



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A
Pyricularia oryzae EN VARIEDADES MEXICANAS
DE ARROZ**

ERIDANI GARCÍA VÁZQUEZ

TESIS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

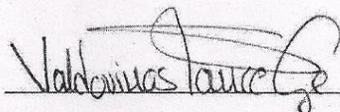
2016

La presente tesis titulada: **Detección de genes de resistencia a *Pyricularia oryzae* en variedades mexicanas de arroz**, realizada por la alumna: **Eridani García Vázquez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado en:

MAESTRA EN CIENCIAS
POSGRADO
FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA

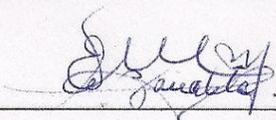
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



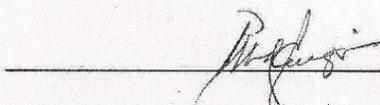
DRA. GUADALUPE VALDOVINOS PONCE

ASESOR



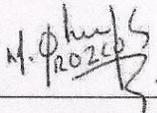
DRA. EMMA ZAVALETA MEJÍA

ASESOR



DR. LEONARDO HERNÁNDEZ ARAGÓN

ASESOR



DR. MARIO OROZCO SANTOS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2016

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A *Pyricularia oryzae* EN VARIEDADES MEXICANAS DE ARROZ

Eridani García Vázquez, MC.

RESUMEN

Pyricularia oryzae, agente causal de la “quema del arroz”, está presente en todas las áreas productoras de arroz del mundo. En algunos países, este hongo es capaz de causar pérdidas que pueden ser del 100%, comprometiendo el abasto de este cereal para millones de personas. En México, el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias, liberó algunas variedades con niveles aceptables de resistencia contra *P. oryzae*; sin embargo, Milagro Filipino, variedad susceptible, se sigue cultivando en las áreas productoras de arroz más importantes de México. Alrededor de 23 genes de resistencia se han clonado del arroz, muchos de ellos son dominantes y codifican proteínas NBS-LRR. Hasta ahora no hay información científica sobre la resistencia genética que presentan las variedades mexicanas de arroz, por lo que el objetivo de esta investigación fue detectar genes de resistencias a *P. oryzae* en 11 variedades mexicanas que se cultivan comercialmente. Las semillas se germinaron en cajas Petri y cinco días después las plántulas se trasplantaron a macetas de plástico con Peat-moss. El ADN genómico se aisló de las hojas de las plántulas y se realizaron pruebas moleculares (PCR) para determinar la presencia de los genes *Pita*, *Pib*, *Pita2*, *Pik*, *Pikm-1* y *Pikm-2*. Todas las variedades de arroz mostraron al menos dos genes de resistencia. Cuatro de las seis variedades resistentes, la moderadamente resistente, y una de las plantas moderadamente susceptibles presentaron cuatro genes de resistencia, mientras que las variedades susceptibles mostraron al menos tres. Debe determinarse si los aislamientos del hongo que están en México tienen los genes de avirulencia correspondientes; si es así, entonces debe corroborarse si los genes de resistencia y avirulencia son dominantes. La ausencia de cualquiera de estos genes o su condición recesiva podría resultar en el desarrollo y reproducción de *P. oryzae* en la planta hospedante. La detección, identificación y caracterización de nuevos genes de

resistencia y avirulencia en las diferentes áreas de producción de arroz en México juegan un papel importante en el desarrollo de nuevas estrategias de manejo y control.

Palabras clave: Tizón del arroz, *Oryza sativa*, genes de resistencia, variedades mexicanas de arroz.

DETECTION OF *Pyricularia oryzae* RESISTANCE GENES IN MEXICAN
VARIETIES OF RICE

Eridani García Vázquez, MC.

ABSTRACT

Pyricularia oryzae, the causal agent of rice blast disease, is present in all the rice production areas worldwide. In some countries, this fungus is able to cause losses that can be up to 100%, compromising the supply of this cereal for millions of people. In Mexico, the Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias, released some varieties with acceptable levels of resistance to *P. oryzae*; however, Milagro Filipino, a susceptible variety, is still cultivated in the most important Mexican rice production areas. In rice, about 23 resistance genes have been cloned; many of them are dominant and encode NBS-LRR proteins. So far there is no scientific information about the genetic resistance of the Mexican varieties, so the objective of this research was to detect *P. oryzae* resistance genes in 11 commercial Mexican rice varieties. Seeds were germinated in Petri dishes and five days later seedlings were transplanted into plastic pots with Peat Moss. Genomic DNA was individually isolated from seedling leaves and molecular tests (PCR) were performed to determine the presence of *Pita*, *Pib*, *Pita2*, *Pik*, *Pikm-1* and *Pikm-2* genes. All the rice varieties showed at least two resistance genes. Four out of six resistant varieties, the moderately resistant, and one of the moderately susceptible plants have four resistance genes while susceptible varieties showed at least three resistance genes. It has to be determined whether the fungal isolates that are in Mexico have the corresponding avirulence genes; if they do, then we have to corroborate whether resistance and avirulence genes are dominant. The absence of any of these genes or its recessive condition could result in the development and reproduction of *P. oryzae* in its plant host. Detection, identification and characterization of new resistance and avirulence genes in different rice production areas of Mexico play an important role in the development of new strategies of management and control.

Keywords: Rice blast, *Oryza sativa*, resistance genes, Mexican rice varieties.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, pero en especial al Posgrado de Fitosanidad-Fitopatología, por haberme brindado la oportunidad de continuar preparación profesional en esta institución.

A la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, por la dirección, apoyo y mucha paciencia y dedicación que me brindó para realizar este trabajo.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía por la revisión y grandes observaciones realizadas al presente trabajo.

Al Dr. Leonardo Hernández Aragón por su revisión y aportaciones al presente trabajo.

Al Dr. Mario Orozco Santos, por su gran apoyo y aportaciones realizadas al trabajo.

A la Biol. Leticia Tavitas Fuentes, por sus revisiones y aportaciones a este trabajo.

A la Dra. María de Jesús Yáñez Morales y a la Dra. María Teresa Santillán Galicia del Posgrado de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, por proporcionarme los instrumentos necesarios para el resguardo de reactivos y muestras.

A los profesores de Fitosanidad-Fitopatología por su amistad, enseñanzas y consejos brindados durante mi paso en la maestría.

A mis amigos, amigas, y compañeros, compañeras del Posgrado de Fitosanidad: Mirna, Alejandra, Adela, Claudia, Gaby, Edgar, Chucho, Santos, David, Victorino y Raúl, que me brindaron su apoyo y compañía en esta etapa de mi formación académica.

DEDICATORIA

A Dios, por darme fuerza y fortaleza para concluir con éxito esta etapa tan importante de mi vida.

A mi abuelita, Lucila Vázquez Sánchez por su amor, cariño y sabios consejos que me ha brindado a lo largo de toda mi vida. Gracias por ser un ejemplo a seguir y porque es y será siempre el pilar de esta familia. Te amo mamá Chila.

A mi madre, Guadalupe García Vázquez por todo lo que me ha dado a lo largo de esta vida. Por su amor, apoyo, confianza, cariño y por acogerme como una hija más. Gracias por creer en mí, por impulsarme a cumplir mis sueños

A mi tía Sara, por su gran apoyo a lo largo de este tiempo y por estar siempre ahí cuando más la he necesitado. Gracia tía, tengo tanto que agradecerle, que toda mi vida estaré en deuda con usted.

A mi madre, Doralia García Vázquez por haberme dado la vida y a mis hermanos Alejandra, Guadalupe y Víctor por su cariño brindado.

A mis tíos y tías, por todo el cariño y apoyo que me han brindaron desde mi infancia.

A mis primos Claudia-Nelson, Jatziry, Vane, Jocelyn, Monse, Belí, Sofi, Fabián, Augusto, Guadalupe, Lalo y Oliver y mis sobrinos Héctor, Emi, Sam, Emily, Ale, Yolo, Gael, Alberto y la pequeña Liesel, por todos esos buenos momentos que hemos y seguiremos compartiendo juntos. Los quiero mucho.

A mi prometido Carlos A. Pensado Medrano, por ser el amor de mi vida, porque sin su apoyo constante no hubiera logrado esta meta en mi vida. Gracias por tu confianza, amor y comprensión; por ser la otra mitad de este equipo de vida.

A mis pequeños peludos de cuatro patas, Nabu, Balam y Tool; gracias por acompañarme y demostrarme su amor cada instante.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 El arroz.....	3
2.2 Importancia	7
2.3 Enfermedades infecciosas	8
2.4 <i>Oryza sativa</i> - <i>Pyricularia oryzae</i>	10
2.5 Estrategias de control	18
2.5.1 Protección.....	19
2.5.2 Resistencia genética.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1 Obtención de material vegetal	23
3.2 Extracción de ADN.....	23
3.3 PCR	24
3.4 Secuenciación y análisis	25
IV. RESULTADOS.....	27
V. DISCUSIÓN.....	31
VI. CONCLUSIONES	34
VII. INVESTIGACIÓN FUTURA	35
VIII. LITERATURA CITADA	36

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales países consumidores de arroz.	4
Cuadro 2. Principales países productores de arroz.	5
Cuadro 3. Producción agrícola de arroz palay en la modalidad de riego y temporal.	7
Cuadro 4. Patógenos del arroz reportados a nivel mundial.	11
Cuadro 5. Genes de resistencia a <i>P. oryzae</i>	14
Cuadro 6. Genes de resistencia a <i>P. oryzae</i> clonados.	18
Cuadro 7. Regiones de producción de variedades Mexicanas de arroz resistentes y susceptibles a <i>Pyricularia oryzae</i>	21
Cuadro 8. Primers específicos para la identificación de genes de resistencia a <i>P. oryzae</i>	26
Cuadro 9. Genes de resistencia a <i>Pyricularia oryzae</i> en 11 variedades Mexicanas de arroz.	27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Productos de PCR amplificados con los primers específicos a partir de ADN foliar de 11 variedades Mexicanas de arroz. Panel A: Gen *Pib* (629 pb). Panel B: Gen *Pik* (112 pb)..... 28
- Figura 2.** Productos de PCR amplificados con los primers específicos a partir de ADN foliar de 11 variedades Mexicanas de arroz. Panel A: Gen *Pita* (440 pb). Panel B: Gen *Pita2* (861 pb)..... 29
- Figura 3.** Productos de PCR amplificados con los primers específicos a partir de ADN foliar de 11 variedades Mexicanas de arroz. Panel A: Gen *Pikm-1* (223 pb). Panel B: Gen *Pikm-2* (291 pb)..... 30

I. INTRODUCCIÓN

Pyricularia oryzae Cav. [Teleomorfo *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr], agente causal de la “quema del arroz”, es uno de los patógenos más devastadoras en el cultivo de arroz a nivel mundial. De acuerdo con Liu *et al.*, (2014), este patógeno, en algunos casos; puede causar hasta el 100% de pérdidas en la producción mundial de arroz, comprometiendo el abasto de este cereal para más del 50% de la población. El arroz, después del maíz, es el segundo cereal de mayor producción en el mundo, por lo que la “quema del arroz” ha sido un tema de investigación ampliamente abordado no solo por su importancia económica y agrícola, sino también por representar un modelo de estudio para entender la interacción planta-microorganismo (Dean *et al.*, 2005).

Una de las medidas de manejo más efectiva y económica para este patógeno es el uso de variedades resistentes. Sin embargo, el hongo es altamente variable, por lo que es muy común la pérdida de resistencia, especialmente cuando está dada por un solo gen (Huang *et al.*, 2014). En este sentido, la identificación de nuevos genes de resistencia en diferentes regiones productoras de arroz juega un papel fundamental en los programas de mejoramiento y en el planteamiento de estrategias para el manejo de *P. oryzae* (Lei *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014).

En México, *P. oryzae* se presenta en las zonas productoras de arroz. En 1975, el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), actualmente Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), inició un proyecto de mejoramiento para la incorporación de resistencia genética al hongo. Se introdujeron diversas fuentes de resistencia para usarse como progenitores donadores, tales como Tetep (Vietnam), Mamoriaka (India), Carreon (Filipinas) y Dawn (Estados Unidos de América), de tal forma que la mayoría de las variedades liberadas y cultivadas en México, desde la década de los años 80, poseen niveles aceptables de resistencia a este patógeno (Jiménez *et al.*, 2014). Sin embargo, en los principales estados productores de arroz como son Nayarit, Campeche, Veracruz, Michoacán y Jalisco, se cultiva la variedad Milagro Filipino, susceptible a *P. oryzae*. Los industriales arroceros

venden esta variedad con el nombre de “Arroz Tipo Morelos”, debido a que el grano es grueso y con 10% de “panza blanca”. El precio en el mercado es similar al del auténtico “Arroz Calidad Morelos”, el cual es también de grano grueso pero más grande y con 20% de “panza blanca”. Debido a su susceptibilidad a *P. oryzae*, los productores aplican fungicidas sin importarles el incremento en el costo del cultivo (Hernández *et al.*, 2015). Aun cuando a nivel internacional se han identificado y mapeado más de 80 genes de resistencia a *P. oryzae* (Ballini *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013), en México no se tienen evidencias científicas sobre el gen o genes que le confieren la resistencia a estas variedades, por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar los genes de resistencia a *P. oryzae* en variedades mexicanas de arroz cultivadas comercialmente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El arroz

El arroz (*Oryza sativa* L.), perteneciente a la familia Poaceae, tiene su origen en China (Franquet y Borrás, 2004) y se cultiva entre los 53° latitud norte y 40° latitud sur (Lu y Chang, 1980) en regiones tropicales y subtropicales. A nivel mundial, la mayor producción se concentra en climas húmedos tropicales con temperaturas de 24 a 28 °C, y en altitudes que van de los 0 a 1,250 msnm (Franquet y Borrás, 2004).

Este cereal es uno de los cultivos de mayor importancia mundial debido a que representa el alimento básico predominante en varios países de Asia; América del Norte, Central y del Sur; Europa; Oceanía y África (Cuadro 1), aportando el 20% de la energía alimentaria. Su producción ha aumentado debido al crecimiento de la población, por lo que tiene gran valor económico (FAO, 2015a).

Actualmente, el género *Oryza* tiene alrededor de 23 especies silvestres y dos cultivadas, *O. sativa* y *O. glaberrima* Steud. (Vaughan *et al.*, 2003). Como se indicó anteriormente, la primera especie se distribuye en varios países del mundo, mientras que *O. glaberrima* crece en áreas limitadas al oeste de África.

Oryza sativa presenta las subespecies *japonica* e *indica*, que se diferencian por sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas (Oka, 1988; Garris *et al.*, 2005). Estas subespecies están asociadas a diferentes hábitats de crecimiento; *indica* se encuentra generalmente en tierras bajas de Asia tropical y *japonica* en tierras altas de China, Corea del Norte y del Sur, Japón, Europa Mediterránea, sureste de Asia e Indonesia (Londo *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Principales países consumidores de arroz.

Continente	País
África	Costa de Marfil, Egipto, Guinea, Malí, Nigeria, Sierra Leona, Tanzania, Madagascar y Mozambique.
América del Norte	Canadá, Estados Unidos de América y México.
América Central	Belice, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá
América del Sur	Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Uruguay
Asia	Bangladesh, Camboya, China, India, Indonesia, Irán, Japón, Corea del Norte y del Sur, Laos, Malasia, Myanmar, Nepal, Pakistán, Filipinas, Sri Lanka, Tailandia y Vietnam.
Europa	Italia, España, Francia, Grecia, Portugal, Rumania, Bulgaria, Hungría y Rusia.
Oceanía	Australia, Nueva Zelanda, Papúa Nueva Guinea e Islas Salomón.

Fuente: FAO (2015a).

Los principales países productores de arroz son China, India e Indonesia, que en conjunto aportan más de la mitad del arroz que se produce a nivel mundial (Cuadro 2). En América destacan Brasil y Estados Unidos (Muñoz, 2014). Como países exportadores se tienen a India, Tailandia, Vietnam, Pakistán y Estados Unidos de América (FAO, 2015a). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2015a), en el año 2014 la producción mundial de

arroz con cáscara disminuyó el 0.5%, obteniéndose una producción total de 741.3 millones de toneladas; esta pérdida se atribuyó principalmente a varios fenómenos naturales y a la persistente tendencia a la baja de los precios.

Cuadro 2. Principales países productores de arroz.

País	Superficie sembrada 2013/2014*	Producción 2014
	(ha)	(t)
China	306,000,000	208,200,000
India	44,500,000	157,200,000
Indonesia	12,160,000	70,800,000
Bangladesh	11,700,000	51,800,000
Vietnam	7,700,000	45,000,000
Tailandia	11,120,000	33,200,000
Myanmar	6,500,000	28,900,000
Filipinas	4,750,000	18,900,000
Brasil	2450,000	12,100,000
Japón	1,602,000	10,800,000
Otros	28,050,000	107,100,000
Total mundial	161,202,000	744,200,000

Fuente: FAO (2015b). *Danty (2013).

En México, el arroz es el quinto cereal de mayor importancia después del maíz, trigo, cebada y avena (SIAP, 2014), aunque históricamente la siembra de este cereal ha ido disminuyendo debido a la falta de competitividad del arroz nacional con los arroces de importación (Jones *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2015). A finales de los años 80 y principios de los 90, la demanda nacional de arroz se cubría con las variedades tipo Sinaloa y Morelos, que en esa época era de 800 mil toneladas anuales. Sin embargo, con el establecimiento del Tratado de Libre Comercio para América del Norte (TLCAN) en 1994 y la Apertura Comercial en el 2000, el arroz tipo Sinaloa perdió competitividad debido a la importación masiva de arroz que tiene el mismo tipo de grano, pero que se vende a precio más bajo. Esta situación causó la disminución drástica de la superficie

sembrada y producción de arroz tipo Sinaloa, pero se mantienen las variedades Morelos en el Estado de México, Guerrero, Morelos y Puebla para cubrir solo el 10% de la demanda nacional (Hernández *et al.*, 2015). Esta situación dio lugar a que los productores empezaran a sembrar la variedad Milagro Filipino, introducida a México en 1965. El grano de esta variedad, de regular valor culinario, es muy parecido al “Arroz Calidad Morelos”, de tal manera que los productores e industriales lo empezaron a vender como tal (Hernández *et al.*, 2015).

Posteriormente, a fin de mantener y distribuir el “Arroz Calidad Morelos”, el INIFAP generó las variedades Morelos A-92, Morelos A-98 y Morelos A-2010. Estas variedades se siembran en 20 de los 33 municipios del estado de Morelos; en Tlapa de Comonfort de la montaña de Guerrero; y en los municipios de Mascota y San Martín de Hidalgo, Jalisco. Morelos A-92 y Morelos A-98 también se cultivan en Malinalco, Estado de México (comunicación personal Hernández, 2015). Recientemente, se liberaron las variedades INIFLAR RT (riego y temporal) e INIFLAR R (riego) con el objetivo de sustituir a Milagro Filipino, recuperar la rentabilidad del cultivo y reducir los niveles de importación (Hernández *et al.*, 2015).

El consumo nacional de arroz es de aproximadamente 7.5 kg per cápita, lo que lo ubica en el quinto lugar después del maíz, trigo, sorgo y frijol. El cultivo se hace bajo condiciones de temporal y riego en Primavera-Verano y riego en Otoño-Invierno mediante siembra directa o trasplante (Hernández *et al.*, 2015). De acuerdo con los datos del Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2014), el arroz palay se produce en 13 estados de la República Mexicana (Cuadro 3) en una superficie total de 41,078.88 ha, aportando 232,158.62 t. con un rendimiento promedio de 5.71 t/ha.

México importa el 80% del millón 100 mil toneladas de arroz que consume anualmente y solo el 20% se abastece con la producción nacional consistente en arroces gruesos (Calidad Morelos y Milagro Filipino). Los estados con mayor superficie sembrada y producción son Nayarit, Campeche, Veracruz y Michoacán, pero los que aportan el

mayor rendimiento son Morelos, Michoacán, Estado de México y Guerrero (Cuadro 3) (SIAP, 2014).

Cuadro 3. Producción agrícola de arroz palay en la modalidad de riego y temporal.

Estado	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t/ha)
Nayarit	8,935.86	8,743.86	47,789.04	5.46
Campeche	7,862.50	7,766.00	30,850.13	3.97
Veracruz	5,660.00	5,660.00	32,928.70	5.82
Michoacán	4,498.50	4,498.50	39,500.61	8.78
Jalisco	3,166.00	3,166.00	18,546.80	5.86
Tabasco	3,041.00	2,901.00	12,575.23	4.34
Colima	2,978.00	2,978.00	17,394.94	5.84
Tamaulipas	2,473.69	2,473.69	15,111.05	6.11
Morelos	1,222.50	1,222.50	12,314.33	10.07
Chiapas	588	588	1,226.10	2.08
Guerrero	394.83	386.83	2,389.19	6.18
Quintana Roo	185	185	925	5
Estado de México	73	73	607.5	8.32
Total	41,078.88	40,642.38	232,158.62	5.71

Fuente: SIAP (2014).

2.2 Importancia

El arroz juega un papel fundamental en la agricultura no solo como cultivo de importancia alimenticia y económica, sino también como una planta modelo para el desarrollo de investigaciones a nivel de genética molecular y genómica en cereales, biología, bioquímica y fisiología vegetal debido, entre otras características, a que se conoce la secuencia completa de su genoma (Xu *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2012); el

cual, comparado con el genoma del sorgo, maíz, cebada y trigo, es el más pequeño (430 Mpb) (Tyagi *et al.*, 2004).

Se tienen disponibles las secuencias de las subespecies cultivables *indica* y *japonica* (Gao e Innan, 2008) y más de 80,000 sitios polimórficos que permiten distinguirlas, lo que resulta en un mapa genético de alta resolución (International Rice Genome Sequencing Project, 2005).

A nivel internacional, se tienen bancos de germoplasma de arroz cultivado y silvestre, extensos programas de mejoramiento genético en casi todos los países productores (Jiang *et al.*, 2012), y bases de datos que permiten depositar, buscar y analizar información genómica (Xu *et al.*, 2005).

Todos estos datos y los resultados de las investigaciones que se han llevado a cabo con arroz, no solo aportan información sólida sobre su manejo agronómico y fitosanitario, sino también permiten establecer teorías e hipótesis sobre las interacciones parasitarias que se establecen entre otros cereales y parásitos a fin de entender sus bases biológicas, y proponer medidas de manejo más amigables con el ambiente que beneficien a los productores.

2.3 Enfermedades infecciosas

En todas las regiones arroceras del mundo se han reportado diferentes especies de virus, bacterias, hongos y nematodos (Cuadro 4) infectando al cultivo del arroz (Garcés *et al.*, 2012). De estos patógenos, el hongo *P. oryzae*, agente causal de la “quema del arroz”, se considera como el principal problema fitosanitario. Este patógeno ha causado pérdidas en la producción que van del 30 (Skamnioti y Gurr, 2009) al 100% (Liu *et al.*, 2014). De hecho, se ha estimado el fuerte impacto que tiene al causar pérdidas anuales del 10%, pues la cifra equivale a alimentar a 60 millones de personas en el mundo (Skamnioti y Gurr, 2009; Shew *et al.*, 2015).

El síntoma característico que induce *P. oryzae*, y que permite hacer el diagnóstico de la enfermedad, es la presencia de lesiones foliares en forma de rombo. En cultivares susceptibles, estas lesiones son grandes y aparecen inicialmente de color gris verdoso,

posteriormente cambian a color gris con bordes necróticos. En cultivares resistentes, las lesiones son pequeñas y de color marrón a marrón oscuro (TeBeest *et al.*, 2007). La incidencia y severidad de los síntomas inducidos por este hongo dependen de varios factores, entre ellos condiciones ambientales, y la susceptibilidad y etapa fenológica del cultivo (Kumar *et al.*, 2013); pero se favorecen en gran medida por una alta fertilización con nitrógeno, alta humedad relativa y temperaturas nocturnas de aproximadamente 20° C (Agrios, 2005).

Como referencias de las pérdidas que *P. oryzae* puede causar, en el 2008, en Kenia, se produjeron 1972.00 kg/ac (acre) de arroz; el año siguiente este hongo redujo a 945 kg/ac, causando una pérdida total del 47.9% (Kihoro *et al.*, 2013).

En Tanzania causa pérdidas del 40% (IRRI, 2010; Hubert *et al.*, 2015), y del 75 y 50% en la India y Filipinas, respectivamente (Kumar *et al.*, 2013). En Japón se estiman pérdidas de rendimiento entre el 20 y 100% (Khush y Jena, 2009), mientras que en Brasil se han reportado pérdidas hasta del 100% en variedades susceptibles bajo condiciones de secano (Prabhu *et al.*, 2009).

En México, los principales patógenos del arroz son *P. oryzae* y *Helminthosporium oryzae*, los cuales se encuentran en todas las zonas arroceras del país. El complejo de hongos *H. oryzae*, *Cercospora oryzae*, *Gerlachia oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma* sp., *Curvularia lunata* y *Trichoconiella padwickii*, en interacción con *Pseudomonas fuscovaginae*, inducen la enfermedad conocida como “grano manchado”, recientemente reportada en el Pacífico Sur (Morelos) y Pacífico Centro (Jalisco y Colima). Los síntomas inducidos por este complejo de parásitos se presentan en las glumas y en el endospermo en cultivos establecidos en suelos delgados y poco fértiles o con deficiencia de nitrógeno (Hernández *et al.*, 2015).

A la fecha, no existen estadísticas oficiales que reporten las pérdidas que ocasionan *P. oryzae* en las zonas arroceras de México (comunicación personal, Dr. Hernández). De acuerdo con los productores del Pacífico Centro, Pacífico Sur, Noreste y Sureste, el hongo afecta negativamente la producción del cereal debido a que la mayoría de los

productores siembran la variedad Milagro Filipino, susceptible a este patógeno (Hernández *et al.*, 2015).

Actualmente, en el estado de Morelos, *P. oryzae* se presenta en algunos lotes cultivados con la variedad Morelos A-92, regados con aguas negras y con altas dosis de fertilizantes nitrogenados en dos períodos críticos: a los 35-40 días (infección foliar) y en floración (ataque al nudo o cuello panicular) (Pinciroli *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2013).

En Tamaulipas, *P. oryzae* no solo causa pérdidas en el cultivo de arroz, sino también afecta las zonas productoras de pasto buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) (Díaz *et al.*, 2007).

2.4 *Oryza sativa* - *Pyricularia oryzae*

El patosistema *O. sativa* - *P. oryzae* (“quema del arroz”), es de gran importancia no solo por su impacto en la agricultura a nivel mundial, sino también porque a partir de las investigaciones que se han desarrollado con este sistema se han generado datos que permiten entender algunas de las bases moleculares y bioquímicas de la interacción planta-hongo y de la teoría del gen-por-gen, por lo que representa un sistema modelo ideal para el estudio de la interacción planta-microorganismo (Valent, 1990; Liu *et al.*, 2014).

Los análisis genéticos de las subespecies *japonica* e *indica* han dado a conocer alrededor de 80 genes de resistencia a *P. oryzae* (Cuadro 5) (Ballini *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2011.), de los cuales 19 están clonados y caracterizados molecularmente (Cuadro 6) (Sharma *et al.*, 2012; Tanweer *et al.*, 2015).

Cuadro 4. Patógenos del arroz reportados a nivel mundial.

Patógeno	Especie	Distribución	Referencia
Virus	<i>Virus de la hoja blanca del arroz</i>	América	Agrios, 2005
	<i>Rice tungro virus.</i>	Sudeste Asiático	Agrios, 2005
Bacterias	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Japón, Filipinas, Indonesia, India, Australia, Malasia, América del Norte, oeste de África, Rusia, América Latina y el Caribe.	Guevara y Maselli, 1999
	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	China, Tailandia, Malasia, India, Vietnam, Filipinas, Indonesia, África occidental, América del Sur y Australia.	Agrios, 2005; Kang <i>et al.</i> , 2008
	<i>Pantoea agglomerans</i>	Venezuela.	González <i>et al.</i> , 2015
	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	México, Brasil, Colombia, Guatemala, Panamá, Perú, Ecuador, África Central, Madagascar y Japón.	Hernández <i>et al.</i> , 2015; Soriano, 2006
	<i>Burkholderia glumae</i>	Japón, Tailandia, Vietnam, Corea del Sur, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Estados Unidos de América, Panamá, Nicaragua, Costa Rica y Colombia.	Zhu <i>et al.</i> , 2008; Devescovi <i>et al.</i> , 2007; Lim <i>et al.</i> , 2009; Nandakumar <i>et al.</i> , 2007; Ham <i>et al.</i> , 2011
Fitoplasmas	Enanismo amarillo del arroz	Sudeste Asiático.	Reveles <i>et al.</i> , 2014

Continuación Cuadro 4

Patógeno	Especie	Distribución	Referencia
Hongos	<i>Cercospora oryzae</i>	Filipinas y Estados Unidos de América.	Rodríguez y Nass, 1991., Sah y Rush, 1988
	<i>Helminthosporium oryzae</i>	África, América, Europa, Oceanía y Asia.	Ba y Sangchote, 2006; Dallagnol <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pyricularia oryzae</i>	África, América, Europa, Oceanía y Asia.	Akator <i>et al.</i> , 2014; Chuwa <i>et al.</i> , 2015
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Asia, África y América.	Meneses <i>et al.</i> , 2001
	<i>Sclerotium oryzae</i>	Estados Unidos, Paquistán, Australia e India.	Cintas y Webster, 2001; Cother y Nicol, 1999
	<i>Sarocladium oryzae</i>	Japón, Estados Unidos de América y América Latina.	Deka y Phookan, 1992
	<i>Neovossia barclayana</i>	Cuba.	Agrios, 2013
	<i>Entyloma oryzae</i>	Asia, África y América.	Agrios, 2013
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Asia y África	Maheshwar <i>et al.</i> , 2009
Nematodos	<i>Criconemella onoensis</i>	Estados Unidos de América, África Occidental, América Central y América del Sur.	Sancho y Salazar, 1985; Coyne <i>et al.</i> , 2007

Continuación Cuadro 4

Patógeno	Especie	Distribución	Referencia
	<i>Helicotylenchus</i> sp.	Costa Rica y Colombia.	Salazar y Quesada, 1999; Hoyos y Moya, 2010.
	<i>Meloidogyne salasi</i>	Costa Rica, Panamá y Venezuela.	Medina <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pratylenchus zaeae</i>	África, Sur y Sudeste de Asia.	Guzmán <i>et al.</i> , 2011; Coyne <i>et al.</i> , 2007
	<i>M. graminícola</i>	Asia, Bangladesh, Laos, Tailandia, Vietnam, India, China, Filipinas, Nepal y Estados Unidos	Upadhyay <i>et al.</i> , 2014
	<i>M. oryzae</i>	Sur y Sudeste de Asia	Coyne <i>et al.</i> , 2007
	<i>Tylenchus</i> sp.	Colombia y Costa Rica	Hoyos y Moya, 2010; Guzmán <i>et al.</i> , 2011
	<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Panamá, Bangladesh, Corea, India, Indonesia, Israel; Japón, Filipinas, Sri Lanka, Taiwán, Turquía, Hungría, Italia y Australia	Agrios, 2013; Escuer y Bello, 2000
	<i>Heterodera oryzae</i>	India y Bangladesh	Coyne <i>et al.</i> , 2007
	<i>Paralongidorus australis</i>	Australia	Coyne <i>et al.</i> , 2007
	<i>Hirschmanniella gracilis</i> , <i>H. imamuri</i> , <i>H. oryzae</i> e	África occidental, América del Norte y del Sur, Sur y Sudoeste de Asia	Coyne <i>et al.</i> , 2007

P. oryzae es capaz de infectar cualquier órgano aéreo de su hospedante, aunque las hojas y panículas son los más comunes. Las infecciones en las hojas reducen el área fotosintética, mientras que las que ocurren en la panícula son las que causan las mayores pérdidas económicas debido al impacto más directo que tienen en la reducción del rendimiento (Roumen, 1992). En condiciones artificiales, el hongo es capaz de infectar el sistema radical, penetrando e invadiendo el sistema vascular e induciendo síntomas en los órganos aéreos (Sesma y Osbourn, 2004).

Cuadro 5. Genes de resistencia a *P. oryzae*.

Gene	Cromosoma	Variedad de arroz donador
<i>Pi24(t)</i>	12	Azuena (J)
<i>Pi62(t)</i>	12	Yashiro-mochi (J), Tsuyuake
<i>Pitq6</i>	12	Tequing (I)
<i>Pi6(t)</i>	12	Apura (I)
<i>Pi12</i>	12	Moroberekan (J)
<i>Pi21(t)</i>	12	Owarihatamochi (J)
<i>Pi31(t)</i>	12	IR64 (I)
<i>Pi32(t)</i>	12	IR64 (I)
<i>Pi157</i>	12	Moroberekan
<i>Pita</i>	12	Tadukan (I)
<i>Pita2</i>	12	Shimokita (J)
<i>Pi19(t)</i>	12	Aichi Asahi (J)
<i>Pi39(t)</i>	12	Chubu 111 (J),
<i>Pi20(t)</i>	12	IR24 (I)
<i>PiGD-3(t)</i>	12	Sanhuangzhan 2
<i>Pia</i>	11	Aichi Asahi (J)
<i>PiCO39(t)</i>	11	CO39 (I)
<i>Pilm2</i>	11	Lemont

Continuación Cuadro 5

Gene	Cromosoma	Variedad de arroz donador
<i>Pi30(t)</i>	11	IR64 (I)
<i>Pi7(t)</i>	11	RIL29 (Moroberekan)
<i>Pi34</i>	11	Chubu32 (J)
<i>Pi38</i>	11	Tadukan (I)
<i>PBR</i>	11	St. No. 1
<i>Pb1</i>	11	Modan
<i>Pi44(t)</i>	11	RIL29 (Moroberekan)
<i>Pik-h</i>	11	Tetep
<i>Pi1</i>	11	LAC23 (J)
<i>Pikm</i>	11	Tsuyuake (J)
<i>Pi18(t)</i>	11	Suweon365 (J)
<i>Pik</i>	11	Kusabue (I)
<i>Pik-p</i>	11	HR22 (I)
<i>Pik-s</i>	11	Shin 2 (J)
<i>Pik-g</i>	11	GA20 (J)
<i>Pise1</i>	11	Sensho
<i>Pif</i>	11	Chugoku 31-1 (St. No. 1)
<i>Mpiz</i>	11	Zenith (J)
<i>Pikur2</i>	11	Kuroka (J)
<i>Piisi</i>	11	Imochi Shirazu (J)
<i>Pi28(t)</i>	10	IR64 (I)
<i>Pii2(t)</i>	9	Azucena
<i>Pi5(t)</i>	9	RIL125, RIL249, RIL260 (Moroberekan)
<i>Pi3(t)</i>	9	Kan-Tao

Continuación Cuadro 5

Gene	Cromosoma	Variedad de arroz donador
<i>Pi15</i>	9	GA25 (J)
<i>Pij</i>	9	Ishikari Shiroke (J)
<i>Pi36</i>	8	Q61 (I)
<i>Pi33</i>	8	IR64 (I)
<i>Pizh</i>	8	Zhai-Ya-Quing8 (I)
<i>Pi29(t)</i>	8	IR64 (I)
<i>Pi17(t)</i>	7	DJ 123
<i>Pi22(t)</i>	6	Suweon365 (J)
<i>Pi26(t)</i>	6	Azucena (J)
<i>Pi27(t)</i>	6	IR64 (I)
<i>Pi40(t)</i>	6	<i>O. australiensis</i>
<i>Piz</i>	6	Zenith (J)
<i>Piz-t</i>	6	Toride 1
<i>Pi9</i>	6	<i>O. minuta</i>
<i>Pi25(t)</i>	6	Gumei 2
<i>Pid2</i>	6	Digu
<i>Pigm(t)</i>	6	Gumei 4
<i>Pi26(t)</i>	5	Gumei 2 (I)
<i>Pi23(t)</i>	5	Sweon 365
<i>Pi10</i>	5	Tongil
<i>pi21</i>	4	Owarihatamochi
<i>Pikur1</i>	4	Kuroka (J)
<i>Pi39(t)</i>	4	Chubu 111 (J)
<i>Pi(t)</i>	4	Tjahaja
<i>Pid1(t)</i>	2	Digu

Continuación Cuadro 5

Gene	Cromosoma	Variedad de arroz donador
<i>Pig(t)</i>	2	Guangchangzhan (I)
<i>Pitq5</i>	2	Teqing
<i>Piy1(t)</i>	2	Yanxian No. 1
<i>Piy2(t)</i>	2	Yanxian No. 1
<i>Pib</i>	2	Tohoku IL9
<i>Pi25(t)</i>	2	IR64 (I)
<i>Pi14(t)</i>	2	Maowangu
<i>Pi16(t)</i>	2	Aus373 (I)
<i>Pit</i>	1	Tjahaja
<i>Pi27(t)</i>	1	IR64 (I)
<i>Pi24(t)</i>	1	Azuenca (J)
<i>Pitp(t)</i>	1	Tetep
<i>Pi35(t)</i>	1	Hokkai 188 (J)
<i>Pi37</i>	1	St. No. 1 (J)

Fuente: Tanweer *et al.*, 2015

*J (*Japonica*) I (*Indica*)

Cuadro 6. Genes de resistencia a *P. oryzae* clonados.

Gene	Cromosoma	Cultivar	Tipo de arroz
<i>Pib</i>	2	Tohoku IL9	<i>Japonica</i>
<i>Pita</i>	12	Tadukan	<i>Indica</i>
<i>Pi54</i>	11	Tetep	<i>Indica</i>
<i>Pi2</i>	6	Jefferson	<i>Japonica</i>
<i>Pi-zt</i>	6	Zenith	<i>Indica</i>
<i>Pi9</i>	6	75-1-127 (101141)	<i>Oryza minuta</i>
<i>Pid2</i>	6	Digu	<i>Indica</i>
<i>Pi36</i>	8	Q61	<i>Indica</i>
<i>Pikm</i>	1	Tsuyuake	<i>Indica</i>
<i>Pi37</i>	11	St. No. 1	<i>Japonica</i>
<i>Pi21</i>	9	Owarihatamochi	<i>Japonica</i>
<i>Pid3</i>	1	Digu	<i>Indica</i>
<i>Pit</i>	6	Tjahaja	<i>Japonica</i>
<i>Pi5</i>	4	Moroberekan	<i>Japonica</i>
<i>Pb1</i>	1	Modan	<i>Indica</i>
<i>Pish</i>	11	Shin 2	<i>Japonica</i>
<i>Pik</i>	11	Koshiminori	<i>Indica</i>
<i>Pikp</i>	11	HR22	<i>Indica</i>
<i>Pia</i>	11	Aichi Asahi	<i>Japonica</i>

Fuente: Tanweer *et al.*, 2015

2.5 Estrategias de control

Actualmente se han aplicado varias estrategias de control contra *P. oryzae*. En general, estas estrategias se agrupan en dos de los cuatro principios de control de patógenos: protección y resistencia genética.

2.5.1 Protección

En términos globales, para controlar al agente causal de la “quema del arroz” se recomienda sembrar en densidades no mayores a 150 o 200 plantas/m², aplicar dosis correctas de fertilizantes nitrogenados y potásicos según los requerimientos nutricionales, hacer manejo adecuado de la lámina de riego, tratamiento químico de la semilla, incorporación de restos de vegetales al suelo, uso de productos a base de bacterias rizosféricas y el uso de fungicidas específicos (Acebo *et al.*, 2011).

También se sugiere quemar los residuos de cosecha (paja y rastrojos infectados), sembrar semilla libre de patógenos, evitar el exceso de fertilizantes nitrogenados y que el cultivo se maneje bajo condiciones de inundación continua.

Estas medidas de control no son completamente eficientes cuando el patógeno se desarrolla en condiciones favorables (Skamnioti y Gurr, 2009). Además, el uso de fungicidas no sólo es costoso, sino también dañino para el ambiente ya que además de contaminar el manto freático y los cuerpos de agua colindantes (Padovani *et al.*, 2006; Acebo *et al.*, 2011), genera resistencia en el hongo y destruyen o desestabilizan las poblaciones de organismos benéficos.

En México, el control de este patógeno se ha basado en la aplicación balanceada de fertilizantes, principalmente de nitrógeno y fósforo-potasio, siembra en fechas recomendadas y con densidad adecuada de semilla certificada, y riego controlado.

Como medida preventiva se aplican fungicidas como Benlate, Azoxystrobin, Pyraclostrobin o Kasumin al inicio de la formación de los primordios florales o cuando aparecen los primeros síntomas (Hernández *et al.*, 2015).

2.5.2 Resistencia genética

La incorporación de genes de resistencia de amplio espectro en cultivares comerciales de arroz, y la utilización de genes que aumenten la eficiencia y rapidez de la expresión de los mecanismos de defensa representan una opción complementaria para el control de este patógeno (Wilson y Talbot, 2009; Acebo *et al.*, 2011).

Los estudios genéticos relacionados con la resistencia a *P. oryzae* comenzaron hace mucho tiempo (Takahashi, 1965), pero pocos cultivares han mostrado resistencia duradera (Ou, 1985) debido, principalmente, a la variabilidad genética del patógeno. Considerando la importancia que tiene este cultivo, las investigaciones más recientes se han enfocado en la clonación y secuenciación de genes de resistencia, análisis de QTL, y selección asistida por marcadores moleculares, entre otras (Miah *et al.*, 2013).

En México, en todas las regiones productoras de arroz se presenta *P. oryzae*. En estas regiones se cultivan algunas variedades cuya respuesta a este fitopatógeno va desde la resistencia hasta una fuerte susceptibilidad, como Milagro Filipino (Cuadro 7). Aunque se conocen los progenitores y el pedigree de tales variedades; a la fecha no se tiene algún tipo de reporte sobre los genes de resistencia que expliquen tales respuestas (Cuadro 7).

El hongo sigue extendiéndose en las principales zonas arroceras de México y del resto del mundo, por lo que hay una necesidad urgente de liberar variedades de arroz con resistencia alta y duradera para garantizar la seguridad alimentaria en los países en vías de desarrollo (Wang *et al.*, 2000; Tanweer *et al.*, 2015).

El uso de estas variedades, complementado con medidas de protección, permitirá la recuperación de los costos de inversión en el cultivo y la reducción de los volúmenes de grano importado, lo que beneficiará al país, a los productores y al abasto de uno de los cereales de mayor importancia económica y alimenticia a nivel mundial.

Cuadro 7. Regiones de producción de variedades Mexicanas de arroz resistentes y susceptibles a *Pyricularia oryzae*.

Región productora	Estado	Variedad	Progenitores	Respuesta a <i>P. oryzae</i>	
Pacífico centro	Nayarit	Milagro Filipino	Peta/Dee Geo Woo Gen	Susceptible	
		El Silverio	Selección de línea pura de Milagro Filipino	Moderadamente resistente	
		INIFLAR RT	CT10825-1-2-1-3/FEDEARROZ//FL02066-4P-1-1P-M	Resistente	
		INIFLAR R	CT9506-28-3-3P-M-1-M/ FSR214-M-5-1-1// FL03191-7P-8-2P-4P	Resistente	
	Jalisco	Milagro Filipino		Susceptible	
		El Silverio		Moderadamente resistente	
		INIFLAR RT		Resistente	
		INIFLAR R		Resistente	
		Colima	Milagro Filipino		Susceptible
			El Silverio		Moderadamente resistente
	Michoacán	Milagro Filipino		Susceptible	
		INIFLAR RT		Resistente	
INIFLAR R			Resistente		
Pacífico sur	Morelos	Morelos A-92	Jojutla Mejorado/Iguala A70*/C4-63 ³ //IR480-5-7-3/C4-63 ³ /Tetep	Moderadamente susceptible	
		Morelos A-98	IR62/LP4861//LP34-86	Resistente	
		Morelos A-2010	Mutación con rayos gamma ⁶⁰ Co con 30 krad de la Morelos A92	Resistente	

Continuación Cuadro 7

Región productora	Estado	Variedad	Progenitores	Respuesta a <i>P. oryzae</i>
Noreste	Tamaulipas	Milagro Filipino		Susceptible
		Aztecas	Sinaloa A80/ITA231//IR8	Resistente
		INIFLAR RT		Resistente
		INIFLAR R		Resistente
Golfo centro	Veracruz	Milagro Filipino		Susceptible
		INIFLAR RT		Resistente
		INIFLAR R		Resistente
		El Silverio		Moderadamente resistente
	Tabasco	Milagro Filipino		Susceptible
		INIFLAR R		Resistente
		INIFLAR RT		Resistente
Sureste	Campeche	Choca A-05	P3084-F ₄ -56-2-2-/IRAT 120//P2191-F ₄ -39-5-1B-3-1B	Resistente
		El Silverio		Moderadamente resistentes
		Milagro Filipino		Susceptible
		El Silverio		Moderadamente resistente
		INIFLAR RT		Resistente
		Aztecas		Resistente
INIFLAR R		Resistente		

Fuente: Hernández *et al.*, 2015

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de material vegetal

Se evaluaron seis variedades de arroz resistentes a *P. oryzae* (Aztecas: A, Choca A-05: ChA05, Morelos A-98: MA98, Morelos A-2010: MA2010, INIFLAR RT: INIRT e INIFLAR R: INIR); una medianamente resistente (El Silverio: S); dos medianamente susceptibles (Morelos A-92: MA92 y Cárdenas A-80: CrA80) y dos variedades susceptibles (Milagro Filipino: MF y Campeche A-80: CmA80). Todos estos materiales se obtuvieron del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) con sede en el Campo Experimental Zacatepec, Morelos, México.

Las semillas se germinaron en cajas Petri en una cámara de ambiente controlado (Sherer-Gillett, Marshall, Mich. modelo CEL 512-37) a 26°C y 12 horas luz. Cinco días después de la germinación, las plántulas se trasplantaron a macetas (2 plántulas/maceta) de plástico de 10 cm de diámetro con sustrato Peat Moss (Pro-Mix Flex), y se mantuvieron en la cámara de ambiente controlado a 26°C, con riego cada 48 horas durante 30 días. Después de este periodo de tiempo se hizo la extracción de ADN.

3.2 Extracción de ADN

El ADN se aisló con el Kit de extracción Wizard® SV Genomic DNA Purification System de Promega (Catálogo A2360). De cada material y de manera independiente, se maceraron 20 mg de tejido foliar con nitrógeno líquido en mortero de porcelana. El macerado se colocó en tubos Eppendorf estériles con 250 µL de amortiguador de lisis y se mezcló invirtiendo los tubos. El lisado celular se transfirió a una columna con tubo colector y se centrifugó a 13,000 g por 3 min. Se descartó el eluido, se agregaron 650 µL de la solución de lavado, se centrifugó a 13,000 g por 1 min y se descartó el eluido. El lavado se repitió 3 veces.

La columna se colocó en el tubo de colecta y se centrifugó a 13,000 g por 2 min. Se removió la columna y se colocó en un tubo Eppendorf estéril con 250 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de RNasa A. La muestra se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 g por 1 min. La columna se descartó y el ADN se incubó a temperatura ambiente durante 10 min.

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis a 85 V durante 1 h en un gel de agarosa al 1% (p/v) (Invitrogen®) en amortiguador TBE 1X (Tris-Borato- EDTA) y la calidad se cuantificó en un nanodrop® 2000 Thermo Scientific™.

3.3 PCR

Las secuencias de los fragmentos de los genes *Pita*, *Pib*, *Pita2*, *Pik*, *Pikm-1* y *Pikm-2* (Cuadro 8), los cuales están reportados en la literatura como genes de resistencia a *P. oryzae* (Jia *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007; Suh *et al.*, 2009; Costanzo y Jia, 2010; Trang *et al.*, 2012; Imam *et al.*, 2013), se mandaron a sintetizar a la empresa Integrated DNA Technologies, Inc.

La amplificación de los genes *Pita*, *Pib*, *Pita2* y *Pik*, se realizó en un volumen total de 25 µL con 40 ng de ADN, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1X de buffer de PCR, 10 pmol/µL de cada primer y 1 U de Taq polimerasa (Promega®). Para los segmentos de *Pita* y *Pib*, la PCR se llevó a cabo en condiciones de desnaturalización inicial a 95° C durante 4 min; 35 ciclos de 30 s a 95° C, 30 s a 55° C, 1 min a 72° C con una extensión final a 72° C durante 10 min; y un periodo de enfriamiento rápido a 4° C, esperando una banda de 440 y 629 pares de bases (pb), respectivamente (Jia *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2007; Suh *et al.*, 2009).

La amplificación de los genes *Pita2* y *Pik* se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 94° C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 45 s a 94° C, 45 s a 59° C (*Pita2*) o 60° C (*Pik*), 2 min a 72° C y una extensión final a 72° C durante 5 min, obteniéndose una banda de 861 y 112 pb, respectivamente (Hayashi *et al.*, 2006; Imam *et al.*, 2013). Finalmente, los fragmentos de los genes de *Pikm-1* y *Pikm-2* se amplificaron en un volumen total de 50 µL [100 ng de ADN, 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1X de

buffer de PCR, 10 pmol/ μ L de cada primer y 1.25 U de Taq polimerasa (Promega®)] a una temperatura inicial de desnaturalización de 95° C durante 5 min; seguida por 30 ciclos de 30 s a 95° C, 30 s a 60° C, 30 s a 72° C; y una extensión final a 72° C durante 5 min, seguida de un enfriamiento a 4° C. El tamaño de los fragmentos esperados es de 223 y 291 pb, respectivamente (Costanzo y Jia, 2010; Trang *et al.*, 2012).

Todas las amplificaciones se hicieron en un termociclador Thermo Scientific™ y se repitieron a partir del ADN que se extrajo de 5 plantas independientes de cada una de las variedades.

Los productos de las amplificaciones se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a un voltaje constante de 90 V durante 2 h, y se visualizaron en un fotodocumentador Gene Wizard, Syngene Bio Imaging.

3.4 Secuenciación y análisis

Los productos amplificados se mandaron a purificar y secuenciar en ambas direcciones a la empresa MacroGen. Las secuencias resultantes se analizaron con el programa BIOEDIT Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3 28 (Hall, 1999) y se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Cuadro 8. Primers específicos para la identificación de genes de resistencia a *P. oryzae*

Gen	Primer	Secuencia del Primer (5´-3´)	Referencia
<i>Pita</i>	YL153	CAACAATTTAATCATACACG	Jia <i>et al.</i> , 2002; Suh <i>et al.</i> , 2009.
	YL154	ATGACACCCTGCGATGCAA	
<i>Pib</i>	NSb F	ATCAACTCTGCCACAAAATCC	Cho <i>et al.</i> , 2007; Suh <i>et al.</i> , 2009.
	NSb R	CCCATATCACCCTTGTTC	
<i>Pita2</i>	Pita3 F	AGTCGTGCGATGCGAGGACAGAAAC	Imam <i>et al.</i> , 2013.
	Pita3 R	GCATTCTCCAACCCTTTTGCATGCAT	
<i>Pik</i>	K39512 F	GCCACATCAATGGCTACAACGTT	Hayashi <i>et al.</i> , 2006.
	K39512 R	CCAGAATTTACAGGCTCTGG	
<i>Pikm-1</i>	Dkm1 F	CTGGAGAGCTTCCGTGTCGAC	Costanzo y Jia, 2010.
	Dkm1 R	TCTTCACGACGTCAATGGTGGC	
<i>Pikm-2</i>	Dkm2 F	GTTGTTCACTCCGTATCTACTACGTC	Costanzo y Jia, 2010.
	Dkm2 R	TTCCTCCGTGATCTCAGCAACG	

IV. RESULTADOS

Todas las variedades Mexicanas de arroz presentaron al menos dos genes de resistencia a *P. oryzae*. El 66.6% (4/6) de las variedades resistentes (R) mostraron cuatro genes de resistencia, al igual que la variedad moderadamente resistente (MR) y una de las variedades moderadamente susceptibles (MS). Las variedades susceptibles (S) son portadoras de al menos tres genes de resistencia (Cuadro 9).

Cuadro 9. Genes de resistencia a *Pyricularia oryzae* en 11 variedades Mexicanas de arroz.

Variedad		Gen de Resistencia					
		<i>Pib</i>	<i>Pita</i>	<i>Pikm-1</i>	<i>Pikm-2</i>	<i>Pik</i>	<i>Pita2</i>
INIRT	R	+	-	-	-	+	-
INIR	R	+	-	-	-	+	+
MA98	R	+	+	-	-	+	+
MA2010	R	+	+	-	-	+	+
ChA05	R	+	+	-	-	+	+
A	R	+	+	-	-	+	+
S	MR	+	-	+	+	+	-
CrA80	MS	+	-	-	-	+	-
MA92	MS	+	+	-	-	+	+
CmA80	S	+	-	+	+	+	-
MF	S	+	-	+	-	+	-

INIRT: INIFLAR RT; INIR: INIFLAR R; MA98: Morelos A-98; MA2010: Morelos A-2010; ChA05: Choca A-05; A: Aztecas; S: El Silverio; CrA80: Cárdenas A-80; MA92: Morelos A-92; CmA80: Campeche A-80; MF: Milagro Filipino. +: presente; -: ausente.

De acuerdo con los resultados de PCR, en las variedades resistentes INIRT, INIR, MA98, MA2010, ChA05 y A, los primers utilizados amplificaron el fragmento esperado para los genes *Pib* (629 pb) y *Pik* (112 pb) (Figura 1). Las secuencias de los fragmentos de estos genes fueron 99 y 98% similares, respectivamente, a las

secuencias con número de acceso JN564625.1 (*O. sativa* indica, cultivar Krenghosa) y AB616659.1 (*O. sativa* japonica, cultivar Kanto 51) reportadas en el GenBank.

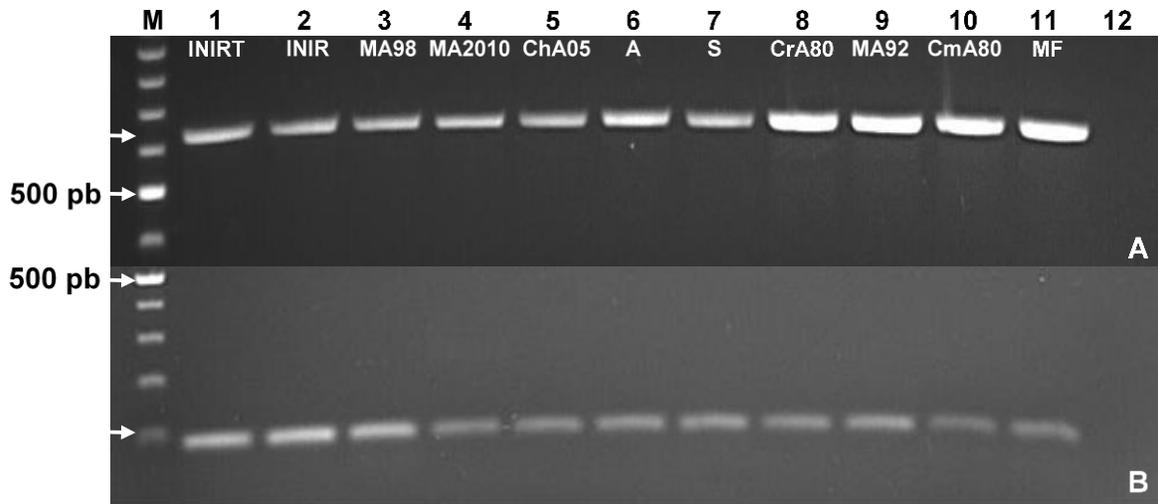


Figura 1. Productos de PCR amplificados con los primers específicos a partir de ADN foliar de 11 variedades Mexicanas de arroz. M: Marcador de peso molecular (Promega® 100 pb). Panel A: Gen *Pib* (629 pb). Panel B: Gen *Pik* (112 pb). Carriles 1 - 6: variedades resistentes; carril 7: variedad moderadamente resistente; carriles 8 y 9: variedades moderadamente susceptibles; carriles 10 y 11: variedades susceptibles; carril 12: control negativo.

Estas mismas variedades, a excepción de INIRT e INIR, son portadoras de *Pita*, y solamente en la variedad INIRT los primers no amplificaron la banda esperada para el gen *Pita2* (861 pb) (Figura 2).

Las secuencias de los fragmentos *Pita* y *Pita2* se alinearon con las secuencias GQ918457.2 de *O. sativa* cultivar Ai-Chiao-Hong y AF207842.1 de *O. sativa* Japónica, respectivamente, con el 100% de similitud.

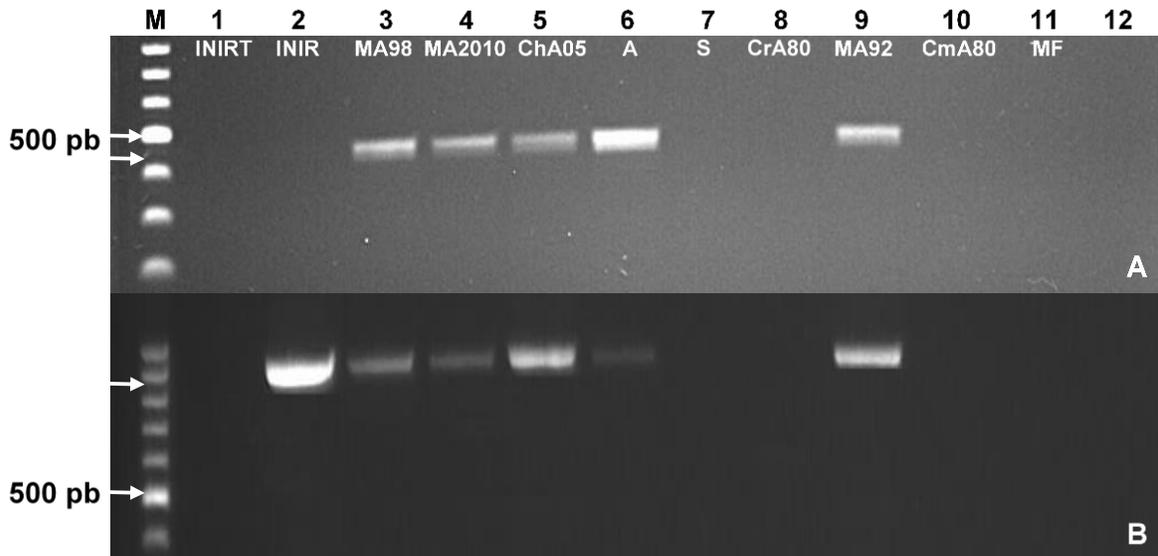


Figura 2. Productos de PCR amplificados con los primers específicos a partir de ADN foliar de 11 variedades Mexicanas de arroz. M: Marcador de peso molecular (Promega® 100 pb). Panel A: Gen *Pita* (440 pb). Panel B: Gen *Pita2* (861 pb). Carriles 1 - 6: variedades resistentes; carril 7: variedad moderadamente resistente; carriles 8 y 9: variedades moderadamente susceptibles; carriles 10 y 11: variedades susceptibles; carril 12: control negativo.

En la variedad El Silverio (S), reportada como moderadamente resistente a *P. oryzae*, los primers correspondientes amplificaron para los genes *Pib*, *Pik* (Figura 1), *Pikm-1* (223 pb) y *Pikm-2* (291 pb) (Figura 3). El último par de genes tienen el 99% de similaridad con las secuencias de *O. sativa* indica cultivar Tetep y *O. sativa* indica cultivar Dular, reportadas en el GenBank con los números de acceso GU811852.1 y GU811869.1, respectivamente.

Las variedades moderadamente susceptibles Cárdenas A-80 y Morelos A-92 tienen los genes *Pib* y *Pik*, y solamente MA92 posee dos genes adicionales de resistencia, *Pita* y *Pita2* (Figuras 1 y 2).

En Milagro Filipino (MF) y Campeche A-80 (CmA80), susceptibles al agente causal de la “quema del arroz”, los primers amplificaron el fragmento esperado para los genes *Pib*, *Pik* (Figura 1) y *Pikm-1* (Figura 3); y solamente en CmA80, al igual que en la

variedad S, el par de primers correspondiente amplificó el fragmento del gen *Pikm-2* (Figura 3).

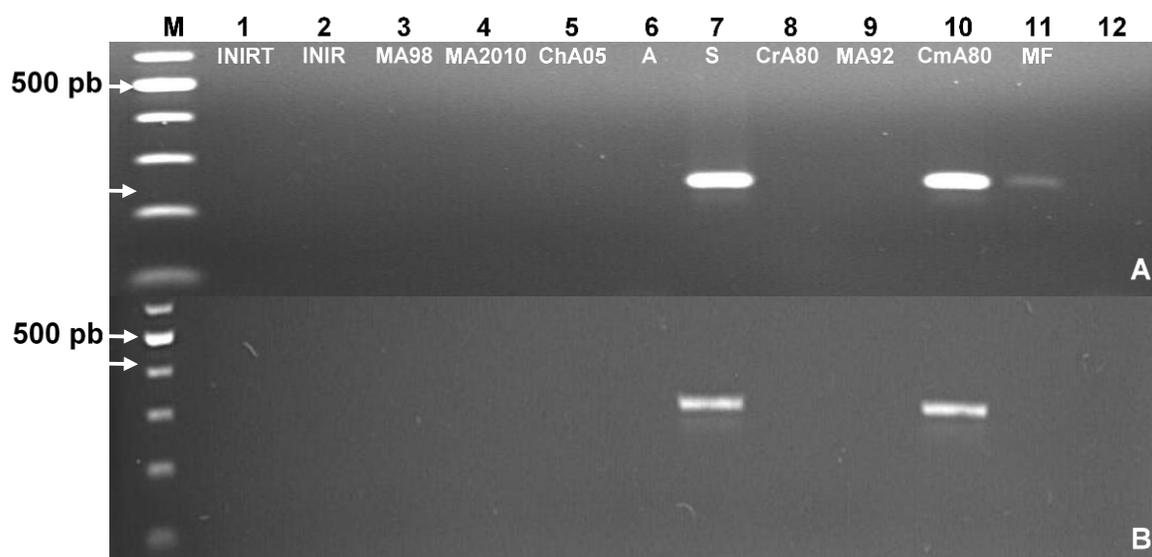


Figura 3. Productos de PCR amplificados con los primers específicos a partir de ADN foliar de 11 variedades Mexicanas de arroz. M: Marcador de peso molecular (Promega® 100 pb). Panel A: Gen *Pikm-1* (223 pb). Panel B: Gen *Pikm-2* (291 pb). Carriles 1 - 6: variedades resistentes; carril 7: variedad moderadamente resistente; carriles 8 y 9: variedades moderadamente susceptibles; carriles 10 y 11: variedades susceptibles; carril 12: control negativo.

V. DISCUSIÓN

En algunos países, *Pyricularia oryzae*, agente causal de la “quema del arroz”, es capaz de ocasionar pérdidas totales en la producción de arroz. En todas las regiones productoras de México se presenta este patógeno, y aun cuando no se tienen reportes formales sobre las pérdidas que causa en este cereal, los productores lo catalogan como un problema fitosanitario importante, al igual que *Helminthosporium oryzae*, el cual se asocia con otros patógenos para causar la enfermedad conocida como “grano manchado” (Hernández 2015, comunicación personal).

El INIFAP liberó variedades comerciales de arroz que son resistentes y moderadamente resistentes a *P. oryzae*, no obstante, la variedad Milagro Filipino, que es altamente susceptible al hongo, se sigue sembrando en todas las regiones arroceras del país (Hernández *et al.*, 2015). A la fecha no hay evidencias científicas que reporten la resistencia genética de estas variedades, por lo que en la presente investigación se evaluaron 11 variedades mexicanas de arroz (subespecie *indica*) con el propósito de detectar los genes implicados en tal resistencia.

La resistencia a *P. oryzae* puede ser completa o parcial (Wang, 1994; Liu *et al.*, 2014). La resistencia completa se basa en la teoría del gen por gen (Flor, 1971), que establece que la expresión de los mecanismos de defensa de la planta está mediada por la interacción de dos proteínas, una codificada por un gen de avirulencia en el patógeno y la otra por el correspondiente gen de resistencia en la planta hospedante, lo cual resulta en una relación incompatible (ausencia de enfermedad). Sin embargo, este hongo presenta alta variabilidad genética, por lo que la durabilidad de la resistencia puede ser de uno, dos (Wang, 1994) o más años (Hernández, comunicación personal).

Hasta la fecha, se han identificado y documentado más de 90 genes de resistencia en las subespecies *japonica* (45%) e *indica* (51%) (McCouch *et al.*, 1994; Ballini *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012). Estos genes se distribuyen a lo largo de los 12 cromosomas del arroz, excepto en el cromosoma 3 (Yang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Imam *et al.*, 2013) y codifican proteínas con dominios NBS-LRR (Nucleotide Binding Sites-Leucine Rich Repeats).

Con base en los resultados de PCR, los genes *Pib* y *Pik*, localizados en el cromosoma 2 y 11, respectivamente (Yamasaki y Kiyosawa, 1966; Yokoo *et al.*, 1978; Hayasaka, 1996), fueron los que se presentaron de manera prevalente en todas las variedades resistentes que se evaluaron, incluyendo la moderadamente resistente (S). El gen *Pib* también se detectó en las variedades susceptibles y moderadamente susceptibles. Estos resultados concuerdan con los reportados por Imam *et al* (2013), quienes encontraron frecuentemente al gen *Pib* en 31 de 32 accesiones de arroz del Este y Noreste de India. Este gen forma parte de una familia pequeña de genes que confiere al arroz alta resistencia contra un amplio rango de aislamientos de *P. oryzae*, por lo que es muy utilizado en varios programas de mejoramiento genético (Constanzo y Jia, 2010; Nadarajah *et al.*, 2010).

De acuerdo con lo reportado en la literatura, el gen de resistencia *Pik* tiene los alelos *Pik*, *Pikm*, *Pikh*, *Pikp*, *Piks* y *Pi1*; cuatro de los cuales, incluyendo *Pik* y *Pikm*, evaluados en la presente investigación, requieren de un par de genes más a fin de disparar los mecanismos de defensa contra *P. oryzae* (***Pik***: *Pik-1* y *Pik-2*; ***Pikm***: *Pikm-1* y *Pikm-2*). Se señala que la proteína codificada por uno de esos genes de resistencia es la que reconocerá al producto del gen de *Avr* correspondiente, mientras que la otra proteína de resistencia será la encargada de transferir las señales que disparan los mecanismos de defensa del arroz (Liu *et al.*, 2014).

Adicionalmente, en cuatro de las seis variedades resistentes (MA98, MA2010, ChA05 y A) se detectaron los genes *Pita* y *Pita2*. Estos genes se localizan cerca del centrómero del cromosoma 12 y están estrechamente relacionados entre sí (Wang *et al.*, 2002), aunque se reporta que el gen *Pita2* tiene un espectro de resistencia más amplio (Rybka *et al.*, 1997; Bryan *et al.*, 2000; Imam *et al.*, 2013), pero no es claro si la resistencia implica solo uno de ellos o la acción de los dos (Jia *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2015). La resistencia conferida por estos genes es eficaz y, al igual que el gen *Pib*, se utilizan comúnmente en los programas de mejoramiento del arroz (Jia *et al.*, 2003).

La resistencia y moderada resistencia que se reporta en las variedades INIRT, INIR, MA98, MA2019, ChA05, A; y S, respectivamente (Hernández *et al.*, 2015), podría explicarse porque poseen el gen *Pib*. Además, en estas variedades, a excepción de INIRT, INIR y S, el pobre o absoluto desarrollo y reproducción de *P. oryzae* también podría ser limitado porque poseen *Pita* y *Pita2*, pero no por *Pik* porque aunque lo presentan no es funcional debido a que carecen de los genes *Pik-1* y *Pik-2*. Es posible también que en la variedad S, *Pikm-1* y *Pikm-2* estén involucrados en su moderada resistencia (Liu *et al.*, 2014). Un factor muy importante que debe señalarse es que por ahora se desconoce si en esta resistencia realmente participan *Pib*, *Pita* y *Pita2*, ya que los aislamientos o razas de *P. oryzae* que se localizan en los cultivos de arroz en México pueden o no poseer el correspondiente gen de avirulencia.

La moderada y alta susceptibilidad en las variedades MA92 y CrA80, y en CmA80 y MF, respectivamente, posiblemente se deba a que el gen *Pib* dejó de ser funcional porque hubo una mutación en el correspondiente gen de avirulencia, hasta ahora no detectado (Liu, *et al.*, 2014), lo cual también pudo haber ocurrido para los genes *Pita* y *Pita2* en la variedad MA92. Sin embargo, es claro que debe determinarse si los aislamientos o razas del patógeno que se encuentran en México tienen los respectivos genes de avirulencia. Si las razas poseen estos genes, entonces debe comprobarse si todos ellos (resistencia y avirulencia) son dominantes y se expresan. La ausencia de algunos de los genes o su estado recesivo implicaría el desarrollo de la enfermedad en la planta, que es lo que se observa en los terrenos cultivados con Milagro Filipino.

La identificación de nuevos genes de resistencia y avirulencia en las diferentes regiones productoras de arroz, juega un papel fundamental en los programas de mejoramiento y en el planteamiento de estrategias para el manejo de *P. oryzae* (Huang *et al.*, 2014), por lo que estos programas deben basarse en el estudio y entendimiento de la diversidad genética del patógeno y de la planta hospedante (Higuera, 2015).

VI. CONCLUSIONES

1. Es posible que la resistencia a *P. oryzae* en las variedades INIFLAR RT, INIFLAR R, Morelos A-98, Morelos A-2010, Choca A-05 y Aztecas esté dada por el gen *Pib*, y por *Pita* y *Pita2* en las últimas cuatro variedades.
2. La resistencia moderada de El Silverio podría explicarse por la presencia de *Pib*, *Pikm-1* y *Pikm-2*.
3. La variedad Morelos A-92 es moderadamente susceptible a *P. oryzae* probablemente porque los aislamientos en las regiones productoras de México no son portadores de los genes de avirulencia *Pib*, *Pita* ni *Pita2*.
4. La susceptibilidad de las variedades Campeche A-80 y Milagro Filipino podría deberse a la ausencia o mutación del gen de avirulencia *Pib*.
5. Es posible que la susceptibilidad de Campeche A-80 se deba a que los aislamientos de *P. oryzae* en México no poseen los genes de avirulencia correspondientes para *Pikm-1* ni *Pikm-2*.

VII. INVESTIGACIÓN FUTURA

Los resultados que se presentan en esta investigación deben complementarse con el aislamiento y caracterización de los genes de avirulencia que se presentan en los aislamientos de *Pyricularia oryzae* en las regiones productoras de arroz en México.

Las variedades mexicanas de arroz que se evaluaron deben inocularse con aislamientos del hongo que sean portadores de los genes de avirulencia correspondientes a los genes de resistencia que aquí se detectaron, y con los aislamientos de *P. oryzae* que se obtengan de las regiones arroceras del país.

Los datos que se generen, no solo nos permitirán determinar la funcionalidad de los genes de resistencia y la posible mutación de los genes de avirulencia, sino también detectar la existencia de razas del hongo y/o la presencia de otros genes de resistencia.

VIII. LITERATURA CITADA

- Acebo G., Y., A. Hernández R., N. Rives R., M. Velázquez V., y A. Hernández L. 2011. Perspectivas del uso de bacterias rizosféricas en el control de *Pyricularia grisea* (Cooke Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista Colombiana de Biotecnología 13(1): 16-22.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5° Ed. Elsevier-Academic Press, San Diego, CA. 922 p.
- Agrios, G. N. 2013. Fitopatología. 2° Edición. Ed. Limusa. 838 p.
- Akator, S. K., D.K. Adjata, S. Drissa, S. Awande, L. Zadji, G. Sangare, Y. Sere and Y. M. D. Gumedzone. 2014. Pathological studies of *Pyricularia oryzae* at M'be in Coted'ivoire and oudeme in Benin. Asian Journal of Plant Pathology 8(1): 10-17.
- Ba, V. V. and S. Sangchote. 2006. Seed borne and transmission of *Bipolaris oryzae*, the causal pathogen of brown spot of rice. Kasetsart Journal: Natural Science 40: 353-360.
- Ballini, E., J. B. Morel, G. Droc, A. Price, B. Courtois, J. L. Notteghem and D. Tharreau. 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. Molecular Plant-Microbe Interaction 21: 859-868.
- Bryan, G. T., K. S. Wu, L. Farrall, Y. Jia, H. P. Hershey, S. A. McAdams, K. N. Faulk, G. K. Donaldson, R. Tarchini and B. Valent. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. Plant Cell 12: 2033-2046.

- Cho, Y. C., S. W. Kwon, I. S. Choi, S. K. Lee, J. S. Jeon, M. K. Oh, J. H. Roh, H. G. Hwang, S. J. Yang and Y. G. Kim. 2007. Identification of major blast resistance genes in Korean rice varieties (*Oryza sativa* L.) using molecular markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 10: 265-276.
- Chuwa, C. J., R. B. Mabagala and M. S. O. Reuben. 2015. Assessment of grain yield losses caused by rice blast disease in major rice growing areas in Tanzania. *International Journal of Science and Research* 4(10): 2211-2218.
- Cintas, N. A. and R. K. Webster. 2001. Effects of rice straw management on *Sclerotium oryzae* inoculum, stem rot severity, and yield of rice in California. *Plant Diseases* 85: 1140-1144.
- Costanzo, S. and Y. Jia. 2010. Sequence variation at the rice blast resistance gene *Pi-km* locus: implications for the development of allele specific markers. *Plant Science* 178: 523-530.
- Cother, E. and H. Nicol. 1999. Susceptibility of Australian rice cultivars to the stem rot fungus *Sclerotium oryzae*. *Australasian Plant Pathology* 28(1): 85-91.
- Coyne, D. L., J. M. Nicol and B. Claudius-Cole. 2007. *Practical plant nematology: a field and laboratory guide*. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Cotonou, Benin. 82 p.
- Dallagnol, L. J., F. A. Rodrigues, S. C. V. Martins, P. C. Cavatte and F. M. DaMatta. 2011. Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australasian Plant Pathology* 40: 360-365.
- Danty L. J. 2013. Mercado del arroz: crecimiento en el mundo y cambios productivos en Chile. ODEPA. http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/138211656712609.pdf (consulta, enero 2016).

- Dean, R. A., N. J. Talbot, D. J. Ebbole, M. L. Farman, T. K. Mitchell, M. J. Orbach, M. Thon, R. Kulkarni, J. Xu, H. Pan, N. D. Read, Y. Lee, I. Carbone, D. Brown, Y. Y. Oh, N. Donofrio, J. S. Jeong, D. M. Soanes, S. Djonovic, E. Kolomiets, C. Rehmeyer, W. Li, M. Harding, S. Kim, M. Lebrun, H. Bohnert, S. Coughlan, J. Butler, S. Calvo, L. Ma, R. Nicol, S. Purcell, C. Nusbaum, J. E. Galagan and B. W. Birren. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434 (7036): 980-986.
- Deka, A. K. and A. K Phookan. 1992. Some common weed hosts of *Sarocladium oryzae* in Assam. India. IRRI. 25 p.
- Devescovi, G., J. Bigirimana, G. Degrassi, L. Cabrio, J. J. Li Puma, J. Kim, I. Hwang and V. Venturi. 2007. Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and Environmental Microbiology* 73(15): 4950-4958.
- Díaz F. A., A. Méndez R. y R. Garza C. 2007. Tizón foliar del pasto buffel: su presencia en Tamaulipas, México. *Agricultura técnica en México* 33(3): 285-295.
- Escuer M. y A. Bello. 2000. Nematodos del género *Aphelenchoides* de interés fitopatológico y su distribución en España. *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas* 26: 47-63.
- Flor H. H. 1971. Current status of gene-for-gene concept. *Annual Review Phytopathology* 9: 275-96.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2015a. Seguimiento del mercado del arroz, Abril de 2015.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Rice/Images/RMM/SMA_APR15.pdf (consulta, mayo 2015).

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2015b. Seguimiento del mercado del arroz, Diciembre de 2015.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Rice/Images/RMM/SMA_DEC15.pdf (consulta, enero 2016).
- Franquet B. J., y C. Borrás P. 2004. Variedades y mejora del arroz (*Oryza sativa* L.) 1° Ed. Universidad Internacional de Cataluña. España. 463 p.
- Gao, L. and H. Innan. 2008. Nonindependent domestication of the two rice subspecies, *Oryza sativa* ssp. *indica* and ssp. *japonica*, demonstrated by multilocus microsatellites. *Genetics* 179: 965-976.
- Garcés F. F., T. Díaz C., y A. Aguirre C. 2012. Severidad de la quemazón (*Pyricularia oryzae* Cav.) En germoplasma de arroz F1 en la zona central del litoral ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología* 5(2): 1-6.
- Garris, A. J., T. H. Tai, J. Coburn, S. Kresovich and S. McCouch. 2005. Genetics structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169: 1631-1638.
- González, A. D., M. A. Franco, I. Galindo-Castro, N. Contreras, Y. Jayaro and E. Graterol. 2015. First report of *Pantoea agglomerans* causing rice leaf blight in Venezuela. *The American Phytopathological Society* 99(4): 552.
- Guevara Y. y A. Maselli. 1999. El Tizón bacteriano del arroz en Venezuela. *Agronomía Tropical* 49(4): 505-516.
- Guzmán H. T., S. Hernández V., I. Varela B., J. Durán M., y W. Montero C. 2011. Nematodos fitoparásitos asociados al arroz en las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 22(1): 21-28.

- Hall T. A. 1999. BioEdit: a userfriendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 4: 95-98.
- Ham, J. H., R. A. Melanson and M. C. Rush. 2011. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice?. Molecular Plant Pathology 12(4): 32-339.
- Hayasaka, H. 1996. RFLP mapping of a rice blast resistance gene *Pi-k*. Breeding Science 46(2): 68.
- Hayashi, K., H. Yoshida and I. Ashikawa. 2006. Development of PCR-based allele specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. Theoretical and Applied Genetics 113: 251-260.
- Hayashi, K., N. Hashimoto, M. Daigen and I. Ashikawa. 2004. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. Theoretical and Applied Genetics 108: 1212-1220.
- Hernández A. M., E. J. Barrios G., L. Hernández A. y A. Berriozabal O. 2013. Plagas y enfermedades de arroz cultivado en Morelos. INIFAP 70: 40 p.
- Hernández A. L., L. Tavitas F. y P. Alberto C. 2015. Paquetes tecnológicos para el cultivo de arroz en México. INIFAP 87: 85 p.
- Higuera A. O. 2015. Comportamiento de progenitores de arroz (*Oryza sativa*) con potencial de resistencia durable en función de la reacción al añublo (*Magnaporthe oryzae*) bajo condiciones del piedemonte llanero. Tesis de maestría. Universidad de Colombia. 80 p.
- Hoyos C. L. y J. G. Moya. 2010. Nematodos asociados con cultivos de arroz en Huila y Tolima. Agronomía Colombiana 28(3): 577-579.

- Huang, J., W. Si, Q. Deng, P. Li and S. Yang. 2014. Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. BMC Genetics 15(45): 1-10.
- Huang, H., L. Huang, G. Feng, S. Wang, Y. Wang, J. Liu, N. Jiang, W. Yan, L. Xu, P. Sun, Z. Liu, S. Pan, X. Liu, Y. Xiao, E. Liu, L. Dai and G. Wang. 2011. Molecular mapping of the new blast resistance genes *Pi47* and *Pi48* in the durably resistant local rice cultivar Xiangzi 3150. Phytopathology. 101: 620-626.
- Hubert, J., R. B. Mabagala, and D. P. Mamiro. 2015 Efficacy of selected plant extracts against *Pyricularia grisea*, causal agent of rice blast disease. American Journal of Plant Sciences 6: 602-611.
- Imam, J., S. Alam, N. P. Mandal, M. Variar and P. Shukla. 2014. Molecular screening for identification of blast resistance genes in North East and Eastern Indian rice germplasm (*Oryza sativa* L.) with PCR based makers. Euphytica 196(2): 199-211.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436: 793-800.
- International Rice Research Institute (IRRI). 2010. *Magnaporthe grisea*: Rice Blast. <http://www.metapathogen.com>. (consulta, enero 2016).
- Jia, Y., G. T. Bryan, L. Farrall and B. Valent. 2003. Natural variation at the *Pi-ta* rice blast resistance locus. Phytopathology 93(11): 1452-1459.
- Jia, Y., Z. Wang and P. Shing. 2002. Development of dominant rice blast *Pi-ta* resistance gene markers. Crop Science 42: 2145-2149.
- Jia, Y., Z. Wang, R. G. Fjellstrom, K. A. K. Moldenhauer, Md. A. Azam, J. Correll, F. N. Lee, Y. Xia and N. J. Rutger. 2004. Rice *Pi-ta* gene confers resistance to the major

pathotypes of the rice blast fungus in the United States. *Phytopathology* 94: 296-301.

Jiang, Y., Z. Cai, W. Xie, T. Long, H. Yu and Q. Zhang. 2012. Rice functional genomics research: Progress and implications for crop genetic improvement. *Biotechnology Advances* 30(5): 1059-1070.

Jiménez C., J., L. López R., y E. Esqueda V. 2014. Guía para producir arroz en el estado de Tabasco. INIFAP. pp: 36-37.

Jones J. J., R. Ochoa O., C. P. Sherwell, C. Cruz F., R. Knutson, P. Westhoff y S. Brown. 2009. Escenario base del sector agropecuario en México. *Proyecciones 2009-2018*. SAGARPA. 60 p.

Kang, M. J., J. K. Shim, M. S. Cho, Y. J., Seol, J. H. Hahn, D. J. Hwang, and D. S. Park. 2008. Specific detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in infected rice plant by use of PCR assay targeting a membrane fusion protein gene. *Journal Microbiology Biotechnology* 18(9): 1492-1495.

Khush, G. S. and K. K. Jena. 2009. Current status and future prospects for research on blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). In: *Advances in genetics, genomics and control of rice blast*. Springer Science. Netherlands. pp: 1-10.

Kihoro, J., N. J. Bosco, H. Murage, E. Ateka and D. Makihara. 2013. Investigating the impact of rice blast disease on the livelihood of the local farmers in greater Mwea region of Kenya. *Springer Plus*. 2: 308.

Kumar, S. M., P. Singh, R. P. Singh and C. Mohapatra. 2013. Association analysis for yield and quality attributes in Indica rice and screening of hybrids against blast disease (*Magnaporthe grisea* Barr.). *Journal of Plant Sciences* 8(2): 45-56.

- Lei, C., K. Hao, Y. Yang, J. Ma, S. Wang, J. Wang, Z. Cheng, S. Zhao, X. Zhang, X. Guo, C. Wang and J. Wan. 2013. Identification and fine mapping of two balst resistance genes in rice cultivar 93-11. *The Crop Journal* 1: 2-14.
- Lim, J. Y., T. H. Lee, B. H. Nahm, Y. D. Choi, M. Kim and I. Hwang. 2009. Complete genome sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. *Journal of Bacteriology* 191(11): 3758-3759.
- Liu, J., X. Wang, T. Mitchell, Y. Hu, X. Liu, L. Dai and G. L. Wang. 2010. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction *Molecular Plant Pathology* 11: 419-427.
- Liu, W., J. Liu, L. Triplett, J. E. Leach and G. L. Wang. 2014. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 52: 213-241.
- Londo, J. P., Y. C. Chiang, K. H. Hung, T. Y. Chiang and B. A. Schaal. 2006. Phylogeography of Asia wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 9578-9583.
- Lu, J. J. and T. T. Chang. 1980. Rice in its temporal and spatial perspectives. In: *Rice: production and utilization*. Luh, B.S., ED. Westport, Connecticut. USA. Pp: 1-74.
- Maheshwar, P. K., S. Ahmed Moharram and G. R. Janardhana. 2009. Detection of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* in paddy (*Oryza sativa* L.) using Polymerase Chain Reaction (PCR). *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 134-138.
- McCouch, S. R., R. J. Nelson, J. Tohme and R. S. Zeigler. 1994. Mapping of blast resistance genes in rice. In: Zeigler R. S., S. A. Leong and P. S. Teng. Eds. *Rice blast disease*. CAB International, Wallingford. Pp: 167-186.

- Medina A., R. Crozzoli, G. Perichi y D. Jáuregui. 2011. *Meloidogyne salasi* (Nematoda: Meloidogynidae) en arroz en Venezuela. *Fitopatología Venezolana* 24 (2): 46-53.
- Meneses C. R., A. Gutiérrez Y., A. García R., G. Antigua P., J. Gómez S., F. Correa V. y L. Calvert. 2001. Guía para el trabajo de campo en el manejo integrado de plagas del arroz. 4 Edición. FLAR. 71 p.
- Miah, G., M. Rafii, M. Ismail, A. Puteh, H. Rahim, R. Asfaliza and M. Latif. 2013. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches. *Molecular Biology Reports* 40(3): 2369-2388.
- Muñoz V. M. 2014. Arroz: baja la producción mundial. ODEPA. http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1415734833Arroz2014.pdf. (consulta, junio 2015).
- Nadarajah, K., A. Md. Samahah and R. Wickneswari. 2010. Isolation and characterisation of *O. rufipogon* *Pib* gene. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 4(2): 469-481.
- Nandakumar, R., M. C. Rush and F. Correa. 2007 Association of *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* with panicle blight symptoms on rice in Panama. *Plant Disease St Paul* 91(6): 767.
- Oka, H. I. 1988. Origin of cultivated rice. Japan Science. Societies. Press, Tokyo. 254 p.
- Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. 2nd. Edition. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 330 p.
- Padovani, L., E. Capri, C. Padovani, E. Puglisi and M. Trevisan. 2006. Monitoring triciclazole residues in rice paddy watersheds. *Chemosphere* 62(2): 303-314.

- Pincirolì, M., M. C. Cordo, R. Bezus, A. A. Vidal and M. Delucis. 2006. Development of rice blast under two nitrogen availability conditions. *Summa Phytopathologica* 32 (3): 280-282.
- Prabhu, A. S., M. C. Filippi, G. B. Silva, V. L. Silva-Lobo and O. P. Morais. 2009. An unprecedented outbreak of rice blast on a newly released cultivar BRS Colosso in Brazil. In: *Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease*. Springer Science, Netherlands. pp: 257-266.
- Reveles T. L. R., R. Velásquez V. y J. A. Mauricio C. 2014. Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos. *INIFAP* 56: 41 p.
- Rodríguez H. y A. Nass H. 1991. Las Enfermedades del arroz y su control. *Fonaiap Divulga* 35: 1-25.
- Roumen, E. C. 1992. Partial resistance to neck blast influenced by stage of panicle development and rice genotype. *Euphytica* 64: 173-182.
- Rybka, K., M. Miyamoto, I. Ando, A. Saito and S. Kawasaki. 1997. High resolution mapping of the *Indica*-derived rice blast resistance genes II. *Pi-ta2* and *Pi-ta* and a consideration of their origin. *Molecular Plant Microbe Interaction* 10: 517-524.
- Sah, D. N. and M. C. Rush. 1988. Physiological races of *Cercospora oryzae* in the Southern United States. *Plant Disease* 72: 262-264.
- Salazar L. y M. Quesada. 1999. Nuevo hallazgo relacionado con la distribución geográfica de *Meloidogyne salasi* en arroz y nuevos hospederos. *Agronomía Mesoamericana* 10(2): 103-105.
- Sancho C. y L. Salazar. 1985. Nematodos parásitos del arroz (*Oriza sativa* L.) en el sureste de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 9(2): 161-163.

- Sesma, A. and A. E. Osbourn. 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature* 431: 582-586.
- Sharma, T. R., A. K. Rai, S. K. Gupta, J. Vijayan, B. N. Devanna and S. Ray. 2012. Rice blast management through host-plant resistance: retrospect and prospects. *Agricultural Research* 1(1): 37-52.
- Shew, A. M., L. L. Nalley, D. M. Danforth, B. L. Dixon, R. M. Nayga Jr., A. C. Delwaide and B. Valent. 2015. Are all GMO's the same? Consumer acceptance of cisgenic rice in India. *Plant Biotechnology Journal* 14: 4-7.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) 2014. Cierre de la producción agrícola por estado. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (consulta diciembre 2015).
- Skamnioti, P. and S. J. Gurr. 2009. Against the grain, safeguarding rice from rice blast disease. *Trends Biotechnology* 27: 141-150.
- Soriano I. J. 2006. Determinación de la incidencia de bacterias patógenas en semillas de arroz, (categorías básica, registrada y certificada) y evaluación de alternativas químicas para su control. Tesis de Maestría. Universidad de Panamá Vicerrectora de Investigación y Posgrado. Panamá. 84 p.
- Suh, J. P., J. H. Roh, Y. C. Cho, S. S. Han, Y. G. Kim and K. K. Jena. 2009. The *Pi40* gene for durable resistance to rice blast and molecular analysis of *Pi40*-advanced backcross breeding lines. *Phytopathology* 99: 243-250.
- Takahashi, Y. 1965. Studies on the mechanism of the resistance of rice plant to *Pyricularia oryzae*, in: *The Rice Blast Diseases*, John Hopkins Press, Baltimore, MA. pp: 303-329.

- Tanweer, F. A., M. Y. Rafii, K. Sijamc, H. A. Rahimd, F. Ahmeda and M. A. Latif. 2015. Current advance methods for the identification of blast resistance genes in rice. *Comptes Rendus Biologies* 338(5): 321-334.
- TeBeest, D. O., C. Guerber and M. Dittmore. 2007. Rice blast. *The Plant Health Instructor*. American Physical Society. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/RiceBlast.aspx> (consulta, Diciembre 2015).
- Trang, T. T. D., T. T. Duc, N. C. Tien, T. T. T. Ha and T. T. B. Phuong. 2012. Identification of *Pi-km* stable blast resistance gene in some rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Annals of Biological Research* 3(1): 322-329.
- Tyagi, A., J. Khurana, P. Khurana, S. Raghuvanshi, A. Gaur, A. Kapur, V. Gupta, V. Kumard, R. Shubha, P. Khurana and S. Sharma. 2004. Structural and functional analysis of rice genome. *Journal of Genetics* 83(1): 79-99.
- Upadhyay, V., N. R. Bhardwaj and P. K. Neelam-Sajeesh. 2014. *Meloidogyne graminicola* (Golden and Birchfield): Threat to Rice Production. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences* 2(3): 31-36.
- Valent, B. 1990. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology* 80: 33-36.
- Vaughan, D. A., H. Morishimay and K. Kadowaki. 2003. Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 139-146.
- Wang, C., K. Hirano and S. Kawasaki. 2002. Cloning of *Pita-2* in the centromeric region of chr 12 with HEGS: high efficiency genome scanning. Third International Rice Blast Conference. 25 p.

- Wang, G., D. J. Mackill, J. M. Bonman, S. R. McCouch, M. C. Champoux and R. J. Nelson. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in durably resistant rice cultivar. *Genetics* 136: 1421-1434.
- Wang, J. C., J. C. Correll and Y. Jia. 2015. Characterization of rice blast resistance genes in rice germplasm with monogenic lines and pathogenicity assays. *Crop Protection*. 72: 132-138.
- Wang, J. C., Y. Jia, J. W. Wen, W. P. Liu, X. M. Liu, L. Li, Z. Y. Jiang, J. H. Zhang, X. L. Guo and J. P. Ren. 2013. Identification of rice blast resistance genes using international monogenic differentials. *Crop Protection* 45: 109-116.
- Wang, M., S. Van Bergen and B. Van Duijn. 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology* 124(2): 523-530.
- Wilson, R. A. and N. J. Talbot. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology* 7(3): 185-195.
- Xiao, W. M., Q. Y. Yang, H. Wang, T. Guo, Y. Z. Liu, X. Y. Zhu and Z. Q. Chen. 2011. Identification and fine mapping of a resistance gene to *Magnaporthe oryzae* in a space-induced rice mutant. *Molecular Breeding* 28: 303-312.
- Xu, Y., S. McCouch and Q. Zhang. 2005. How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome?. *Plant Molecular Biology* 59: 7-26.
- Yang, J. Y., S. Chen, L. X. Zeng Y. L. Li, Z. Chen, C.Y. Li, X. Y. Zhu. 2008. Race specificity of major rice blast resistance genes to *Magnaporthe grisea* isolates collected from indica rice in Guangdong. *China Rice Science* 15(4): 311-318.

- Yamasaki, Y. and S. Kiyosawa. 1966. Studies on inheritance of resistance of rice varieties to blast. Inheritance of resistance of Japanese varieties to several strains of the fungus. Bulletin of the National Institute of Agricultural Science D14. pp: 39-69.
- Yang, Q., F. Lin, S. Feng, L. Wang and Q. Pan. 2009. Recent progress on molecular mapping and cloning of blast resistance genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientia Agricultura Sinica* 42: 1601-1615.
- Yokoo, M., F. Kikuchi, H. Fujimaki, and K. Nagai. 1978. Breeding of blast resistance lines (BL1 to 7) from *indica japonica* crosses of rice. *Japanese Journal Breeding* 28: 359-385.
- Zhai, C., F. Lin, Z. Dong, X. He, B. Yuan, X. Zeng, L. Wang and Q. Pan. 2011. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication. *New Phytologist* 189: 321-334.
- Zhu, B., M. Lou, Y. Huai, G. Xie, J. Luo, and L. Xu. 2008. Isolation and identification of *Burkholderia glumae* from symptomless rice seeds. *Rice Science* 15(2): 145-149.