El grupo 5, estuvo conformado por 10 haplotipos, representados por 18 aislamientos con un porcentaje de similitud en su patrón de bandas del 80.9% (Tabla 4-15). Un haplotipo quedó representado por seis aislamientos, otro haplotipo quedó representado por tres aislamientos y un haplotipo representado por dos aislamientos, los ocho haplotipos restantes estuvieron representados por un solo aislamiento. En este grupo se ubicó el aislamiento 10683 (*Oryzica Caribe 8 (17)*), perteneciente al grupo genético SRL-4, caracterizado previamente (Levy *et al.*, 1993; Correa *et al.*, 2002) (Figura 4-2). El análisis de la reacción de los 25 genes de resistencia frente a los aislamientos de este grupo, permitió determinar que la combinación de los genes *Pi9(t) + Pita-2 + Pik-h*, excluye el 94% de estos aislamientos y que en este grupo se encuentra uno de los seis aislamientos que superaron la resistencia de los 25 genes de resistencia (Anexo R).

El grupo 6 quedó conformado únicamente por cuatro haplotipos, representados por un aislamiento cada uno y el porcentaje de similitud entre ellos fue del 80.3% (Tabla 4-15). Este grupo quedó conformado únicamente por aislamientos referencia, es decir que se les conocía el grupo genético, pues habían sido caracterizados previamente (Levy *et al.*, 1993; Flor, 1998; Correa *et al.*, 2002), estos son: 708 (*Cica 9 (15)*) del grupo genético SRL-1; 12244 (*Oryzica Llanos 5 (237-2)*) y 8714 (*Cica 9 (151-1)*) ambos del SRL-2 y Línea 2(62) de grupo ALI-7 (Figura 4-2). El que estos aislamientos hayan quedado en un mismo grupo en este estudio, coincide con los estudios anteriores, pues estos grupos SRL-1 y SRL-2 son muy cercanos genéticamente y formaban un mismo grupo a un nivel del 85% de similitud en sus patrones de bandas (Levy *et al.*, 1993). El análisis de la reacción de los 25 genes frente a los aislamientos de este grupo genético, permitió determinar que el gen *Pi9(t)* confiere resistencia al 100% de estos aislamientos (Anexo S).

El grupo 7 quedó conformado por cinco aislamientos, donde cada uno representa un haplotipo. El porcentaje de similitud en el patrón de bandas entre estos aislamientos fue del 69.8% (Tabla 4-15). En este grupo al igual que en los grupos dos y cuatro no se ubicó ninguno de los aislamientos referencia (Tabla 4-1) (Figura 4-2). En la tabla 4-16, se presenta el número de aislamientos y haplotipos por grupo genético. El análisis de la reacción de los 25 genes frente a los aislamientos de este grupo, determinó que la combinación de los genes *Pi9(t) + Pita-2 + Piz-t*, confiere resistencia al 100% de estos aislamientos (Anexo T).

Tabla 4-16. Número de aislamientos y haplotipos por grupo genético

Grupo genético	No. Aislamientos	No. Haplotipos
1	26	18
2	13	11
3	9	8
4	20	11
5	18	10
6	4	4
7	5	5

Los análisis de similitud entre grupos, indican que estas oscilaron entre el 0.28 y el 0.78%, encontrándose el mayor porcentaje de similitud entre los grupos 4 y 5 y la menor similitud entre los grupos 3 y 4. El porcentaje de similitud entre los grupos 1 y 5 fue del 68.6%; entre los grupos 1 y 4 fue del 62%; entre los grupos 3 y 6 fue del 29.3%; entre los grupos 1 y 3 fue del 32.2%; entre los grupos 3 y 5 fue del 30.3% (Tabla 4-17).

Tabla 4-17. Similitud entre grupos genéticos.

Obs	Grupo_a	Grupo_b	Comparaciones	Similitud
1	1	2	338	0.66
2	1	3	234	0.32
3	1	4	520	0.62
4	1	5	468	0.68
5	1	6	104	0.49
6	1	7	130	0.58
7	2	3	117	0.29
8	2	4	260	0.50
9	2	5	234	0.55
10	2	6	52	0.48
11	2	7	65	0.58
12	3	4	180	0.28
13	3	5	162	0.30
14	3	6	36	0.29
15	3	7	45	0.33
16	4	5	360	0.78
17	4	6	80	0.33
18	4	7	100	0.44
19	5	6	72	0.38
20	5	7	90	0.49
21	6	7	20	0.42

Tomando como referencia los aislamientos previamente caracterizados (tabla 4-1) (Levy *et al.*, 1993; Flor, 1998; Correa *et al.*, 2002), se observó que 46 aislamientos (54.7%) del

total de la población (84 aislamientos), a la cual no se le conocía su estructura genética, tiene una estructura similar a la previamente caracterizada; detectándose que los aislamientos del grupo 1 tuvieron similaridad con los grupos SRL-5 y SRL-6, los del grupo 3 presentaron similaridad con el grupo SRL-3 y los del grupo 5 tuvieron similaridad afinidad con el grupo SRL-4. También se observó que 38 aislamientos (45%) restantes de esta población presentan una estructura diferente, pues formaron tres grupos aparentemente nuevos (2, 4 y 7) (Figura 4-2).

4.3.3 Índice de diversidad genética por haplotipos

La diversidad genética total de la población basada en patrones de bandas de los aislamientos fue del 98.7%, indicando esto que la población fue muy diversa en cuanto a esta característica (Tabla 4-18).

El coeficiente de diferenciación genética estuvo por debajo de 0.5 como era esperado. Esto indica que las similaridades fueron más altas al interior de cada grupo que entre grupos (Tabla 4-18).

Tabla 4-18. Índice de diversidad genética por haplotipos entre y dentro de grupos

No. Aislamientos	No. Haplotipos	Hs	Hst	Ht	Gst
95	67	0.93860	0.049310	0.98791	0.049913

Hs= Diversidad entre grupos

Hst=Diversidad dentro de grupos

Ht=Diversidad total de la población

Gst =Coeficiente de diferenciación genética

La diversidad genética del **grupo 1** fue del 95.6%, encontrándose en este 18 haplotipos representados por 26 aislamientos (Tabla 4-19).

El grupo 2, presentó una diversidad genética del 97.4%, en el que se encontraron 11 haplotipos representados por 13 aislamientos, casi que cada aislamiento representa un haplotipo (Tabla 4-19).

En el **grupo 3**, la diversidad genética fue del 97.2%, donde se presentaron 8 haplotipos representados por 9 aislamientos, al igual que en el grupo genético 2, aquí prácticamente cada aislamiento representa un haplotipo (Tabla 4-19).

La diversidad genética del **grupo 4** fue del 90.5%, encontrándose 11 haplotipos, representados por 20 aislamientos (Tabla 4-19).

En el **grupo 5**, la diversidad genética fue del 87.5%, encontrándose 10 haplotipos, representados por 18 aislamientos (Tabla 4-19).

En el **grupo genético 6**, la diversidad genética fue del 100%, aquí se encontraron cuatro haplotipos, representados cada uno por un aislamiento diferente (Tabla 4-19).

La diversidad genética del **grupo 7** fue del 100%, encontrándose cinco haplotipos, representado cada uno por un aislamiento diferente (Tabla 4-19).

Tabla 4-19. Diversidad genética por haplotipos dentro de grupos genéticos

Grupo genético	No. Aislamientos	No. Haplotipos	H
1	26	18	0.95
2	13	11	0.94
3	9	8	0.97
4	20	11	0.90
5	18	10	0.87
6	4	4	1
7	5	5	1

H=Diversidad genética dentro de grupos.

4.3.4 Distribución geográfica de haplotipos

Al analizar la distribución geográfica de los grupos genéticos, se observa que cada uno de estos estuvo presente en por lo menos dos departamentos; lo cual indica que no hay una especificidad de grupo genético por departamento. Obsérvese también que únicamente en el departamento del Meta se encuentran los siete grupos genéticos y que ningún grupo genético estuvo presente en los siete departamentos; el grupo genético 5 fue el que se

encontró mayormente distribuido, pues se encontró en seis de los siete departamentos, no presentándose únicamente en el departamento de Sucre (Tabla 4-20).

Tabla 4-20. Distribución geográfica de los grupos genéticos obtenidos.

Grupo genético	Departamentos							Total
	Casanare	Cundinamarca	Meta	Santander	Sucre	Tolima	Valle	
1	4		16			4	2	26
2	1		11			1		13
3	1		8					9
4			14		1	2	3	20
5	1	1	11	1		2	2	18
6			4					4
7			4			1		5
Total Aislamientos	7	1	68	1	1	10	7	95
Total Haplotipos	5	1	50	1		7	3	67

En el departamento del Meta fue donde se encontró el mayor número de haplotipos, siendo esto debido a que de este sitio proviene el mayor número de aislamientos como se observa en la tabla 24. Sin embargo, se recalca lo importante de esta información, pues en este departamento, se sigue observando una gran diversidad genética de *Magnaporthe oryzae*, obteniéndose un total de 50 haplotipos de 68 aislamientos evaluados. Resultados similares se observan en los análisis patotípicos (Anexo B).

De la estación experimental de Santa Rosa (EESR-Meta) fueron analizados molecularmente 52 aislamientos, los cuales representaron 36 haplotipos del total de 50 detectados en el departamento del Meta. Este resultado indica la alta diversidad genética presente en esta estación, resultado similar al obtenido con los análisis patotípicos.

El aislamiento proveniente de Sucre (20352) y colectado de la variedad Fedearroz 473 en el año 2009, forma un haplotipo con el aislamiento 20283 proveniente de la estación experimental de Santa Rosa y colectado de la variedad diferencial BL1, este haplotipo se ubica en el grupo genético 4 y queda en los haplotipos del departamento del Meta; Por esta razón, el haplotipo de este aislamiento de Sucre no se encuentra registrado en la tabla 4-20.

4.3.5 Correspondencia entre grupos genéticos y grupos patotípicos

No se observó una correspondencia entre los grupos genéticos obtenidos con los grupos patotípicos, puesto que los aislamientos de los grupos genéticos se distribuyeron a lo largo de todos los grupos patotípicos; siendo así que en el **grupo genético 1**, se ubicaron aislamientos correspondientes a los grupos patotípicos 1, 2, 3 y 4. **En el grupo genético 2**, se ubicaron aislamientos de los grupos patotípicos 1, 2, 3, 4 y 6. **En el grupo genético 3**, se ubicaron aislamientos de los grupos patotípicos 2, 3, 4 y 6. **En el grupo genético 4**, se ubicaron aislamientos de los grupos patotípicos 1, 2, 3, y 4. **En el grupo genético 5**, se ubicaron aislamientos de los grupos patotípicos 1, 2, 3, 4 y 7. **En el grupo genético 6**, se encontraron aislamientos de los grupos patotípicos 6 y 7. **En el grupo genético 7**, se ubicaron aislamientos de los grupos patotípicos 1 y 3 (Tabla 4-21).

Únicamente se observó algo de correlación entre el grupo genético 1 y el grupo patotípico 1, pues 11 de 22 aislamientos del grupo patotípico 1 se ubicaron en el grupo genético 1. Estos dos grupos tanto el patotípico como el genético están estrechamente relacionados con el grupo SRL-5 (Tabla 4-21).

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores (Levy *et al.*, 1993; Correa y Guimaraes, 1997; Flor 1998, Correa *et al.*, 2002), puesto que estos autores encontraron una alta similitud en los espectros de virulencia de los aislamientos que pertenecían a cada grupo genético (SRL-1 a SRL-6), inoculados sobre grupos de variedades comerciales.

Tabla 4-21. Correspondencia entre grupo genéticos y grupos patotípicos.

Grupos genéticos	Grupos patotípicos						Gran Total
	1	2	3	4	6	7	
1	11	5	5	5			26
2	3	1	2	6	1		13
3		2	2	2	3		9
4	4	6	8	2			20
5	3	3	7	4		1	18
6					1	3	4
7	1		4				5
Gran Total	22	17	28	19	5	4	95

5. Discusión

5.1 Caracterización patotípica

5.1.1 Aislamientos obtenidos

El que la gran mayoría de los aislamientos obtenidos tengan origen en el departamento del Meta (71.05% del total de los aislamientos), se debe a que este departamento es un sitio endémico del añublo del arroz, debido a que las condiciones ambientales presentes allí y el sistema de cultivo de secano que se lleva a cabo en esta zona son muy favorables para el desarrollo de esta enfermedad, lo cual permitió tomar un mayor número de muestras; además, en este departamento a 30 minutos de la ciudad de Villavicencio se encuentra ubicada la estación experimental de Santa Rosa (EESR), la cual se considera un sitio “HOT SPOT” para *M. oryzae*, no solo para Colombia sino para la región de América Latina, debido a que allí se encontró la mayor diversidad patogénica de este hongo en Colombia en los años 90 (Levy *et al.*, 1993; Correa, 1997) y es de este sitio de donde proviene el mayor número de aislamientos colectados del departamento del Meta (55) que representan el 67.9% del total de las muestras (81) colectadas en este departamento (Tabla 4-3). Quiere decir que al tomar muestras (hojas o cuellos de panícula) con síntomas de la enfermedad hay un mayor porcentaje de probabilidades de tener éxito en la obtención de aislamientos del hongo, puesto que allí no se hacen aplicaciones de fungicidas para el control de la enfermedad por ser un sitio experimental para caracterizar el germoplasma de arroz del CIAT, FLAR y FEDEARROZ por resistencia a *M. oryzae*.

Caso contrario sucede con las muestras colectadas en otros sitios de este mismo departamento y en otros departamentos, donde la probabilidad de tener éxito en la obtención de cultivos puros del hongo se disminuye, debido a que las muestras se toman en lotes comerciales, donde posiblemente cuando se toman las muestras ya se han hecho aplicaciones de fungicidas para el control de la enfermedad. También se debe tener en

cuenta que en localidades diferentes a las del departamento del Meta, la presión de la enfermedad es menor y esto junto con las aplicaciones de fungicidas, disminuye la posibilidad de obtención de aislamientos del hongo.

5.1.2 Patotípos

La obtención de 61 razas de 114 aislamientos estudiados, explica la alta diversidad patotípica de este hongo y corrobora resultados de trabajos anteriores (Levy *et al.*, 1993; Correa, 1997; Correa *et al.*, 2002), donde también se demostró bajo otro sistema de caracterización internacional y con grupos de líneas diferentes, la alta diversidad patotípica que presenta *M. oryzae* en Colombia, habiéndose encontrado en esa época 45 razas de este patógeno.

El que los aislamientos 2950 (Cica 9 (52-1)), 20881 (Maleza (16-1)) y 20889 (IRBLta-2 Pi(1-1)) pertenecientes a la raza U00-i0-k000-z00-ta000 (Tabla 4-4), no hayan infectado ninguno de los 25 genes, se debe a la especie vegetal o variedad de origen, pues a través de muchas inoculaciones hechas en los años 90 y principios del 2.000 en el proyecto de patología de arroz del CIAT, se observaba que los aislamientos provenientes de malezas no eran infectivos en el arroz y los aislamientos provenientes de la variedad Cica 9 no eran patogénicos y algunos de ellos solo infectaban a la misma variedad Cica 9 y a la variedad Fanny (Flor, 1998). También existe la probabilidad que estos aislamientos hayan perdido patogenicidad en el laboratorio.

Existe la hipótesis que algunos aislamientos para poder infectar una variedad deben perder otros genes que pueden ser determinantes para su sobrevivencia en la naturaleza, lo cual hace que infecten una sola vez, pero luego no vuelven a causar infección ni aun en su variedad de origen, debido a los efectos deletéreos que le puede ocasionar la pérdida de determinado gen de avirulencia (Correa *et al.*, 2002, Tharreau, comunicación personal), tal es el caso del aislamiento 20889 (IRBLta-2 Pi(1-1)), el cual no causó infección ni aún en la línea de donde se colectó originalmente (IRBLTa-2 Pi). Resultados similares fueron obtenidos por Flor, 1998, donde obtuvo aislamientos de las variedades Cica 9 y Oryzica 1 con una muy baja capacidad infectiva.

Los amplios espectros de virulencia de aislamientos provenientes de variedades altamente susceptibles como fue el caso de los aislamientos provenientes de las variedades LTH y Fanny (Tabla 16), tal vez se deba a que estos no han tenido que perder factores de avirulencia para poder infectar este tipo de variedades, permitiéndoles esto conservar todos sus factores de virulencia y por lo cual no se presentan en ellos efectos deletéreos que les hagan disminuir su capacidad infectiva y que afecten su adaptabilidad en la naturaleza. Resultados similares con respecto al aislamiento Fanny (54) fueron reportados por Levy et al., 1993; Correa y Guimaraes, 1997; Correa et al., 2002.

El amplio espectro de virulencia presentado por el aislamiento 20892 (Maleza (17-1)) (Tabla 4-5), hace pensar que aislamientos de *M. oryzae* provenientes de malezas estén evolucionando para ser infectivos en el cultivo del arroz, tal como está sucediendo en Brasil y Argentina (Gutierrez et al., 2000; Nunes et al., 2014), siendo este un proceso natural en la evolución de los hongos (Stukenbrock y McDonald, 2008). De igual manera, es probable que este sea un aislamiento originario de arroz y que haya infectado esta maleza, desafortunadamente este fue uno de los aislamientos a los cuales no se les pudo hacer el análisis dactiloscópico mediante la técnica rep-PCR*Pot2*; esto hubiera mostrado si es un aislamiento proveniente del arroz o de maleza, pues los patrones de bandas son diferentes para los aislamientos provenientes de malezas.

El que aislamientos provenientes de una misma variedad presenten espectros de virulencia diferentes y por esta razón representen razas diferentes, es común que suceda en poblaciones de patógenos tan diversos como lo es *Magnaporthe oryzae*. Tal fue el caso de los aislamientos 12244 y 20350, colectados ambos de la variedad Oryzica Llanos 5 (Tabla 4-7).

5.1.3 Análisis de correspondencia múltiple (ACM)

El análisis de correspondencia múltiple (ACM), agrupó la población estudiada en siete grupos patotípicos, de acuerdo a sus espectros de virulencia. Este resultado mostró que la alta diversidad observada en la población del hongo a nivel de patotipos o razas (61), se puede reducir a un grupo más pequeño, con fines de practicidad y aplicabilidad de los resultados que se obtienen con este tipo de análisis. De los siete grupos obtenidos, únicamente el grupo 5 presentó aislamientos no infectivos y fueron los pertenecientes a la

raza U00-i0-k000-z00-ta000 y los grupos 1, 2, 3 y 4 fueron en los que se ubicaron los aislamientos con los mayores espectros de virulencia, siendo el grupo 3 el que posee los aislamientos con los mayores espectros de virulencia, encontrando en el los aislamientos que superaron la resistencia de los 25 genes de resistencia utilizados. Los grupos 6 y 7 presentaron más bajos espectros de virulencia. Los aislamientos de este grupo 3 son los que deberían utilizarse al momento de caracterizar nuevos genes de resistencia a este patógeno. Adicionalmente se deben utilizar aislamientos que permitan identificar los genes *Pi9(t)*, *Pita-2*, *Pik-h*, *Pik-m*, *Piz-t* y *Pi20*.

Estos resultados concuerdan con los trabajos hechos en los años 90 por el grupo de patología de arroz del CIAT, en los cuales se obtuvo que los aislamientos más virulentos eran aquellos que pertenecían a los linajes genéticos SRL4, SRL 5, SRL6 y los aislamientos menos virulentos se encontraban en los grupo genéticos SRL3, SRL2 y SRL1 (Correa *et al.*, 1997, Flor, 1998, Correa, 2002), pues los resultados de este estudio arrojaron que el aislamiento 10683 (*Oryzica Caribe 8 (17)*) al grupo genético SRL4, se ubicó en el grupo patotípico 4; los aislamientos 1620 (*Fanny (47-1)*) (SRL-5), 9381 (*Isolínea 6 (7-1)*) (SRL-5) y 1628 (*Isolínea (22-3-1)*) (SRL-5), se ubicaron en el grupo 1; los aislamientos 12098 (*Oryzica Caribe 8 (31-2)*) (SRL4), 8970 (*Selecta 3-20(1)*) (SRL6) y 7333 (*Metica 1 (33-18)*) (SRL3) quedaron en el grupo 2; el aislamiento 8137 (*Fanny (54)*) (SRL6) se ubicó en el grupo 3, perteneciendo todos estos aislamientos a los grupos más virulentos (1, 2, 3 y 4). Por otra parte los aislamientos 12244 (*Oryzica Llanos 5 (237-2)*) (SRL2), 8714 (*Cica 9 (151-1)*) (SRL1), 708 (*Cica 9 (15)*) (SRL-1) se ubicaron el grupo 7; el aislamiento 7708 (*Línea 2 (62)*) (ALI-7) quedó en el grupo 6 y el aislamiento 2950 (*Cica 9 (52-1)*) (SRL2) se ubicó en el grupo 5, siendo estos grupos 5, 6 y 7 los menos virulentos (Figura 4-2).

Se puede ver claramente que los aislamientos con los grupos genéticos conocidos y caracterizados previamente por sus espectros de virulencia, se distribuyeron en todos los grupos de la población evaluada y los más virulentos (grupos genéticos SRL-4, SRL-5 y SRL-6) se ubicaron en los grupos patotípicos más virulentos de este estudio (1, 2, 3 y 4) y los menos virulentos (SR-L3, SRL-2 y SRL-1) se ubicaron en los grupos menos virulentos de este estudio (5, 6 y 7).

5.1.4 Índice de similitud de Sokal & Michener

Con estos resultados se puede observar que aunque los aislamientos de los grupos genéticos SRL4 (*Oryzica Caribe 8* (17) y *Oryzica Caribe 8* (31-2) hayan quedado en grupos patotípicos diferentes (grupos 2 y 4), al igual que los aislamientos del grupo genético SRL-6 (*Fanny* (54) y *Selecta 3-20(1)*) (grupos 2 y 3), estos grupos presentan entre ellos altos porcentajes de similitud (2 y 4 79%), (2 y 3 83%). Pudiera ser que estos aislamientos de los grupos genéticos indicados hayan quedado en grupos patotípicos diferentes debido a que en este estudio se utilizaron 25 genes de resistencia para caracterizar la población del hongo estudiada a diferencia de estudios anteriores, donde se utilizaron grupos de variedades comerciales, un menor número de variedades diferenciales (ocho variedades diferenciales internacionales) o en su defecto un menor número de genes de resistencia (13), sobre las cuales se inoculaban los aislamientos para ser caracterizados por sus virulencias (Correa-Victoria y Zeigler, 1993b; Levy *et al.*, 1993; Correa *et al.*, 1997; Flor 1998). Es posible que bajo esta nueva metodología y nuevo grupo de diferenciales-monogénicas haya más sensibilidad en la discriminación de los aislamientos. Igual caso pudo acontecer con los aislamientos de los grupos genético SRL-2 que uno se ubicó en el grupo patotípico 5 y el otro en el grupo patotípico 7. El aislamiento del grupo genético ALL-7 se ubicó en el grupo patotípico 6 con otros cinco aislamientos de la colección de estudio nueva y separado de los demás grupos genéticos SR-1 a SRL-6; resultado que era de esperarse pues este grupo genético (ALI-7) proviene de la Altillanura colombiana en el departamento del Meta, donde la producción de arroz es muy particular debido a las condiciones agroclimáticas que se presentan allí y los aislamientos que provienen de este sitio no se encuentran con regularidad en otras zonas arroceras del país.

Algo particular sucedió con el aislamiento representativo del grupo genético SRL3, pues en este estudio quedó inmerso en el grupo patotípico 2, el cual es uno de los grupos representados por aislamientos de un amplio espectro de virulencia (aquí se encuentran aislamientos de los grupos SRL-4 y SRL-6) y en estudios anteriores los aislamientos de este grupo mostraron tener espectros de virulencia muy bajos y estando más cercanos a los grupos SRL-1 y SRL-3 (Correa-Victoria y Zeigler, 1993b; Levy *et al.*, 1993; Correa *et al.*; 1997).

Se debe tener en cuenta que aunque las distribuciones de los grupos hayan quedado de la manera como se explicaron en el párrafo anterior, los porcentajes de similaridad entre los grupos 2 y 4, donde ambos integran los aislamientos de SRL-4 fue del 79%; entre los grupos 2 y 3 que integran los aislamientos de SRL-6 fue del 83%. Estos porcentajes de similaridad son bastante altos, mostrando que de alguna manera hay similitudes importantes entre estos grupos.

Los porcentajes de similaridades entre los grupos 5 (donde esta SRL-2), 6 (donde está ALI-7) y 7 (donde esta SRL-1 y SR_2) y los grupos 1 (donde esta SRL-5), 2 (donde esta SRL-3, SRL-4 y SRL-6), 3 (donde esta SRL-6) y 4 (donde esta SRL-4) oscilaron entre el 5% (grupos 5 y 3) y el 71% (grupos 6 y 4). Observese que estos porcentajes de similaridad son bajos, indicando esto que hay un mayor distanciamiento entre estos grupos. Esto tiene relación con lo reportado por Levy *et al.*, 1993 y Flor, 1998, quienes encontraron que los grupos genéticos SRL-1, SRL-2 y SRL-3, se encuentran más distanciados de los grupos SRL-4 a SRL-6, pero que entre ellos se encuentran más cercanos; igualmente los grupos SRL-4 a SRL-6 están más cercanos entre ellos.

5.1.5 Frecuencias de compatibilidad

Con respecto a la reacción de las líneas monogénicas que representan los 25 genes utilizados en este estudio frente a la población del patógeno evaluada, los resultados de este estudio corroboran resultados obtenidos por otros autores, quienes ya habían reportado previamente las bajas frecuencias virulencia de aislamientos de *Magnaporthe oryzae* frente a los genes (*Pi9(t)*, *Pita-2*, *Piz-t*, *Pi20*, *Pik-h* y *Pik-m* (Correa *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013, Odjo *et al.*, 2014)). Los espectros de resistencia de estos genes frente al grupo de aislamientos con los espectros de virulencia más amplios (grupo patotípico 3) se presentan en el anexo 7, en el cual se presenta la reacción de los aislamientos del grupo patotípico 3 y se puede ver que el gen *Pi9(t)* es el que tiene el más amplio espectro de resistencia frente a este grupo y los espectros de resistencia de los otros genes (*Pita-2*, *Piz-t*, *Pi20*, *Pik-h* y *Pik-m*), es muy bajo, siendo los genes *Pita-2* y *Pi20* susceptibles a todos los aislamientos de este grupo.

Aunque ninguno de los 25 genes de resistencia haya excluido la población total del hongo aquí estudiada, es importante anotar que con las combinaciones de los genes que

presentaron los espectros más amplios de resistencia (*Pi9(t)*, *Pita-2*, *Pik-m*, *Pik-h*, *Piz-t* y *Pi20*) y acompañados con el gen *Pi5(t)* que fue resistente solo al 17,54% del total de los aislamientos, se puede excluir el 94,7% de la población total del hongo, permitiendo el desarrollo de germoplasma con resistencia durable a este patógeno (Anexos E al K).

5.1.6 Índice de similaridad patotípica

Los resultados de este análisis mostraron que esta población es altamente diversa patotípicamente, con un porcentaje de diversidad patotípica total del 97.5%

5.1.7 Distribución geográfica de patotipos

En cuanto a la distribución geográfica de los patotipos, es claro que el mayor número de razas se encontró en el departamento del Meta, seguido de los departamentos del Tolima y Casanare, debido a que de estos departamentos proviene la mayor número de aislamientos obtenidos para este estudio, principalmente del departamento del Meta; de las 50 razas detectadas en este departamento, 31 provienen de la Estación Experimental de Santa Rosa (EESR), demostrándose nuevamente la alta diversidad que se encuentra en este sitio (Tabla 24). Esto corrobora la importancia de la EESR para caracterizar germoplasma por resistencia a este patógeno. Resultados similares fueron obtenidos por Correa y Zeigler (1993); Levy *et al* (1993); Flor (1998).

De igual manera se entiende que otros sitios específicos de determinados departamentos como los son el Tolima y Casanare, podrían considerarse para exponer germoplasma en ellos y caracterizarlos por resistencia a este patógeno, debido a que en ellos también se encuentran las razas representadas por los aislamientos con los más amplios espectros de virulencia encontrados en este estudio, básicamente los del grupo patotípico 3 (Tabla 15). El que estas razas sean comunes entre estos departamentos, puede deberse al movimiento de variedades comerciales de un sitio a otro.

5.2 Caracterización genética

5.2.1 Análisis de correspondencia múltiple (ACM)

El ACM mostro que la población estudiada (95 aislamientos), representa 67 haplotipos y que estos se estructuran en siete grupos genéticos de acuerdo a sus patrones de bandeo y que de estos siete grupos, tres son diferentes a los que anteriormente se habían descrito (Levy *et al.*, 1993; Flor, 1998 y Correa, 2002). Los grupos 1, 2, 4 y 5 fueron los que presentaron el mayor número de haplotipos (Tablas 4-15 y 4-16).

5.2.2 Índice de similaridad de Nei-Li

Se encontró en este estudio que el 54.7% del total de la población evaluada, a la cual no se le conocía su estructura genética (84 aislamientos), sigue perfiles similares en sus patrones de bandeo a los de los grupos SRL-1 a SR-6 (Levy *et al.*, 1993) y que el 45% restante de la población (35 aislamientos) presentan patrones distintos, conformando tres grupos diferentes a los ya conocidos previamente (Figua 4-4).

Podría pensarse que se hayan presentado cambios al interior de la población de este patógeno en Colombia en cuanto a sus estructura genética y por esta razón los resultados obtenidos; esto se presume, debido a que los últimos estudios caracterizando genéticamente la población de este patógeno en Colombia se hicieron hace más de 10 años y que a través de este tiempo se pudieron haber presentado cambios genéticos en la población de Colombia (Stukenbrock y McDobald, 2008).

También puede considerarse que la presencia de estos tres grupos genéticos diferentes en la población del hongo estudiada, se deba a la gran diversidad de materiales de arroz y sitios de colección de las muestras que dieron origen a los 84 aislamientos utilizados en este estudio (incluidos los 11 aislamientos referencia o testigo), los cuales provienen de más de 99 materiales, entre ellos variedades comerciales de arroz, líneas avanzadas de los programas de mejoramiento de arroz del CIAT y FLAR, variedades diferenciales internacionales y líneas monogénicas-diferenciales, además de ser colectados en siete departamentos diferentes del país (Anexo A), aunque la mayor muestra de aislamientos (68) provenga del departamento del Meta, específicamente de la estación experimental de

Santa Rosa (EESR). Si se tiene en cuenta los trabajos realizados con anterioridad, estos fueron hechos con muestras colectadas de un menor número de materiales y proviniendo básicamente de una localidad específica como es la Estación Experimental de Santa Rosa, lo cual tal vez no permitió detectar una mayor diversidad genética del patógeno (Levy *et al.*, 1993; Flor, 1998).

Por otra parte, si se hace un análisis de la población teniendo en cuenta el 70% de la varianza explicada, se tendría que los haplotipos obtenidos se estructurarían en cuatro grupo genéticos, donde los grupos 2 y 4 entrarían a formar parte del grupo 1, el cual contiene dentro de sí a los aislamientos que representan los grupos SRL-5 y SRL-6. Los grupos tres y seis se conservarían idénticos y los haplotipos del grupo 4 entrarían a hacer parte del grupo 5, el cual posee al aislamiento representativo de SRL-4. De esta manera se obtendría una población estructurada en cuatro grupos genéticos teniendo que **el grupo 1** estaría conformado por 44 aislamientos y que estos representarían a los grupos genéticos SRL-5 y SRL-6, debido a que aquí se ubicarían los aislamientos 1620 (Fanny (47-1)), 9381 (Isolínea 6 (7-1)), 1628 (Isolínea 22 (3-1)), 8137 (Fanny (54)) y 8970 (Selecta 3-20 (1)), representativos ellos de los dos grupos genéticos antes mencionados (Levy *et al.*, 1993; Correa *et al.*, 2002). **El grupo 2** estaría conformado por 9 aislamientos representativos del grupo genético SRL-3, puesto que aquí quedaría ubicado el aislamiento 7333 (Mética 1 (33-18)) que pertenece a este grupo genético (Levy *et al.*, 1993). **El grupo 3** estaría conformado por 4 aislamientos 708 (Cica 9 (15)), 12244 (O. Llanos 5 (237-2)), 8714 (Cica 9 (151-1)) y 7708 (Línea 2 (62)), siendo estos representativos de los grupos genéticos SRL-1, SRL-2 y ALI-7 (Tabla 11) (Levy *et al.*, 1993, Flor, 1998). **El grupo 4** quedaría conformado por 38 aislamientos representativos todos ellos del grupo genético SRL-4, debido a que aquí estaría ubicado el aislamiento 10683 (O. Caribe 8 (17)) que pertenece a este grupo genético de acuerdo a los estudios hechos anteriormente (Levy *et al.*, 1993).

5.2.3 Índice de diversidad genética

Como se puede observar en los resultados, la diversidad genética general por haplotipos de la población fue bastante alta (98.7%), y dentro de cada grupo genético fue igualmente alta, oscilando entre 87.5 y 100%, esto se debió a que para la mayoría de los grupos hay casi tantos haplotipos como aislamientos. Como se ha mencionado con anterioridad, tal

vez este resultado se deba a la gran diversidad de las muestras que dieron origen a los aislamientos que se utilizaron para este estudio.

5.2.4 Distribución geográfica de haplotipos

Todos los grupos genéticos obtenidos están presentes en el departamento del Meta, tal como ocurrió con la distribución geográfica a nivel de patotipos. Esto indica que este departamento es un sitio de gran importancia para los estudios de este patógeno, pues allí está representada toda la diversidad genética y patotípica de *Magnaporthe oryzae* en Colombia. Los departamentos del Tolima, Casanare y Valle, se encontraron más de dos grupos genéticos (cinco, cuatro y tres respectivamente), indicando esto que en estos departamentos también se encuentra una amplia diversidad genética de este patógeno. En los análisis patotípicos se obtuvieron resultados similares, presentándose cuatro grupos patotípicos en el Tolima, tres en Casanare y dos en el Valle. Cundinamarca, Santander y Sucre, presentaron un solo grupo genético cada uno, presentándose el mismo grupo genético en Cundinamarca y Sucre.

El grupo genético 5 fue el que se encontró mayormente distribuido en Colombia, detectándose en seis de los siete departamentos de origen de los aislamientos, seguido del grupo genético 4, presente en cuatro departamentos.

La distribución de estos grupos genéticos y patotípicos, puede ser debido al movimiento de las variedades comerciales a lo largo y ancho de las zonas arroceras del país.

5.2.5 Correspondencia entre grupos genéticos y patotípicos

No se estableció correspondencia entre los grupos genéticos y los grupos patotípicos obtenidos.

Tal vez esta correspondencia no está en este estudio debido a la muestra tan diversa de aislamientos que se utilizó y por basarse únicamente en inoculaciones sobre líneas diferenciales-monogénicas, no habiendo utilizado variedades comerciales de Colombia, las cuales son las que realmente podrían indicar con mayor exactitud procesos coevolutivos en el patosistema Arroz-*Magnaporthe oryzae*.

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

6.1.1 Estructura patotípica

Se identificaron 61 razas en la población de 114 aislamientos estudiada de acuerdo a la reacción de cada aislamiento frente al grupo de 25 genes de resistencia, contenidos en las 26 líneas diferenciales-monogénicas utilizadas.

La población se estructuró en siete grupos patotípicos, de los cuales los grupos 1, 2, 3 y 4 están representados por los aislamientos con los espectros de virulencia más amplios de la población; siendo el grupo 3, en el que se encuentran los aislamientos que superaron la resistencia de los 25 genes utilizados.

Los siete grupos patotípicos obtenidos tienen correspondencia con los grupos SRL-1 a SRL-6 y ALI-7, no se presentó un grupo patotípico diferente a los identificados en estudios anteriores.

Las menores frecuencias de virulencia de la población del patógeno estudiada se presentó frente a los genes de resistencia *Pi-9(t)*, *Pita-2(1)*, *Pita-2*, *Pik-m*, *Pik-h*, *Pi20(t)* y *Piz-t*. Las combinaciones de estos genes de resistencia excluyen más del 90% de la población del hongo estudiada.

Esta población es altamente diversa en cuanto a su estructura patotípica, obteniéndose una diversidad total de la población del 97.5%.

En el departamento del Meta se encuentran todos los grupos patotípicos obtenidos en este estudio y los grupos 1, 2, 3, que son altamente virulentos, se encuentran distribuidos en los departamentos de Casanare, Meta, Tolima y Valle.

De las 50 razas obtenidas en el departamento del Meta, 31 son de la estación experimental de Santa Rosa, lo cual indica la gran diversidad presente en esta estación, la cual sigue siendo un sitio de gran importancia para la caracterización de germoplasma de arroz por resistencia a este patógeno.

6.1.2 Estructura genética

De un total de 95 aislamientos utilizados en los análisis moleculares, se obtuvieron 67 haplotipos, confirmando la alta diversidad genética del patógeno en Colombia.

La población se estructuró en siete grupos genéticos, de los cuales, cuatro de ellos presentaron similitud con los grupos genéticos antes reportados, SRL-1 a SRL-6 y ALI-7 (Levy *et al.*, 1993; Flor, 1998; Correa, 2002) y tres de ellos son grupos nuevos.

Los siete grupos genéticos están presentes en el departamento del Meta; en el Casanare cuatro (1, 2, 3 y 5), en el Tolima cinco grupos genéticos (1, 2, 4, 6 y 7) y en el departamento del Valle tres grupos (1, 4 y 5).

El grupo genético 5, fue el más ampliamente distribuido, encontrándose en seis de los siete departamentos de procedencia de los aislamientos analizados. No se encontró en el departamento de Sucre.

En la estación experimental de Santa Rosa se encontraron 36 haplotipos, indicando esto la gran diversidad genética de este patógeno en este sitio.

La diversidad genética de la población total fue de 98.7%, indicando que la población fue bastante diversa en cuanto a sus patrones de bandas se refiere.

No se encontró correspondencia entre los grupos genéticos y patotípicos obtenidos.

6.2 Recomendaciones

Inocular el grupo de aislamientos utilizados en este estudio, sobre un grupo de variedades comerciales de Colombia y estimar con la reacción de estas la estructura patotípica de *Magnaporthe oryzae* en nuestro país, pues utilizando estas variedades se podrá tener información más precisa sobre la diversidad de las poblaciones de este hongo y se podrá entender mejor la dinámica de este patosistema.

Utilizar los aislamientos presentes en el grupo patotípico 3, en la identificación de nuevos genes de resistencia y adicionalmente inocular aislamientos en líneas elite de los programas de mejoramiento que permitan identificar los genes *Pi9(t)*, *Pita-2*, *Pik-h*, *Pik-m*, *Piz-t* y *Pi20*.

Involucrar en programas de mejoramientos los genes de resistencia *Pi-9(t)*, *Pita-2(1)*, *Pita-2*, *Pik-m*, *Pik-h*, *Pi20(t)* y *Piz-t*, pues fueron estos los que mostraron los mejores niveles de resistencia frente a la población del hongo estudiada.

Basar los programas de mejoramiento a *Magnaporthe oryzae* en la identificación de nuevos genes de resistencia y en estudios de las frecuencias de compatibilidad de los genes de resistencia *Pi9(t)*, *Pita-2*, *Pik-h*, *Pik-m*, *Piz-t* y *Pi20* frente a los aislamientos del Tolima, Meta, Casanare y Valle (por ser los más virulentos), involucrando nuevos grupos de aislamientos, lo cual permitirá determinar cuáles serían las mejores combinaciones de estos genes para ser utilizados en un programa de mejoramiento con búsqueda de resistencia durable a *Magnaporthe oryzae*.

A. Anexo: Variedades de origen de los 114 aislamientos utilizados en este estudio

Conse	Variedad
1	75 - 1 – 127
2	ACD 2526
3	Aichi Asahi
4	Alejandra 3-18
5	BL1 (13-1)
6	C101 - A 51
7	C101 LAC
8	C101 PKT
9	C101 -TTP-6
10	C103 –TTP
11	C105 -TTP-1
12	C105 -TTP-4
13	CICA 8
14	Cica 9 (15)
15	Clearfield 205
16	Coprosem 304
17	CT 13432 – 33
18	CT 13432 -107
19	El Zorro (40220)
20	El Zorro (40508)
21	F 124 – 1
22	F 129 – 1
23	F 80 – 1
24	F2 1850
25	F2 2060
26	Fanny
27	Fed 4-73 (3-1)
28	Fedearroz 174
29	Fedearroz 2000
30	Fedearroz 369
31	Fedearroz 473
32	Fedearroz 50
33	Fedearroz 60
34	FL 07275 -1P-3-2P -1P- M (1-1)

Anexo A. Continúa en la página siguiente

Conse	Variedad
35	FL 07375 -10P-3-3P -1P- M (1-1)
36	FL 07432 -6P-4-3P -1P- M (1-1)
37	Fortaleza (7-1)
38	FSC 11 (1-1)
39	Fujizaka 5
40	I -17 (1-1)
41	II – 23
42	III -7(1-1)
43	IRBL - 19A (1-1)
44	IRBL 1 - CL
45	IRBL 11 Zh
46	IRBL 12 - M
47	IRBL 3 CP4
48	IRBL 7 – M
49	IRBL 9 – W
50	IRBL Km- Ts
51	IRBL SH-S(1-1)
52	IRBL Z5
53	IRBLA a
54	IRBLA –c
55	IRBLK- Ka
56	IRBLKN - K 53
57	IRBLKp - K60
58	IRBLKs - Fs
59	IRBLKs - S
60	IRBLsh - B
61	IRBLsh - S
62	IRBLt- K 59
63	IRBLTa - K1 (1-1)
64	IRBLta 2 - Pi
65	IRBLTa -2 Pi (1-1)
66	IRBLta 2 –Re
67	IRBLta CP 1
68	IRBLZ 25 – CA
69	IRBLz-Fu
70	IRGA 417
71	Isolinea 22 (3-1)
72	Isolinea 6-7 (1)
73	IV -22
74	K – 1
75	K 59
76	L 3000
77	Linea 2 (62)
78	LTH
79	Maleza (16-1)
80	Maleza (17-1)
81	Metica 1 (33-18)
82	MOCARI
83	Nipponbare

Anexo A. Continúa en la página siguiente

Conse	Variedad
84	NORIN 22
85	O. Caribe 8 (17)
86	Orizica F2
87	Orquidea 1
88	Orquidea 2
89	Oryzica 1
90	Oryzica Llanos5
91	PCT- 4\O\O\4>23
92	PCT-4\O\O\4>136
93	PCT-4\SA\1,Bo\4\1>1s-M-2
94	PCT-4\SA\1\1,Bo\4\1>16-2-2
95	PCT-4\SA\1\1,Bo\4\1>16-2-3
96	PCT-4\SA\9\1>132
97	PI N 4(17-1)
98	Selecta 320
99	ZENITH 52 - 1

B. Anexo: Aislamientos obtenidos de las muestras tomadas en campos y procesados en el laboratorio (101), más 13 aislamientos previamente caracterizados por el grupo de patología de arroz del CIAT en los años 90.

Cons	Código	Sitio de colección	Aislamiento y variedad de colección	Año de colección
1	1620	Corocoa	Fanny 47-1	1990
2	1628	SANTA ROSA	Isolinea 22 (3-1)	1990
3	20188	Dpto /Meta/V/V/Puente de Oro	Fedearroz 2000	2008
4	20191	Dpto Meta /V/V Pompeya/Alaska	Fed 4-73 (3-1)	2008
5	20198	Dpto Meta /V/V Pompeya/Alaska	CT 13432 -107	2008
6	20201	Dpto Meta /V/V Caños Negros/Llanitos	Orquidea 1	2008
7	20202	Dpto Meta /V/V Caños Negros/Llanitos	Orquidea 2	2008
8	20221	Dpto/Tolima/Ibague/Coprosem/Zorro	El Zorro (40508)	2008
9	20278	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	Fujizaka 5	2009
10	20283	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	BL1 (13-1)	2009
11	20288	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	F 124 - 1	2009
12	20303	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	C101 LAC	2009
13	20336	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 11	Oryzica 1	2009
14	20497	Dpto/Casanare/Nuchia/la Redencion/Finc/I	Orquidea 1	2009
15	20503	Dpto/Aguazul/Tesoro/Finc/el Triunfo	Alejandra 3-18	2009
16	20510	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLK- Ka	2010
17	20512	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLKN - K 53	2010
18	20514	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLZ 25 - CA	2010
19	20519	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLt- K 59	2010
20	20522	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBL 1 - CL	2010
21	20526	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBL 9 - W	2010
22	20529	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBL Km- Ts	2010
23	20534	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBL 11 Zh	2010
24	20571	Dpto/Tolima/Ibague/Coprosem/Finc/el Zorr	IRBLz-Fu	2010
25	20575	Dpto/Tolima/Ibague/Coprosem/Finc/el Zorr	CT 13432 - 33	2010
26	21338	Dpto del Meta,V.V,Pompeya,Fin Alaska	ACD 2526	2012

Anexo B. Continua en la página siguiente

Cons	Código	Sitio de colección	Aislamiento y variedad de colección	Año de colección
27	9381	CIAT	Isolinea 6-7 (1)	1995
28	12098	SANTA ROSA	O. Caribe 8 (31-2)	1996
29	20199	Dpto Meta /V/V Pompeya/Alaska	Fedearroz 369	2008
30	20205	Dpto/Tolima/lbague/Coprosem/Zorro	I -17 (1-1)	2008
31	20212	Dpto/Tolima/lbague/Coprosem/Zorro	IV -22	2008
32	20217	Dpto/Tolima/lbague/Coprosem/Zorro	El Zorro (40220)	2008
33	20290	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	K - 1	2009
34	20344	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 11	Selecta 320	2009
35	20350	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 11	Oryzica Llanos5	2009
36	20486	Dpto Meta /Santa Rosa/FLAR/Lote 5/RD	FL 07375 -10P-3-3P -1P- M (1-1)	2009
37	20500	Dpto/Casanare/Nuchia/cañas/Finc/Mata de	Fedearroz 369	2009
38	20501	Dpto/Casanare/Nuchia/cañas/Finc/Mata de	Fedearroz 60	2009
39	20502	Dpto/Casanare/Nuchia/cañas/Finc/Mata de	Fedearroz 2000	2009
40	20531	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLta 2 - Pi	2010
41	20532	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLta 2 -Re	2010
42	20533	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLta CP 1	2010
43	20535	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBL Z5	2010
44	20573	Dpto/Tolima/lbague/Coprosem/Finc/el Zorr	NORIN 22	2010
45	7333	SANTA ROSA	Metica 1 (33-18)	1993
46	8970	Semillano Pompeya	Selecta 3-20 (1)	1994
47	20207	Dpto/Tolima/lbague/Coprosem/Zorro	III -7(1-1)	2008
48	20210	Dpto/Tolima/lbague/Coprosem/Zorro	II - 23	2008
49	20228	Dpto Meta /Santa Rosa/Finca Alaska	Fortaleza (7-1)	2009
50	20281	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	C103 -TTP	2009
51	20282	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	Aichi Asahi	2009
52	20292	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	F 129 - 1	2009
53	20296	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	Nipponbare	2009
54	20335	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 11	CICA 8	2009
55	20377	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 8	Fedearroz 174	2009
56	20482	Dpto Meta /Santa Rosa/FLAR/Lote 5/RD	FL 07275 -1P-3-2P -1P- M (1-1)	2009
57	20489	Dpto Meta /Santa Rosa/FLAR/Lote 5/RD	FL 07432 -6P-4-3P -1P- M (1-1)	2009
58	20504	Dpto/Tauramena/Iquia/Finc/la Veronica	Clearfield 205	2009
59	20506	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLA -c	2010
60	20509	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLKs - S	2010
61	20511	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLKp - K60	2010
62	20536	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	LTH	2010
63	20591	Dpto Meta /V/V/Santa Rosa/E.E L.Liberta	PCT-4\SA\9\1>132	2010
64	20596	Dpto Meta /V/V/Santa Rosa/E.E L.Liberta	PCT-4\SA\1\1,Bo\4\1>16-2-3	2010
65	20647	Dpto Meta /V/V/Santa Rosa	75 - 1 - 127	2010
66	20648	Dpto Meta /V/V/Santa Rosa	Fedearroz 50	2010
67	20651	Dpto Valle /Palmira/CIAT	Orizica F2	2010
68	20652	Dpto Valle /Palmira/CIAT	F2 2060	2010
69	20660	Dpto Valle /Palmira/CIAT	F2 1850	2010
70	20691	Dpto Valle /Palmira/CIAT	L 3000	2010
71	20693	Dpto Valle /Palmira/CIAT	IRGA 417	2010
72	20892	Dpto Meta /V/V/Santa Rosa	Maleza (17-1)	2011
73	21337	Dpto del Meta, V.V, Pompeya, Fin Alaska	Coprosem 304	2012
74	21339	Dpto del Casanare, Globitos, Fin la puerta	ACD 2526	2012
75	21340	Dpto del Casanare, Globitos, Fin la puerta	MOCARI	2012

Anexo B. Continua en la página siguiente

Anexo B: Aislamientos obtenidos de las muestras tomadas en campos y procesados en el laboratorio (101), más 13 aislamientos previamente caracterizados por el grupo de patología de arroz del CIAT en los años 90.

97

Cons	Código	Sitio de colección	Aislamiento y variedad de colección	Año de colección
75	21340	Dpto del Casanare, Globitos, Fin la puerta	MOCARI	2012
76	21341	Dpto del Casanare, Globitos, Fin la puerta	MOCARI	2012
77	8137	CIAT	fanny 54	1993
78	10683	ICA La Sabana	O. Caribe 8 (17)	1995
79	20257	Dpto Meta /Santa Rosa/Alaska/Finc/porve	C 101 A 51	2009
80	20279	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	C101 -TTP-6	2009
81	20280	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	C105 -TTP-1	2009
82	20284	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	F 80 - 1	2009
83	20293	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	PI N 4(17-1)	2009
84	20294	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	C105 -TTP-4	2009
85	20299	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 1B	C101 - A 51	2009
86	20352	Dpto Sucre/San Benito/Remdino/Sajonia	Fedearroz 473	2009
87	20505	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLA a	2010
88	20508	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLKs - Fs	2010
89	20520	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLsh - S	2010
90	20521	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBLsh - B	2010
91	20523	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBL 3 CP4	2010
92	20525	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBL 7 - M	2010
93	20527	Dpto Meta /Santa Rosa/Lote 9	IRBL 12 - M	2010
94	20572	Dpto/Tolima/Ibague/Coprosem/Finc/el Zorr	K 59	2010
95	20574	Dpto/Tolima/Ibague/Coprosem/Finc/el Zorr	C 101 A 51	2010
96	20576	Dpto/Tolima/Ibague/Coprosem/Finc/el Zorr	C101 PKT	2010
97	20578	Dpto/Tolima/Ibague/Coprosem/Finc/el Zorr	Fanny	2010
98	20588	Dpto Meta /V/V/Santa Rosa/E.E L.Liberta	PCT- 4\O\O\4>23	2010
99	20590	Dpto Meta /V/V/Santa Rosa/E.E L.Liberta	PCT-4\O\O\4>136	2010
100	20594	Dpto Meta /V/V/Santa Rosa/E.E L.Liberta	PCT-4\SA\1,Bo\4\1>1s-M-2	2010
101	20595	Dpto Meta /V/V/Santa Rosa/E.E L.Liberta	PCT-4\SA\1\1,Bo\4\1>16-2-2	2010
102	20881	Dpto Meta /V/V/Puerto Lopez/Ver/ el tig	Maleza (16-1)	2010
103	20889	Dpto Meta /V/V/Puerto Lopez/Finc/ Sta/C	IRBLTa -2 Pi (1-1)	2011
104	2950	SANTA ROSA	Cica 9 (52-1)	1989
105	20886	Dpto Meta /V/V/Puerto Lopez/Finc/ Sta/C	IRBL - 19A (1-1)	2011
106	20887	Dpto Meta /V/V/Puerto Lopez/Finc/ Sta/C	FSC 11 (1-1)	2011
107	20888	Dpto Meta /V/V/Puerto Lopez/Finc/ Sta/C	IRBL SH-S(1-1)	2011
108	20890	Dpto Meta /V/V/Puerto Lopez/Finc/ Sta/C	ZENITH 52 - 1	2011
109	20891	Dpto Meta /V/V/Puerto Lopez/Finc/ Sta/C	IRBLTa - K1 (1-1)	2011
110	7708	MATA AZUL	Linea 2 (62)	1993
111	12244	GRANADA SANTA	O.Llanos 5 (237-2)	1996
112	20732	Dpto/Sur/Santander/Sabana Torres/Finc/Ma	Fedearroz 2000	2011
113	708	SANTA ROSA	Cica 9 (15)	1989
114	8714	SANTA ROSA	Cica 9 (151-1)	1994

C. Anexo: Total de razas encontradas e identificación de las mismas

Obs	Raza	Obs	Raza
1	U00-i0-k000-z00-ta000	32	U73-i7-k137-z03-ta431
2	U33-i2-k006-z17-ta431	33	U73-i7-k137-z07-ta733
3	U33-i3-k006-z13-ta431	34	U73-i7-k137-z17-ta733
4	U33-i3-k006-z13-ta631	35	U73-i7-k167-z03-ta431
5	U33-i3-k106-z13-ta431	36	U73-i7-k167-z05-ta431
6	U63-i1-k126-z15-ta423	37	U73-i7-k167-z07-ta431
7	U63-i7-k177-z01-ta733	38	U73-i7-k167-z07-ta633
8	U71-i0-k107-z01-ta433	39	U73-i7-k167-z07-ta733
9	U73-i0-k100-z06-ta403	40	U73-i7-k167-z17-ta431
10	U73-i2-k177-z07-ta733	41	U73-i7-k167-z17-ta433
11	U73-i3-k010-z06-ta423	42	U73-i7-k167-z17-ta533
12	U73-i3-k100-z07-ta433	43	U73-i7-k177-z01-ta523
13	U73-i3-k107-z07-ta433	44	U73-i7-k177-z03-ta423
14	U73-i3-k167-z01-ta433	45	U73-i7-k177-z03-ta431
15	U73-i3-k177-z03-ta733	46	U73-i7-k177-z03-ta433
16	U73-i3-k177-z13-ta733	47	U73-i7-k177-z03-ta533
17	U73-i3-k177-z17-ta723	48	U73-i7-k177-z03-ta633
18	U73-i3-k177-z17-ta733	49	U73-i7-k177-z03-ta733
19	U73-i4-k177-z13-ta423	50	U73-i7-k177-z07-ta431
20	U73-i6-k177-z13-ta733	51	U73-i7-k177-z07-ta433
21	U73-i7-k004-z03-ta431	52	U73-i7-k177-z07-ta531
22	U73-i7-k100-z00-ta533	53	U73-i7-k177-z07-ta633
23	U73-i7-k107-z02-ta733	54	U73-i7-k177-z07-ta733
24	U73-i7-k107-z05-ta733	55	U73-i7-k177-z13-ta433
25	U73-i7-k107-z07-ta431	56	U73-i7-k177-z13-ta533
26	U73-i7-k107-z07-ta733	57	U73-i7-k177-z13-ta733
27	U73-i7-k124-z13-ta533	58	U73-i7-k177-z17-ta431
28	U73-i7-k127-z03-ta431	59	U73-i7-k177-z17-ta433
29	U73-i7-k127-z07-ta431	60	U73-i7-k177-z17-ta533
30	U73-i7-k127-z07-ta733	61	U73-i7-k177-z17-ta733
31	U73-i7-k127-z17-ta733		

D. Anexo: Razas con el respectivo número de aislamientos que las conforman.

Raza	No de aislamientos / Raza
U73-i7-k177-z07-ta733	11
U73-i7-k127-z07-ta733	10
U73-i7-k177-z17-ta733	6
U73-i7-k167-z17-ta431	5
U73-i7-k177-z07-ta431	4
U00-i0-k000-z00-ta000	3
U63-i7-k177-z01-ta733	3
U73-i6-k177-z13-ta733	3
U73-i7-k167-z07-ta431	3
U73-i7-k177-z03-ta433	3
U73-i7-k177-z07-ta433	3
U33-i3-k006-z13-ta431	2
U73-i7-k127-z03-ta431	2
U73-i7-k127-z07-ta431	2
U73-i7-k127-z17-ta733	2
U73-i7-k167-z03-ta431	2
U73-i7-k167-z05-ta431	2
U73-i7-k167-z07-ta733	2
U73-i7-k177-z13-ta433	2
U73-i7-k177-z17-ta433	2
U73-i7-k177-z17-ta533	2
U33-i2-k006-z17-ta431	1
U33-i3-k006-z13-ta631	1
U33-i3-k106-z13-ta431	1
U63-i1-k126-z15-ta423	1
U71-i0-k107-z01-ta433	1
U73-i0-k100-z06-ta403	1
U73-i2-k177-z07-ta733	1
U73-i3-k010-z06-ta423	1
U73-i3-k100-z07-ta433	1
U73-i3-k107-z07-ta433	1
U73-i3-k167-z01-ta433	1

Anexo D. Continua en la página siguiente

Raza	No de aislamientos / Raza
U73-i3-k177-z03-ta733	1
U73-i3-k177-z13-ta733	1
U73-i3-k177-z17-ta723	1
U73-i3-k177-z17-ta733	1
U73-i4-k177-z13-ta423	1
U73-i7-k004-z03-ta431	1
U73-i7-k100-z00-ta533	1
U73-i7-k107-z02-ta733	1
U73-i7-k107-z05-ta733	1
U73-i7-k107-z07-ta431	1
U73-i7-k107-z07-ta733	1
U73-i7-k124-z13-ta533	1
U73-i7-k137-z03-ta431	1
U73-i7-k137-z07-ta733	1
U73-i7-k137-z17-ta733	1
U73-i7-k167-z07-ta633	1
U73-i7-k167-z17-ta433	1
U73-i7-k167-z17-ta533	1
U73-i7-k177-z01-ta523	1
U73-i7-k177-z03-ta423	1
U73-i7-k177-z03-ta431	1
U73-i7-k177-z03-ta533	1
U73-i7-k177-z03-ta633	1
U73-i7-k177-z03-ta733	1
U73-i7-k177-z07-ta531	1
U73-i7-k177-z07-ta633	1
U73-i7-k177-z13-ta533	1
U73-i7-k177-z13-ta733	1
U73-i7-k177-z17-ta431	1

F. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo 2.

Obs	Cód. isla.	Raza	Pia	Piz5	Piz-t	Pita	Pib	Pit	Pish	Pi1	Pi3	Pi5(t)	Pi7(t)	Pi9	Pi12(t)	Pi19	Pik-m	Pi20	Pita2	Pita2	Pita	Pii	Pik-s	Pik	Pik-p	Pik-h	Piz	NR	NS
28	_12098_	U73-i3-k107-z07-ta433	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	7	19	
29	_20199_	U73-i7-k124-z13-ta533	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	6	20
30	_20205_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
31	_20212_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
32	_20217_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
33	_20290_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
34	_20344_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
35	_20350_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
36	_20486_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
37	_20500_	U73-i7-k127-z17-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	2	24	
38	_20501_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
39	_20502_	U63-i1-k126-z15-ta423	S	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	10	16
40	_20531_	U73-i7-k107-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	4	22	
41	_20532_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
42	_20533_	U73-i7-k127-z07-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3	23	
43	_20535_	U73-i7-k127-z17-ta733	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	2	24	
44	_20573_	U73-i7-k107-z05-ta733	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	5	21	
45	_7333_	U71-i0-k107-z01-ta433	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	12	14	
46	_8970_	U73-i7-k107-z02-ta733	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	6	20	

J. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo 6.

Obs	Cód. Aisl	Raza	Pia	Piz5	Piz-t	Pita	Pib	Pit	Pish	Pi1	Pi3	Pi5(t)	Pi7(t)	Pi9	Pi12(t)	Pi19	Pik-m	Pi20	Pita2	Pita2	Pita	Pii	Pik-s	Pik	Pik-p	Pik-h	Piz	NR	NS	
105	_20886_	U33-i2-k006-z17-ta431	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	11	15
106	_20887_	U33-i3-k006-z13-ta431	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	11	15
107	_20888_	U33-i3-k006-z13-ta631	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	10	16
108	_20890_	U33-i3-k106-z13-ta431	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	10	16
109	_20891_	U33-i3-k006-z13-ta431	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	11	15
110	_7708_	U73-i7-k004-z03-ta431	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	11	15

K. Anexo: Espectro de virulencia de razas y aislamientos del grupo 7.

Obs	Cód. Aisl	Raza	Pia	Piz5	Piz-t	Pita	Pib	Pit	Pish	Pi1	Pi3	Pi5(t)	Pi7(t)	Pi9	Pi12(t)	Pi19	Pik-m	Pi20	Pita2	Pita2	Pita	Pii	Pik-s	Pik	Pik-p	Pik-h	Piz	NR	NS	
111	_12244_	U73-i3-k010-z06-ta423	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	12	14
112	_20732_	U73-i7-k100-z00-ta533	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	11	15
113	_708_	U73-i0-k100-z06-ta403	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	15	11
114	_8714_	U73-i3-k100-z07-ta433	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	10	16

L. Anexo: Razas comunes y no comunes entre los departamentos de origen de los aislamientos.

Cons.	Raza	Departamento			No. Razas únicas y comunes
1	U00-i0-k000-z00-ta000	Meta			1
2	U33-i2-k006-z17-ta431	Meta			1
3	U33-i3-k006-z13-ta431	Meta			1
4	U33-i3-k006-z13-ta631	Meta			1
5	U33-i3-k106-z13-ta431	Meta			1
6	U63-i1-k126-z15-ta423	Casanare			1
7	U71-i0-k107-z01-ta433	Meta			1
8	U73-i0-k100-z06-ta403	Meta			1
9	U73-i2-k177-z07-ta733	Meta			1
10	U73-i3-k010-z06-ta423	Santander			1
11	U73-i3-k100-z07-ta433	Meta			1
12	U73-i3-k107-z07-ta433	Meta			1
13	U73-i3-k167-z01-ta433	Meta			1
14	U73-i3-k177-z03-ta733	Casanare			1
15	U73-i3-k177-z13-ta733	Meta			1
16	U73-i3-k177-z17-ta723	Meta			1
17	U73-i3-k177-z17-ta733	Meta			1
18	U73-i4-k177-z13-ta423	Meta			1
19	U73-i6-k177-z13-ta733	Meta			1
20	U73-i7-k004-z03-ta431	Meta			1
21	U73-i7-k100-z00-ta533	Santander			1
22	U73-i7-k107-z02-ta733	Meta			1
23	U73-i7-k107-z05-ta733	Tolima			1
24	U73-i7-k107-z07-ta431	Cundinama			1
25	U73-i7-k107-z07-ta733	Meta			1
26	U73-i7-k124-z13-ta533	Meta			1
27	U73-i7-k127-z03-ta431	Meta			1
28	U73-i7-k127-z07-ta431	Meta			1
29	U73-i7-k137-z03-ta431	Meta			1
30	U73-i7-k137-z07-ta733	Casanare			1
31	U73-i7-k137-z17-ta733	Meta			1
32	U73-i7-k167-z05-ta431	Meta			1
33	U73-i7-k167-z07-ta431	Meta			1
34	U73-i7-k167-z07-ta633	Meta			1
35	U73-i7-k167-z17-ta431	Meta			1
36	U73-i7-k167-z17-ta433	Meta			1
37	U73-i7-k167-z17-ta533	Meta			1
38	U73-i7-k177-z01-ta523	Meta			1
39	U73-i7-k177-z03-ta423	Meta			1

Anexo L. Continua en la página siguiente

Cons.	Raza	Departamento			No. Razas únicas y comunes
40	U73-i7-k177-z03-ta431	Meta			1
41	U73-i7-k177-z03-ta433	Meta			1
42	U73-i7-k177-z03-ta533	Casanare			1
43	U73-i7-k177-z03-ta633	Meta			1
44	U73-i7-k177-z03-ta733	Valle			1
45	U73-i7-k177-z07-ta531	Tolima			1
46	U73-i7-k177-z07-ta633	Meta			1
47	U73-i7-k177-z13-ta533	Meta			1
48	U73-i7-k177-z13-ta733	Meta			1
49	U73-i7-k177-z17-ta431	Tolima			1
50	U73-i7-k177-z17-ta433	Meta			1
51	U63-i7-k177-z01-ta733	Meta	Valle		2
52	U73-i7-k127-z17-ta733	Casanare	Meta		2
53	U73-i7-k167-z03-ta431	Meta	Tolima		2
54	U73-i7-k167-z07-ta733	Meta	Tolima		2
55	U73-i7-k177-z07-ta433	Meta	Tolima		2
56	U73-i7-k177-z13-ta433	Casanare	Meta		2
57	U73-i7-k177-z17-ta533	Meta	Tolima		2
58	U73-i7-k127-z07-ta733	Casanare	Meta	Tolima	3
59	U73-i7-k177-z07-ta431	Meta	Sucre	Tolima	3
60	U73-i7-k177-z07-ta733	Casanare	Meta	Valle	3
61	U73-i7-k177-z17-ta733	Casanare	Meta	Tolima	3

M. Anexo: Aislamientos que no se analizaron molecularmente.

Cons	Código	Aislamiento	Sitio de colección	Año de colección
1	2950	Cica 9(52-1)	Meta-SR	1989
2	12098	Oryzica Caribe 8 (31-2)	Meta-SR	1996
3	20207	III-7(1-1)	Tolima	2008
4	20336	Oryzica 1	Meta-EESR	2009
5	20497	Orquidea 1	Casanare	2009
6	20486	FL07375-10P-3-3P-1P-M(1-1)	Meta-EESR	2009
7	20504	CF205	Casanare	2009
8	20293	Pi No 4(17-1)	Meta-EESR	2009
9	20510	IRBLK-ka	Meta-EESR	2010
10	20512	IRBLK-k53	Meta-EESR	2010
11	20514	IRBLZ25-Ca	Meta-EESR	2010
12	20521	IRBLsh-B	Meta-EESR	2010
13	20574	C101 A51	Tolima	2010
14	20576	C101 PKT	Tolima	2010
15	20590	PCT-4/0/0/4>136	Meta-EELL	2010
16	20881	Maleza (16-1)	Meta-Pto Lopez	2010
17	20892	Maleza (17-1)	Meta-SR	2011
18	20889	IRBLta-2 Pi (1-1)	Meta-Pto Lopez	2011
19	20890	Zenith (52-1)	Meta-Pto Lopez	2011

Bibliografía

- Aricapa, M. G. & Correa, F. (1994). Almacenamiento de hongos sobre papel filtro. *Ascolfi Informa*: 20 (3), 29-30.
- Arnao, E., Gonzalez, A., Jayaro, Y., Graterol, E. & Borges, O. (2008). Evaluación de la resistencia a *Pyricularia grisea* en algunas variedades de arroz en Venezuela. *Fitopatología venezolana*: 21(1), 9-14.
- Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. (1993). Recordando y actualizando nombres científicos. *Ascolfi Informa*. Vol. 19. No. 5. P.61-62.
- Ballini, E., Morel, J.B., Droc, G., Price, A., Courtois, B., Notteghem, J.L. & Tharreau, D. (2008). A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 859-868.
- Bonman, J.M. (1987). Pathogenic variability of monoconidial isolates of *Pyricularia oryzae* in Korea and in the Philippines. In: *Phytopathology*. Pp. 127-129.
- Brusés, B.L; Lucero, H., Aguirre, M.V. & Gorodner, J. O. (2000). Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR. En: Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Recuperado de: http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2000/3_medicas/m_pdf/m_011.pdf
- Carvalho, A.C. & Guimaraes, E.P. (2003). Ganancia genética para resistencia a *Pyricularia* en una población de arroz. En: *Mejoramiento Poblacional, Una Alternativa Para Explorar los Recursos Genéticos del Arroz en América Latina*. pp. 319-354.
- Causse, M.A., Fulton, T.M., Cho, Y.G; Ahn, N; Chunwonges, J., Wu, K.S., Kiao, J.H., Yu, Z.H., Ronald, P.C., Harington, S.E., Second, G., MaCouch, S.R. & Tanksley, S.D. (1994). Saturated molecular map of the rice chromosome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138, 1251-1274.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1995). *Informe anual del programa de arroz*. Palmira, Colombia.

- Centro Internacional de Agricultura Tropical. (2000). *Informe anual del programa de arroz*. Palmira, Colombia.
- Chen, Q.H., Wang, Y.C. & Zheng, X.B. (2006). Genetic diversity of *Magnaporthe grisea* in China as revealed by DNA fingerprint haplotypes and pathotypes. *Phytopathology*. 154 (6), 361-369.
- COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA. *Área sembrada de arroz incremento 21% en 2015*. Recuperado de: www.agronet.gov.co
- Correa, F. (1997a). Diversidad genética de *Pyricularia grisea*. En: *Ventana al Campo*. 1(2), 6-7.
- Correa, F. (1997b). Principales enfermedades del arroz. En: *MIP EN ARROZ: manejo integrado de plagas: Artrópodos, enfermedades y malezas*. CIAT. pp. 123-147.
- Correa, F.J. (May 16-20, 1994). Characterization of blast populations (*P. grisea*) using DNA-Fingerprinting and virulence analysis. (Abstract). In: *VII Annual meeting of the international program on rice biotechnology*. Bali, Indonesia.
- Correa, F., Guimaraes, E. & Martínez, C. (1997). Caracterización de la estructura genética y la virulencia de *Pyricularia grisea* Sacc. Para desarrollar variedades resistentes al añublo del arroz. En: *Selección Recurrente en Arroz*. CIAT-EMBRAPA. pp. 203-215.
- Correa-Victoria, F.J. (1997c). Caracterización de la estructura genética y de la virulencia de *Pyricularia grisea* Sacc. para desarrollar variedades resistentes al añublo del arroz. En: Guimaraes, E.P. (Ed.). *Selección recurrente en arroz*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. pp. 2013-2015.
- Correa-Victoria, F.J. & Zeigler, R.S. (1993a). Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "Hot Spot" breeding site in eastern Colombia. *Plant Disease*. 77, 1029-1035.
- Correa-Victoria, F.J. & Zeigler, R. S. (1993b). Field breeding for durable rice resistance in the presence of diverse pathogen populations. In: T. H, Jacobs and J. E, Parlevliet (eds) *Durability of disease resistance*. Klumer Academic Publishers. 375 p.
- Correa-Victoria, F.J. & Martínez, C. (1995). Genetics structure and virulence diversity of *Pyricularia grisea* in breeding for rice blast resistance. *Proceeding of international symposium on the use of induced mutation and molecular techniques for crop improvement jointly*. International Atomic Energy Agency and the Food and Agriculture. Viena, ONU. pp. 133-145.

- Correa-Victoria, F. J., Tharreau, D., Martínez, C., Vales, M., Escobar, F., Prado, G. & Aricapa, G. (2002). Combinaciones de genes en arroz para el desarrollo de resistencia durable a *Pyricularia grisea* en Colombia. *Fitopatología colombiana*. 26(2), 47-54.
- Correll, J.C., Harp, T.L., Guerber, J.C., Zeigler, R.S., Liu, B., Cartwright, R. D. & Lee, F.N. (2000). Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology*. 90, 1396-1404.
- Correll, J.C., Boza, E.J., Seyran, E., Cartwright, R.D., Jia, Y. & Lee, F.N. (2009). Examination of the Blast Pathogen Population Diversity in Arkansas, USA-Stable or Ustable. In: *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer Ed. pp. 217-228.
- Dai, Y., Jia, Y., Correll, J.C., Wang, X. & Wang, Y. (2010). Diversification and evolution of the avirulence gene AVR-Pita1 in field isolates of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 973-980.
- El Arroz en Colombia. Recuperado de: <http://www.agrocadenas.gov.co/home.htm>.2009
- Farman, M.L. & Leong, S.A. (1998). Chromosome Walking to the AVR1-CO39 Avirulence Gene of *Magnaporthe grisea*: Discrepancy Between the Physical and Genetic Maps. *Genetics*. 150, 1049-1058.
- Fischer, A., Pantoja, A., Ramirez, A., Sanint, A. & Correa, F. (1997). Producción de arroz en América Latina: Área sembrada y costos. En: *MIP EN ARROZ: manejo integrado de plagas: artrópodos, enfermedades y malezas*. CIAT. pp. 3-5.
- Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9, 275-296.
- Flor, N.C. (1998). Dinámica de la virulencia y estructura genética de *Pyricularia grisea* (Sacc) del arroz *Oryza sativa* (L) en el tiempo. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia: Palmira. 218 p.
- Franquet, J.M. & Borrás, C. (2004). *Varietades y mejoras del arroz (Oryza sativa)*. Universidad Internacional de Cataluña. Escola Universitaria de Ciències Experimentals i Tecnologia. UIC-Campus de l'Ebre. EUCET. Col-Leccio Tecnica.
- Fuda, I., Collemare, J., Bohnert, H.U., Melayah, D. & Lebrun, M.H. (2007). *Expression of Magnaporthe grisea Avirulence Gene ACE1*. Is Connected to the Initiation of Appressorium Mediated Penetration. *Eukaryot Cell*. pp. 546-554.

- Fukuta, Y., Xu, D., Yanoria, M., Hairmansis, A., Hayashi, N. & Kobayashi, N. (2009). Genetic Characterization of Universal Differential Variety Sets Developed Under the IRRI-Japan Collaborative Research Project. In: *Advances in Genetics, Genomics and Control of Blast Disease*. Springer Ed. P 325-335.
- Fukuota, S; & Okuno, K. (2001). QTL analysis and mapping of Pi-21, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *Theor Appl Genet.* 103, 185-190.
- Fuentes, J. L; Correa-Victoria, F. J; Escobar, F; Prado, G; Aricapa, G; Duque, M. C; Tohme, J. 2008. Identification of microsatellite markers linked to the blast resistance gene Pi-1(t) in rice. *Euphytica.* 160: 295-304.
- George, M.L.C. Nelson, R.J., Zeigler, R.S. & Leung, H. (1998). Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* with rep-PCR using endogenous repetitive DNA sequences. *Phytopathology.* 88, 223-229.
- Gouda, M., Barman-Roy, S. & Chato, B. (2006). Molecular mapping of a novel blast resistance gene Pi-38 in rice using SSLP and AFLP markers. *Plant Breed.* 125, 596-599.
- Gutierrez, S.A., Mazzanti de Castaño, M.A. & Galmarini, M.R. (2000). Avances en el conocimiento de hospedantes espontaneos de *Pyricularia grisea* en Argentina. En: *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste.*
- Guzmán, M.P. (2000). Añublo del arroz (*Pyricularia grisea*) Sacc. En: *Guía de Reconocimiento y Manejo de las Principales Enfermedades del Arroz.* FEDEARROZ. pp. 13-20.
- Hamer, J., Farral, L., Orbach, M., Valent, B. & Chumley, F. (1989). Host Species – specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Genetics.* 86, 9981-9985.
- Hamer, J. E., Talbot, N.J. & Levy, M. (1992). Genome dynamics and pathotype evolution in the rice blast fungus. In: *Proc Sixth Intl. Symp. Mol. Plant-Microb. Seattle, W. A. USA.*
- Hayashi, N; Kobayashi, N; Vera Cruz, C. & Fukuta, Y. (2009). Protocols for the sampling of diseased specimens and evaluation of blast disease in rice. In: *Development and Characterization of Blast Resistance Using Differential Varieties in Rice. JIRCAR working Report.* 63, 17-33.

- Hayashi, N. & Fukuta, Y. (2009). Proposal for a new international system of differentiating races of blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) by using LTH monogenic lines in rice (*Oryza sativa* L.). In: Development and Characterization of Blast Resistance Using Differential Varieties in Rice. *JIRCAR working Report*. 63, 11-15.
- Hebert, T.T. (1971). The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*. 61, 83-87.
- Huke, R. & Huke, E. (1991). Origin and diffusion of rice. In: *RICE: Then and Now*. pp. 5-6.
- Jia, Y., Wang, X., Constanzo, S. & Lee, S. (2009). Understanding the Co-evolution of the Rice Blast Resistance Gene *PI-TA* and *Magnaporthe oryzae* Avirulence Gene *AVR-PITA*. In: *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer ed. pp. 137-147.
- Jeung, J.U., Kim, B.R., Cho, Y.C., Han, S.S., Moon, H.P., Lee, Y.T. & Jena, K.K. (2007). A novel gene, Pi-40(t), linked to the DNA markers derived from NBS-LLR motif confers broad-spectrum of blast resistance in rice. *Theor Appl Genet*. 115, 1163-1177.
- Joseph, H., Anderson, R., Tatham, R. & Black, W. (1992). *Multivariate data Analysis with Readings*. Third Edition USA. 544 p.
- Kiyosawa, S. (1981). Genetic analysis of blast resistance. *Oryza* 18, 196-203.
- Koizumi, Sh. (2009). Monitoring of blast races to ensure durability of blast resistance in Japanese rice cultivars. In: Development and Characterization of Blast Resistance Using Differential Varieties in Rice. *JIRCAS working report*. 63, 1-9.
- Kumar, K.G., Hitalmani, S.S., Shashidhar, H.E. (2000). Marker assisted backcross gene introgression of major genes for blast resistance in rice. In: *Advances in rice blast research*. Academic press. pp. 43-51.
- Kush, G.S & Jena, K.K. (2009). Current Status and Future Prospects for Research on Blast Resistance in Rice (*Oryza sativa*). In: *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer ed. pp. 1-10.
- Leal, D. (1990). Obtención de variedades mejoradas de arroz. En: *Curso de Arroz*. Ed. Banco Ganadero. Bogotá, Colombia. pp. 25-33.
- Levy, M., Romao, J., Marchetti, M.A. & Hamer, J.E. (1991). DNA-Fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *The Plant Cell*. 3, 95-102.

- Levy, M., Correa-Victoria, F.J., Zeigler, R.S., Xu, S. & Hamer, J.E. (1993). Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology*. 83(12), 1427-1433.
- Li, W., Lei, C., Cheng, Z., Jia, Y., Huang, D., Wang, J., Wang, J., Zhang, X., Su, N., Guo, X., Zhai, H. & Wan, J. (2008). Identification of SSR markers for a broad-spectrum blast resistant genes *Pi20(t)* for market-assisted breeding.
- Li, W., Wang, B., Wu, J., Lu, G., Hu, Y., Zhang, X., Zhang, Z., Zhao, Q., Feng, Q., Zhang, H., Wang, Z., Wang, G., Han, B., Wang, Z. & Zhou, Bo. (2009). The *Magnaporthe oryzae* Avirulence Gene *AvrPiz-t* Encodes a Predicted Secreted Protein That Triggers the Immunity in Rice Mediated by the last Resistance Gene *Piz-t*. *Molecular Plant-Microbe interaction*. 22(4), 411-420.
- Ling, Z.Z., Mew, T.V., Wang, J., Lei, C. & Huang, N. (1995). Development of near-isogenic lines as international differentials of the blast pathogen. *International Rice Research Notes*. 20(1), 13-14.
- Liu, G., Lu, G., Zeng, L. & Wang, G-L. (2002). Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. *Mol Genet Genomics*. 267, 472-480.
- Liu, X; Yang, Q; Lin, F; Hua, L; Wang, L; & Pan, Q. 2007. Identification and fine mapping of Pi-39, a major gene conferring the broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Genet. Genomics*. 278: 403-410.
- Luo, Ch. X., Yin, L.F., Koyanagi, S., Farman, M.L., Kusaba, M. & Yaegashi, H. (2005). Genetic Mapping and Chromosomal Assignment of *Magnaporthe oryzae* Avirulence Genes *AvrPik*, *AvrPiz*, and *Avr Piz-t* Controlling Cultivars Specificity on Rice. *Phytopathology*. 95(6), 640-647.
- Mackill, D.J. & Bonman, J.M. (1992). Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology*. 82(7), 746-749.
- Miki, S., Matsui, K., Kito, H., Otsuka, K., Ashizawa, T., Yasuda, N., Fukiya, S., Sato, J., Hirayae, K., Fujita, Y., Nakajima, T., Tomita, F. & Sone, T. (2009). Molecular cloning and characterization of the *AVR-Pia* locus from a Japanese field isolate of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular plant pathology*. 10(3), 361-374.
- Nagato, Y; & Yoshimura, A. (1998). Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genet News Letter*. 15, 13-74.

- Nunes, C., Mota, M., Carvalho, F. Oliveira de, A. (2014). Variabilidade de *Pyricularia oryzae* CAV. em genotipos de arroz. *Pesq. Agropec. Trop., Goiania*. 44(3), 263-270.
- Odjo, T., Kawasaki-Tanaka, A., Noda, T., Ahohuendo, B., Sere, Y., Kumashiro, T., Yanagihara, S. & Fukuta, Y. (2014). Pathogenecity Analysis of Blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) Isolates from West Africa. *JARQ* 48(4), 403-412.
- Ou, S.H. (1985). *Rice Diseases*. Ed. Commonwealth Mycological Institute. 2da. Ed. Engly. 380 p.
- Pan, Q., Hu, Z., Tanisaka, T. & Wang, L. (2003). Fine mapping of blast resistance gene Pi-15, linked to Pi-1 on chromosome 9. *Acta Bot Sin.* 45, 871-877.
- Pingali, P., Hossain, M. & Gerpacio, R.V. (1997). *Asian rice bowls: The returning crisis?* CAB International in association with IRRI. Manila, Filipinas.
- Pinzón, C. (2003). Stratego DC 250 – a new means of control for *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, and other important rice-disease pathogens in Colombia. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*. 56, 399-416.
- Prabhu, A.S. & Coris de Fillipi, M.C. (2006). Diversidade genética em populaces de *Pyricularia grisea* em arroz irrigado. En: *Brusone em Arroz: Controle genético, progresso e perspectivas*. Embrapa. Goiania, Brasil. pp.136-143.
- Prado, G.A. (2004). Herencia de la resistencia a *Magnaporthe grisea* (Heber) Barr en las líneas isogénicas de arroz (*Oryza sativa* L.) C101 LAC y C101 A51. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. 96 p.
- Pulgarin, D.L. (2005). Caracterización de Genes de Resistencia a *Pyricularia grisea* (Sacc) en Variedades de Arroz de América Latina y el Caribe. Tesis de grado. Universidad de Antioquia, Medellín. 127 p.
- Pyricularia oryzae* en el arroz. (2012). Recuperado de: www.tecnicoagricola.es.
- Rossmann, A., Howard, R. & Valent, B. (1990). *Pyricularia grisea*, the correct name of the rice blast disease fungus. In: *Mycology*. 82(4), 509-512.
- RoyChouDhury, M., Jia, Y. & Cartwright, R.D. (2012a). Structure, function and coevolution of rice blast resistance genes. *Acta agric. Sin.* 38, 381-393.

- Sallaud, C., Lorieux, M., Roumen, E., Tharreau, D., Berruyer, R., Svestasrani, P., Garsmeur, O., Ghesquiere, A. & Notteghem, J.L. (2003). Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistance rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theor Appl Genet.* 106, 794-803.
- Sanint, L.R & Wood, S. (1998). El arroz en Latino América y el Caribe. En: *Impacto de la Investifación en Arroz en Latino América y el Caribe Durante las Tres últimas Décadas*. San José, Costa Rica. p. 11.
- Sanint, L.R. & Gutierrez, N.F. (2001). Agricultura siglo XX y arroz siglo XXI: Una mirada desde América Latina. En: *Anais II Congreso Brasileiro de Arroz Irrigado*. IRGA. Porto Alegre R-S. pp. 839-862.
- Sanint, L.R. (2010). Nuevos Retos y Grandes Oportunidades Tecnológicas para los Sistemas Arroceros: Producción, Seguridad Alimentaria y Disminución de la Pobreza en América Latina y el Caribe. En: *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina*. Tomo I. CIAT-FLAR-UNIVERSIDAD de CORDOBA. Palmira-Colombia. pp. 3-13.
- Sokal, R.R & Michener (1958). A stadistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas Science Bulletin*, 38, 1409-1438.
- Species 2000: Itis*. Recuperado de: www.catalogueoflife.org/col/species.2000
- Stukenbrock & McDonald, B. (2008). The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Ann. Rev. Phytopathol.* 46, 75-100.
- Tohme, J., Montenegro, M. V., Correa, F., Martinez, C., Zeigler, R. & Roca, W. (1991). *Tagging resistance genes to rice hoja blanca virus and Colombian isolates of rice blast with RFLP and RAPD markers*. Fifth Annual meeting of the international program on rice biotechnology. October 2-5. Tucson, Arizona, USA.
- Toung Le, M., Arie, T. & Teraoka, T. (2010). Population dynamic and pathogenic races of rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* in the Mekong Delta in Vietnam. *Gen plant pathology.* 76, 177-182,
- Valent, B. (1997). The rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. In: Part, B.G; Carroll, C; Tudzynoski, P; Mycota, V. (Eds), *Plant relationships*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 37-54.
- Villarraga, L.A & Andrade, E. (1982). Principales enfermedades en el cultivo del arroz. En: *Arroz*. 31, 8-21.

- Wang, G.L., Mackill, D.J., Bonman, J.M., MacCouch, S.R; Champoux, M.C. & Nelson, R.J. (1994). RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics* 136, 1421-1434.
- Wang, J.C., Jia, Y., Wen, J.W., Liu, W.P., Liu, X.M., Li, L., Jiang, Z.Y., Zhang, J.H., Guo, X.L. & Ren, J.P. (2013). Identification of rice blast resistance genes using international monogenic differentials. *Crop Protection*. 45, 109-116.
- Yang, Q., Saito, K., Yang, P., Wang, Q., Sunohara, Y., Zheng, F., Ye, C., Li, J. & Kato, A. (2001). Molecular mapping of a new blast resistance gene pi-25(t) possessed in a japonica rice cultivar, *Oryza sativa* L. cv Yunxi 2; 49-55. In proc General Meeting Rice Blast in China, Kunming.
- Yasuda, N., Noguchi, M.T. & Fujita, Y. (2006). Partial mapping of avirulence genes AVR-Pii and AVR-Pia in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Canadian Phytopathological Society*. 28(3), 494-498.
- Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matzumura, H., Yoshida, K., Tosa, Y., Chuma, I., Takano, Y., Win, J., Kamoun, S. & Terauchi, R. (2009). Association Genetics Reveals Three Novel Avirulence Genes from the Rice Blast Fungal Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*. 21, 1573-1591.
- Zeigler, R.S., Couc, X.L. & Scott, R.P. (1995). The relationship between lineage and virulence in *P. grisea* in Philippines. *Phytopathology*. 85, 443-451.
- Zhu, M., Wang, L. & Pan, Q. (2004). Identification and Characterization of a new blast resistance gene located on rice chromosome 1 through linkage and differential analysis. *Phytopathology*. 94, 515-519.
- Zeng, J., Feng, S., Cai, J., Wang, L., Lin, F. & Pan, Q. (2009). Distribution of Mating Type and Sexual Status in Chinese Rice Blast Populations. *Plant Disease*. 93(3), 238-242.