UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS GENÉTICO DE LA RESISTENCIA PARCIAL A *MAGNAPORTHE ORYZAE* EN ARROZ (*ORYZA SATIVA*) EN VARIAS POBLACIONES Y AMBIENTES

MEMORIA PRESENTADA POR

JORGE PÉREZ LOTZ

PARA OPTAR AL GRADO DE

DOCTOR INGENIERO AGRÓNOMO

DIRECTORES

Mª PAU BRETÓ MONFORT
RAMÓN CARRERES ORTELLS

DICIEMBRE DE 2015

A María Teresa

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a realizar esta tesis doctoral. En primer lugar, especialmente a mis directores, Pau Bretó Monfort y Ramón Carreres Ortells. Muchas gracias por todo el tiempo y los esfuerzos invertidos en dirigir y corregir esta tesis; os agradezco mucho vuestra ayuda, vuestros consejos y todo lo aprendido durante estos años. Me llevo grandes lecciones, tanto profesionales como personales.

También quisiera agradecer a mi tutor, Jaime Cebolla Cornejo, de la Universidad Politécnica de Valencia, el asesoramiento y apoyo en el desarrollo esta tesis. Muchas gracias, igualmente, a los investigadores Manuel Aguilar Portero del IFAPA, José María Osca Lluch de la Universidad Politécnica de Valencia, Didier Tharreau del CIRAD y a María del Mar Català Forner del IRTA por su colaboración en el proyecto Genblast, parte de cuyos datos se han utilizado para un apartado de esta tesis.

Así mismo, agradezco especialmente a mis compañeros del laboratorio de Genética del Departamento del Arroz del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Amparo, Isabel, Oscar y André la gran ayuda que me han brindado en la realización de este trabajo y a Álvaro, Ruth y a los trabajadores de campo por la ayuda en los ensayos en campo. Mi agradecimiento se extiende también al resto de trabajadores del Departamento, Mari, Teresa y Toni por su agradable compañía y las conversaciones interesantes en los momentos de descanso.

Finalmente, mis agradecimientos a mis padres por el apoyo incondicional que me han prestado en mis estudios y, especialmente, a mi mujer, María Teresa, por los ánimos, la comprensión y la paciencia que ha mostrado y, simplemente, por estar a mi lado con su alegría y su ayuda.

A todos ellos y a todas las personas que se me han olvidado:

Muchas gracias

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L) is the main staple food for over 3 billion people (almost half the world population), and rice blast, caused by the fungus *Magnaporthe oryzae*, is the major threat for this crop worldwide, triggering also important losses in Spain some years. Some resistant cultivars have been released, mainly with complete resistance genes (*Pi* genes), but their resistance has not lasted long, due to the emergence of new virulent isolates. Therefore, the efforts for obtaining effective and durable resistance are focused nowadays on the use of partial resistance or a combination of partial and complete resistance. Partial resistance is a quantitative character, controlled by numerous genes of small effects (QTLs), that can interact among them, and usually also strongly with the environment. For a better knowledge of the population of *M. oryzae* in the Albufera region, and of the resistance genes and QTLs that might be effective in various Spanish rice growing regions, we tested along four years 31 differential varieties (isogenic lines carrying one different *Pi* gene each); these studies showed that fungus population can significantly change from one year to the other. On the other hand, we analyzed the genetics of resistance to *M. oryzae* in two populations derived from crosses between local and well adapted, although moderately susceptible, varieties (Sivert, JSendra), and allegedly resistant but poorly adapted varieties (CNA-6159, Gigante Vercelli). In F3 lines of both populations, the leaf and panicle susceptibility was determined in field trials under conditions that favour the infection: SixCNA lines were tested in a plot in the Albufera region, and those of JSxGV in four locations of Valencia, the Ebro River Delta, and Seville; inoculations in controlled conditions were also carried out in the second population. We compare the different methodologies for assessing susceptibility, and we discuss the environmental influence on it. 22 QTLs were detected in SIxCNA, and 61 in JSxGV, most of them in only one location. All four parents displayed partial resistance QTLs; but some QTLs showed small additive effects and, often, high dominance. At the same time, most of these QTLs exhibit significant interactions with other QTLs; and many of them co-localize with QTLs found in other studies. We have discovered substantial coincidences between QTLs that control incidence in panicle and those that determine leaf severity, thus supporting the hypothesis that there are common defence mechanisms in both organs. Chromosomal regions of interest for marker assisted breeding of resistant genotypes have been identified.

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es la principal fuente de alimentación para más de 3.000 millones de personas, casi la mitad de la población mundial, y la "piriculariosis", causada por el hongo *Magnaporthe oryzae* Couch, es la enfermedad que más pérdidas causa en este cultivo a escala mundial; también en España ha causado pérdidas importantes algunos años. Se han obtenido diversas variedades resistentes, principalmente al incorporar genes de resistencia completa (genes *Pi*), pero la mayoría se han vuelto susceptibles en pocos años al aparecer nuevos aislados más virulentos. Actualmente, para conseguir una resistencia efectiva y duradera, se busca incorporar resistencia parcial, o una combinación de ambos tipos de resistencia. La resistencia parcial es un carácter cuantitativo, controlado por numerosos genes de efecto pequeño (o QTLs), que pueden interaccionar entre ellos y que, con frecuencia, también lo hacen intensamente con el ambiente. Para conocer mejor la población del patógeno presente en la zona de la Albufera, y qué genes y QTLs de resistencia pueden ser efectivos en ésta y otras zonas arroceras de España, por un lado se ensayaron durante varios años 31 variedades diferenciales (líneas con un gen *Pi* diferente cada una); esto demostró que la estructura de la población del hongo puede variar significativamente con los años. Por otro lado, realizamos estudios genéticos sobre la resistencia a *M. oryzae* en dos poblaciones, procedentes del cruzamiento entre variedades locales, bien adaptadas pero moderadamente susceptibles (Sivert y JSendra) y variedades resistentes, pero no adaptadas (CNA-6159 y Gigante Vercelli). En líneas F3 de ambas poblaciones se determinó la resistencia en campo, en condiciones favorables para el ataque del hongo, en hojas y órganos productivos: en SixCNA, en una parcela de la Albufera, y en JSxGV, en 4 localidades de Valencia, el Delta del Ebro y Sevilla; en JSxGV, además, se realizaron inoculaciones en condiciones controladas. Se comparan los diferentes sistemas de medida de la susceptibilidad, y se discute la influencia ambiental en ella. Se detectaron 22 QTLs en SixCNA, y 61 QTLs en JSxGV, la mayoría de los cuales sólo se expresan en una localidad. Todos los parentales aportan alelos de resistencia; pero la mayoría de los QTLs identificados son de efectos pequeños y, a menudo, con un notable componente dominante. Al mismo tiempo, gran parte de estos QTLs presentan interacciones significativas con otros QTLs; y muchos de ellos co-localizan con QTLs identificados en otros estudios. Hemos encontrado bastantes coincidencias entre QTLs que controlan la incidencia en panículas y los que determinan la severidad en las hojas, apoyando la hipótesis de que existen mecanismos de defensa comunes en ambos órganos. Se han localizado regiones cromosómicas de interés que podrían ser utilizadas para la selección de genotipos resistentes.

RESUM

L'arròs (*Oryza sativa* L.) és la principal font d'alimentació per a més de 3.000 millions de persones, quasi la meitat de la població mundial, i la "piriculariosi", causada pel fong *Magnaporthe oryzae* Couch, és la malaltia que més pèrdues origina en aquest conreu a escala mundial; també a Espanya ha causat pèrdues importants alguns anys. S'han obtès diverses varietats resistents, principalment en incorporar gens de resistència completa (gens *Pi*), però la majoria s'han tornat susceptibles en pocs anys en aparèixer nous aïllats més virulents. Actualment, per aconseguir una resistència efectiva i duradora, es cerca incorporar resistència parcial, o una combinació de tots dos tipus de resistència. La resistència parcial és un caràcter quantitatiu, controlat per nombrosos gens d'efecte reduït (o QTLs), els quals poden interaccionar entre sí i que, sovint, també ho fan intensament amb l'ambient. Per conéixer millor la població del patògen present a la zona de l'Albufera, i quins gens i QTLs de resistència poden ser efectius a aquesta i a d'altres zones arrosseres d'Espanya, per una banda s'assajaren durant diversos anys 31 varietats diferencials (línies amb un gen *Pi* diferent cadascuna); això demostrà que l'estructura de la població del fong pot variejar significativament amb els anys. Per altra banda, realitzàrem estudis genètics sobre la resistència a *M. oryzae* en dues poblacions, procedents del encreuament entre varietats locals, adaptades però moderadament susceptibles (Sivert i JSendra) i varietats resistents però no adaptades (CNA-6159 i Gigante Vercelli). En línies F3 d'ambdues poblacions es determinà la resistència en camp, en condicions favorables per a l'atac del fong, en fulles i òrgans productius: en SixCNA, en una parcel·la de l'Albufera, i en JSxGV en quatre localitats de València, el Delta de l'Ebre i Sevilla; en JSxGV, a més a més, es realitzaren inoculacions en condicions controlades. Es comparen els diversos sistemes de mesura de la susceptibilidad, i es discuteix la influència ambiental en aquesta. Es detectaren 22 QTLs en SixCNA i 61 QTLs en JSxGV, la major part dels quals solament s'expressen a una localitat. Tots els parentals aporten al·lels de resistència; però alguns dels QTLs identificats són d'efectes reduïts i, freqüentment, amb un notable component dominant. Paral·lelament, gran part d'aquestos QTLs presenten interaccions significatives amb altres QTLs; i molts d'aquestos co-localitzen amb QTLs identificats en altres estudis. Hem trobat bastants coincidències entre QTLs que controlen la incidència en panícules i els que determinen la severitat a les fulles, recolzant la hipòtesi que existeixen mecanismes de defensa comuns en ambdós òrgans. S'han localitzat regions cromosòmiques d'interès que podrien ser emprades per a la selecció de genotipus resistents.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....1

1.1. IMPORTANCIA Y CULTIVO DEL ARROZ.....3

1.1.1. Origen e historia del arroz.....3

1.1.2. Distribución geográfica y ecosistemas del arroz 5

1.1.3. Producción, consumo y mercado mundial 6

1.1.4. Producción en Europa y España 10

1.1.5. Importancia ecológica del cultivo del arroz 13

1.2. EL ARROZ COMO ESPECIE MODELO PARA ESTUDIOS GENÉTICOS 14

1.3. INFLUENCIA DE LA INVESTIGACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ARROZ (REVOLUCIÓN VERDE) .16

1.4. LA PLANTA DE ARROZ.....17

1.4.1. Técnicas de cultivo.....20

1.4.2. Enemigos del cultivo del arroz.....21

1.5. LA ENFERMEDAD CAUSADA POR *MAGNAPORTHE ORYZAE* 24

1.5.1. Daños causados por Magnaporthe oryzae 24

1.5.2. Síntomas 25

1.5.3. Biología de Magnaporthe oryzae 29

1.5.4. Ciclo de vida de Magnaporthe oryzae 30

1.5.5. Lucha contra Magnaporthe oryzae 34

1.5.6. Estructura y distribución de la población mundial de Magnaporthe oryzae 35

1.6. RESISTENCIA A *MAGNAPORTHE ORYZAE* EN ARROZ 37

1.6.1. La resistencia a enfermedades en las plantas.....37

1.6.1.1. Bases moleculares del sistema inmunológico de la planta 38

1.6.1.2. Resistencia completa y genes R 42

1.6.1.3. Mecanismos moleculares de la resistencia parcial.....42

1.6.2. Genética de la resistencia a Magnaporthe oryzae en arroz.....43

1.6.2.1. Genes de resistencia a *Magnaporthe oryzae*.....44

1.6.2.2 Durabilidad de la resistencia a *Magnaporthe oryzae* 47

1.6.2.3. Resistencia parcial a *Magnaporthe oryzae* 48

1.6.3. Variedades diferenciales.....50

1.7. ESTUDIO DE LOS CARACTERES CUANTITATIVOS.....52

1.7.1. La mejora y la genética cuantitativa 52

1.7.2. El estudio de QTLs.....55

1.7.3. Métodos de análisis de QTLs.....57

1.7.3.1. Poblaciones segregantes 58

1.7.3.2. Genotipado y construcción de un mapa de ligamiento 59

1.7.3.3. Evaluación fenotípica. El caso de la resistencia parcial a *Magnaporthe oryzae* 63
1.7.3.4. Análisis estadístico 64

2 OBJETIVOS 67

3 MATERIALES Y MÉTODOS 71

3.1. MATERIAL VEGETAL 73
3.2. EVALUACIÓN FENOTÍPICA 77
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS FENOTÍPICOS 80
3.4. GENOTIPADO DE LAS POBLACIONES F2 81
3.5. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO DE LOS MARCADORES 82
3.6. DETECCIÓN DE QTLS 83

4 RESULTADOS 85

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE *MAGNAPORTHE ORYZAE* CON VARIEDADES DIFERENCIALES 87
4.2. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN LA POBLACIÓN SIXCNA 93
4.2.1. Evaluación de la resistencia en la población SixCNA 93
4.2.2. Mapeo de QTLs en la población SixCNA 94
4.2.2.1. Segregación de los marcadores y mapa de ligamiento 94
4.2.2.2. QTLs de resistencia 96
4.3. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN LA POBLACIÓN JSXGV 99
4.3.1. Evaluación de la resistencia en la población JSxGV 99
4.3.2. Correlación entre caracteres en la población JSxGV 104
4.3.3. Mapeo de QTLs en la población JSxGV 106
4.3.3.1. Segregación de los marcadores y mapa de ligamiento 106
4.3.3.2. QTLs de resistencia 106

5 DISCUSIÓN 117

5.1. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A *MAGNAPORTHE ORYZAE* 119
5.1.1. Medida de la resistencia por inoculación. 120
5.1.2. Medida de la resistencia en campo. 121
5.1.3. Relevancia del ambiente en la evaluación de la resistencia. 125
5.2. ENSAYOS CON VARIEDADES DIFERENCIALES: ESPECTRO DE VIRULENCIA DE LA POBLACIÓN DE *MAGNAPORTHE ORYZAE* 127
5.2.1. Validez de la colección IRBL 127
5.2.2. Composición y estabilidad de la población de Magnaporthe oryzae en el arrozal valenciano. 129
5.2.3. Genes Pi potencialmente útiles para mejorar la resistencia de las variedades cultivadas en España. 131

5.3. DETECCIÓN DE QTLS DE RESISTENCIA A *MAGNAPORTHE ORYZAE* 132
5.3.1. Mapas de ligamiento.....*132*
5.3.2. Resultados generales del análisis de QTLs de resistencia *146*
5.3.4. Regiones cromosómicas importantes para la resistencia a Magnaporthe oryzae *153*

6 CONCLUSIONES.....165

7 BIBLIOGRAFÍA 171

8 ANEXOS 219

ANEXO I: ESCALA ADOPTADA EN EL PRIMER SIMPOSIO SOBRE PIRICULARIOSIS EN EL IRRI EN 1963 (OU, 1965) 221
ANEXO II: INTERACCIONES ADITIVAS SIGNIFICATIVAS ENTRE QTLS DE SEVERIDAD (SH) Y DE INCIDENCIA EN PANÍCULA (INC) EN EL CRUZAMIENTO SIXCNA 227
ANEXO III: INTERACCIONES ADITIVAS SIGNIFICATIVAS ENTRE QTLS DE SEVERIDAD (SH) Y DE INCIDENCIA EN PANÍCULA (PAN) EN JSXGV 245
ANEXO IV: RESULTADOS DEL ENSAYO DE INOCULACIÓN EN LA POBLACIÓN F3 DEL CRUZAMIENTO JSXGV Y EN LOS PARENTALES 275
277
ANEXO V: QTLS DEL ÁREA FOLIAR AFECTADA EN LA POBLACIÓN JSXGV: DESGLOSE POR AISLADO, Y PROMEDIOS 279

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS ECOSISTEMAS DEL ARROZ MAYORITARIOS EN EL MUNDO. 5
FIGURA 2. TIPOS DE GRANO DE LA CLASIFICACIÓN COMERCIAL DE VARIEDADES EN LA UNIÓN EUROPEA. 9
FIGURA 3. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE ARROZ E INTERVENCIONES TECNOLÓGICAS CLAVES ENTRE 1960 Y 2007.....16
FIGURA 4. PARTES DEL TALLO DE LA PLANTA DE ARROZ. 18
FIGURA 5. PARTES DE LA PANÍCULA. 19
FIGURA 6. PARTES DE LA FLOR.....19
FIGURA 7. CICLO DE ARROZAL VALENCIANO... 20
FIGURA 8. COMPARACIÓN ENTRE PLANTA DE ARROZ AFECTADA POR *M. ORYZAE*.. 24
FIGURA 9. DAÑOS PROVOCADOS POR *M. ORYZAE* EN CAMPO.. 25
FIGURA 10. LESIONES TÍPICAS DE *M.ORYZAE* EN HOJA.. 26
FIGURA 11. DAÑOS DE M. ORYZAE EN NUDO.. 27
FIGURA 12. ATAQUE DE *M. ORYZAE* EN PANÍCULA.....28
FIGURA 13. PANÍCULA DOBLADA POR ATAQUE SEVERO DE *M. ORYZAE* EN CUELLO DE PANÍCULA. 29
FIGURA 14. CONIDIAS DE *M. ORYZAE*... 30
FIGURA 15. CICLO DE VIDA DEL HONGO *M. ORYZAE*. 31
FIGURA 16. PENETRACIÓN DE *M. ORYZAE*.. 32
FIGURA 17. FASES DE LA INFECCIÓN DE *M. ORYZAE*.. 32
FIGURA 18. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA POBLACIÓN SIXCNA.....75
FIGURA 19. ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL EN LA POBLACIÓN JSXGV.. 76
FIGURA 20. ENSAYOS EN CAMPO DE RESISTENCIA A *M .ORYZAE* DE LAS VDS Y LAS LÍNEAS F3.. 78
FIGURA 21. EJEMPLO DEL ANÁLISIS DE MARCADORES SSR EN GEL DE POLIACRILAMIDA.. 83
FIGURA 22. RESPUESTA DE LAS VARIEDADES DIFERENCIALES EN 2006... 89
FIGURA 23. RESPUESTA DE LAS VARIEDADES DIFERENCIALES EN 2009.. 89
FIGURA 24. RESPUESTA DE LAS VARIEDADES DIFERENCIALES EN 2010.. 90
FIGURA 25. RESPUESTA DE LAS VARIEDADES DIFERENCIALES EN 2011... 90
FIGURA 26. ANÁLISIS DE CLUSTERS DE LOS GENES PI DE LA COLECCIÓN INTERNACIONAL DE VDS, ENSAYADOS EN EL PALMAR DURANTE LOS AÑOS 2006, 2009, 2010 Y 2011. 91
FIGURA 27. DISTRIBUCIÓN DE LA SEVERIDAD EN HOJA Y DE LA INCIDENCIA EN PANÍCULAS Y NUDOS EN LAS LÍNEAS F3 DE LA POBLACIÓN SIXCNA.. 94
FIGURA 28. MAPA DE LIGAMIENTO Y QTLS DE RESISTENCIA A *M. ORYZAE* EN LA POBLACIÓN PROCEDENTE DEL CRUZAMIENTO SIVERT X CNA.....95
FIGURA 29. DISTRIBUCIÓN DEL NÚMERO DE LESIONES EN HOJA DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN CON EL AISLADO TH12 DE *M. ORYZAE* EN LA POBLACIÓN F2 DEL CRUZAMIENTO JS X GV. 100
FIGURA 30. DISTRIBUCIONES DE LAS MEDIAS DE LOS PORCENTAJES DE ÁREAS FOLIARES AFECTADAS DESPUÉS DE LAS INOCULACIONES DE 6 AISLADOS DE M. ORYZAE EN LA POBLACIÓN F3 DEL CRUZAMIENTO JS X GV.....101

FIGURA 31. DISTRIBUCIÓN DE LA SEVERIDAD EN HOJA (MEDIA DEL PORCENTAJE DE SUPERFICIE AFECTADA) EN LAS LÍNEAS F3 DEL CRUZAMIENTO JSXGV.. 102
FIGURA 32. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO MÁXIMO DE MANCHA EN LAS LÍNEAS F3 DEL CRUZAMIENTO JSXGV MEDIDA, EN EL PALMAR Y EN SUECA. 103
FIGURA 33. DISTRIBUCIÓN DE LA INCIDENCIA EN PANÍCULA (PORCENTAJE DE PANÍCULAS AFECTADAS) EN LAS LÍNEAS F3 DEL CRUZAMIENTO JSXGV. 104
FIGURA 34. MAPA DE LIGAMIENTO Y QTLS DE RESISTENCIA A *M. ORYZAE* EN LA POBLACIÓN PROCEDENTE DEL CRUZAMIENTO JSENDRA X GIGANTE VERCELLI.. 108
FIGURA 35. PARCELA DE ENSAYO DE RESISTENCIA A *M. ORYZAE* EN EL PALMAR. PUEDEN VERSE LOS ASPERSORES EN EL CENTRO, Y LA BARRERA DE CAÑAS AL FONDO. 127
FIGURA 36. ALINEACIÓN DE LOS MAPAS DE LIGAMIENTO DE LAS POBLACIONES SIXCNA Y JSXGV. 134

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MAYORES PRODUCTORES Y CONSUMIDORES DE ARROZ. 7
TABLA 2. CONSUMO DE ARROZ Y APORTE ENERGÉTICO EN LOS PAÍSES DE MAYOR CONSUMO. 7
TABLA 3. PRINCIPALES PAÍSES EXPORTADORES DE ARROZ. 8
TABLA 4. PRINCIPALES IMPORTADORES DE ARROZ. 8
TABLA 5. CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN COMERCIAL DEL ARROZ ELABORADO EN LA UNIÓN EUROPEA. ... 8
TABLA 6. PRODUCCIÓN, SUPERFICIE Y RENDIMIENTO DE ARROZ CÁSCARA. DATOS DE LOS 10 MÁXIMOS PRODUCTORES EUROPEOS EN EL AÑO 2012. 10
TABLA 7. SUPERFICIE Y PRODUCCIÓN DE ARROZ EN ESPAÑA DESDE 1990. 11
TABLA 8. PRODUCCIÓN, SUPERFICIE Y RENDIMIENTO DE ARROZ CÁSCARA EN ESPAÑA EN 2014. 12
TABLA 9. PRINCIPALES MALAS HIERBAS DE LOS ARROZALES. 22
TABLA 10. SUMARIO DE LOS GENES PI CLONADOS. 46
TABLA 11. GENES R DE RESISTENCIA PARCIAL CARTOGRAFIADOS. 49
TABLA 12. VARIEDADES DIFERENCIALES UTILIZADAS EN LOS ENSAYOS Y GENES DE RESISTENCIA QUE POSEEN. 77
TABLA 13. ESCALA DARP-UDL-IRTA. 80
TABLA 14. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS DE RESISTENCIA DE LAS VDS. 88
TABLA 15. COMPARACIÓN DE LAS SUSCEPTIBILIDADES A *M. ORYZAE* EN HOJA, PANÍCULA Y NUDOS DE LAS VDS EN LOS DISTINTOS AÑOS DEL ENSAYO.. 92
TABLA 16. SUSCEPTIBILIDAD EN EL CRUZAMIENTO SIXCNA, EN LOS PARENTALES Y EN EL CONTROL BAIXET. 93
TABLA 17. INTERVALOS CROMOSÓMICOS ASOCIADOS CON QTLS DE RESISTENCIA A *M. ORYZAE* EN SIXCNA. 96
TABLA 18. SUSCEPTIBILIDAD EN EL CRUZAMIENTO JSXGV, EN LOS PARENTALES (JS: JSENDRA; GV: GIGANTEVERCELLI), Y EN EL CONTROL BAIXET. 99
TABLA 19. COEFICIENTES DE CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS DE RESISTENCIA DE LA POBLACIÓN JSXGV. 105
TABLA 20. INTERVALOS CROMOSÓMICOS ASOCIADOS CON QTLS DE RESISTENCIA A *M. ORYZAE* EN EL CRUZAMIENTO JSXGV. 109
TABLA 21. INTERVALOS CROMOSÓMICOS ASOCIADOS CON QTLS DE ÁREA FOLIAR AFECTADA (AFA) POR DIFERENTES AISLADOS DE *M. ORYZAE* EN EL CRUZAMIENTO JSXGV. 112

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ANOVA: Análisis de la varianza.

Avr: Gen de avirulencia.

BOE: Boletín Oficial del Estado.

BYDV: Virus del enanismo amarillo de la cebada.

cADN: ADN complementario (o copia).

CEE: Comunidad Económica Europea.

CGIAR: Grupo Consultivo para la Investigación Internacional en Agricultura.

CIM: Mapeo por intervalos compuesto.

CIRAD: Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agraria para el Desarrollo.

DH: Doble haploide.

DOGV: Diario Oficial de la Generalitat Valenciana.

EST: Marcador de secuencia expresada.

ETI: Inmunidad desencadenada por efectores.

ETS: Susceptibilidad desencadenada por efectores.

F1: Primera generación procedente de un cruzamiento.

F2, F3 (Fn, en general): Generación procedente de la autofecundación de la generación (n-1).

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FAOSTAT: Información estadística de la Organización para la FAO.

HR: Respuesta hipersensible.

IM: Mapeo por intervalos.

ICIS: Sistema de información internacional del cultivo del CGIAR.

IRD: Instituto de Investigación para el Desarrollo de Francia.

IRGSP: Proyecto internacional de secuenciación del genoma del arroz.

IRRI: Instituto Internacional de Investigación del Arroz, Filipinas.

IRTA: Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias de Cataluña.

ISR: Resistencia sistémica inducida.

IVIA: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias.

LOD: Probabilidad relativa (es el logaritmo de LR).

LR: Relación de probabilidad.

LRR: Repeticiones de bloques de aminoácidos ricos en leucina.

MAS: Selección asistida por marcadores.

MIM: Mapeo por intervalos múltiple.

NBS: Zona de unión de nucleótidos.

NCBI: Centro Nacional para Información Biotecnológica de EEUU.

NIL: Línea cuasi isogénica.

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Pi: Gen de resistencia completa a Magnaporthe oryzae.

PR: Proteínas asociadas a la patogénesis.

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones.

PTI: Inmunidad desencadenada por PAMPs.

QTL: Locus que influye en un carácter cuantitativo.

R (gen): Gen de resistencia completa.

RGA: Análogo a genes de resistencia

REDB: Base de datos de EST de arroz.

RPDS: ADN polimórfico amplificado al azar.

RIL: Línea recombinante.

RLP: Proteínas similares a receptores.

RM: Microsatélite de arroz.

ROI: Intermediarios reactivos de oxígeno.

SAR: Resistencia sistémica adquirida.

SMA: Análisis marcador a marcador

SIM: Mapeo por intervalos simple.

SNP: Polimorfismo de nucleótido único.

SSR: Repetición de una secuencia simple (o ADN microsatélite).

VD: Variedad diferencial.

1 INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia y cultivo del arroz

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una planta monocotiledónea de la tribu de las *Oryzeas* de la familia de las Poaceae, dentro del orden de las *Poales* (Strasburger y *col.*, 2004). El género *Oryza* comprende más de 20 especies, de las cuales sólo dos tienen interés agrícola: *O. sativa* L., de origen asiático y que se cultiva en todo el mundo, y *O. glaberina* de origen africano (Delta del Níger), continente al que actualmente se restringe su cultivo.

El arroz desempeña un papel clave en el abastecimiento mundial de alimentos y en la estabilidad socioeconómica mundial. Es el alimento más importante para la mayoría de países en vías de desarrollo: por una parte porque es la base de la alimentación de más de 3.000 millones de personas (Cantrell y Reeves, 2002), casi la mitad de la población mundial; por otra, porque su cultivo es la principal actividad y fuente de ingresos de alrededor de 100 millones de hogares de Asia y África. El arroz aporta más del 50% de las calorías ingeridas diariamente para aproximadamente 520 millones de personas en Asia (http://irri.org/about-rice/rice-facts/rice-basics). Por ello, el precio del arroz es importante y su aumento, como cuando se triplicó en pocos meses en el año 2008, se convierte en noticia de portada en todo el mundo.

1.1.1. Origen e historia del arroz

La especie *Oryza sativa* L. se domesticó hace aproximadamente 10.000 años, a partir de su ancestro silvestre *O. rufipogon,* en zonas tropicales y subtropicales asiáticas, probablemente en China, en el valle del río Yangtsé (Vaughan *y col.*, 2008; Molina *y col.*, 2011). De allí se fue expandiendo su cultivo a otras partes del mundo. Excavaciones en la India, en el valle del Ganges, sitúan los primeros cultivos de arroz en esa zona alrededor de 4.000 años a. C. Posteriormente se fue extendiendo desde China a Tailandia, Corea, Japón, Indonesia, Sri Lanka y el resto del sureste asiático. Bajo el Imperio Persa se extendió hasta Mesopotamia, Siria y Turquestán. Los griegos lo conocieron gracias a las conquistas de Alejandro Magno en Asia. A la Península Ibérica lo trajeron muy probablemente los árabes en el siglo VII (Luján, 1997), quienes también lo introdujeron en Sicilia. A finales del siglo XV llegó a Italia y Francia. Posteriormente, los colonizadores españoles y portugueses lo llevaron a América.

A pesar de los avances en genética y arqueología, sigue existiendo debate sobre el proceso de domesticación del arroz (Sang y Ge, 2007a, b). Una de las hipótesis, basada en las diferencias genéticas entre las subespecies, es que las subespecies *japonica* e *indica* se domesticaron de forma separada y, a partir de ellas, se diferenciaron las demás subespecies (Cheng *y col.*, 2003; Londo *y col.*, 2006; Rakshit *y col.*, 2007; Tang *y col.*, 2006; Caicedo *y col.*, 2007; Zhu y Ge, 2005; Fuller *y col.*, 2010; Xu *y col.*, 2011). Otros autores, basándose en la conservación de las secuencias génicas en los genes de caracteres claves para la domesticación, como la indehiscencia (Li *y col.*, 2006a) o el porte erecto (Tan *y col.*, 2008), proponen un único origen de domesticación y que la diferenciación en las distintas subespecies se produjo posteriormente (Oka y Morishima, 1982; Gao e Innan, 2008; Molina *y col.,* 2011).

O. sativa incluye unas 120.000 variedades descritas, de las que unas 83.000 se pueden encontrar en el banco de germoplasma del IRRI Tradicionalmente, se han distinguido tres subespecies, diferenciadas según las características morfológicas de la planta: *indica, japonica templado* y *japonica tropical*. Los grupos *japonica templado* e *indica* son los más importantes y engloban a la mayoría de las variedades cultivadas (Faure y Mazaud, 1995). Sin embargo, los análisis con marcadores moleculares realizados desde los años 80 para aclarar una clasificación en entredicho (Glaszmann, 1987; Wang y Tanksley, 1989; Zhang *y col*., 1992; Blair *y col*., 1999; y Garris *y col*., 2005) han dado lugar a la clasificación actualmente más aceptada en 5 subespecies: *japonica templada*, *japonica tropical*, *indica*, *aus* y *aromatica*. Sin embargo, muchas de las variedades modernas proceden de cruzamientos entre diferentes subespecies o, incluso de introducciones de germoplasma silvestre, dando lugar a tipos intermedios. Por ello, la diferenciación en tipos va diluyéndose.

La subespecie *japonica templado* se cultiva normalmente en zonas templadas del este y en áreas elevadas del sudeste asiático, y ha sido introducida en muchas otras zonas del mundo, entre ellas en los países mediterráneos. Prácticamente todas las variedades de arroz que se cultivan en Europa son de esta subespecie. Sus granos tienen formas variadas, aunque los redondos, cortos o semilargos son los mayoritarios. Tiene una talla media-baja, con un ciclo vital corto y una tendencia al ahijamiento medio; sus hojas son cortas o medias, relativamente erectas y de color verde intenso y sus panículas son más bien compactas, no desgranan con facilidad y tiene ausencia de dormancia seminal. La variabilidad morfológica de este grupo es amplia.

La subespecie *japonica tropical* (denominado anteriormente *javanica*) se cultiva principalmente en Java y otras islas de Indonesia, y en África occidental, pero también en algunas regiones de Brasil. Tiene un grano medio, la planta es de talla media-alta y las hojas son más anchas que las de *japonica templado*. Los arroces *japonica tropical* y *templado* son genéticamente muy similares y estudios genéticos realizados por Garris *y col*., (2005) parecen respaldar la hipótesis de que los *templados* provienen de los *tropicales*.

La subespecie *indica* es originaria de las regiones húmedas de Asia tropical y subtropical (como India, Tailandia, etc.). La mayoría de sus variedades se caracterizan por sus granos largos. La talla de la planta es alta, produce muchos hijuelos, sus panículas son largas y generalmente poco compactas, y sus hojas suelen ser largas, inclinadas y de color verde pálido. Su respuesta a las dosis elevadas de abonado es muy baja. La expansión de este tipo de arroces se ve frenada por su baja adaptación a algunos suelos y por su sensibilidad a las bajas temperaturas.

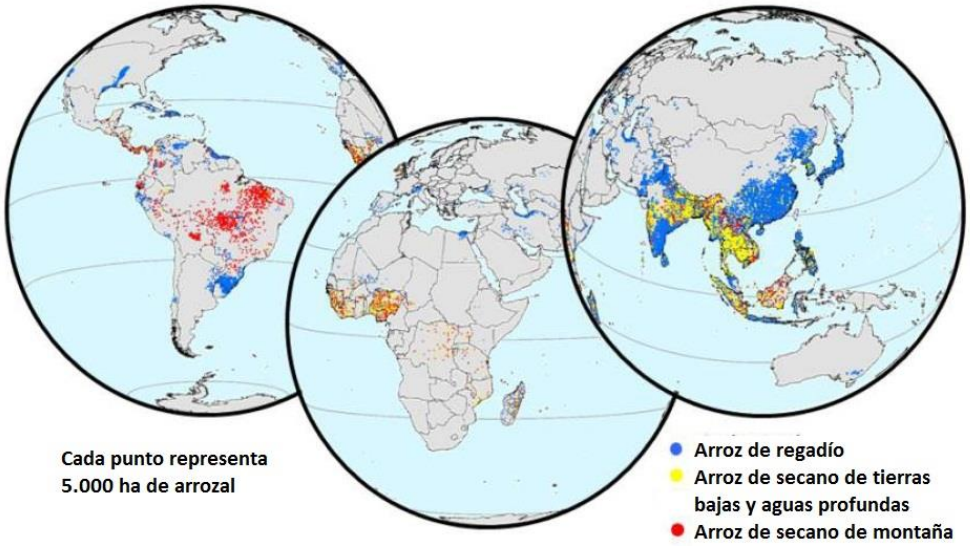
Los arroces de la subespecie *aromática* muestran una relación genética cercana a los *japonica*. Los más cultivados son los de tipo “jasmine” de Tailandia y los de tipo “basmati” de India y Pakistán. *Aus* es un grupo menor de poca distribución geográfica y se considera un subgrupo de *indica*: se cultiva durante la temporada de verano en Bangladesh y las características positivas de sus variedades son su precocidad y resistencia a la sequía.

1.1.2. Distribución geográfica y ecosistemas del arroz

Si bien se trata de una planta de origen tropical, el arroz se encuentra plenamente adaptado a otras regiones. Se cultiva en 113 países, en una superficie total de unos 160 millones de hectáreas y en un amplio abanico de condiciones edáficas. La producción de arroz se extiende desde los 53ºN en la provincia de Heilongjiang en la República Popular de China, a los 35ºS en el estado de Nueva Gales del Sur en Australia; desde el clima tropical de la República Democrática del Congo, hasta el clima continental templado de Krasnodar (Rusia); y desde regiones a nivel del mar, hasta una altura de 2.700 m en las cadenas montañosas del Himalaya (Nepal).Generalmente, el arroz se cultiva como una planta anual, aunque en áreas tropicales puede sobrevivir como planta perenne y puede ahijar durante 20 años. Hay básicamente cuatro ecosistemas en los que se cultiva arroz:

- Arroz de regadío: representa el 56% del área de cultivo (unos 80 millones de hectáreas) y el 75% de la producción global. Siempre que las temperaturas y la disponibilidad de agua lo permitan, se pueden realizar dos (o incluso tres) ciclos al año. Suelen ser cultivos de alto rendimiento, con utilización de grandes cantidades de abono nitrogenado. Los factores que pueden limitar la producción en estas regiones son la mala gestión de los recursos, pérdidas por malas hierbas, plagas, enfermedades y accidentes, manejo inadecuado del suelo, deficiente nivelación del suelo y cultivo en suelos con agua de calidad inadecuada. Todo el arroz cultivado en Europa, Norte América y Oceanía, y más del 50% del cultivado en Asia, se produce en regadío (Figura 1).

Figura 1. Distribución de los ecosistemas del arroz mayoritarios en el mundo. (http://irri.org/about-rice/rice-facts/rice-production-and-processing)



- Arroz de secano de tierras bajas: el agua necesaria para el cultivo proviene de la lluvia o de la escorrentía. En este sistema se construyen diques que almacenan el agua de lluvia cerca de los campos. Estos arrozales se caracterizan por la falta de control del agua, por lo que las inundaciones y las sequías pueden suponer problemas. Hay unos 60 millones de hectáreas de arroz de secano de tierras bajas que constituyen aproximadamente un 20% de la producción mundial. Este sistema se puede encontrar en el sur y sudeste asiáticos y en África (Figura 1). Los rendimientos suelen ser escasos debido al clima adverso, la mala calidad de los suelos y la falta de tecnología moderna apropiada.
- Arroz de secano de montaña: al igual que el anterior, el aporte de agua depende de la lluvia. Ocupa unos 14 millones de hectáreas (el 13% del arroz cultivado en Asia y más del 50% en África y Sudamérica, Figura 1), y contribuye el 4% de la producción mundial. En este sistema se encuentran desde zonas con pequeñas colinas, hasta zonas montañosas con elevada pendiente y escorrentía; algunas de ellas tienen riesgo de sequía frecuente. Se suele dar en cultivos mixtos, frecuentemente con maíz. Las limitaciones más severas de la producción son las malas hierbas y las enfermedades de hoja, como la piriculariosis.
- Arroz de aguas profundas: este ecosistema se compone de planicies de inundación y deltas de ríos como el Irrawaddy de Myanmar, el Mekong de Vietnam y Camboya, el Chao Phraya de Tailandia, el Delta del Ganges en Bangladesh y el Níger de África occidental; ocupa unos 11 millones de hectáreas. Se requieren variedades adaptadas a un ecosistema caracterizado por profundidades de agua de 1-3 m de media (pudiendo superar los 5 m), salinidad en las áreas costeras, y suelos problemáticos (alcalinos o sulfatados ácidos): se siembran variedades altas, con entrenudos largos y que pueden flotar al subir el nivel del agua por inundaciones. En estas condiciones, los rendimientos son bajos y muy variables.

1.1.3. Producción, consumo y mercado mundial

La superficie dedicada al cultivo del arroz en el mundo es de 165 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2013), aproximadamente el 10% de las tierras en cultivo. La producción mundial de arroz se ha ido incrementando en las últimas décadas y llegó a 741 millones de toneladas en 2013 (últimos datos definitivos). La FAO prevé un incremento anual de producción de alrededor del 3%. Los máximos productores de arroz, que aportan casi la mitad de la producción mundial, son China, con 203 millones de toneladas, e India, con 159 millones de toneladas (Tabla 1). Nueve de los diez máximos productores son países asiáticos, de modo que el 90% de la producción mundial procede de Asia.

El consumo *per cápita* sobrepasa los 100Kg anuales (Zeigler y Barclay, 2008) en muchos países asiáticos. En 1999, el arroz aportó entre 680 y 2.049 Kcal/persona y día a más de tres mil millones de personas en 26 países. En Bangladesh, Camboya, Myanmar y Vietnam llega a proporcionar del 65 al 71% del aporte calórico diario (FAO, 2006). La Tabla 2 muestra los 10 mayores consumidores per cápita.

Tabla 1. Mayores productores y consumidores de arroz. Producción de arroz cáscara (paddy) y consumo de arroz descascarillado en los 10 máximos productores en el año 2013 (fuente: FAOSTAT).

País	Producción arroz cáscara (toneladas)	Superficie (ha)	Rendimiento (Kg/ha)	Consumo arroz descascarillado (toneladas)
China	203.612.200	30.311.750	6.717	108.321.000
India	159.200.000	43.940.000	3.623	87.006.000
Indonesia	71.279.700	13.835.250	5.152	33.637.000
Bangladesh	51.500.000	11.770.000	4.376	26.892.000
Vietnam	44.039.300	7.902.800	5.573	13.253.000
Tailandia	36.062.600	12.373.200	2.915	7.677.000
Myanmar	28.767.000	7.500.000	3.836	7.073.000
Filipinas	18.439.400	4.746.100	3.885	11.752.000
Brasil	11.782.500	2.872.040	4.102	6.437.000
Japón	10.758.000	1.599.000	6.728	5.517.000
Mundo	*741.000.000*	*165.163.400*	*4.486*	*370.313.000*

Tabla 2. Consumo de arroz y aporte energético en los países de mayor consumo. Datos de 2013 (FAOSTAT).

País	Consumo (kg/cápita y año)	Aporte energético (kcal/cápita y día)
Bangladesh	172	1.711
RDP Laos	162	1.436
Camboya	159	1.520
Vietnam	145	1.390
Indonesia	134	1.328
Myanmar	133	1.234
Filipinas	119	1.174
Tailandia	115	1.139
Sri Lanka	108	1.062
Madagascar	103	1.040

Se pueden distinguir tres grandes modelos de consumo de arroz (Carreres, 2003):

- Modelo asiático, con un consumo medio superior a los 80Kg/habitante y año (China, 90Kg; Indonesia, 230Kg; Myanmar, más de 300Kg).
- Modelo subtropical, con un consumo medio de entre 30 y 60Kg/habitante y año (Colombia, 40Kg; Brasil, 45Kg; Costa de Marfil, 60Kg).

- Modelo occidental, con un consumo medio inferior a 15Kg/habitante y año (Francia, 4Kg; España, 7Kg; EEUU, 9Kg; Portugal, 14Kg).

Más del 80% del arroz mundial se produce y consume por pequeños agricultores. A causa de ello, el mercado internacional del arroz representa apenas el 7% de la producción mundial (40 millones de toneladas en 2012 [FAOSTAT]). Cuatro países (Tailandia, Vietnam, Pakistán y Estados Unidos) acaparan más de la mitad de las exportaciones de arroz (Tabla 3). La importación de arroz está mucho más fragmentada y existen amplias variaciones anuales respecto a las compras de los diferentes países (Tabla 4).

Tabla 3. Principales países exportadores de arroz. Datos de 2012 (FAOSTAT).

País	Exportación (toneladas de arroz blanqueado)	Porcentaje
Vietnam	8.015.000	20,1
Tailandia	6.794.000	17,1
Pakistán	3.423.000	8,6
Estados Unidos	3.247.000	8,2
Brasil	1.099.000	2,8
India	1.047.000	2,6

Tabla 4. Principales importadores de arroz. Datos de 2012 (FAOSTAT).

País	Importación (toneladas de arroz blanqueado)	Porcentaje
China	2.334.000	6,2
Nigeria	2.296.000	6,1
Indonesia	1.802.000	4,8
Costa de Marfil	1.686.000	4,5
Irak	1.384.000	3,7
Sudáfrica	1.294.000	3,4
Arabia Saudita	1.217.000	3,2

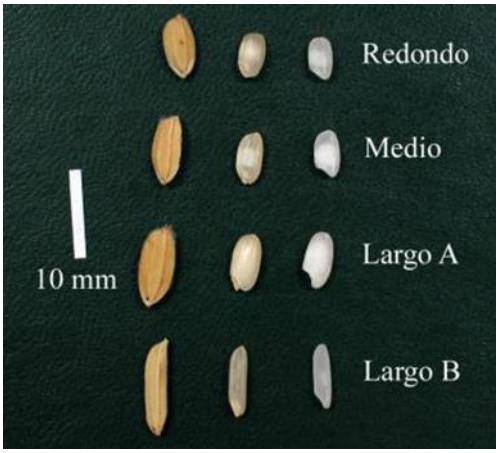
A diferencia de otros productos básicos, el mercado internacional del arroz se encuentra segmentado en un gran número de calidades. Independientemente de la clasificación botánica, comercialmente se conoce como arroz de “perfil indica” a todas aquellas variedades cuyos granos tienen aspecto largo y delgado. Aparte de la mayoría de variedades de la subespecie *indica*, este perfil engloba algunas variedades de la subespecie *japonica templado* (Faure y Mazaud, 1995). Todas las variedades cultivadas como tipo “indica” en España son *japonica* desde el punto de vista botánico. El “perfil japonica” engloba las variedades con granos más cortos y gruesos. Las normativas que rigen en los diferentes mercados clasifican los arroces en diversos tipos, según la longitud y la forma (relación longitud/anchura) de los granos elaborados. La legislación de la Unión Europea (Reglamento CEE nº 1785/2003) considera cuatro tipos de granos: largo A, largo B, medio y redondo (Tabla 5 y Figura 2).

Tabla 5. Criterios para la clasificación comercial del arroz elaborado en la Unión Europea.

Tipo de grano	Redondo	Medio	Largo A	Largo B
Longitud (mm)	≤ 5,2	5,2 < L ≤ 6,0	> 6,0	> 6,0
Longitud/anchura	< 2,0	< 3,0	2,0 < L/a ≤ 3,0	≥ 3,0

Para muchas culturas, el arroz forma parte integral de la tradición culinaria. Muchos países tienen platos típicos de arroz, como el sushi, el arroz frito, el curry, la paella, el risotto y los frijoles con arroz. Por ello, diferentes culturas tienen diferentes preferencias en cuanto a tamaño, forma, sabor, textura, color y viscosidad del arroz, y esto influye en las variedades que se cultivan en cada zona. Por ejemplo, en EEUU, Canadá, el norte de Europa y Oriente Medio, se prefieren los arroces de grano largo, blanco, cristalino, firme y suelto una vez cocido; mientras que en los países europeos del sur (España, Grecia e Italia), se prefiere el grano redondo o medio (Briz *y col.*, 1997), perlado, menos firme una vez cocido, pero que absorbe en mayor grado el condimento del agua de cocción.

Figura 2. Tipos de grano de la clasificación comercial de variedades en la Unión Europea. Izquierda, arroz cáscara; centro, integral o descascarillado; y derecha, elaborado.



El mercado mundial de arroz demanda seis tipos de arroz (Efferson, 1985): grano largo de alta calidad, grano largo de calidad media, grano medio o corto, aromático, sancochado o “parboiled” y glutinoso.

Los arroces de grano largo de calidad alta representan un 25% del mercado mundial y son consumidos preferentemente en el norte de Europa, Norteamérica, las naciones caribeñas y algunos centros urbanos asiáticos, como Hongkong y Singapur, mientras que los de calidad media representan un 45-55% del mercado mundial y se consumen en Sudamérica y el sur y sudeste de Asia. El arroz de grano largo es estrecho y cristalino y cuece suelto, esponjoso y con brillo.

Los arroces de grano medio o corto representan tan sólo el 10% del mercado total. Se cultivan en Japón, Corea, Taiwán, zonas de China, Australia, el Mediterráneo, Brasil y California. Se caracteriza porque sus granos quedan húmedos y tiernos y tienden a pegarse cuando se cuecen, excepto en algunas variedades, como las españolas “Bomba” y “Albufera”. En Europa se consume en los países productores de la cuenca Mediterránea. En España se han obtenido numerosas variedades de grano medio de talla baja y productivas, destacando entre las más recientes “Fonsa”, “Montsianell”, “Gleva”, “JSendra”, “Sivert”, “Sarcet” y “Albufera”, esta última con las características culinarias de “Bomba”.

Los arroces aromáticos representan el 10-15% del mercado mundial. Son un grupo de arroces largos o medios, que se caracterizan por poseer un aroma especial, similar al de “palomitas de maíz” o “nuez tostada”, aunque existen variedades con aromas similares a “chocolate” y “arroz tostado” (Chaudhary y Tran, 2001).

El arroz sancochado o “parboiled” se obtiene mediante un tratamiento hidrotérmico antes de eliminar la cáscara del grano. Esto da lugar a un grano ambarino, vítreo y que queda suelto en la cocción; además, las vitaminas hidrosolubles y los minerales de las capas externas difunden al interior del endospermo y no se eliminan en el proceso de blanqueado. Se desarrolló inicialmente para revalorizar el arroz con mala calidad de molienda, ya que el tratamiento reduce los granos rotos en molinería (Efferson, 1985). Conocido también como arroz "brillante", este arroz resiste más la sobrecocción y, después de cocido, se conserva íntegro sin pegarse, pero absorbe mal los sabores del condimento y su textura es gomosa. Se consume principalmente en Bangladesh, India, Sri Lanka, Pakistán, muchos países africanos y Arabia Saudita.

El arroz glutinoso se caracteriza porque el almidón del endospermo está compuesto sólo por amilopectina (no hay amilosa). Sus granos son totalmente opacos y tienen un bajo porcentaje de roturas. Tras la cocción, los granos son más pegajosos. El consumo de arroz glutinoso está limitado casi enteramente a los países asiáticos.

1.1.4. Producción en Europa y España

En Europa, la superficie cultivada con arroz es de 648.320 ha y la producción es de 3.895.000 toneladas (Tabla 6). Es decir, el arroz es poco importante si se le compara con otros cereales, o con otras regiones del mundo. Italia es el máximo productor con 1,3 millones de toneladas (Valle del rio Po; en las regiones de Lombardía y Piamonte), y España el tercero con 851.500 toneladas.

Tabla 6. Producción, superficie y rendimiento de arroz cáscara. Datos de los 10 máximos productores europeos en el año 2012 (Fuente: FAOSTAT).

País	Producción (toneladas)	Superficie (ha)	Rendimiento (Kg/ha)
Italia	1.339.000	212.500	6.301
Rusia	935.000	189.000	4.947
España	851.500	113.200	7.522
Grecia	227.000	29.200	7.774
Portugal	168.000	31.200	5.385
Ucrania	145.000	24.200	5.992
Francia	82.000	20.300	4.039
Bulgaria	54.900	10.000	5.490
Rumanía	54.600	11.600	4.707
Macedonia	28.000	4.700	5.957
Europa	*3.895.000*	*648.300*	*6.008*

En España, tanto la superficie cultivada como la producción se han mantenido bastante estables desde 1996 (Tabla 7). En 2014 (últimos datos definitivos) se sembraron 110.419 ha, que produjeron 861.103 toneladas de arroz. Casi dos tercios de la producción española corresponden a arroz de grano largo (Tabla 8)**,** que se destina fundamentalmente a la exportación. El tercio restante es grano corto-medio, que está destinado mayoritariamente al consumo interno. La necesidad de agua ha limitado el cultivo en España, casi por completo, a las proximidades de zonas húmedas. Por ello, los arrozales están muy concentrados en cinco regiones, que se reparten el 97% del total de la superficie (Tabla 8).

Tabla 7. Superficie y producción de arroz en España desde 1990 (Fuente: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente).

Años	**Superficie (miles de hectáreas)**	**Producción (miles de toneladas)**
1990	90.3	569.9
1991	93.7	581.8
1992	85.7	552.6
1993	47.9	317.8
1994	66.3	407.6
1995	54.5	329.5
1996	105.1	734.0
1997	113.6	775.6
1998	112.7	796.3
1999	110.5	817.3
2000	117.0	827.1
2001	115.6	876.1
2002	113.5	818.9
2003	118.2	861.3
2004	121.3	900.4
2005	119.2	824.1
2006	106.5	724.4
2007	101.6	723.4
2008	95.3	634.0
2009	119.2	913.8
2010	122,2	927,8
2011	122,1	921,7
2012	112,6	897,3

La zona de Andalucía se extiende a ambos márgenes del río Guadalquivir, sobre todo en la comarca de las Marismas en Sevilla. Suelen dedicarse 40.000 ha al cultivo del arroz, un tercio del total nacional, pero algunos años las restricciones de riego por sequía y los problemas de salinidad pueden llegar a reducir la superficie cultivada a la mitad. Predominan las explotaciones de 25-30 ha, mucho mayores que en otras zonas, lo que,

junto con las condiciones climáticas bastante favorables, permite altos rendimientos (9.200-9.600 Kg/ha) y unos costes de producción unitarios inferiores a los de otras regiones.

En Extremadura, aproximadamente el 80% de la superficie arrocera (22.000 ha) se localiza en la provincia de Badajoz en la vega del Guadiana, en las proximidades de Don Benito, Medellín y Villanueva de la Serena. En Cáceres se cultivan las restantes 6.000 ha. Los rendimientos medios en las explotaciones extremeñas se sitúan en torno a los 7.300 – 7.900 Kg/ha.

Tabla 8. Producción, superficie y rendimiento de arroz cáscara en España en 2014. Distribución por tipos (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente)

	Producción (toneladas)			**Superficie (ha)**			**Rendimiento (Kg/ha)**	
	Indica	Japonica	Total	Indica	Japonica	Total	Indica	Japonica
Cádiz	19.325	2.823	22.148	2.458	343	2.801	7.862	8.230
Huelva	225	–	225	25	–	25	9.002	–
Sevilla	257.242	87.059	344.301	27.430	9.013	36.443	9.378	9.659
ANDALUCÍA	*276.792*	*89.882*	*366.674*	*29.913*	*9.356*	*39.269*	*9.246*	*9.607*
Badajoz	93.398	73.926	167.323	12.754	9.279	23.649	7.323	7.967
Cáceres	17.541	26.462	44.004	2.463	3.492	5.955	7.122	7.578
EXTREMADURA	*110.939*	*100.388*	*211.327*	*15.217*	*12.711*	*27.988*	*7.290*	*7.861*
Girona	52	5.329	5.380	9	930	939	5.730	5.730
Lleida	–	184	184	–	29	29	-	6.334
Tarragona	17.314	114.327	131.641	2.506	17.412	19.918	6.909	6.566
CATALUÑA	*17.366*	*119.840*	*137.205*	*2.515*	*18.371*	*20.886*	*6.905*	*6.523*
Alicante	–	972	972	–	260	260	–	3.737
Castellón	–	1.173	1.173	–	153	153	–	7.667
Valencia	–	124.396	124.396	–	14.565	14.565	–	8.541
C. VALENCIANA	–	*126.541*	*126.541*	–	*14.978*	*14.978*	–	*8.448*
Huesca	135	23.271	23.406	16	3.872	3.888	8.455	6.010
Teruel	255	208	463	44	50	94	5.800	4.160
Zaragoza	12.896	229	13.125	2.590	42	2.632	4.979	5.452
ARAGÓN	*13.286*	*23.708*	*36.994*	*2.650*	*3.964*	*6.614*	*5.014*	*5.981*
NAVARRA	*85*	*15.562*	*15.562*	*12*	*2.208*	*2.220*	*7.083*	*7.048*
R. DE MURCIA	–	*2.001*	*2.001*	-	*427*	*427*	–	*4.686*
Albacete	–	930	930	–	143	143	–	6.500
CASTILLA-LA MANCHA		*930*	*930*	–	*143*	*143*	–	*6.500*
BALEARES	–	*93*	*93*	–	*32*	*32*	–	*2.908*
ESPAÑA	**420.469**	**467.850**	**897.318**	**50.734**	**61.823**	**112.557**	**8.288**	**7.713**

El cultivo de arroz en Cataluña se localiza principalmente en la zona del delta del río Ebro, en la que se cultivan unas 20.000 ha con un rendimiento de 6.600-6.900 Kg/ha. En 1991 se reconoció la Denominación de Origen Protegida "*Arroz del Delta del Ebro*" (BOE., Orden de 11 de Diciembre de 1991). Otra zona de producción se encuentra en la desembocadura del río Ter (Girona), en la que se cultivan 900 ha.

En la Comunidad Valenciana se cultivan 15.000 ha de arroz con un rendimiento en torno a los 8.400 Kg/ha. Más del 90% de la superficie cultivada en esta comunidad se

encuentran dentro de los límites del Parque Natural la Albufera, del que supone el 75% de la superficie. Cuatro municipios reúnen el 75% de la superficie arrocera: Sueca, Sollana, Silla y Cullera. También se cultivan 260 ha en la Marjal de Pego-Oliva. En 1997 se reconoció la Denominación de Origen "Arroz de Valencia" (DOGV, 1997. Orden del 11 de Junio de 1997 de la Consellería de agricultura, pesca y alimentación; BOE., Orden de 21 de Septiembre de 2000). Esta Denominación de Origen incluye las variedades Bahía, Senia y Bomba. En los últimos años se ha ampliado a JSendra, Gleva, Montsaniel, Sarcet y Albufera.

La superficie cultivada en Aragón es de unas 6.600 ha, principalmente en Huesca y Zaragoza. Los problemas principales son el abancalamiento del terreno, las bajas temperaturas durante la época de siembra y la microesporogénesis, y la inexistencia de medios para la regulación del agua, por lo que se pueden producir déficits hídricos. El rendimiento obtenido oscila entre 5.000 y 6.000 Kg/ha. Es una de las zonas españolas en las que el cultivo de arroz está en expansión.

Las 2.200 ha de cultivo de arroz en Navarra se agrupan en dos núcleos: por un lado, las proximidades del río Ebro, en municipios como Arguedas, Valtierra, Murillo de las Limas o Tudela; y por otro lado, en los regadíos de Bárdenas, Rada o Catarrosos. Los rendimientos medios que se obtienen se sitúan alrededor de los 7.000 Kg/ha. Las primaveras frías de estas zonas hacen necesario el uso de variedades de ciclo corto, al igual que en el caso de Aragón.

La Denominación de Origen *Calasparra*, la primera D.O. de arroz en España. (BOE, Orden de 19 de Febrero de 1986), engloba las zonas productoras de Calasparra y Moratalla en Murcia, y La vega del Segura y Hellín en Albacete. La superficie cultivada es de unas 400 ha en Murcia y 140 ha en Albacete, con unos rendimientos de unos 4.000 y 6.500 Kg/ha respectivamente.

1.1.5. Importancia ecológica del cultivo del arroz

El cultivo del arroz contribuye a la conservación del medio ambiente, pues mantiene una extensa lámina de agua durante muchos meses que sirve como hábitat para aves y plantas acuáticas, así como para numerosos invertebrados (Carreres, 2003). De hecho, el arrozal es uno de los sistemas más importantes para la conservación de la riqueza biológica de los humedales (Roselló, 2002), por una serie de características que lo definen como un sistema de alta sostenibilidad, según describe Girona (1998) en el caso del Parque Natural de la Albufera:

- Mejora de la fertilidad del suelo: la inundación del arrozal provoca el desarrollo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, que aportan, además, fósforo y materia orgánica.
- Reciclaje de nutrientes mediante la incorporación al suelo de rastrojos y paja, o las cenizas de la paja.
- Actúa como balsa de decantación: oxigena el agua y elimina materia orgánica, impurezas y sólidos disueltos, aportando agua limpia al lago de la Albufera.

- Conservación y regeneración del suelo: el bajo desnivel del arrozal, los restos de cosecha y el alto contenido en materia orgánica hacen que el complejo arcillo-húmico sea estable y evitan la erosión del suelo. La inundación regula la temperatura, aumenta la disponibilidad de nutrientes, permite el desarrollo de algas, hongos y pequeños artrópodos que descomponen los restos de cosecha y lava el suelo de sales. El barbecho durante los meses de invierno favorece la regeneración del suelo.

1.2. El arroz como especie modelo para estudios genéticos

Entre los cereales, el arroz tiene ciertas características que lo convierten en una especie modelo para realizar estudios genéticos en monocotiledóneas. Tiene un genoma corto (aproximadamente 430 Mb) en comparación con otros cereales (sorgo: 800 Mb; maíz: 2.400 Mb y trigo: 16.000 Mb), que incluye un amplio porcentaje (75%) de ADN simple o no repetitivo (McCouch *y col.*, 1998). Estudios comparativos entre genomas de diferentes cereales (Van Deynze *y col.*, 1995a, b; Devos y Gale, 1997) han demostrado que existe una elevada sintenia, es decir, hay grandes bloques de genes homólogos con un orden altamente conservado. La existencia de genes homólogos hace posible la transferencia de la información obtenida en arroz a otras especies de cereales (Sorrells *y col.*, 2003). Una ventaja adicional de la especie es que permite el uso de técnicas de cultivo de tejidos, como son el rescate de embriones para conseguir la viabilidad de cruces difíciles, especialmente interespecíficos, o el cultivo de anteras para estabilizar más rápidamente nuevas líneas; asimismo, el arroz es el cereal más fácilmente transformable (Hiei *y col.*, 1994; Komari *y col.*, 1998). Por otra parte, existe una gran cantidad de entradas en diversos bancos de germoplasma. Cabe destacar el del IRRI, con más de 200.000 entradas, tanto de variedades cultivadas como de especies silvestres, disponibles para programas de estudios genéticos y de mejora. Además, es una especie muy estudiada en aspectos como el rendimiento, el vigor híbrido, o la resistencia genética a enfermedades, entre otros.

Se han desarrollado diversos mapas de ligamiento de alta densidad (con una densidad media de 1 marcador por cM) (Causse *y col.*, 1994; Harushima *y col.*, 1998), que recientemente se han ido completando con abundantes SNPs (single nucleotide polymorphisms), como en el proyecto de comparación del genoma completo de 21 variedades (www.oryzasnp.org) (McNally *y col.*, 2006).

En 1997 se fundó el International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP), un consorcio de laboratorios públicos de 10 países (Japón, EEUU, China, Taiwán, Corea del Sur, India, Tailandia, Francia, Brasil y Reino Unido), con el fin de secuenciar el genoma del arroz con un alto nivel de precisión; y en diciembre de 2004 se concluyó la secuenciación de las subespecies *japonica* e *indica* (Goff *y col.*, 2002, Yu *y col.*, 2002; Burr *y col.*, 2005). La secuencia establece que el genoma del arroz contiene unos 460 millones de pares de bases y entre 40.000 y 60.000 genes; además, aporta la posición de innumerables marcadores de tipo microsatélite (SSR), que junto con los SNPs mencionados anteriormente, pueden proporcionar marcadores en prácticamente cualquier punto del genoma.

Disponer de la secuencia completa del genoma del arroz proporciona un índice completo de los genes, pero no informa sobre sus funciones ni sobre las interacciones entre ellos para dar lugar a un fenotipo concreto, que es el objetivo de la mejora. La meta después de la secuenciación completa del genoma del arroz es asignarles funciones a los genes secuenciados. A continuación se hace un repaso, no exhaustivo, de las numerosas técnicas y herramientas que se están utilizando para ello:

- Colecciones de mutantes de deleción y de inserción para estudios de genética reversa (Jeon *y col.*, 2000; Leung *y col.*, 2001; Hirochika *y col.*, 2004; Ryu *y col.*, 2004; Sallaud *y col.*, 2004;http://orygenesdb.cirad.fr/).
- Avances en genómica funcional y estructural en la planta de arroz (http://rice.plantbiology.msu. edu/) (Yuan y *col.*, 2005).
- Análisis de expresión (transcriptómica) de genes del arroz (Matsumura y *col.*, 1999; Gowda y *col.*, 2004, http://plantgenomics.biology.yale.edu/riceatlas, http://mpss.udel. edu/rice/,). A ello contribuyen unos 32.000 cADNs (Kikuchi y *col.*, 2003) y unos 400.000 EST en arroz.
- Microarrays de oligonucleótidos (www.ricearray. org) y de expresión (Lan y *col.*, 2004).

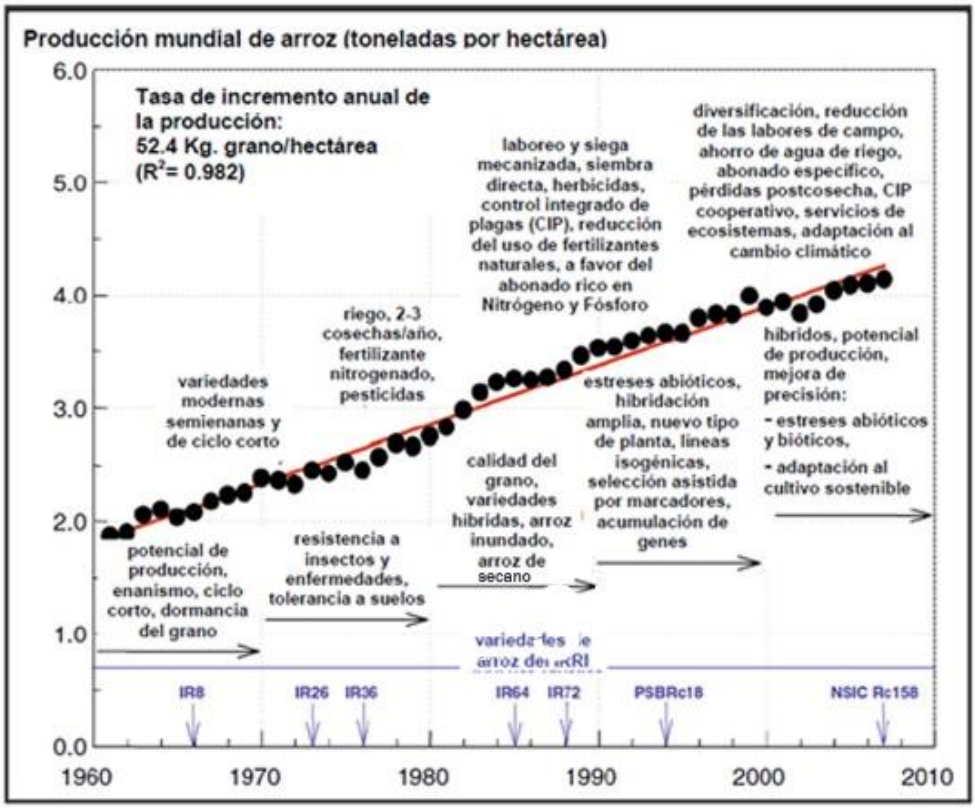
La abundante información disponible sobre el genoma del arroz se puede encontrar en numerosas bases de datos que son accesibles en internet, como por ejemplo:

- http://orygenesdb.cirad.fr yhttp://urgi.versailles.inra.fr/OryzaTagLine(CIRAD)
- http//retoryza.fr
- The Rice Biological Resource Center Database (http://rice-brcdb.mpl.ird. fr/brcdb/index.html?cat=0), del Institut de Recherche pour le Développement (IRD) y el CIRAD.
- http://www.gramene.org/ del Cold Spring Harbor Laboratory y la Universidad de Cornell.
- http://sundarlab.ucdavis.edu/smrnas/.de la Universidad de Davis.
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST (base de datos de EST del National Center for Biotechnology Information, NCBI, EEUU).
- http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml(Rice Genome Annotation Project: base de datos de la secuencia del arroz) y http://oryzasnp.plantbiology. msu.edu/index.html, de la Universidad Estatal de Michigan.
- http://www.ricesnp.org del Rice Snp Consortium.
- DRTF http://drtf.cbi.pku.edu.cn de la Universidad de Pekin.
- http://rmdncpgr.cn (Rice Mutant Database).
- http://bioinfo.hzau.edu.cn/ (Rice EST Data Base, REDB).
- http://rise.genomics.org.cn.
- http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp (Oryzabase).
- http://rgp.dna.affrc.go.jp/giot/INE.html. (Rice Genome Research Programm).
- http://www.iris.irri.org del IRRI
- http://www.icis.cgiar.org International Crop Information System (ICIS) del CGIAR.
- http://mips.gsf.de/proj/plant/jsf/rice/index.jsp del Helmholtz Zentrum de Alemania.

1.3. Influencia de la investigación en la producción de arroz (Revolución Verde)

Aunque la demanda global *per cápita* de arroz está disminuyendo, la demanda de arroz en su conjunto continuará aumentando debido al crecimiento de la población. Zeigler y Barclay (2008) estiman que se requiere un aumento de la producción mundial de 8-10 millones de toneladas cada año para satisfacer las necesidades nutricionales de la población mundial.

Figura 3. Producción mundial de arroz e intervenciones tecnológicas claves entre 1960 y 2007. En la parte inferior de la línea de tendencia se indican los cambios en los objetivos de mejora y las variedades obtenidas en el IRRI En la parte superior, los principales cambios en el manejo del cultivo y los logros (Dobermann *y col.*, 2008).



Este reto sólo se puede alcanzar con la ayuda de la investigación agraria. Ya durante los años 1950, el rápido aumento de la población mundial provocó la alarma por la posible insuficiencia de recursos para alimentar la población. Como reacción a esa amenaza se impulsaron una serie de iniciativas de investigación, desarrollo y transferencia de tecnología en el campo de la agricultura para aumentar el rendimiento de los cultivos,

proceso conocido como “Revolución Verde”. Un ejemplo de las muchas iniciativas tomadas por diferentes gobiernos es la creación del International Rice Research Institute (IRRI), fundado en 1959 en un acuerdo entre las Fundaciones Rockefeller y Ford con el Gobierno de Filipinas, con el objetivo de reducir la hambruna y mejorar la nutrición y la salud de los productores y consumidores de arroz. El primer objetivo de los investigadores del IRRI fue la obtención de variedades semi-enanas, ya que la susceptibilidad de las variedades tradicionales al encamado como consecuencia de su elevada estatura era el mayor obstáculo para el aumento del rendimiento (Khush y *col.*, 2001). Los resultados de estos esfuerzos no tardaron en aparecer con la obtención en 1966 de la variedad IR8, primera variedad semi-enana de alto rendimiento (Peng y Khush, 2003). Desde entonces el IRRI, junto con los sistemas de investigación agraria de varias naciones, ha ido desarrollando una serie de variedades mejoradas tanto en producción como en otros caracteres, como la resistencia a plagas y enfermedades o la calidad del grano (Figura 3).

En 1976 se obtuvo IR36, la primera variedad con resistencia múltiple, fruto de una década dedicada a conseguir resistencia a plagas, enfermedades y tolerancia a suelos adversos. En la década de los 1980, el objetivo principal de mejora fue la obtención de variedades con excelente calidad culinaria, destacando la variedad IR64. Pero a finales de los 80 se observó que el incremento anual del rendimiento medio era cada vez más pequeño, por lo que se volvió a fijar como objetivo principal el aumento de la producción. Mediante la obtención de variedades híbridas y la búsqueda de un “nuevo tipo de planta” se obtuvo, entre otras, la variedad PSBRc18. Sin embargo, la síntesis de los caracteres deseados *a priori* en este “nuevo tipo de planta”, no ha dado hasta el momento los resultados esperados (Hossain y Narciso, 2003). Por el contrario, el arroz híbrido está siendo cada vez más utilizado en China, con importantes incrementos de producción.

1.4. La planta de arroz

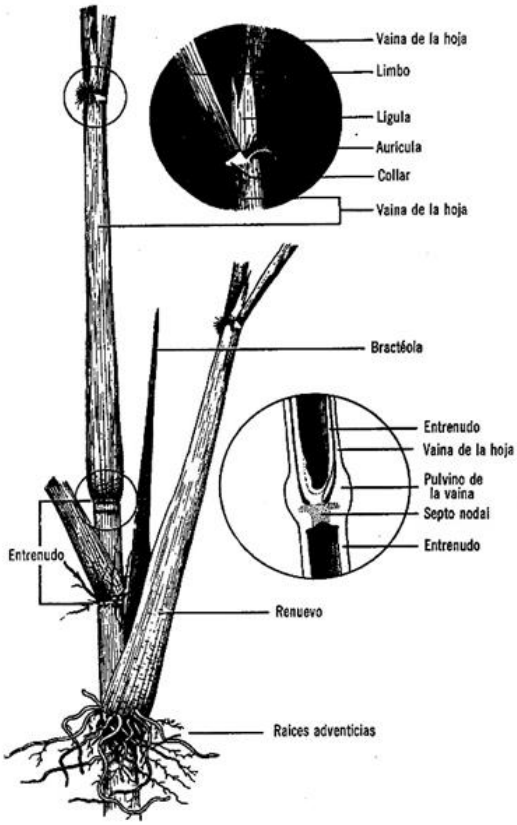
La planta de arroz consta de raíces, tallos y hojas, que constituyen los órganos vegetativos de la planta, y de órganos florales o reproductivos que se disponen en panículas.

El tallo (Figura 4) está compuesto por un número variable de nudos y entrenudos que se alargan durante la fase de crecimiento. Cada nudo tiene una hoja, en cuya axila se encuentra una yema, que puede originar un vástago o hijuelo. Las hojas se disponen de forma alterna a lo largo del tallo. El número de hijuelos es variable, dependiendo sobre todo de las condiciones edafo-climáticas y de las prácticas del cultivo, siendo determinantes la densidad de siembra y el abonado. En condiciones normales, la planta tiene de dos a seis hijuelos fértiles.

Las flores del arroz aparecen agrupadas en una inflorescencia en panícula, que está compuesta por un eje principal o raquis que se abre en ramificaciones primarias, y éstas en secundarias (Figura 5). Las espiguillas, que contienen una única flor, se encuentran sobre estas ramificaciones. Las flores son hermafroditas, con seis estambres y un ovario con dos estigmas plumosos (Figura 6). La fecundación en el arroz es,

mayoritariamente, autógama y da lugar al grano de arroz, formado por el fruto en cariópside y recubierto por los tegumentos de la espiguilla, a los que se conoce como cascarilla.

Figura 4. Partes del tallo de la planta de arroz.



El ciclo del arroz puede dividirse en tres periodos:

- Periodo vegetativo: comprende desde la germinación de las semillas hasta el final del ahijamiento.
- Periodo reproductivo: desde el inicio de la panícula hasta la floración.
- Periodo de maduración: desde la fecundación de las flores hasta la maduración del grano.

La duración de cada uno de estos periodos es variable y depende tanto del genotipo como del ambiente. En la región mediterránea, el ciclo del arroz suele durar entre 125 y 145 días en función de la variedad y las condiciones climatológicas de la campaña.

Figura 5. Partes de la panícula. (http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/arroz/inflores.htm)

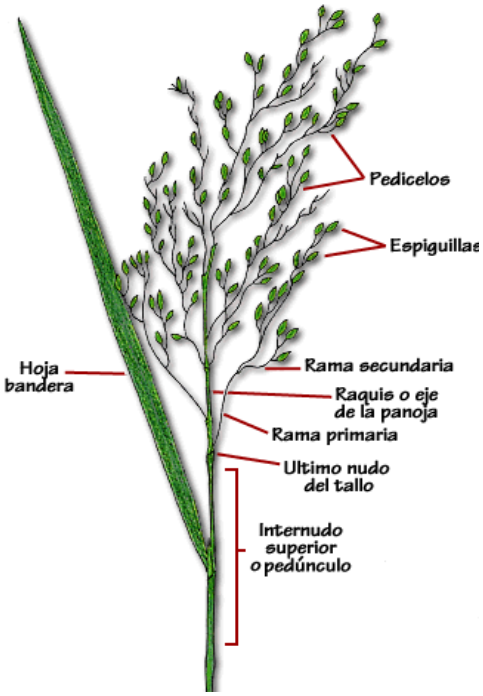
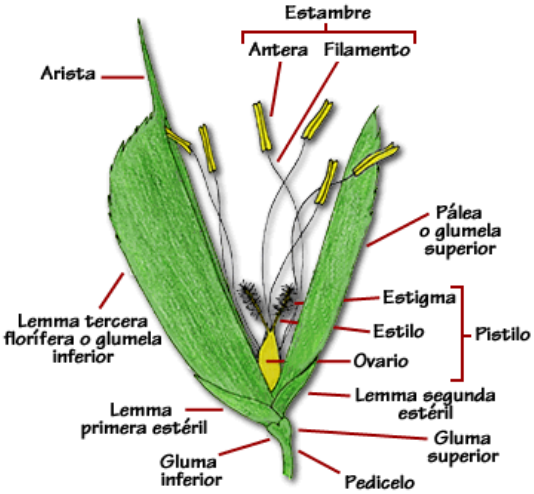


Figura 6. Partes de la flor. (http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/arroz/espiguil.htm)

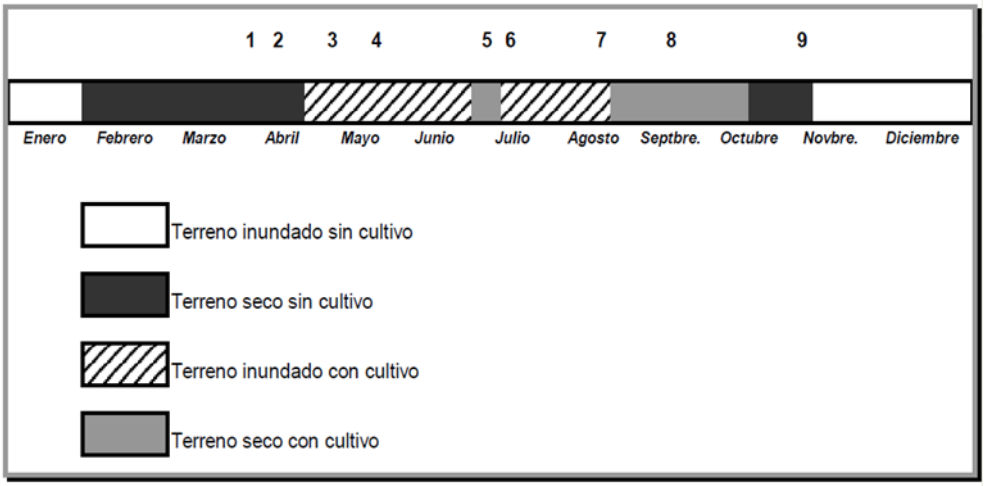


El arroz es un cultivo muy exigente tanto en temperatura como en agua, siendo su característica más peculiar el tolerar la saturación hídrica del terreno. La temperatura debe ser alta y constante, ya que se resiente mucho de grandes oscilaciones térmicas. En los países de climas templados, como España, su cultivo sólo se puede llevar a cabo en primavera-verano, pero en regiones ecuatoriales se pueden realizar dos o incluso tres cosechas al año. Cada estado fenológico del arroz posee un intervalo de temperaturas óptimas y dos temperaturas críticas. La temperatura mínima de germinación es de 12ºC; para el encañado y la floración se requieren entre 23 y 25ºC (Osca-Lluch, 2001). El arroz responde bien al aporte de fertilizantes; las extracciones medias del cultivo son de 21 Kg de N, 11 Kg de P_2O_5 y 18 Kg de K_2O por tonelada de grano producido (Guerrero, 1990).

1.4.1. Técnicas de cultivo

En la mayor parte de España se practica monocultivo, por lo que los arrozales permanecen sin explotar durante la época fría. En algunas zonas, como en el Parque Natural de la Albufera, las parcelas permanecen cubiertas de agua durante tres meses: desde mediados de octubre hasta mediados de enero. La figura 7 muestra un ciclo de cultivo de arroz típico en la Comunidad Valenciana (López *y col.,* 1975). Las técnicas de cultivo, sobre todo las de preparación del terreno y aporte de abonos y productos fitosanitarios, varían en función de las condiciones del suelo. Igualmente, el periodo de cada una de estas labores oscila según las condiciones climáticas y la duración del ciclo de la variedad sembrada.

Figura 7. Ciclo de arrozal valenciano. (1) Labores preparatorias, (2) drenaje, arado y nivelado del terreno, (3) inundación y siembra, (4) primer tratamiento contra malas hierbas y reposición de faltas por trasplante, (5) secado, (6) segundo tratamiento contra malas hierbas y abonado de cobertera (si es necesario), (7) drenaje, (8) cosecha, (9) inundación.



Las labores preparatorias (Fase 1 de la Figura 7) comienzan con el “fangueo”, que consiste en remover el terreno inundado hasta una profundidad de 10-15 cm, incorporando los rastrojos al suelo, mediante un tractor al que se le sustituyen las ruedas traseras por unas estructuras cilíndricas de barras metálicas. Cuando los campos se han secado, se realizan el labrado y la nivelación del terreno (2), si es necesario. La nivelación, que se realiza cada dos o tres años, es importante para mantener una lámina de agua de profundidad constante en toda la parcela, lo que facilita la emergencia y el desarrollo uniforme de las plantas, el control de las malas hierbas, el drenaje de las parcelas y el manejo del riego. Finalizadas estas tareas, se distribuye el fertilizante de fondo y se incorpora mediante una labor superficial.

En la mayor parte de los arrozales españoles, la siembra (3) se realiza sobre terreno inundado a finales de abril, de forma manual o mecánica, a razón de 150-200 Kg/ha según la variedad (Carreres, 2007). Es habitual sembrar una pequeña zona de la parcela más densamente, para poder realizar un trasplante (4) si han quedado zonas de baja densidad de plantas. El primer tratamiento contra las malas hierbas se realiza cuando las plántulas tienen entre 1-4 hojas.

En el mes de junio, durante unos diez días, se elimina en su totalidad el agua (5), operación que se conoce en la zona valenciana como “aixugó”; ello oxigena el suelo y vigoriza el cultivo. También sirve para eliminar algas, que pueden llegar a ser un problema en algunas parcelas. Este momento se suele aprovechar para realizar otro tratamiento herbicida y el abonado de cobertera (6).

Cuando los granos de arroz se han llenado (hacia finales de agosto), se corta el suministro de agua (7), para que las parcelas se vayan secando y el arroz acabe de madurar. La cosecha del arroz (8) se inicia generalmente en septiembre. El momento óptimo de recolección es importante, y debe efectuarse a una humedad media del grano del 18 al 22%, pues con humedades inferiores aumenta el porcentaje de granos partidos en el molino, y si son superiores disminuye la producción y aumenta el número de granos verdes y yesosos. Tras la cosecha, se lleva a secaderos y se almacena en silos hasta ser transportado al molino para su elaboración. El terreno se vuelve a inundar hasta la siguiente campaña (9).

1.4.2. Enemigos del cultivo del arroz

Malas hierbas

Las malas hierbas compiten con el arroz por el espacio, la luz y los nutrientes; disminuyen la calidad de la cosecha, ya que se recolecta el grano de arroz mezclado con semillas de malas hierbas (Osca-Lluch, 2001); y hospedan a numerosas plagas y son fuente de inóculo de enfermedades (Aguilar, 2001). Las malas hierbas de los arrozales tienen una actividad fotosintética y radicular muy eficaz, por lo que crecen más rápidamente que el arroz y cubren antes el terreno, compitiendo con el cultivo. También aventajan al arroz en su capacidad de propagación y muchas de ellas tienen gran facilidad de desgrane. También las algas compiten con el arroz, y provocan a veces graves daños; destacan las

algas filamentosas, que pueden llegar a formar una auténtica barrera para el enraizamiento, la emergencia y el desarrollo de la plántula de arroz.

Tabla 9. Principales malas hierbas de los arrozales.

Familia	Nombre científico	Nombre común
Gramíneas	*Echinochloa* ssp.	Serreig, Cola, Mill, Panissola, Mijeras
	Paspalum distichum L	Grama gruesa o de agua
	Leptochloa fascicularis Lam.	
	Leptochloa fusca (L.) Kunth.	
Cyperáceas	*Cyperus difformis* L	Junquillo, Tiña, Buriol, Castanyola, Jonçabova,
	Scirpus maritimus L.	Juncia, Chufa, Castañuela, Junça, Serrada mayor
	Scirpus mucronautus L.	Punxó, Junquet, Junquillo, Puñalera, Serrada menor
	Scirpus supinus L.	Ponxonet, Borró, Borronet, Espartet
Alismatáceas	*Alisma plantago-aquatica* L	Col, Coleta, Llanten de agua, Orella de burro,
Litráceas	*Ammania coccinea* Rottb.	Alfabegueta, Arbolito, Presseguera, Fábriga
	Ammania robusta Herr&Regel	Arbolito
Potamogetonáceas	*Potamogeton nodosus* Poiret	Llenguad'oca
	Potamogeton natans L.	
Tifáceas	*Typha* spp.	Espadaña, Boba, Anea, Enea, Paja real
Pontederiáceas	*Heteranthera limosa* (Sw.) Willd.	
	Heteranthera reniformis Ruiz & Pavón	
	Heteranthera rotundifolia (Kunth) Griseb.	
Elatináceas	*Bergia capensis* L.	Tomatito, Alfabegueta
Lemnáceas	*Lemna* spp. L.	Lenteja de agua, Pá de granota

Plagas

Los campos de arroz son un hábitat excelente para muchos animales que pueden causar daños en el arrozal; destacan las aves acuáticas, que dificultan la germinación, cortan las plántulas, y provocan el encamado de la planta y el desgrane de las panículas; y el cangrejo rojo americano, *Procambarus clarkii*, que excava galerías que pueden llegar a desaguar los terrenos más altos. Pero especialmente algunos insectos pueden ser plagas importantes. Las principales en España son (Osca, 2001):

- *Chilo suppresalis*, un lepidóptero conocido como “cucat”, “barrenador del arroz” o “palometa”. Sus larvas atacan al arroz desde el estado de plántula hasta la madurez, alimentándose del interior de los tallos y provocando que las panículas queden vacías. Se están empleando con éxito diversos métodos de lucha

biológica, como la suelta de parásitos naturales o el empleo de feromonas sintéticas.

- El hemíptero *Eusarcorisin conspicuus*, conocido como “pudenta” o “chinche de la espiga”, es una plaga en los arrozales andaluces y extremeños (Aguilar, 2001). Los daños los causa al perforar la cascarilla del grano y originar unas manchas características llamadas “grano picado”.
- Ocasionalmente, las larvas de quironómidos pueden causar daños al arroz en sus primeros estadios de desarrollo al alimentarse de granos en germinación, raicillas u hojas jóvenes. Los géneros que ocasionan daños con más frecuencia son *Chironomus* y *Cricotopus*.
- Los nematodos, especialmente *Aphelenchoides besseyi* Christie, que ha producido daños importantes, fundamentalmente en la variedad Bomba (Carreres *y col.*, 2010), al causar una enfermedad conocida como *white tip* o punta blanca; las plantas enfermas tienen menos vigor, una reducción en el crecimiento, y pérdidas de producción (Carreres, 2005). Se transmite principalmente por semilla, por lo que la desinfección de ésta, junto con prácticas de cultivo adecuadas, y la obtención de variedades resistentes son los métodos de control utilizados contra *Aphelenchoides*.

Otras plagas del arroz en España con menor incidencia son la rosquilla del arroz (*Mythimna unipuncta*), la rosquilla negra (*Spodoptera littoralis*), el taladro del maíz (*Sesamia nonagroides*), la tijereta (*Ephydrariparia*) y los pulgones.

Enfermedades

En España, las enfermedades del arroz más importantes son:

- Piriculariosis, causada por el hongo *Magnaporthe oryzae*. Dado que la resistencia a este patógeno es el tema de esta Tesis, se dedicará un apartado específico a esta enfermedad.
- *Bipolaris oryzae* (llamado hasta recientemente *Helminthosporium oryzae*), que provoca manchas en diverso órganos, y que produce daños por la disminución de la germinabilidad y el vigor, y al reducir el valor comercial del grano debido a la disminución del peso y a la presencia de manchas (Carreres, 2005).
- Podredumbre basal, enfermedad endémica provocada por *Sclerotium oryzae*. Este hongo inverna en forma de esclerocios, que flotan en el agua y se adhiere al tallo, iniciando la infección. En la época de maduración del arroz, los tallos muy afectados tienen su parte basal podrida. Los daños provocados por el hongo son reducción del número de hijuelos, aumento del encamado y reducción de la productividad y de la calidad del grano (Carreres, 2001).

Otros patógenos de menor importancia son *Fusarium sp*. y el virus del amarilleo enanizante de la cebada (Barley Yellow Dwarf Virus, BYDV), conocido como *enrojat*.

1.5. La enfermedad causada por *Magnaporthe oryzae*

1.5.1. Daños causados por *Magnaporthe oryzae*

Entre las enfermedades que padecen los arrozales, la piriculariosis es la más extendida por todo el mundo. Además, las pérdidas en rendimiento causadas por este hongo pueden ser muy elevadas, pudiendo alcanzar del 50 al 90% de la cosecha en algunas zonas (Mehrotra, 1998; Ramkumar *y col.*, 2010): en ataques severos en los años 1969 y 1970 en las provincias de Laguna y Quezón (Filipinas), las pérdidas en algunas variedades llegaron a alcanzar el 85% (Nuque, 1970); en Nepal se estimaron pérdidas de hasta el 80% (Manandhar *y col.*, 1992); y durante las últimas tres décadas ha habido tres grandes ataques de piriculariosis en China, en el último de los cuales (2001-2005) se vieron afectadas severamente 5,7 millones de hectáreas (Khush y Jena, 2009). En 2004, las pérdidas causadas por el hongo fueron del 70% en áreas de Java Occidental, Indonesia (Sobrizal y Anggiani, 2007), y en años recientes también han ocurrido ataques fuertes en Corea del Sur, Japón, Vietnam y los Estados Unidos (Wilson y Talbot, 2009).

En España no son frecuentes los ataques severos de piriculariosis, y la caída en la producción no suele superar el 5-25%, aunque las pérdidas pueden ser muy superiores en algunas parcelas o parajes. Los daños varían mucho según las condiciones climáticas, la variedad, el abonado nitrogenado y la fecha de siembra. En el año 2003, variedades que hasta entonces habían sido tolerantes, como Senia, sufrieron un ataque severo, supuestamente de una nueva raza que, en algunos campos, redujo la producción un 40-50%.

Figura 8. Comparación entre planta de arroz afectada por *M. oryzae*. Izquierda: planta sana; derecha: planta afectada.

La piriculariosis es una enfermedad conocida desde hace siglos. La primera cita escrita proviene de China: Soong Ying-Shin la describió en el libro “Utilización de Recursos Naturales” publicado en 1637, llamándola “fiebre del arroz”. Según Goto (1955), M. Tsuchiya indicó la presencia de piriculariosis en Japón en su libro publicado en 1704. En Italia, Astolfi (1828) describió por primera vez una enfermedad en el cultivo del arroz cuyos síntomas parecen coincidir con la piriculariosis. En cuanto a la aparición de la enfermedad en España, en 1884, 1885, 1895, 1910 y 1911, se produjeron grandes pérdidas de producción por un fenómeno que se bautizó como “fallada” (Anónimo, 1887; Font de Mora, 1939; Carrasco, 1952). Aunque no se puede constatar que el agente causante de dicha patología fuese *M. oryzae*, es probable que lo fuera, ya que los síntomas descritos coinciden con los de *Magnaporthe* y Butler lo identificó en 1914 en arrozales valencianos (Butler, 1914). Precisamente a causa de estas “falladas” se creó en 1913 la Granja Arrocera de Sueca con el fin de obtener variedades menos susceptibles. Esa institución ha pasado a ser hoy en día el Departamento del Arroz del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Carreres *y col*., 1997; Zaragoza, 2011), lugar en el que he desarrollado la presente Tesis.

Aparte del arroz, *M. oryzae* ataca a un amplio rango de especies, entre ellas otras plantas de interés agrícola, como el trigo (*Triticum aestivum*), la cebada (Chen *y col*., 2003), o el mijo africano (*Eleusine coracana*), alimento importante en la India y el sur y el este de África (Ekwamu, 1991).

1.5.2. Síntomas

En nuestra zona arrocera, los ataques del hongo se detectan en julio con los primeros síntomas en hoja, e incrementan su virulencia en agosto y septiembre, ocurriendo entonces también ataques en nudos y panícula. Los primeros focos de piriculariosis suelen observarse en rodales, pudiendo llegar a tener el aspecto de áreas quemadas, fácilmente distinguibles a simple vista (Figura 9).

Figura 9. Daños provocados por *M. oryzae* en campo. Izquierda: típico rodal afectado por el hongo. Derecha: cultivo afectado severamente.

El hongo *Magnaporthe oryzae* puede infectar cualquier parte de la planta, aunque suele afectar más a las hojas, los nudos, las panículas y los granos. Sesma y Osbourn (2004) han observado *in vitro* que *M. oryzae* es también capaz de atacar las raíces, lo que podría llevar a una invasión sistémica. Cuando la infección es severa y ocurre en una fase temprana del cultivo, se produce un retraso en el desarrollo, prolongando el periodo de ahijamiento con el consiguiente retraso de la floración y maduración, y la disminución del número y peso de los granos, o incluso la muerte completa de las plantas (Carreres, 2001). En condiciones favorables para su desarrollo, *M. oryzae* puede destruir completamente un semillero.

La enfermedad en hoja comienza con pequeñas manchas puntiformes verde-grisáceas o azuladas. Al crecer se vuelven elípticas, siguiendo la dirección de los nervios, hasta alcanzar finalmente forma de huso con un color típicamente grisáceo ceniciento en el centro, indicador de la esporulación del hongo, y con bordes necrosados de color marrón-rojizo (Figura 10). Las manchas totalmente desarrolladas alcanzan una longitud de 1-1,5 cm y una anchura de 0,3-0,5 cm (Carreres, 1997). Tamaño, forma y color de la mancha pueden variar según las condiciones ambientales, la edad de la lesión y de la hoja, y el grado de resistencia de la variedad. Si el ataque es severo, la hoja acaba marchitándose. Cuando el ataque sobre las hojas es temprano, la rápida evolución de la enfermedad puede llegar a destruir completamente grandes extensiones del cultivo, hasta el punto de que el cultivo aparece como quemado (Figura 9).

Figura 10. Lesiones típicas de *M. oryzae* en hoja (Fuente: /viarural.com.ar/agricultura/aa-enfermedades/pyricularia-oryzae.htm).

La infección de los nudos (Figura 11) comienza con pequeños puntos necróticos, que van creciendo y alargándose. En algunos casos, el hongo acaba invadiendo completamente el tejido del nudo y partes próximas, llegando a necrosarlo totalmente. Esto provoca el marchitamiento o secado de la parte del vástago, incluyendo la panícula, que permanece erguida pero con los granos vacíos (Torres y Teng, 1993). En casos extremos, se puede producir incluso la ruptura del tallo por esta zona.

Figura 11. Daños de *M. oryzae* en nudo (Fuente: http://knowledgebank. cimmyt.org/ ricebreedingcourseBreeding_for_disease_resistance__Blast.htm).

Los ataques más temibles son los que ocurren en la panícula (Figuras 12 y 13), especialmente en el cuello, pues suelen ser los más destructivos. Según el momento en que ocurre la infección, los daños son de diferente gravedad, afectando en mayor o menor medida a la producción. Si sucede durante la emergencia de la panícula, o antes de iniciarse el llenado de los granos, la zona necrótica formada interrumpe la circulación de la savia y la espiguilla queda vacía (de ahí el nombre de “fallada”). Las infecciones de cuello tardías provocan granos yesosos o a medio llenar (Candole *y col.*, 1999). Katsube y Koshimizu (1970) observaron que cada 10% de incremento de infección en cuello, el rendimiento descendía en aproximadamente un 6%, y los granos yesosos aumentaban en un 5%; lo que supone un descenso de calidad de 1 o 2 clases. *M. oryzae* también puede afectar al grano, apareciendo manchas marrones en la cáscara.

Además de estas pérdidas de producción directas, la piriculariosis aumenta la respiración de la planta y reduce la tasa máxima de fotosíntesis y la eficiencia en el uso fotosintético de la luz (Pinnschmidt *y col.*, 1994), puesto que reduce el área foliar verde, lo

cual tiene un efecto indirecto sobre la biomasa de la panícula (Burrel y Rees, 1974; Padhi *y col.*, 1978).

Figura 12. Ataque de *M. oryzae* en panícula. Panículas con distinto grado de afectación.

Un factor importante para el desarrollo de la enfermedad es el estado fenológico, ya que la planta es más sensible a la infección al inicio de su desarrollo y desde el hinchamiento de la panícula hasta su emergencia. La infección resulta más fácil en tejidos blandos. Las hojas de arroz se vuelven más resistentes tanto con la edad de la planta (Andersen, 1947; Kahn y Libby, 1958) como con la de la hoja (Roumen *y col*, 1992). Roumen (1992a; 1994) observó que el número de lesiones disminuía a medida que la

infección ocurría en hojas con más edad y que ese aumento de la resistencia difería según la variedad. Goto *y col*. (1961) y Notteghem y Andriatompo (1977) vieron que el tamaño de las nuevas lesiones también disminuía con la edad de la hoja. También la panícula va incrementando su resistencia con la edad.

Figura 13. Panícula doblada por ataque severo de *M. oryzae* en cuello de panícula.

1.5.3. Biología de *Magnaporthe oryzae*

Magnaporthe oryzae es un ascomiceto filamentoso, que se puede reproducir sexualmente mediante ascosporas. Es heterotálico, es decir, la reproducción sexual es posible únicamente a través de los dos tipos de talos diferentes presentes en esta especie, MAT1-1 y MAT1-2, los cuales son cepas similares morfológicamente. Se han conseguido la reproducción sexual *in vitro* de aislados de campo, tanto en un medio de cultivo como sobre tejido muerto (Silué y Notteghem, 1990; Hayashi *y col*, 1997a; Luangsa-*Ard y col*., 1997); en tal caso, se forman los cuerpos fructíferos (llamados peritecios) a los 21 días (Valent *y col*., 1991). Estos peritecios están llenos de ascas que, a su vez, contienen las ascosporas. En campos de arroz, sin embargo, la gran mayoría de aislados hallados son infértiles y no se han encontrado hasta el momento pruebas concluyentes de reproducción sexual en la naturaleza.

A la forma asexual del hongo se la venía denominando *Pyricularia oryzae*, aunque esta nomenclatura se ha abandonado. Se reproduce mediante otro tipo de esporas,

llamadas conidias, que surgen por multiplicación vegetativa de los extremos de los conidióforos. Las conidias tienen forma de pera (de ahí el antiguo nombre de la especie y de la enfermedad). Están formadas por 3 células, miden unos 19-27 x 8-10 µm (Asuyama, 1965) (Figura 14), y se encuentran en número de 1 a 20 sobre conidióforos simples o en grupo.

Figura 14. Conidias de *M. oryzae*. (Izquierda: http://www.padil.gov.au/pbt). Derecha: Conidia con un gota de sustancia mucilaginosa (Howard y Valent, 1996).

Este patógeno no se puede distinguir morfológicamente de algunos otros que se hospedan en otras especies vegetales, por lo que el grupo entero fue denominado *Pyricularia grisea* hasta que, recientemente, Couch y Kohn (2002) demostraron, mediante análisis filogenético y ensayos de fertilidad entre diversas cepas, que debería separarse en dos especies distintas: una que infecta al género *Digitaria* y otra que infecta al arroz y a otras hierbas (géneros *Oryza*, *Setaria*, *Lolium*, *Eragrostis* y *Eleusine*), la cual se denominó *Magnaporthe oryzae*.

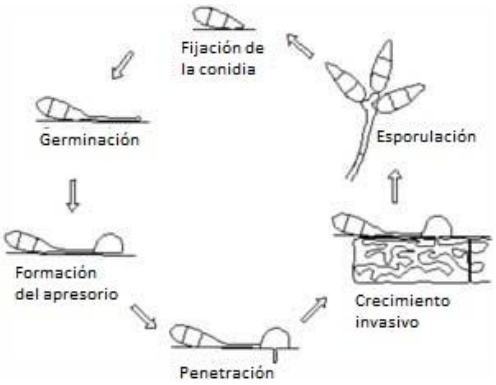
1.5.4. Ciclo de vida de *Magnaporthe oryzae*

El hongo pasa el invierno como esporas (conidias) y micelio en los restos de cultivo que quedan en el campo tras la siega. Con el aumento primaveral de las temperaturas y con una alta humedad relativa, el micelio esporula y produce conidias, que constituyen la fuente primaria de infección. Otra fuente primaria de infección, menos importante, es la siembra de semillas infectadas, donde el hongo se puede encontrar en el embrión, el endospermo y las glumas. *M. oryzae* también inverna en cereales de invierno y en plantas huésped. En el Parque Natural de la Albufera, las posibles plantas huésped son:

serreig (*Echinochloa sp*.), grama (*Cynodon dactilon*), carrizo (*Phragmites communis*), cañota (*Sorghum halepense*), juncia (*Cyperus rotundus*) o caña común (*Arundodonax*). Los estudios sobre la susceptibilidad de diferentes gramíneas a *M. oryzae* son contradictorios, sobre todo por los distintos fondos genéticos (tanto del hongo como de las especies huésped) y condiciones ambientales (Ou, 1985). En ambientes secos y a temperatura ambiente, las conidias pueden sobrevivir durante más de un año y los micelios durante casi 3 años; pero Kuribayashi (1928) e Ito y Kuribayashi (1931) publicaron que, en ambientes húmedos, el patógeno no puede sobrevivir hasta el cultivo siguiente; sin embargo, en nuestras húmedas condiciones de cultivo, el foco principal de infección parecen ser los rastrojos procedentes del año anterior.

El ciclo de la enfermedad se ha descrito en hoja, aunque es probable que en otros tejidos sea igual o similar (Figura 15). Comienza cuando las conidias, arrastradas por el viento o gotas de agua, se posan en la superficie de la hoja (de modo que sobre variedades con hojas de disposición horizontal se depositan más esporas que sobre las de porte más erecto). Las conidias se anclan a la superficie foliar mediante una sustancia mucilaginosa (Figuras 14 derecha, 15, 16 y 17) que es liberada por la punta de la espora durante su hidratación.

Figura 15. Ciclo de vida del hongo *M. oryzae* (Fuente: http://www.btny/purdue.edu).



Una vez fijada a la superficie de la planta, la espora germina mediante la emisión de su tubo germinativo (Figura 16), unas dos horas después de posarse las conidias sobre la superficie foliar. Después de haber crecido unos 15 a 30 µm, comienza a ensancharse en su punta y a aplastarse contra la superficie de la hoja (Bourett y Howard, 1990). Se supone que entonces se produce algún tipo de reconocimiento de las características de la superficie antes de la formación del apresorio (Figura 17 A). El apresorio tiene forma de cúpula y requiere una superficie dura e hidrofóbica para formarse. La pared celular del apresorio contiene una capa de melanina, salvo en la zona donde está en contacto con la cutícula de la planta (Howard y Valent, 1996), que se llama poro. La producción de melanina es una característica de virulencia en numerosos patógenos fúngicos, y funciona como una barrera semipermeable que permite la difusión de agua a través de ella, pero impide la salida de los carbohidratos y lípidos, que son movilizados desde la conidia. La

acumulación de estos sólidos solubles en el apresorio provoca la entrada de agua a través de la capa de melanina, lo cual aumenta la presión de turgencia hasta alcanzar unas 80 atmósferas (Howard *y col.*, 1991), que a su vez se transforma en presión mecánica en el poro del apresorio, favoreciendo la formación de una hifa de penetración que acaba atravesando la cutícula de la hoja (Figura 17 B).

Figura 16. Penetración de *M. oryzae*. A: Conidias. B: Anclaje de las conidias a la superficie de la hoja mediante una sustancia mucilaginosa. C y D: Germinación y formación del apresorio. E: Penetración e invasión de las hifas. ml: capa de melanina; sp: septum; pp: hifa de penetración; rg: anillo pegajoso; bih: hifas invasivas; pc: cutícula de la planta; pcw: pared celular de la planta (Clergeot *y col.*, 2001).

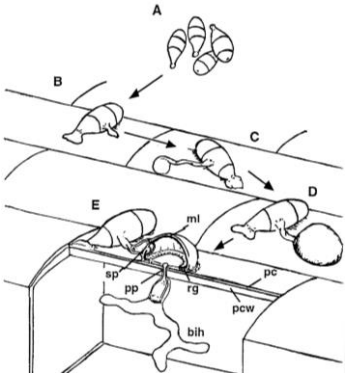
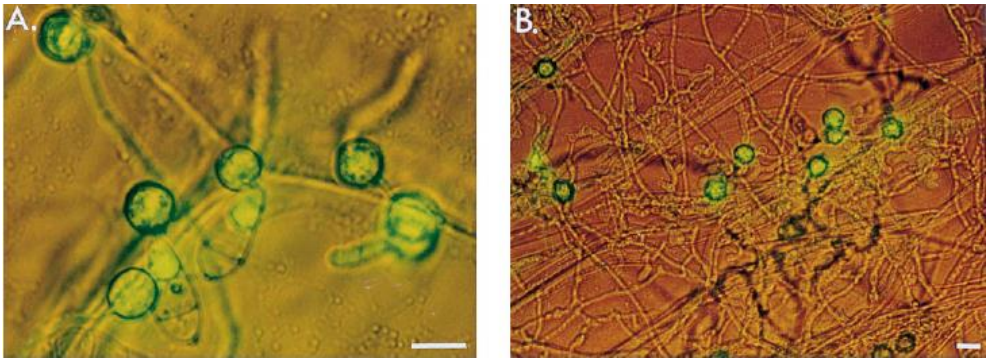


Figura 17. Fases de la infección de *M. oryzae*. A.: Conidias con tubos germinativos y apresorios a las 24h de la infección. B.: Hifas de *M. oryzae* en una hoja a las 48 h de la infección. Barra = 120μm. (Kershaw *y col.*, 1998).



La hifa primaria va ramificándose en una serie de hifas bulbosas, llamadas hifas invasivas, estructuras especializadas adaptadas a la extracción de nutrientes de células vivas (Talbot, 2003; Ebbole, 2007), lo que sugiere un comportamiento inicial biotrófico del patógeno. Sólo cuando la infección se ha desarrollado más, el hongo se comporta de forma

más necrotrófica, por lo que *M. oryzae* se ha clasificado como hongo hemibiótrofo (Ou, 1985; Talbot, 2003; Ebbole, 2007; Wilson y Talbot, 2009). Después de llenar la célula epidérmica inicial, el hongo va creciendo de célula en célula a través de la pared celular, al parecer buscando las zonas donde se acumulan plasmodesmos (Kankanala *y col.*, 2007; 2009). Aparentemente, el hongo puede liberar proteínas fúngicas al citoplasma de la célula huésped viva a través de una estructura lamelar que se produce en la punta de las hifas (Ebbole, 2007). Las células invadidas ya no están vivas cuando el hongo invade la célula vecina (Kankanala *y col.*, 2007).

Cuatro o cinco días después de la germinación de las conidias comienzan a verse los síntomas en la planta huésped (Roumen, 1994). El hongo esporula profusamente hasta 20.000 conidias al día a través de la lesión (Barksdale y Asai, 1961), iniciando con ello un nuevo ciclo de infección. En condiciones óptimas de temperatura y humedad, un ciclo de infección se reduce a unos cinco días, por lo que puede repetirse muchas veces. Cuando ocurren sucesivas esporulaciones se da la denominada fase de infección secundaria, crítica para el desencadenamiento de una epidemia (Aguilar, 2001). Las conidias requieren un periodo de oscuridad para su formación, por lo que su diseminación se desencadena por la exposición a una o dos horas de oscuridad, y disminuye posteriormente (Barksdale y Asai, 1961; Leach, 1980; Lee *y col.*, 2006). La diseminación de las esporas es a corta distancia: la mayoría de ellas se encuentran a menos de 1-5 m de la fuente de inóculo (Tharreau *y col.*, 2009).

Puesto que en las zonas arroceras españolas normalmente hay inóculo suficiente y las variedades que se cultivan son de escasa o mediana resistencia, los principales determinantes de la aparición de la piriculariosis son la humedad y la temperatura ambiental. Las condiciones óptimas para la germinación de las conidias son de 24 a 28ºC, y de 90 a 100% de humedad relativa del aire (Bourett y Howard, 1990; Hamer *y col.*, 1988). La formación del apresorio, por el contrario, se ve favorecida por temperaturas algo más bajas: entre 16 y 25ºC (Aguilar, 2001). La germinación y el desarrollo de las hifas se produce a partir de los 20ºC, siendo la temperatura óptima 25 – 28 ºC (Sueda, 1928). Para que estos filamentos penetren en los tejidos vegetales, se precisa que las condiciones atmosféricas sean las óptimas durante al menos 12 horas. La esporulación se produce en condiciones de humedad superiores a 90% y con temperaturas que van de 10 a 35ºC (Kuribayashi, 1928; Sueda, 1928), con una temperatura óptima de 25–28ºC (Tochinai y Shimamura, 1932, Kato y Kozaka, 1974).

Por lo tanto, días de bochorno acompañados de noches con abundante rocío son las circunstancias más favorables para la aparición de la enfermedad. Por otra parte, los campos inundados perjudican el desarrollo del micelio, por lo que el ataque del hongo es menor que en el arroz de secano (Lai *y col.*, 1999); además, el agua actúa como colchón térmico, y retrasa el enfriamiento ambiental nocturno y, por tanto, la formación de rocío y la germinación de las esporas.

Sakamoto (1940) demostró que la presencia de viento incrementa la susceptibilidad de la planta de arroz a *Magnaporthe,* pues las heridas producidas por el rozamiento son una vía de entrada fácil para el hongo. No obstante, si el viento es seco, como el poniente en nuestra región, reduce la humedad ambiental, previniendo así el desarrollo de la enfermedad.

Abundantes estudios han demostrado que un exceso de abonado nitrogenado hace más susceptible a la planta de arroz (por mencionar algunos: Hori, 1898; Murata *y col.*, 1933; Matsuyama y Dimond, 1973; Correa y Zeigler, 1991; Long *y col.*, 2000, Tang *y col.*, 2009). El efecto es mayor cuando el aporte del nitrógeno se realiza en una sola aplicación (Templeton y *col.*, 1970; Amin y Venkatorao, 1979; Kürschner *y col.*, 1992) y en forma de fertilizantes de acción rápida, como sulfato amónico. Las causas de dicho incremento de susceptibilidad en la planta siguen siendo discutidas. Varios investigadores (Ikeda, 1933; Suzuki, 1934 a, b; Abumiya y Kobayashi, 1955; Wakimoto y Yoshii, 1958) constataron que, al estimularse el desarrollo vegetativo por el nitrógeno, disminuye la acumulación de sílice en las membranas celulares, lo que facilitaría la penetración de las hifas; y Matsuyama (1975) vio que la aplicación de nitrógeno reducía el contenido de hemicelulosa y lignina en la pared de las células epidérmicas, lo que también las hace menos resistentes a ataques mecánicos. Parece ser que el fósforo y el potasio no tienen efecto sobre la incidencia de la enfermedad, salvo que un exceso o una carencia debiliten la planta (Okamoto, 1958; Kozaka, 1965). Por el contrario, la aplicación de silicio aumenta la resistencia a *Magnaporthe* (Kawashima, 1927; Ishizuka y Hayakawa, 1951; Ou, 1985), presumiblemente porque endurece las membranas de las células epidérmicas, reforzando la barrera física de la planta frente a las infecciones (Suzuki, 1934c).

1.5.5. Lucha contra *Magnaporthe oryzae*

Existen prácticas culturales que ayudan a reducir los daños: es conveniente la destrucción de rastrojos y de malas hierbas donde se pueda hospedar el patógeno tras la siega, especialmente el arroz salvaje y *Echinochloa*; hay que evitar también un exceso de abono nitrogenado; es recomendable adelantar al máximo la fecha de siembra, pues en siembras tardías el inicio de la maduración de la planta suele coincidir con las condiciones más favorables para el desarrollo del hongo; se deben evitar densidades de plantación excesivas, en las que el entorno de las plantas se airea poco, acumulándose mayor humedad; y tampoco conviene retirar tempranamente el agua antes de la cosecha.

No obstante, si las condiciones ambientales son propicias para que se produzca la infección por el patógeno, los daños pueden ser graves y hay que recurrir a otros métodos para combatir al hongo. El empleo de microorganismos como *Bacillus* ssp*., Pseudomonas* ssp., *Micromonospora* ssp. *y Streptomyces sindeneusis*, entre otros, ha sido objeto de investigación (Sy *y col.*, 1994; Valasubramanian, 1994; Yoshihiro *y col.*, 2003; Gnanamanickam, 2009), pero no se ha llegado a utilizar en la práctica.

Los métodos de lucha química contra la enfermedad son limitados, sobre todo porque las zonas principales de cultivo de arroz en España son Parques Naturales, en los cuales el uso de productos químicos está restringido. En la actualidad se utilizan 5 productos contra *Magnaporthe*: mancozeb, tebuconazol, procloraz, azoxistrobin y propiconazol (http://www.magrama.gob.es/es/). Debido a la dificultad de control de la plaga con estas restricciones se han publicado autorizaciones excepcionales durante un intervalo de tiempo limitado.

Un buen conocimiento de las condiciones microclimáticas de temperatura y humedad a nivel del cultivo son de gran utilidad para estimar el riesgo de que se desarrolle

la enfermedad; por ello son útiles los termohigrógrafos digitales, aunque deben colocarse a la altura de las panículas; la utilización de cazaesporas sólo aporta información parcial sobre la cantidad de inóculo existente. En la mayor parte de zonas arroceras, desgraciadamente, no hay un buen sistema de vigilancia y predicción de la piriculariosis, por lo que los tratamientos químicos se realizan de forma preventiva en cuanto se observan los primeros indicios de la enfermedad, o incluso, de forma incorrecta, antes de ello.

Es conocido el impacto ambiental que provoca la aplicación de funguicidas en los arrozales (Schaefer *y col.*, 1981; Suarez-Serrano *y col.*, 2010). Según autores como Cassman (1999), para evitar los daños que la intensificación del cultivo del arroz puede causar al medio ambiente, se debe practicar una intensificación ecológica, buscando un equilibrio entre alta productividad, sostenibilidad y protección del medio ambiente. La utilización de variedades resistentes a plagas y enfermedades minimiza el uso de productos fitosanitarios (Jia *y col.*, 2000; Dobermann *y col.*, 2008), y además resulta ser el método más eficiente y económico de protección y es compatible con otras técnicas de manejo del cultivo (Pantoja *y col.*, 1997).

1.5.6. Estructura y distribución de la población mundial de *Magnaporthe oryzae*

El hongo *Magnaporthe oryzae* se considera altamente variable y su población está compuesta por una gran cantidad de linajes. La diversidad y la estructura de las poblaciones de *M. oryzae* ha sido estudiada en muchos países en las últimas décadas, utilizado distintos tipos de marcadores genéticos (Levy *y col.*, 1991, 1993; Correa-Victoria *y col.*, 1994; Chen *y col.*, 1995; Roumen *y col.*, 1997; Don *y col.*, 1999a, b; Xia *y col.*, 2000; Park *y col.*, 2003; Javan-Nikkah *y col.*, 2004; Consolo *y col.*, 2008; Lara-Álvarez *y col.*, 2010). La diversidad es mayor en Asia, especialmente en las laderas del Himalaya, lo que hace suponer que es el centro de origen del patógeno (Zeigler, 1998). Tharreau *y col.* (2009) observaron 3 grupos genéticos diferentes a nivel mundial, dos de los cuales sólo incluían un único tipo de talo, mientras que el tercero incluía ambos. Lo habitual en las áreas de cultivo de arroz es la reproducción asexual del hongo (Chen *y col.*, 1995; Levy *y col.*, 1991; 1993; Roumen *y col.*, 1997; Kumar *y col.*, 1999; Couch *y col.*, 2005; Tharreau *y col.*, 2009); aunque se han encontrado aislados hermafroditas de razas virulentas en la provincia de Yunnan de China (Hayashi *y col*, 1997b; Tharreau *y col.*, 2009), en Tailandia (Luangsa-Ard *y col*, 1997; Mekwatanakarn *y col.*, 1999) y en India (Kumar *y col.*, 1999), lo que sugiere que podría haber reproducción sexual en áreas limitadas en la ladera sur del Himalaya (Tharreau *y col.*, 2009). De hecho, Saleh *y col.* (2012) han aportado evidencias biológicas y genéticas de que el hongo se reproduce en la actualidad en campo en el sudeste asiático.

La mayoría de estudios genéticos de las poblaciones de *M. oryzae* han mostrado que éstas contienen típicamente varios linajes, que son grupos de aislados estrechamente relacionados entre sí y que provienen de un ancestro común (Levy *y col.*, 1993; Correa-Victoria *y col.*, 1994; Chen *y col.*, 1995, Zeigler *y col.*, 1997, Kumar *y col.*, 1999). Cada linaje tienen un patrón de virulencia específico y restringido: un linaje entero puede ser invariablemente virulento frente a variedades que posean un determinado gen de

resistencia, mientras que otras resistencias le resultan muy difíciles de superar. En cuanto al número de linajes presentes en una determinada región, en Asia, donde el cultivo del arroz tiene una historia más larga y se realiza a mucha mayor escala que en otros continentes, hay mucha variabilidad en la población del patógeno (Chen, 1993; Zeigler *y col.*, 1995; Kumar *y col.*, 1999; Chen *y col.*, 2001); así, se encontraron 68 linajes diferentes de *M. oryzae* tan sólo en Tailandia (Mekwatanakarn *y col.*, 1999; 2000); 56 en la región del Himalaya de India (Kumar *y col.*, 1999) y más de 50 en China (Ying *y col.*, 1998). Por el contrario, estudios en Europa encuentran pocos linajes: análisis con RFLP y RAPDs de más de 40 aislados provenientes de Francia, Hungría, Italia, Portugal y España hallaron sólo 5 linajes diferentes (Jorge, 1996; Roumen *y col.*, 1997). Los linajes E1, E2 y E5 están distribuidos ampliamente en todos los países, mientras que el linaje E3 sólo se encontró en Hungría y el E4 sólo en España, en la región del Delta del Ebro. No obstante, más recientemente se ha comprobado que las regiones del Delta del Ebro y de la Albufera de Valencia tienen los mismos linajes (Tharreau, comunicación personal). Además, Piotti *y col.* (2005) detectaron, en 43 aislados de campos de arroz en Italia, evidencias de dos linajes adicionales, y, en un estudio reciente centrado en las marismas del Guadalquivir y con un número mayor de aislados (186), Lara-Álvarez *y col.* (2010) identificaron los cuatro linajes detectados anteriormente en España y un nuevo linaje, E6, hallado por primera vez en Europa. En EEUU la variabilidad en la población de *M. oryzae* es similar: Levy *y col.* (1991) detectaron ocho linajes diferentes. Se puede concluir, pues, que el tiempo desde el establecimiento del cultivo del arroz en una región y los métodos (más o menos intensivos) de cultivo pueden influir en la variabilidad genética de *M. oryzae* (Piotti *y col.*, 2005).

Se han realizado pocos estudios sobre la evolución de la población de *M. oryzae* a lo largo del tiempo. En algunos casos no se ha apreciado una variación importante en décadas, como en Italia, donde se encontraron los mismos linajes a principio de los 60 que en 1997 (Latterell *y col.*, 1965; Roumen *y col.*, 1997); en EEUU, donde la población de *M. oryzae* apenas varió a lo largo de 30 años (Levy *y col.*, 1991); o en Corea, donde han permanecido estables los siete mismos linajes durante 20 años (Park *y col.*, 2003). Por el contrario, en Japón los linajes cambiaron tras una sustitución varietal completa (Don *y col.*, 1999b), debido a que la estructura de la población del patógeno depende mucho del espectro de susceptibilidad presente en el huésped (*Chen y col.*, 1995). Quizá por el mismo motivo, en las Marismas del Guadalquivir se han observado fuertes variaciones interanuales en la frecuencias relativas de los linajes entre 1999 y 2003 (Lara-Álvarez *y col.*, 2010).

A escala local, Tharreau *y col.* (2009) consiguieron detectar diferencias entre poblaciones que distaban menos de 20 km, en la zona de la Camarga (Francia) y en la parte central de Madagascar. La variación poblacional a tan corta distancia se explica por el corto alcance de la dispersión de las esporas (1-5 m). También Xia *y col.* (2000) observaron variabilidad en los campos de arroz de Arkansas (EEUU). Al analizar más de 1700 aislados de 40 países, Tharreau *y col.* (2009), constataron que la población mundial de *M. oryzae* mostraba una estructuración geográfica, lo que indica una migración limitada entre regiones; aunque algunos aislados de América y África occidental mostraron similitudes con aislados de otras regiones distantes, que pueden achacarse al transporte de material infectado, semillas probablemente (Long *y col.*, 2001).

1.6. Resistencia a *Magnaporthe oryzae* en arroz

1.6.1. La resistencia a enfermedades en las plantas

Las plantas están sometidas continuamente a estreses de tipo biótico. A pesar de carecer de un sistema inmunológico que se adapte al invasor y que produzca anticuerpos móviles o linajes de células inmunológicas especializadas, como en muchos animales, las plantas han desarrollado varios niveles de detección de posibles patógenos, así como una amplia gama de defensas estructurales y químicas que pueden detener o controlar al organismo invasor antes de que pueda causar daño.

La mayoría de veces el patógeno no puede colonizar una determinada especie vegetal (Keen, 1992; Madriz-Ordeñana, 2002), principalmente porque la planta no satisface los requerimientos para una colonización exitosa. A ese tipo de resistencia se le denomina resistencia no-huésped, y ocurre cuando todas las plantas de la especie vegetal son resistentes a todos los linajes del patógeno, que, sin embargo, es capaz de infectar a otras especies vegetales (Heath, 1991; Somerville, 2004). Por ello también se conoce como resistencia a nivel de especie.

Los mecanismos de defensa frente a los patógenos se pueden clasificar en constitutivos o inducidos. Los constitutivos están presentes o activos de manera permanente en la planta, y pueden ser estructurales, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula y de tricomas, la formación de papilas o la deposición de ceras, entre otros; pero también pueden ser químicos, como la acumulación en las células vegetales de compuestos tóxicos. Un ejemplo de defensas químicas constitutivas se observa en las plantas cianogénicas como el sorgo (*Sorghum* sp.) y la yuca (*Manihot esculenta*), que poseen cantidades considerables de compuestos relacionados con el ácido cianhídrico (Osbourn, 1996). A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos de resistencia inducida se activan sólo como respuesta al ataque de algún patógeno (Collinge *y col*., 1994). Son mecanismos activos, que implican cambios en el metabolismo causados por la expresión diferencial de genes, y que requieren, por lo tanto, de un sistema de reconocimiento de la presencia del patógeno.

Para estudiar cualquier interacción planta-patógeno es necesario tener en cuenta tanto la virulencia o avirulencia del patógeno como la resistencia o susceptibilidad de la planta. Dependiendo del resultado final de la interacción entre planta y patógeno, se habla de interacción compatible cuando el patógeno es capaz de desarrollar la enfermedad, mientras que se dice que una interacción es incompatible cuando la planta dispone de mecanismos de defensa que impiden el desarrollo de la enfermedad. Se han utilizado muchos términos para describir la resistencia a enfermedades, a veces con diferentes significados (van der Plank, 1968). En el presente trabajo nos referimos a una resistencia completa cuando la reproducción del patógeno se ve completamente inhibida. En cambio, una resistencia parcial sería aquella en que se permite la reproducción del patógeno, aunque de forma significativamente menor que en un genotipo susceptible (Parlevliet y Ommeren, 1975). A la resistencia completa también se la llama resistencia cualitativa, porque su efecto se clasifica fácilmente en categorías y está determinada por uno o pocos

genes. Por el contrario, a la resistencia parcial se le conoce también como resistencia cuantitativa, porque habitualmente el fenotipo varía de forma gradual entre resistente y susceptible y está determinada por varios genes de efectos pequeños. El término “resistencia de campo” se ha utilizado a veces como sinónimo de resistencia parcial. Por otra parte, una resistencia específica es aquella que es efectiva sólo contra una o pocas razas del patógeno, mientras que una resistencia de amplio espectro, no-específica u horizontal, es efectiva contra un gran número de razas. Por último, se dice que una variedad tiene resistencia duradera cuando ésta permanece efectiva mientras es cultivada ampliamente durante un tiempo prolongado (Johnson, 1981).

1.6.1.1. Bases moleculares del sistema inmunológico de la planta

El sistema inmunológico de la planta puede describirse como dos respuestas operando en escalas temporales distintas (Jones y Dangl, 2006). Según ese modelo, se trata de un proceso de interacción planta-patógeno en zigzag, en el que se va oscilando a lo largo del tiempo entre un estado compatible y otro incompatible. Los patógenos, con el tiempo, se adaptan y encuentran formas de vencer al sistema inmunológico, mientras que la planta huésped responde con nuevos sistemas de defensa. Al comienzo de una infección, la planta huésped reconoce caracteres comunes a muchos microorganismos, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; como por ejemplo la flagelina, lipopolisacáridos bacterianos, o la quitina fúngica), mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Este reconocimiento activa la respuesta inmunitaria innata (también llamada defensa basal o inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI)) para detener el desarrollo del patógeno; puesto que las moléculas reconocidas están presentes en numerosos organismos, esta respuesta puede ser activada también por especies no patógenas.

Algunos patógenos pueden bloquear las defensas basales al segregar unas proteínas llamadas efectores, codificadas por los genes Avr, que interrumpen la respuesta normal. El resultado es una susceptibilidad desencadenada por efectores (effector-triggered sensibility, ETS). Como contrapartida, las plantas resistentes son capaces de reconocer específicamente un efector concreto mediante la acción de proteínas codificadas por los llamados genes R (Parker y Coleman, 1997), a los que dedicamos el siguiente apartado; se desencadena así una respuesta de defensa mucho más amplificada y más rápida que la basal, llamada inmunidad desencadenada por efectores (ETI). Los genes R no serían, pues, responsables directos de la resistencia, sino que tienen una función determinante de especificidad de reconocimiento, actuando como iniciadores de la defensa (De Wit, 1997). La ETI implica, generalmente, una respuesta hipersensible (HR), que se caracteriza por una muerte celular local (Van Loon, 1997; Agrios, 2005): las células muertas rodean al patógeno, que, al no encontrar células vivas que parasitar, no puede extenderse. La resistencia completa puede ser superada por el patógeno si se produce alguna mutación que conlleve la desaparición o un cambio en el efector, o la aparición de efectores adicionales que supriman la ETI. Esto causaría una fuerte presión de selección sobre las plantas, para que aparezca un nuevo gen R capaz de activar nuevamente la respuesta ETI.

Este tipo de interacción planta-patógeno está caracterizado por fenotipos extremos (muy resistentes o muy susceptibles), aunque existen loci modificadores que pueden

moderar la intensidad de la respuesta mediada por los genes R (Hu *y col.*, 1997; Penning *y col.*, 2004). Según Katagiri y Tsuda (2010), la respuesta innata y la inducida por efectores son estrategias complementarias en la defensa frente a patógenos: ya que la respuesta ETI es una respuesta muy fuerte, que requiere muchos recursos (Bolton, 2009) y perjudica el estado de la planta (el ejemplo más obvio es la respuesta hipersensible, que conlleva la muerte celular), el coste de que este mecanismo se activara fácil y rápidamente sería excesivo. Por ello, las plantas han desarrollado la débil e inespecífica respuesta PTI para los estadios iniciales de la invasión. Los efectores son específicos de patógenos potentes, para los que una respuesta ETI, rápida y fuerte, es más apropiada; además en este caso es difícil para los efectores bloquear la rápida respuesta molecular de la ETI.

Una vez reconocido el patógeno, se ponen en marcha una serie de reacciones en cascada, iniciadas en la membrana plasmática y que culminan en el núcleo celular, con la inducción de la expresión de genes de defensa (Nürnberger y Scheel, 2001). Esta transducción de señales puede ser de varios tipos: activación de una cascada de protein-quinasas, explosión oxidativa, o inducción de un flujo de iones a través de la membrana, entre otros. En algunos casos la PTI y la ETI utilizan los mismos mecanismos de transducción de señales (Grant y Mansfield, 1999; Tsuda *y col.*, 2009). Por ello, Katagiri y Tsuda (2010) sugieren que ambos tipos de respuesta comparten una misma red con varias ramas interconectadas. No obstante, parece que, según el patógeno, se inducen distintas rutas de transducción de señales que activan diferentes partes de la maquinaria de defensa (Feys y Parker, 2000).

Las primeras reacciones que se observan son alteraciones en el flujo de iones a través de la membrana (entrada de H^+ y Ca^{2+} y salida de K^+ y Cl^-), y la formación de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), como el superóxido (O_2^-) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); ambos compuestos pueden generar otras especies de oxígeno aún más reactivas, que producen daños tanto en el patógeno como en el huésped. A altas dosis, los ROI desencadenan la muerte celular programada. También el óxido nítrico (NO) tiene un papel importante en el desencadenamiento de la respuesta hipersensible y en la expresión de genes de defensa (Hausladen y Stamler, 1998). Otra molécula asociada a la inducción de los mecanismos de defensa es el ácido salicílico (SA). Los ROI, el NO y el SA interactúan de forma directa y cooperativa en el mecanismo de amplificación de la señal (McDowell y Dangl, 2000). En cambio, en el caso de hongos necrótrofos, la transducción de señales está generalmente regulada por ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). En el proceso de transmisión de la señal también participan protein-quinasas dependientes de calcio (CDPKs) o activadas por mitógeno (MAPKs).

Cuando la señal alcanza el núcleo celular y se activan los mecanismos de defensa, se pueden producir distintos tipos de respuestas, como un reforzamiento de la pared celular por acumulación de componentes estructurales de ella, la expresión de genes de defensa basal, o la muerte celular. En *Arabidopsis*, tras la inoculación con diversos patógenos, cientos, e incluso miles, de genes se expresan durante y después de la detección de un patógeno; de hecho, hasta el 25% de los genes muestran un alteración en su nivel de transcripción (Maleck *y col.*, 2000; Glazebrook, 2001; Tao *y col.*, 2003). Entre los compuestos producidos por la célula tras la invasión del patógeno destacan una serie de proteínas, que de una manera genérica se han denominado proteínas asociadas a la patogénesis o proteínas PR (Datta *y col.*, 1999; van Loon, 1999; van Loon y van Strien,

1999; Muthukrishan *y col.*, 2001), aunque en algunos casos también se inducen por otros tipos de estreses (Van Loon *y col.*, 2006). Estas proteínas se clasifican de acuerdo a su actividad en diecisiete familias: con actividad antifúngica, como las β-1,3-glucanasas (Familia PR-2), las quitinasas (Familias PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11), las ribonucleasas (Familia PR-10), las defensinas (Familia PR-12), las tioninas (Familia PR-13) y las oxalato-oxidasas (Familia PR-15). Existen muchos otros compuestos que también se acumulan como parte de la respuesta de defensa de la planta, como las fitoalexinas o las enzimas chalcona sintasa (CHS), flavanona-3-hidroxilasa (F3H) y fenilalanil-amonioliasa (PAL), las enzimas de estrés oxidativo, de reparación de tejidos, lignificación y de otros procesos relacionados.

Las plantas no activan la respuesta de defensa sólo en el punto concreto de ataque del patógeno, sino también en tejidos sanos, en preparación a un ataque posterior; este fenómeno se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR). Se sabe poco acerca de la naturaleza de la señalización en la SAR, pero al parecer se trata de una molécula lipídica que induce la acumulación de SA (Maldonado *y col.*, 2002; Durrant y Dong, 2004), desencadenando una cascada de señales en la que es esencial la proteína NPR1 (*non-expressor of PR1*), y que culmina con la expresión de numerosos genes *PR*. Un fenómeno similar, la resistencia sistémica inducida (ISR), por el que las plantas incrementan el nivel de resistencia como respuesta a un estímulo biótico (la colonización de las raíces por rizobacterias no patógenas), requiere tanto NPR1, como JA y ET.

Tipos de genes R

Con los datos acumulados hasta el momento se pude afirmar que los genes R deben, tanto reconocer la señal procedente del patógeno, como iniciar la reacción de defensa (García-Más *y col.*, 2004). Desde 1992 se han clonado muchos genes R, la mayoría de los cuales se pueden agrupar en unos pocos grupos según el tipo de proteínas que codifican, siendo 4 los tipos principales (Hammond-Kosack y Kanyuka, 2007). La clase más numerosa, y la más estudiada, está constituida por genes que codifican proteínas con dominios NBS-LRR (NBS *nucleotide-binding site* o zona de unión de nucleótidos; LRR: *leucine rich repeat*; repeticiones de bloques de aminoácidos ricos en leucina) (Hulbert *y col.*, 2001; Chisholm *y col.*, 2006). Se cree que el dominio LRR está involucrado en interacciones entre proteínas, en uniones de péptidos con ligandos y en interacciones entre proteínas y carbohidratos (Jones y Jones, 1996; Kajava, 1998); mientras que el dominio NBS está implicado en la transducción de señales (Pan y *col.*, 2000). El dominio NBS está constituido por subdominios, entre los que merecen especial mención: el dominio quinasa 1a (también conocido como “P-loop”); el dominio TIR (“Toll/Interleukin-1 Receptor”), presente sólo en un subgrupo de genes; y el dominio de estructura CC (*coiled-coil*, en hélice superenrollada), que estaría implicado en la formación de dímeros o en interacciones con otras proteínas, y que define otro subgrupo (Dangl y Jones, 2001; Chisholm y *col.*, 2006). Todos los genes de este grupo en las plantas monocotiledóneas parecen ser del subgrupo CC-NBS-LRR, pues los 600 genes NBS-LRR conocidos en arroz lo son (Bai *y col.* 2002; Zhou *y col.*, 2004). La especificidad en la detección de razas de este tipo de genes R reside básicamente en el dominio LRR (McDowell *y col.* 1998; Meyers *y col.* 1998; Ellis *y col.*, 1999; Sun *y col.* 2001), ya que es la zona que se supone que se puede ligar a (y por tanto reconocer) la proteína

segregada por el patógeno; además, es el dominio más polimórfico en este grupo de genes (Ellis *y col.*, 2000; Ellis y Jones, 2003). Pero también otros dominios pueden estar implicados (Ellis *y col.*, 1999; Luck *y col.*, 2000). Otra característica interesante es que es frecuente encontrar agrupaciones de genes NBS-LRR en el genoma de las especies vegetales (Michelmore y Meyers, 1998; Meyers *y col.*, 1999; Richter y Ronald, 2000; Richly *y col.*, 2002; Liu *y col.*, 2010a). En arroz, algunos de estos genes confieren resistencia frente a *Xanthomonas oryzae* y/o *Magnaporthe oryzae* (Song y Goodman 2001; Bryan *y col.* 2000; Ashikawa *y col.* 2008; Shang *y col.* 2009; Liu *y col.* 2010a), pero la función de la mayoría de genes CC-NBS-LRR aún es desconocida.

Otro tipo de genes R codifican serín-treonín-quinasas intracelulares; el más representativo de este grupo es el gen *Pto* del tomate (Martin *y col.*, 1993). El tercer grupo son los genes *Cf* de tomate (Jones *y col.*, 1994); sus proteínas tienen un dominio LRR extracelular (eLRR), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta. La disposición extracelular del dominio LRR puede indicar una función de centinela en el reconocimiento del patógeno (Gabriel, 1999), por lo que se las conoce como proteínas similares a receptores (RLP). La última clase de genes R codifica proteínas con estructuras comunes a los dos tipos anteriores: contienen los dominios eLRR y transmembrana similares a los de los genes *Cf*, así como un dominio serín-treonín-quinasa intracelular similar a la del gen *Pto* de tomate, y se conocen como protein quinasas similares a receptores (RLK); ejemplos de este grupo son los gen *Xa21* y *Xa26* del arroz, que confieren resistencia frente a *X. oryzae* pv *oryzae* (Wang *y col.*, 1998; Sun *y col.*, 2004). Recientemente se han caracterizado nuevos genes de resistencia que presentan similitudes con los cuatro grupos anteriormente descritos, pero con ligeras particularidades en su estructura. Se puede encontrar un amplio listado de los genes de resistencia caracterizados en revisiones como la de Hammond-Kosack y Kanyuka (2007).

Puesto que tienen estructuras comunes y probablemente el mismo mecanismo de actuación, se asume que los genes R tienen un origen común (Caicedo *y col.*, 1999). Se cree que los mecanismos de evolución de los genes R se deben a dos causas principales: la recombinación desigual entre distintos genes dentro de una de las frecuentes agrupaciones, y la acumulación de mutaciones en miembros de una familia multigénica (resultante de la duplicación de un gen R ancestral); otra posibilidad es la actividad de transposones, que suelen causar alteraciones en la actividad de los genes en que están insertados (Bennetzen, 2000); de hecho, se han encontrado muchos tipos de transposones en clusters de genes R (Song *y col.*, 1997; Wei *y col.*, 2002; Miyao *y col.*, 2003; Takahashi *y col.*, 2010).

Reconocimiento de los efectores

Hay varios modelos para explicar el mecanismo de reconocimiento de efectores por parte de las proteínas de los genes *R*. El más sencillo es aquel en el que la proteína R reconoce directamente a la proteína Avr (Keen, 1990), por ejemplo a través de los dominios LRR, como se ha comprobado que ocurre en algunos casos (Scofield *y col.*, 1996; Tang *y col.* 1996; Jia *y col.* 2000; Deslandes *y col.*, 2003; Dodds *y col.*, 2006; Ueda *y col.*, 2006); por ejemplo, en arroz, el dominio LRR de la proteína codificada por el gen *Pita* se liga directamente al producto del gen de avirulencia (*Avr-Pita*) de *Magnaporthe oryzae* (Jia *y*

col., 2000). Pero en muchas otras combinaciones R/Avr no se ha podido observar una interacción directa. Por el contrario, el "modelo de guardia" propone que el efector modifica una molécula de la planta relacionada con la respuesta basal y que sería la alteración en esa molécula diana la detectada por la proteína R (van der Biezen y Jones, 1998; Dangl y Jones, 2001); se han encontrado varias moléculas que podrían ser dianas de los efectores (Jones y Dangl, 2006). Este mecanismo explica que una proteína de un gen R sea capaz de detectar a varios efectores, permitiendo así que una colección pequeña de genes R pueda conferir resistencia a una gran diversidad de patógenos. No obstante, dado que muchos efectores tienen varias dianas en la planta huésped, van der Hoorn y Kamoun (2008) proponen un nuevo modelo en el que existe en la planta una molécula señuelo que imita a la molécula diana del efector, pero sin tener función en la respuesta de defensa; la proteína R detectaría la alteración en esa molécula señuelo.

1.6.1.2. Resistencia completa y genes R

En los años 1940 Flor, tras estudiar en profundidad la resistencia del lino (*Linum usitatissimum)* al hongo *Melampsori lini* (roya del lino), propuso la hipótesis gen-a-gen, que postula que "un gen de resistencia es efectivo sólo si el patógeno que infecta a la planta posee el correspondiente gen de avirulencia" (Flor, 1955). Los genes de resistencia del huésped reciben el nombre de genes R y los genes de avirulencia del patógeno de denominan Avr. En general la resistencia y la avirulencia son dominantes sobre susceptibilidad y virulencia. Por otra parte, los genes R confieren normalmente resistencia específica.

Como ya se ha comentado, muchas interacciones de tipo *Avr/R* conllevan una respuesta hipersensible (HR), en la que el patógeno permanece confinado en la zona de la lesión necrótica. Pero se han encontrado otros mecanismos desencadenados por genes R, como la detoxificación de toxinas fúngicas (p. ej., *Hm1* y *Hm2* en maíz (Johal, y Briggs, 1992)), la modulación de la respuesta de defensa (p. ej., *mlo* en cebada (Büschges *y col.*, 1997)) y la regulación de la transcripción (p. ej., *Bs3* en pimiento (Romer *y col.*, 2007)). Respecto a la muerte celular por HR, datos recientes sugieren que está controlada genéticamente (Shirasu y Schulze-Lefert, 2000), y que sería la última etapa de una respuesta de resistencia que sólo se utilizaría una vez sobrepasado un determinado umbral de señales de estrés celular. La HR es un mecanismo de defensa activo, que puede encontrarse frente a infecciones de muy distinto origen, e incluso insectos (Rubiales y Niks, 2004); sin embargo, en el caso de hongos necrótrofos, puede aumentar la susceptibilidad de la planta, ya que el patógeno puede explotar la muerte programada de células para adquirir nutrientes. De hecho, dos estudios han descrito cómo patógenos necrótrofos pueden producir toxinas que activan la muerte celular programada (Nagy *y col.*, 2007; Lorang *y col.*, 2007).

1.6.1.3. Mecanismos moleculares de la resistencia parcial

Hay varias hipótesis sobre la naturaleza de la resistencia parcial, y es probable que la amplitud de las respuestas sea debida a que hay diversos mecanismos implicados en ella (Poland *y col.*, 2009). En primer lugar, siguiendo la hipótesis de que los QTLs son alelos

"menores" de genes "mayores" (Thompson, 1975; Robertson, 1985), la resistencia parcial estaría controlada por genes de resistencia completa que han sido superados por el patógeno (Parlevliet y Zadoks, 1977; Young, 1996; Talukder *y col.*, 2004). De hecho, esto es así, por ejemplo, en el caso del gen *Xa4* de resistencia a *Xanthomonas oryzae* en arroz: aun cuando alguna cepa del patógeno supera la resistencia controlada por *Xa4*, las plantas que contienen el alelo resistente siguen siendo más resistentes que las que no lo poseen (Li *y col.*, 1999); este fenómeno, llamado "resistencia residual", también se ha observado en otros sistemas planta-patógeno (Nass *y col.*, 1981; Brodny *y col.*, 1986). Igualmente, los QTLs que muestran resistencia específica pueden indicar que el mecanismo de defensa es el mismo que el de los genes R, sólo que con una respuesta más débil (Parlevliet y Zadoks, 1977; Parlevliet, 1978; Zenbayashi-Sawata *y col.*, 2005; Marcel *y col.*, 2008). Finalmente, otra observación que apoya esta teoría, es que varios QTLs de resistencia co-localizan con genes R en arroz (Wang *y col.*, 1994; Wisser *y col.*, 2005; Ballini *y col.*, 2008; Vergne *y col.*, 2008), maíz (Xiao *y col.*, 2007) y patata (Gebhardt y Valkonen, 2001).

Otras hipótesis, sin embargo, sostienen que los QTLs de resistencia regulan mecanismos de defensa diferentes a los controlados por los genes R. Una mutación que introduzca una variación cuantitativa que afecte a alguno de los múltiples procesos implicados en la respuesta de la planta, podría explicar porqué los QTLs provocan variaciones fenotípicas de menor grado que cuando se expresan genes R. Los QTLs podrían estar implicados en la defensa basal (PTI), ya que se han observado mutaciones en genes de reconocimiento genérico de patógenos (genes PRR) que reducen el nivel de resistencia a determinados patógenos (Zipfel *y col.*, 2004; Ramonell *y col.*, 2005; Miya *y col.*, 2007; Wan *y col.*, 2008). También se ha propuesto que los QTLs de resistencia están implicados en la transducción de señales, puesto que se han encontrado numerosos ejemplos de componentes de la red de transducción que condicionan el nivel de resistencia cuando son mutados (Petersen *y col.*, 2000; Kunkel y Brooks, 2002; Zheng *y col.*, 2006; Koornneef y Pieterse, 2008); por ejemplo, existe una fuerte correlación entre diferentes alelos del gen *StAOS2* de la patata que regula el nivel de JA, y el nivel de resistencia frente a *Phytophthora infestans* (Pajerowska-Mukhtar y *col.*, 2009). Se han hallado igualmente correlaciones entre QTLs de resistencia a enfermedades y proteínas PR (Vleeshouwers *y col.*, 2001) y el nivel de la fitoalexina camalexina en el sistema *Arabidopsis-Botrytis* (Kliebenstein *y col.*, 2005), así como co-localización de QTLs de resistencia con genes de la familia de las glutation S-transferasas en arroz (Wisser *y col.*, 2005), lo que podría indicar que los QTLs controlan la producción de estos compuestos de defensa.

Finalmente, es posible que los genes de resistencia cuantitativa sean un tipo de genes diferentes a los conocidos hasta el momento, ya que ninguno de los genes de resistencia parcial clonados hasta ahora se asemeja a los genes *R* conocidos: los genes *Lr34* e *Yr36* en trigo (Krattinger *y col.*, 2009; Fu *y col.*, 2009) y los genes *pi21* y *Pb1* en arroz (Fukuoka *y col.*, 2009; Hayashi *y col.*, 2010).

1.6.2. Genética de la resistencia a *Magnaporthe oryzae* en arroz

Sasaki (1923) comenzó a estudiar por primera vez la interacción entre genes de resistencia y *M. oryzae* en 1917, sólo unos años después de que se hubiese demostrado

que la resistencia a enfermedades en plantas estaba controlada genéticamente. Observó cómo variedades resistentes a una raza del hongo eran susceptibles a otra. Le siguieron un número considerable de ensayos, siendo los realizados hasta 1959 recopilados por Takahashi para el simposio sobre piriculariosis de 1963 (Takahashi, 1965). Hasta la década de los 60 no se tenía suficiente conocimiento acerca de la especificidad patogénica del hongo, lo que dificultaba el estudio de su interacción con la planta huésped. Sólo después de que Goto (1965) estableciera un sistema diferencial para las razas de *M. oryzae* en Japón, se pudieron realizar estudios más sistemáticos. En la mayoría de casos, la interacción arroz/*M. oryzae* sigue el modelo gen-a-gen y a los genes R frente a *M. oryzae* se les denomina *Pi* (por el nombre de la forma asexual del hongo: *Pyricularia oryzae*). Con la secuenciación del genoma del arroz y de *M. oryzae*, la piriculariosis se ha convertido en enfermedad modelo para estudiar las interacciones planta-patógeno en monocotiledóneas (Valent 1990; Veneault-Fourrey y Talbot, 2005; Ebbole, 2007; Faivre-Rampant *y col.*, 2008).

1.6.2.1. Genes de resistencia a *Magnaporthe oryzae*

Atkins y Johnston (1965) identificaron los dos primeros genes de resistencia a *M. oryzae* en arroz y los llamaron *Pi1* y *Pi6(t)*. A partir de entonces, se han realizado abundantes estudios de resistencia específica en numerosas variedades (algunas de las cuales poseen tres o más genes de resistencia), y utilizado diferentes aislados del patógeno para describir nuevos genes de resistencia. La revisión de Koide *y col.* en 2009 recopila la información de 96 genes de resistencia completa a *M. oryzae* en arroz, aunque tres de ellos provienen de las especies *O. minuta* (Liu *y col.*, 2002), *O. australiensis* (Jeung *y col.*, 2007), y *O. rufipogon* (Ballini *y col.*, 2007). Los genes de resistencia están descritos en bases de datos como Gramene (http://www.gramene.org) y OryGenesDB (http://orygenesdb.cirad.fr/).

Pese a existir unas claras pautas de nomenclatura establecidas (Kinoshita *y col.*, 1994), algunos genes se han nombrado sin seguirlas, con lo que se han producido casos de genes homónimos (como ocurre con los genes *Pi21(t)* y *pi21*, o con dos genes distintos denominados *Pi12*), y sinónimos (como, por ejemplo, *Pi2*/*Piz* o *Pid3*/*Pi25(t)*). Por otra parte, algunos de los genes recopilados podrían ser en realidad alelos de un mismo gen, que confieran resistencia específica a diferentes linajes del patógeno. Esto es importante para los mejoradores, pues no se pueden incorporar dos alelos de un mismo locus en una variedad, pero sí dos genes distintos. Hasta el momento se han realizado pocos tests de alelismo, puesto que es difícil distinguir entre alelismo y genes estrechamente ligados, lo cual, como se ha comentado, es frecuente en el caso de los genes *R* (Notteghem *y col.*, 1994; Sallaud *y col.*, 2003; Deng *y col.*, 2006; Yang *y col.*, 2009).

Se ha logrado localizar a muchos de estos genes de resistencia en el genoma del arroz. Aunque hay genes *Pi* distribuidos por todo él, la mayoría se encuentran en determinadas regiones, particularmente en tres cromosomas: al menos doce genes R se encuentran en el cromosoma 6, cerca del centrómero (*Pi2*, *Piz*/*Piz-t*/*Piz-5*, *Pi8*, *Pi9*, *Pi13*, *Pi25(t)*, *Pi26(t)*, *Pi27(t)*, *Pid2*, *Pigm(t)*, *Pi40(t)* y *Pi50*); nueve se localizan en el brazo largo del cromosoma 11 (*Pi1*, *Pi7(t)*, *Pi18(t)*, *Pif*, *Pi34*, *Pi38*, *Pi44(t)*, *PBR* y *Pilm2*); y diecisiete alrededor del centrómero del cromosoma 12 (*Pita*, *Pita-2*, *Pitq6*, *Pi6(t)*, *Pi12*, *pi12*, *Pi19(t)*, *Pi20(t)*, *Pi21(t)*, *Pi24(t)*, *Pi31(t)*, *Pi32(t)*, *Pi39(t)*, *Pi62(t)*, *Pi157*, *IPi(t)* y *IPi3(t)*). Tanto estos tres clusters como otros genes *Pi*, están estrechamente asociados a agrupaciones de

secuencias homólogas a los genes NBS-LRR (Monosi *y col.*, 2004; Ballini *y col.*, 2008; Koide *y col.*, 2009). Por lo tanto, esta distribución no aleatoria de genes *Pi* parece deberse, en parte, a la particular distribución de los genes NBS-LRR en el genoma.

La Tabla 10 muestra los 17 genes *Pi* clonados hasta el momento. En algunos de estos loci se han podido identificar varios alelos; es el caso de *Piz* (*Piz*, *Piz-5y Piz-t*). Todos los genes de resistencia clonados, salvo *pi21* y *Pid2*, pertenecen al tipo CC-NBS-LRR. A continuación se hace una breve descripción de los datos más relevantes de estos genes.

El gen *Pib* en el cromosoma 2 fue el primer gen de resistencia a *M. oryzae* en ser clonado (Wang *y col.*, 1999). Es miembro de una pequeña familia de genes que codifican una proteína NBS-LRR citoplasmática sin dominio transmembrana. Su expresión está regulada por señales medioambientales como temperatura, luz, agua, y por JA, SA, etileno y probenazol.

Pita, en el cromosoma 12, confiere resistencia a un amplio espectro de linajes de *M. oryzae*, y se ha identificado en 89 entradas de germoplasma en todo el mundo (Bryan *y col.*, 2000). Requiere del gen *Ptr,* al que está ligado, para ejercer su función de reconocimiento y transducción de señales (Jia y Martín, 2008). Sólo un aminoácido difiere entre las proteínas codificadas por los alelos susceptible y resistente de *Pita*.

Tanto *Pi9* como el par alélico *Pi2/Piz-t* se localizan en un cluster de genes *R* en el cromosoma 6 (Liu *y col.*, 2002). Ambos genes confieren resistencia de amplio espectro y se expresan constitutivamente. *Pi9* procede de una introgresión de la especie silvestre *Oryza minuta* (Sitch *y col.* 1989; Amante-Bordeos *y col.* 1992), lo que puede explicar que su efectividad sea duradera, puesto que ha estado expuesto a la presión de la selección natural durante mucho tiempo (Liu *y col.* 2002). Respecto a los alelos *Pi2* y *Piz-t*, sólo les distinguen ocho diferencias en la secuencia de aminoácidos, y su especificidad (Zhou *y col.*, 2006).

En el cromosoma 11 se han identificado seis genes *R* en un cluster que se conoce como locus Pik: se trata de los genes *Pik*, *Pi1*, *Pik-m*, *Pik-h*, *Pik-p*, y *Pik-s* (Hayashi *y col.* 2006; Li *y col.* 2007a; Xu *y col.*, 2008; Wang *y col.*, 2009a), muchos de los cuales confieren resistencia de amplio espectro duradera. Varios de estos genes (*Pik-m, Pik-p, Pik* y *Pi1*) requieren, en realidad, de la expresión de dos genes adyacentes para que haya resistencia completa; todos ellos tienen la estructura básica de los genes NBS-LRR (Ashikawa *y col.*, 2008; Yuan *y col.*, 2011; Zhai *y col.*, 2011; Hua *y col.*, 2012).

Hay otros casos similares: el gen *Pia*, en otra región del cromosoma 11, también con dos genes adyacentes, orientados en dirección opuesta, que se expresan constitutivamente, y que codifican proteínas NBS-LRR diferentes (Okuyama *y col.*, 2011); y *Pi5(t)*, en el cromosoma 9 , cuya función completa es conferida por los genes adyacentes *Pi5-1* y *Pi5-2*, en una región de 130 kb, el primero inducido por el patógeno, mientras que el segundo se expresa constitutivamente (Lee *y col.*, 2009). Este hecho se ha detectado también en tomate, donde la función del gen de resistencia completa *Pto* requiere de la presencia de un producto de otro gen, *Prf*. Lee *y col.* (2009) proponen que la necesidad de dos genes podría explicarse por el “modelo de guardia”, de modo que uno de los genes codificaría una molécula diana del efector, y el otro la proteína R que detecta la alteración

Tabla 10. Sumario de los genes *Pi* clonados.[1] Nombre del gen o de los sinónimos, [2] longitud en aminoácidos de la proteína codificada, [3] variedad y subespecie o especie de la que se aisló el alelo resistente. Abreviaturas: Cr = cromosoma; cM = centimorgan; Estr. loc = estructura local; Loc. celular = localización celular; Long = longitud; Pos = posición; subespecie: ind = indica; jap = japonica.

Gen [1]	Cr.	Pos. (cM)	Estr. loc.	Tipo	Long.[2]	Loc.celular	Expresión	Variedad [3]	Referencia
Pit	1		múltiple	CC-NBS-LRR		-	Inducible		Hayashi y Yoshida, 2009
Pi37	1	136,1	4 genes	CC-NBS-LRR	1.290	citoplasma	constitutiva	St.No.1 (jap)	Lin *y col.*, 2007
Pish	1		múltiple	CC-NBS-LRR		-	constitutiva		Takahashi *y col.*, 2010
Pib/Pis	2	154,1	2 genes	CC-NBS-LRR	1.251	-	inducible por estrés	Tohoku IL9 (jap)	Wang *y col.*, 1999
Pi21	4		múltiple	CC-NBS-LRR/ rico en prolina Resistencia parcial		citoplasma	Inducible por estrés		Fukuoka *y col.*, 2009
Pi9	6	58,7	9 genes	CC-NBS-LRR	1.032	-	constitutiva	75-1-127 (101141) Oryza minuta	Qu *y col.*, 2006
Pi2/Pizt	6	58,7	9 genes	CC-NBS-LRR	1.033	-	constitutiva	IR56 (jap)	Zhou *y col.*, 2006
Pid2	6	65,8	simple	B lectina	825	membrana	constitutiva	Digu (ind)	Chen *y col.*, 2006
Pi36	8	21,6-25,2	simple	CC-NBS-LRR	1.058	-	constitutiva	Q61 (ind)	Liu *y col.*, 2007
Pi5(t)	9		múltiple	CC-NBS-LRR		-	*Pi*5-1 dependiente del patógeno *Pi*5-2 constitutiva		Lee *y col.*, 2009
Pid3	-		múltiple	CC-NBS-LRR		-	constitutiva		Shang *y col.*, 2009
Pib1	11		múltiple	CC-NBS-LRR Resistencia parcial		-	Inducible		Hayashi *y col.*, 2010
Pia	11		múltiple	CC-NBS-LRR		-	constitutiva		Okuyama *y col.*, 2011
Pik	11		múliple	CC-NBS-LRR		-	constitutiva		Zhai *y col.*, 2011
Pik-m	11		múltiple	CC-NBS-LRR		-	constitutiva		Ashikawa *y col.*, 2008
Pik-p	11		múliple	CC-NBS-LRR		-	constitutiva		Yuan *y col.*, 2011
Pita/Pi4	12	50,4	2 genes	NBS-LRR	928	citoplasma	constitutiva	Yashiro-mochi (jap)	Bryan *y col.*, 2000

de la molécula diana y desencadena la respuesta de defensa. Okuyama *y col*. (2011) sugieren que la participación de más de un gen en la resistencia completa podría ser más frecuente de lo detectado hasta el momento, ya que el método convencional de clonación sólo detectaría el locus polimórfico, y no la posible existencia de un segundo locus monomórfico necesario para la respuesta de defensa.

Pid2, en el cromosoma 6, se expresa constitutivamente. La proteína Pid2 contiene un dominio de unión ß-lectina que no se ha encontrado hasta el momento en ningún otro gen R. Como en *Pita*, sólo la sustitución de un aminoácido distingue los alelos resistente y susceptible; lo mismo ocurre en *Pi36* (cromosoma 8). Es posible que esta sustitución se haya producido en la región activa de la proteína y afecte a la interacción con otras moléculas (Hanzawa *y col*. 2005).

El gen de resistencia en panícula *Pb1*, en el cromosoma 11, confiere resistencia sólo en estado adulto (Fuji *y col*., 2000). Esta resistencia es parcial para hoja y panícula, y de amplio espectro. *Pb1* codifica una proteína CC-NBS-LRR atípica, especialmente en el dominio NBS. Sorprendentemente, parece carecer del dominio “P-loop”, que se considera esencial para la unión a nucleótidos e indispensable para la función de una proteína NBS-LRR (Tameling *y col*., 2002; Tornero *y col*., 2002). Esta estructura atípica de la proteína sugiere un mecanismo diferente de activación de la respuesta inmunológica, y podría ser una de las claves para la durabilidad de la resistencia exhibida por las variedades portadoras de este gen.

Pit, en el cromosoma 1, también confiere resistencia de amplio espectro. El alelo resistente tiene al retrotranposón *Renovator* funcionando como promotor del gen *Pit*. Parece ser que la inserción de un promotor delante de la secuencia de RGA (análogo a gen de resistencia) es un mecanismo frecuente de creación de nuevos genes R (Hayashi y Yoshida, 2009), como también se ha sugerido para *Pb1*.

Otro gen que confiere resistencia de amplio espectro es *pi21*, aunque su expresión depende de factores de estrés. Se identificó originariamente como un QTL en el cromosoma 4 (Fukuoka y Okuno, 2001). A diferencia de los otros genes *Pi* conocidos, es el alelo recesivo el que confiere la resistencia; y no pertenece a ninguna de las clases de genes R descritas hasta el momento. El alelo susceptible parece ralentizar la respuesta de defensa, mientras que, en las plantas con el alelo resistente, se ha producido una deleción que inhibe esta ralentización.

El resto de genes clonados (*Pi37*, *Pish* y *Pid3/Pi2*) son de expresión constitutiva.

1.6.2.2 Durabilidad de la resistencia a *Magnaporthe oryzae*

A pesar de la relativamente larga historia de los estudios acerca de la genética de la resistencia a *M. oryzae*, hay pocas variedades con resistencia duradera (Ou, 1985). La estrategia utilizada hasta ahora era la acumulación de genes *Pi*, pero la norma general es que la resistencia de una variedad es superada (también se dice que se rompe) a los pocos años de que ésta empiece a cultivarse (Ezuka, 1972; Jeanguyot, 1983; Ou, 1985; Bonman *y col*., 1986; Yaegashi, 1994). Ou concluyó en 1985 que “algunas variedades muestran una pérdida de la resistencia después de unos pocos años y otras resultan ser susceptibles en

otras áreas geográficas. El problema se produce por la variabilidad en la patogenicidad del hongo, un factor que en el pasado ha sido subestimado." Aunque el problema también se puede achacar al limitado conocimiento que se tiene de los mecanismos de resistencia (Ballini *y col.*, 2008).

La superación de la resistencia es debida a que la resistencia completa somete al patógeno a una fuerte presión de selección para sobrevivir. Cualquiera de sus genes, ya existente o modificado por mutación, que sea capaz de superar esa barrera se verá claramente favorecido por la selección natural, más aún en las condiciones de grandes monocultivos de la agricultura moderna. La probabilidad de que ocurra alguna mutación en la población del hongo que consiga romper la resistencia es relativamente alta, debido al corto ciclo reproductivo del patógeno y a las numerosas esporas producidas (McDonald y Linde, 2002).

Puesto que la existencia de resistencia completa no ha resultado efectiva para obtener resistencia duradera, se han utilizado estrategias tales como la piramidación de varios genes *Pi* en una misma variedad (Zeigler *y col.*, 1994), la utilización de multilíneas (Abe, 2004) o la mezcla de variedades (Zhu *y col.*, 2000; 2005; Leung, 2003; Castilla *y col.*, 2003). Sin embargo, en los últimos tiempos se ha observado que las variedades que sí muestran resistencia duradera como la variedad *japonica* Moroberekan, poseen un conjunto de genes de resistencia a *Magnaporthe*, siendo algunos de resistencia parcial y otros de resistencia completa (Bonman y Mackill, 1988; Wang *y col.*, 1994). Moroberekan ha sido cultivada durante muchos años en amplias zonas del oeste de África, región endémica de *M. oryzae*, sin sufrir pérdidas por la enfermedad. Otras variedades con resistencia de amplio espectro y duradera, y dotadas de una combinación de genes de resistencia completa y parcial son las *indica* Oryzica Llanos 5 y Sanhuangzhan 2 (SHZ-2). (Zhu *y col.*, 1996, 2003; Liu *y col.*, 2009; Lopez-Gerena. 2006; Manosalva *y col.*, 2009). Por ello, en la actualidad se considera que la introducción de resistencia parcial, sola o con algún gen R, es la mejor estrategia para alcanzar una resistencia duradera de amplio espectro (Bonman *y col.,* 1992; Hirano 1994; Song y Goodman, 2001; Miyamoto *y col.* 2001; Lindhout, 2002; Parlevliet, 2002; Zenbayashi *y col.* 2002); pues si el cultivo exhibe resistencia parcial, el patógeno no sufre una presión selectiva tan intensa, y no evoluciona tan rápidamente (aparición de nuevos aislados, o predominio de los más virulentos), lo que hace que la resistencia sea más duradera (Parlevliet, 1995; Boyd, 2006).

1.6.2.3. Resistencia parcial a *Magnaporthe oryzae*

Desde los años 70 se han realizado estudios genéticos sobre la resistencia parcial con diversas variedades de arroz (Higashi y Kushibuchi 1978; Higashi y Saito 1985; Lin, 1986; Wang *y col.* 1994; Ahn *y col.* 2000; Zhou *y col.* 2004; Wu *y col.* 2005; Li *y col.* 2007b, 2008a). La mayoría de ellos mostraron que se trata de un carácter complejo, y controlado por múltiples genes con efectos aditivos (Ezuka, 1979; He *y col.*, 1989; Wang *y col.*, 1989; Roumen, 1993), y por interacciones entre ellos y con el medio ambiente (Bonman, 1992). Los caracteres poligénicos como éste están determinados por los llamados QTLs, que se analizarán con detenimiento en el apartado 1.7. Liu *y col.* (2011) demostraron que la acumulación de QTLs de efectos moderados sobre la resistencia a *M. oryzae* puede reducir significativamente la susceptibilidad de la planta. La naturaleza poligénica de la resistencia

parcial también contribuye a su mayor durabilidad, pues una raza del patógeno podría necesitar mutar varios genes para poder superarla.

Wang *y col*. (1994) realizaron el primer análisis de QTLs de resistencia a *M. oryzae* en la variedad Moroberekan. Desde entonces se han publicado muchos estudios de QTLs de resistencia a la enfermedad, y en una revisión bibliográfica reciente, Ballini *y col*. (2008) han encontrado alrededor de 350 QTLs de resistencia a *M. oryzae*; este número es tan elevado porque se recopilan 19 estudios, de distintas poblaciones procedentes de 28 parentales diferentes, y probados frente a diversos aislados o poblaciones de patógeno. Esta información, probablemente redundante, fue utilizada para efectuar un meta-análisis, que estima la probabilidad de que algunos QTLs correspondan *de facto* a un solo QTL (Goffinet y Gerber, 2000). Esta técnica, que ya había dado resultados satisfactorios en otros cultivos y caracteres (Chardon *y col*., 2004; Rong *y col*., 2007; Hanocq *y col*., 2007), se redujo el número a 165 MetaQTLs, de los que sólo un 10% son “robustos”, es decir, habían sido detectados en 4 o más estudios. Aunque estos autores encontraron que buena parte de los QTLs detectaban resistencia parcial, algunos otros corresponden a genes de resistencia completa, ya que la técnica de mapeo de QTLs también sirve para detectar genes mayores (Sallaud *y col*., 2003).

Es de suma importancia que la resistencia sea de amplio espectro, pues las poblaciones del patógeno se componen de una mezcla de diversos linajes. Es una asunción frecuente, aunque no se haya demostrado, que la resistencia completa es específica, mientras que la resistencia parcial es de amplio espectro. Sin embargo, algunos genes de resistencia completa (*Pi1*, *Pi3*, *Pi2/Piz-t*, *Pi5(t)*, *Pi9*, *Pi33*, *Pib1* y *Pigm*), confieren resistencia frente a un amplio espectro de aislados (Jeon *y col*., 2003; Berruyer *y col*., 2003; Deng *y col*., 2006; Mew *y col*., 1994; Qu *y col*., 2006, Zhou *y col*., 2006). Mientras que hay numerosos estudios que demuestran que la resistencia parcial puede ser específica: de los doce genes *Pi* de resistencia parcial (Tabla 11), todos, salvo *pi21*, han sido descritos como específicos (Bonman *y col*., 1989b; Roumen, 1992b; Fuji *y col*., 1995; Fukuoka y Okuno, 1997; Zenbayashi *y col*., 2002; Talukder *y col*., 2004; Lopez-Gerena, 2006). Igualmente, Ballini *y col*. (2008) hallaron que los MetaQTLs de resistencia no tenían un espectro de resistencia particularmente amplio.

Tabla 11. Genes R de resistencia parcial cartografiados.

Nombre del gen	Cromosoma	Variedad donante	Referencia
Pif	11	St No.1	Yunoki *y col*. 1970
Pise	11	Sensho	Goto 1970
Pikur1	4	Kuroka	Shinoda *y col*. 1971
Pikur2	11	Kuroka	Goto 1988
Pb1	11	Modan	Fuji *y col*. 1995
pi21	4	Owarihatamochi	Fukuoka y Okuno 1997
Pi21	12	Suweon 365	Ahn *y col*. 1997
Pi22(t)	6	Suweon 365	Ahn *y col*. 1997
Pi23(t)	5	Suweon 365	Ahn *y col*. 1997
Pi34	11	Chubu 32	Zenbayashi - Sawata *y col*. 2007
Pi35 (t)	1	Hokkai 188	Nguyen *y col*. 2006

Como se indicó en el apartado 1.6.1.3, no parece existir un mecanismo de defensa único subyacente a la resistencia parcial. El caso concreto de los QTLs del sistema *M.oryzae*/arroz tampoco aporta respuestas concluyentes. La hipótesis de que los QTLs son genes R superados no se ve respaldada por los dos genes clonados que confieren resistencia parcial a *M. oryzae*, pues no se asemejan a ninguna clase de genes conocidos: como se ha descrito anteriormente, *pi21* es no-específico, recesivo y no es un clásico RGA, ni un clásico gen de defensa; y *Pb1*, a pesar de ser un gen del tipo CC-NBS-LRR, tiene una secuencia diferente a los demás genes de esta familia.

Por el contrario, sí hay más evidencias de que estos QTLs pueden corresponder a genes de defensa: Wisser *y col.* (2005) y Vergne *y col.* (2008) encontraron QTLs de resistencia que co-localizan con genes de defensa y con genes *PR*, respectivamente. Algunas de estas co-localizaciones son: con dos genes de la familia WRKY (*WRKY13* y *WRKY45*), involucrados en diferentes rutas de señalización (Qiu *y col.*, 2009; Tao *y col.*, 2009). También con *GH3-1*, *GH3-2* y *GH3-8*, que actúan como QTLs de resistencia de amplio espectro a *M. oryzae*, y los dos últimos también a *X. oryzae* (Fu *y col.*, 2011; Ding *y col.*, 2008); la familia de genes GH3 regula mecanismos de defensa basal, desactivando al ácido indol-acético (IAA), que induce el debilitamiento de la pared celular. Y con el gen *OsMPK5*, que como otras MAPK ejerce un papel importante en los mecanismos de transducción de señales; su silenciamiento aumenta la expresión de genes *PR* (Xiong y Yang, 2003). También se lograron seleccionar líneas con resistencia parcial a *M. oryzae* mediante marcadores derivados de genes de defensa (Liu *y col.*, 2004a).

1.6.3. Variedades diferenciales

La caracterización de los linajes de *M. oryzae* presentes en una zona determinada de cultivo de arroz es muy importante para fijar las estrategias de lucha más efectivas. Las dos formas más frecuentes para llevarla a cabo son el análisis genético de tipo “fingerprinting” (un sistema preciso, pero que requiere instalaciones y personal cualificado no siempre asequibles), y la utilización de una colección de variedades diferenciales (VDs) que es una alternativa más económica. Cada VD es una NIL (línea quasi-isogénica), monogénica, con un gen R diferente. Según el modelo gen-a-gen, cuando se produce una infección por *M. oryzae* en una serie de variedades de las cuales se conoce el gen de resistencia que porta, se puede distinguir el linaje del patógeno basándose en el patrón de reacción en el conjunto de las variedades. La utilización de colecciones de líneas monogénicas ha facilitado la caracterización y diferenciación de razas de *M. oryzae* en las diferentes zonas arroceras.

En primer lugar, científicos japoneses y estadounidenses que intentaban estandarizar la clasificación del patógeno, generaron ocho líneas diferenciales (Atkins y *col.*, 1967) con las que teóricamente se podían describir 256 posibles patotipos (Ling y Ou, 1969). No obstante, esta colección no conseguía caracterizar adecuadamente la diversidad del patógeno en algunas zonas del mundo (Bonman y col., 1986). Otras colecciones posteriores (Yamada *y col.*, 1976; Kiyosawa, 1984) tampoco funcionaron en países distintos a Japón (Bonman *y col.*, 1986), porque algunas de las VDs poseían otros genes de resistencia adicionales aparte del esperado. En los años 80 se desarrollaron nuevas

colecciones cuya aplicación resultó limitada debido al reducido número de genes presentes; fue el caso de las combinaciones de genes *Pi1*, *Pi3*, *Piz-5(t)* y *Pita/Pi4* (Mackill y Bonman, 1992), o los genes *Pita*, *Pita-2*, *Pib*, *Pik*, *Pik-m* y *Pik-p* (Ling *y col.*, 1995).

Los intentos posteriores han sido más exitosos: como fruto de la colaboración entre el IRRI y varios institutos de investigación en Japón, se obtuvieron lo que se considera la primera colección internacional estándar de VDs, que está compuesta por 31 líneas monogénicas con 24 genes de resistencia (*Pia*, *Pib*, *Pii*, *Pik*, *Pik-h*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pik-s*, *Pish*, *Pit*, *Pita*, *Pita-2*, *Piz*, *Piz-5* (= *Pi2*), *Piz-t*, *Pi1*, *Pi3*, *Pi5(t)*, *Pi7*, *Pi9*, *Pi11(t)*, *Pi12(t)*, *Pi19(t)*, y *Pi20(t)*), procedentes de 25 variedades donantes en la variedad *japonica* susceptible Lijiangxintuanheigu (LTH) (Tsunematsu *y col.*, 2000; Fukuta *y col.*, 2004; Kobayashi *y col.*, 2007 b; Telebanco-Yanoria *y col.*, 2008). Estas líneas monogénicas se denominan líneas IRBL, y se identifican por el gen de resistencia y la abreviatura de la variedad donante. Por ejemplo, IRBLa-A es la línea con el gen de resistencia *Pia* procedente de la variedad Aichi Asahi. Algunas variedades donantes (Shin2, BL1, IRT13, Fukunishiki, WHD-1S-75-1-127, Moroberekan, Aichi Asashi, K3, Caloro, K1, Zhaiyequing, Yashiromochi, Pi No.4, Reiho y Fujisaka5) poseen varios genes de resistencia conocidos. Las líneas IRBL se están utilizando en más de 30 países para identificar linajes del patógeno (Ebron *y col.*, 2004; Telebanco-Yanoria *y col.*, 2008; Takehisha *y col.*, 2009; Koide *y col.*, 2011a; Odjo *y col.*, 2011), y también como fuentes de genes de resistencia en programas de mejora (Telebanco-Yanoria *y col.*, 2010). Además, estas líneas han servido para cartografiar con mayor precisión algunos genes *R*, como *Pia* y *Pi19(t)* (Koide *y col.*, 2010; 2011a). También en España se ha utilizado este conjunto de líneas para analizar la población de *M. oryzae* presente en distintas regiones arroceras, incluyendo al Departamento del Arroz del IVIA en el Parque Natural de la Albufera.

Las líneas IRBL tienen los genes de resistencia fijados, pero los caracteres agronómicos no son uniformes entre líneas (Fukuta *y col.*, 2004; 2009). Esto puede deberse a la introgresión de grandes segmentos cromosómicos de las variedades donantes, ya que estas líneas se obtuvieron después de pocos ciclos de retrocruzamientos. De hecho, Fukuta *y col.* (2004; 2009) han determinado que estas líneas monogénicas poseen, de media, sólo el 77% del genoma del parental recurrente, LTH. Aparte de esto, se ha propuesto un nuevo sistema para clasificar los linajes de *M. oryzae* utilizando las líneas IRBL (Hayashi y Fukuta, 2009).

Se han desarrollado nuevas colecciones de NILs que pretenden mejorar la empleabilidad de las líneas IRBL, en tres fondos genéticos diferentes: de nuevo en LTH, con menor número de genes *Pi* (14), pero genética y morfológicamente más uniformes que las líneas IRBL; en la variedad *indica* CO39, también con 13 genes en 20 NILs; y en US-2, una línea susceptible desarrollada recientemente, en la que no se ha detectado ningún gen de resistencia, y que procede del cruzamiento entre variedades susceptibles del tipo *indica* y *japonica*; estos últimos genotipos pueden cultivarse tanto en ambientes tropicales como templados (Fukuta *y col.*, 2004; Telebanco-Yanoria *y col*, 2010; Kobayashi *y col.*, 2007 b).

1.7. Estudio de los caracteres cuantitativos

1.7.1. La mejora y la genética cuantitativa

En la agricultura moderna hay una continua demanda de nuevas variedades vegetales con mayor producción, calidad adecuada, características agronómicas más deseables, mejor adaptadas a las condiciones de cultivo locales, que abaraten y simplifiquen las prácticas agrícolas, o que se vean menos afectadas por factores bióticos o abióticos limitantes. Para ello se llevan desarrollando y perfeccionando desde hace muchos años estrategias de mejora de variedades. Los métodos tradicionales combinan ciclos de cruzamiento y selección, con el objetivo de reunir en un solo genotipo las mejores características de los parentales o bien de introducir determinados genes en un fondo genético diferente. Se denomina *carácter* a una característica fenotípica heredable, es decir, determinada genéticamente. Hay caracteres que muestran valores fenotípicos discretos por estar controlados por uno o pocos genes de gran efecto; son los llamados *caracteres cualitativos*, y su modo de herencia es generalmente mendeliano. Por el contrario, los *caracteres cuantitativos* muestran una distribución de valores fenotípicos continua; estos caracteres son el resultado de 1) el efecto de varios genes segregando, aportando cada uno un efecto pequeño, 2) la interacción entre estos genes, llamada epistasia, y 3) los efectos ambientales directos, o su interacción con el genotipo. El modo de herencia de los caracteres cuantitativos es, por lo tanto, complejo y no hay una clara relación entre genotipo y fenotipo. La mayor parte de caracteres agronómicos de importancia en plantas y animales son caracteres cuantitativos; en el caso de cultivos podemos mencionar: la altura, el rendimiento, el peso de los frutos, la duración del ciclo reproductivo, el contenido en nutrientes, la tolerancia a estreses abióticos, etc..., y también, como ya se ha mencionado, algunas resistencias a patógenos, como *M. oryzae*.

El método genealógico (también llamado de pedigrí) es el más generalizado en los programas de mejora de arroz y el que mejores resultados ha dado, aunque también se utilizan la selección masal y la selección recurrente. El método genealógico parte de un cruzamiento entre variedades o líneas puras (hibridación). Para ello se deben castrar las flores del progenitor femenino y polinizar con el polen del progenitor masculino. La autofecundación de la primera generación, F1, da lugar a una población de plantas F2 en las que segregan los caracteres en que difieren los parentales y, a veces, en algunos en que los parentales no muestran diferencias. De esta generación se seleccionan las plantas que más se ajusten a determinados criterios establecidos para alcanzar los objetivos de mejora. La autofecundación de las plantas F2 seleccionadas da lugar a líneas F3. Los ciclos de autofecundación y selección de líneas y plantas continúan de generación en generación, aumentando la proporción de alelos favorables y el grado de homocigosis. Cuando se ha obtenido la suficiente homocigosis, en las plantas con las características buscadas se comprueba la homogeneidad, la estabilidad y el valor agronómico de la línea, y se procede a su registro como nueva variedad y a su comercialización.

Si los métodos de mejora tradicionales han generado abundantes y valiosas obtenciones, tienen la limitación de que hacen falta muchas generaciones de selección para obtener líneas con los caracteres de interés suficientemente fijados como para cumplir los

requisitos de homogeneidad exigidos por el Registro Oficial de Variedades (en el caso de España, se requieren, al menos, de 10 a 12 años), lo cual entraña un gran coste de tiempo, espacio y recursos. La principal causa de que se tarden tantas generaciones en fijar los caracteres es que el fenotipo no da una medida directa del genotipo de cada individuo, por lo que una selección basada en caracteres observados no asegura que éstos se hereden, o que se mantengan al cambiar de ambiente, especialmente en el caso de los caracteres cuantitativos. De hecho, es posible que una planta tenga los alelos de interés y no los exprese en una generación determinada y, por tanto, no sea seleccionada. Pero, si se pueden identificar los genes que controlan un carácter determinado, es posible realizar una selección más eficiente que cuando se atiende únicamente al fenotipo, con lo que el carácter puede ser fijado más rápidamente. El análisis de QTLs para identificar y caracterizar aquellos que están implicados en el control genético de los caracteres cuantitativos se convierte así en una herramienta esencial en el análisis genético y, por lo tanto, para la mejora.

Los primeros intentos de estudiar los caracteres cuantitativos partieron de Galton (1889), quien, junto con Pearson, desarrolló muchas de las herramientas estadísticas básicas de la genética cuantitativa, tales como los análisis de regresión y de correlación. Cuando en 1900 se redescubrieron los trabajos de Mendel sobre la herencia de caracteres cualitativos, éstos parecían inadecuados para explicar la herencia de los caracteres cuantitativos; hasta que Nilsson-Ehle (1909) y, paralelamente, East (1910), basándose en sus propios experimentos y en ensayos de Johannsen (1909), propusieron que la variación continua del fenotipo era consecuencia de la combinación de múltiples genes segregando y de la variación ambiental. Finalmente, Fisher demostró que la variación continua de los caracteres cuantitativos era compatible con las leyes de Mendel (Fisher, 1918). Hasta los años 80, los caracteres cuantitativos se estudiaron mediante técnicas estadísticas basadas en medias, varianzas y covarianzas, tratando de estimar el número de genes implicados y la magnitud y dirección de sus efectos conjuntos. Actualmente, gracias al desarrollo de numerosos marcadores genéticos, el análisis de caracteres cuantitativo se realiza mediante la identificación de los QTLs implicados y la estimación de sus efectos.

A continuación se repasan sucintamente algunos conceptos y parámetros estadísticos fundamentales de la genética cuantitativa. Una de las ideas fundamentales de la genética cuantitativa es que el valor fenotípico (P) de un individuo es la resultante de la acción combinada de su genotipo (G) y del ambiente (E):

$$P = G + E$$

El valor genotípico puede estimarse como la media de los valores de los individuos con el mismo genotipo en diferentes ambientes, mientras que el valor ambiental se estima como la diferencia entre el valor fenotípico del individuo y el valor genotípico estimado. Pero la acción ambiental no es idéntica para todos los genes, por lo que también se debe de tener en cuenta la interacción entre genotipo y ambiente (GxE).

Por otro lado, el valor genotípico se puede descomponer en:

- un valor aditivo (A), debido al efecto medio de los alelos en cada locus implicado,
- un valor dominante (D), debido a la interacción entre alelos de un mismo locus, y
- un valor epistático (I), debido a la interacción entre alelos de loci distintos.

$$G = A + D + I$$

Recopilando todo:

$$P = (A + D + I) + E + G \times E$$

Correlación entre caracteres

Muchos caracteres importantes están correlacionados positiva o negativamente. La correlación está causada básicamente por la pleiotropía, que es el fenómeno por el cual un mismo gen (o genes) es responsable de efectos fenotípicos distintos y no directamente relacionados. También puede deberse al ligamiento de genes que afectan a caracteres diferentes, o por estar relacionados metabólica o estructuralmente los productos que codifican los genes. Conocer estas correlaciones es importante para el mejorador, ya que pueden afectar a la selección de más de un carácter simultáneamente: en ocasiones arrastrando caracteres indeseados, en otras facilitando la incorporación de combinaciones favorables. Por otro lado, la correlación entre caracteres se puede aprovechar para seleccionar indirectamente caracteres difíciles de evaluar o que no pueden ser evaluados en el momento deseado.

Varianza

Para expresar la variación que existe en la población se utiliza la varianza, que es una medida que cuantifica la dispersión de la distribución de un carácter entorno a su media. Si en una población de n individuos, μ es la media de la población en un carácter y x_i es el valor del carácter del individuo i, la varianza es:

$$Var = \frac{\sum(x_i - \mu)^2}{n}$$

Una varianza pequeña indica que la mayoría de valores son cercanos a la media y, por tanto, que la media es un buen predictor del valor del carácter de un individuo elegido al azar. Una de las propiedades más importantes de la varianza es que, si dos variables *x* e *y* son independientes, la varianza de la suma es igual a la suma de las varianzas. Por ello:

$$Var(x + y) = Var(x) + Var(y)$$

La varianza fenotípica puede expresarse de la siguiente forma:

$$Var(P) = Var(A) + Var(D) + Var(I) + Var(E) + Var(G \times E) + 2Cov(G, E)$$

donde Cov es la covarianza, una medida de la asociación de dos caracteres:

$$Cov(x, y) = \frac{\sum(x_i - \mu_x)(y_i - \mu_y)}{n}$$

La varianza ambiental se puede estimar a partir de los datos de un testigo homocigoto (en el que no existe varianza genotípica y toda la varianza fenotípica observada es ambiental). Tener una estimación de la aportación relativa de las varianzas genética y ambiental a la variación total de un carácter es interesante para evaluar la eficacia de la selección fenotípica. El análisis de la varianza (ANOVA) es un conjunto de modelos que permiten establecer los diferentes componentes de la varianza atribuibles a diferentes

fuentes de variación. Además, con el ANOVA se puede determinar si las medias de un carácter evaluado en dos o más grupos son iguales.

Heredabilidad

La heredabilidad se puede definir como la proporción de variación en un carácter determinado atribuible a factores genéticos en lugar de a factores ambientales. Existen dos modos de expresar la heredabilidad: la heredabilidad en sentido amplio (H^2) es la proporción de varianza fenotípica debida al conjunto de efectos genéticos, mientras que la heredabilidad en sentido estricto (h^2) es la proporción de la varianza fenotípica debida únicamente a la aditividad (Allard, 1960; Kearsey y Pooni, 1996):

$$H^2 = \frac{Var(G)}{Var(P)}$$

$$h^2 = \frac{Var(A)}{Var(P)}$$

Una h^2 cercana a 1 indica que la mayoría de la variación observada se debe a los efectos de los diferentes alelos; pero una h^2 pequeña no implica que el genotipo no tenga un efecto importante, pues pueden existir componentes no aditivos (dominancia y epistasia) contribuyendo a la variación total. La función más importante que tiene la heredabilidad en la mejora vegetal es la de predicción del valor de un carácter en la siguiente generación. La h^2 es más interesante que la H^2 para los programas de mejora en que se buscan líneas puras, como ocurre en arroz, pues cualquier efecto dominante (incluido en la estimación de la H^2) desaparece al alcanzar la homocigosis en las líneas puras.

La heredabilidad no es un valor intrínseco de un determinado carácter, puesto que depende del conjunto de genes concretos presentes en una población dada y de las condiciones ambientales que afectan a dicha población, y, además, va variando a medida que avanza la selección; no obstante, hay caracteres que suelen tener heredabilidades más altas que otros: los caracteres controlados por pocos genes tienden a tener heredabilidades mayores que los caracteres complejos. Por el contrario, los caracteres relacionados con la aptitud biológica (como viabilidad, fertilidad, etc.) tienen generalmente h^2 menores que los caracteres morfológicos (Walsh, 2001).

1.7.2. El estudio de QTLs

Cada uno de los loci que afectan a un carácter cuantitativo se llama QTL (del inglés: *Quantitative Trait Locus*). Un QTL puede ser un solo gen o un grupo de genes ligados que afectan a un determinado carácter. En la mayoría de los caracteres, gran parte de la variación genética es explicada por unos pocos QTLs con efectos grandes, mientras que la restante es explicada por QTLs de efectos pequeños, algunos de los cuales podrían

actuar como modificadores (Robertson, 1967; Kearsey y Farquhar, 1998; Brem y Kruglyak, 2005). El análisis de QTLs tiene varias aplicaciones, siendo la principal que permite profundizar en el conocimiento de caracteres complejos y sus relaciones. Aparte de ello, la localización de los QTLs en el genoma permite la identificación y clonación de los genes subyacentes que regulan los caracteres cuantitativos. Por otra parte, en un carácter correlacionado con otro, el análisis de QTLs puede ayudar a esclarecer si dicha correlación se debe a efectos pleiotrópicos o a un ligamiento entre QTLs, los cuales pueden ser separados por recombinación; en tal caso, sería posible mejorar ambos caracteres simultáneamente. Otra aplicación es la selección asistida por marcadores (*Marker Assisted Selection*, MAS) en programas de mejora, que consiste en la introgresión del QTL deseado mediante selección indirecta de marcadores ligados a dicho QTL; de este modo, los mejoradores pueden seleccionar individuos según el genotipo del marcador ligado al QTL en lugar de según el fenotipo del individuo. La MAS permite la selección temprana, y la facilita en los caracteres que son genéticamente complejos o difíciles de evaluar (como ensayos de campo complicados o que tienen que ser realizados en un momento particular o en una localidad específica, o incluso la resistencia a enfermedades de cuarentena). Además, puede evitar la incorporación de genes no deseados (arrastre por ligamiento), y permite la combinación de múltiples genes simultáneamente (piramidación), Finalmente, al suprimir los efectos ambientales de los ensayos de campo, es generalmente más efectiva que la selección fenotípica cuando hay interacción genotipo-ambiente (Liu *y col.* 2006).

La eficacia de la detección de QTLs puede verse influenciada por muchos factores (Asins, 2002; Tanksley, 1993). Los más importantes son las propiedades genéticas de los QTLs (el número y la contribución de cada uno de ellos a la variación genotípica total, las interacciones entre ellos y su distribución en el genoma), los efectos ambientales, el tamaño de la población estudiada y el error experimental. El número y la importancia relativa de los QTLs que se pueden detectar al analizar un determinado carácter cuantitativo dependen de muchos factores y, después de los numerosos estudios de QTLs que se han llevado a cabo en las últimas décadas, se puede concluir que no existe una pauta general. Aunque autores como Mackay (2009) estiman que un carácter cuantitativo puede estar afectado por cientos de genes con efectos pequeños, Kearsey y Farquhar (1998) observaron que el número de QTLs identificados para un determinado carácter en un único experimento era generalmente menor de ocho; Hyne y Kearsey (1995), por su parte, demostraron que es difícil detectar más de 12 QTLs en un único ensayo (una población y un ambiente). Esto se debe a que los métodos de detección de QTLs fijan un umbral de significación para poder declarar la existencia de un QTL con certeza, por lo que sólo detectan aquellos con efectos fenotípicos grandes. Es importante establecer un nivel de significación estadística que asegure una baja probabilidad de falsos positivos, aunque ello suponga que se dejen de detectar algunos QTLs de menor efecto, ya que la obtención de falsas asociaciones puede ser más negativa que la no detección de algún QTL; sin embargo, se debe tener en cuenta que el análisis sobreestima los QTLs con efectos grandes (Georges *y col.*, 1995; Burns, 1997). Asimismo, dos QTLs ligados estrechamente (20 cM o menos) serán tomados generalmente como un único QTL (Tanksley, 1993); en consecuencia, lo que aparece como un QTL puede ser en realidad el centro de gravedad de varios loci ligados, y lo que se está evaluando es el valor cuantitativo promediado del conjunto de QTLs. Por otra parte, en una población concreta sólo se detectan aquellos QTLs para los que existe variación entre los parentales y polimorfismo en los marcadores asociados. Por último, es posible que el

ambiente afecte a la expresión de alguno QTLs; en el caso de resistencia a enfermedades, por ejemplo, si existen diferentes espectros de virulencia según localidades, los QTLs de resistencia específica sólo se detectarán cuando estén presentes ciertos linajes.

Uno de los problemas del análisis y aplicación de los QTLs es su estabilidad: ya que la expresión de los QTLs depende del fondo genético y del ambiente, la capacidad de los investigadores para detectarlos y/o manejarlos también se ve condicionada. El efecto del fondo genético viene determinado principalmente por las posibles interacciones entre QTLs y otros genes, que pueden tener diferentes alelos en diferentes genotipos; es más, hay QTLs cuyo efecto principal es la interacción con otros genes que determinan el carácter (QTLs epistáticos, Carlborg y Haley, 2004) y que sólo se detectan cuando se considera la epistasia como parte del modelo. Numerosos estudios sugieren que las interacciones epistáticas entre dos, tres o, incluso más, loci pueden tener efectos importantes sobre el fenotipo (Spickett y Thoday, 1966; Fasoulas y Allard, 1962; Allard, 1988; Lark *y col.*, 1995; Cockerham y Zeng, 1996; Maughan *y col.*, 1996). Sin embargo, la epistasia no ha sido tenida en cuenta en muchos estudios de mapeo de QTLs, a pesar de que Liu *y col.*, (2003) demostraron que se consiguen mejores genotipos en programas de MAS en los que se tiene en cuenta el efecto de la epistasia. En arroz, Loan *y col.* (2003) hallaron 34 QTLs epistáticos en un estudio de resistencia a 10 linajes de *M. oryzae* en 292 RILs procedentes de un cruce entre una variedad *indica* y otra *japonica*. Otras interacciones epistáticas detectadas en arroz afectan a caracteres relacionados con el rendimiento (Li, 1977; Li *y col.*, 1997a, 2008b; Yu *y col.*, 1997; Liao *y col.*, 2001), otros caracteres de interés agronómico (Lin *y col.*, 2000; Cao *y col.*, 2001; Zhang *y col.*, 2001; Mei *y col.*, 2005; Liu *y col.*, 2007 a), el aspecto del grano (Kearsey y Pooni, 1996; Qin *y col.*, 2008), la fisiología de la planta (Li *y col.*, 1998), o la pérdida de vigor en cruces entre las subespecies *indica* y *japonica* (Li *y col.*, 1997b). En algunos casos, tanto en caracteres relacionados con el rendimiento del arroz como en resistencia a *M. oryzae*, los QTLs epistáticos contribuyen más a la variabilidad fenotípica que los QTLs de efecto directo sobre el carácter (Li *y col.*, 1997a; Liao *y col.*, 2001; Loan *y col.*, 2003).

Por otro lado, se han descrito numerosas interacciones genotipo-ambiente en estudios de QTLs (Lu *y col.*, 1996; Zhuang *y col*, 1997; Yan *y col.*, 1999; Cao *y col.*, 2001, Liu *y col.*, 2007a). La influencia del ambiente sobre la expresión de los QTLs es especialmente importante para los mejoradores, particularmente cuando se buscan variedades resistentes a estreses ambientales, en cuyo caso interesan QTLs que aporten las mejores características en unas determinadas condiciones. Por tanto, cuando se quieren obtener variedades que den buen rendimiento en distintos ambientes, es recomendable comprobar la estabilidad de los QTLs en diferentes poblaciones y años antes de incorporarlos a programas de mejora (Tanksley y Hewitt 1988; Veldboom y Lee 1996).

1.7.3. Métodos de análisis de QTLs

Para estudiar los QTLs hay que localizarlos en el genoma; este proceso se denomina mapeo de QTLs y se ha convertido en un procedimiento estándar en el estudio de caracteres cuantitativos (Lynch y Walsh, 1998). Consiste en el análisis estadístico de los alelos presentes en un locus y los fenotipos a los que se asocian (McCouch y Doerge,

1995; Mohan *y col.*, 1997; Paterson, 1996 a, b). Sax (1923) formuló por primera vez el fundamento para el mapeo de QTLs: el ligamiento entre un carácter cuantitativo y un marcador permite que se pueda seguir la herencia del locus marcador relacionado con el carácter. Desde entonces, se ha ido desarrollando la metodología de análisis de tal ligamiento (Rasmusson, 1933; Thoday, 1961; Tanksley *y col.*, 1982).

El mapeo de QTLs se realiza en tres pasos, que a continuación se analizan con cierto detenimiento:

1 Generación de una población segregante.

2 Caracterización de los individuos de la población: Genotipado con marcadores genéticos, construcción de un mapa de ligamiento y evaluación fenotípica del o de los caracteres cuantitativos.

3 Análisis de QTLs, buscando asociaciones entre los marcadores y los valores fenotípicos.

1.7.3.1. Poblaciones segregantes

Para iniciar el estudio de caracteres cuantitativos se eligen parentales que se diferencien en el carácter a estudiar, y que aseguren que el carácter segregará en la descendencia, así como la existencia de suficiente número de marcadores genéticos polimórficos entre los parentales, es decir, que evidencien variaciones en la secuencia de ADN de ambos (Young, 1994). Si sólo se tuviera esto en cuenta, lo ideal para construir un mapa de ligamiento serían los cruzamientos entre parentales alejados genéticamente o, incluso, cruzamientos interespecíficos. Sin embargo, en programas de mejora aplicados se suelen utilizar parentales no muy alejados para acelerar el proceso de obtención de una nueva variedad.

El tamaño de la población es un factor muy a tener en cuenta en el diseño experimental, ya que influye en el número de QTLs detectados, la magnitud de la variación genética explicada por estos (R^2), y la estima de sus efectos genéticos. Cuanto mayor es el tamaño de la población, mayor es el poder estadístico y, por tanto, mejora la localización de los QTLs y sus intervalos de confianza, se estiman mejor los efectos genéticos (Beavis, 1998; Darvasi *y col.*, 1993), y mayor es la probabilidad de detectar QTLs de efectos menores (Tanksley, 1993; Haley y Andersson, 1997). Sin embargo, llega un punto en el que la precisión apenas aumenta con el tamaño de la población y es más recomendable utilizar un mayor número de marcadores (Stuber *y col.*, 1999); pero si los marcadores están a menos de 5-10 cM, tampoco mejora la precisión (Darvasi *y col.* 1993).

Se pueden obtener diferentes tipos de poblaciones segregantes; las más utilizadas son la F_2 y los retrocruzamientos, porque son relativamente fáciles y rápidas de generar, sobre todo la F_2 si la especie es autógama, como en el caso del arroz. Las poblaciones F_2, que se obtiene de la autofecundación de la F_1, tiene el valor de heterocigosidad más alto después de la F_1 y en cada locus están presentes las tres clases genotípicas, por lo que se pueden estimar los valores aditivo y dominante de los QTLs (Carbonell *y col.*, 1993). No obstante, las F_2 son poblaciones de segregación temporal, ya que cada individuo tiene un genotipo diferente y éste no se conserva en sucesivas generaciones. Esto implica que no

se pueden realizar réplicas del ensayo, ni evaluar en diferentes ambientes o años, salvo en especies que se puedan multiplicar vegetativamente. Para aumentar la potencia del análisis o para realizar ensayos replicados, una posibilidad es utilizar las líneas F_3 descendientes de cada individuo F_2 autofecundado, y tomar la media de la línea como el valor del carácter en el individuo F_2 del que procede (se denomina F_2:F_3) (Romero-Severson *y col.* 1989); también se pueden emplear generaciones posteriores, pero aplicando las correcciones pertinentes.

Los retrocruzamientos, por su parte, se obtienen cruzando un híbrido con uno de los parentales. Cuando la población proviene del cruzamiento de una F_1, se denomina BC_1, y sólo están presentes dos clases genotípicas, con lo que se pierde la información acerca del efecto de uno de los homocigotos (el donador). Tampoco se pueden hacer repeticiones, pues el genotipo individual no se conserva a menos que se analice la siguiente generación, como en el caso de los F_2:F_3. En algunos caracteres conviene retrasar el análisis de QTLs hasta el segundo o tercer retrocruzamiento, lo que se conoce como *advanced backcross QTL-analysis* (Tanksley y Nelson, 1995); se ha utilizado en cruzamientos entre una especie cultivada y especies silvestres relacionadas, y facilita realizar un proceso de selección genotípica asociado al análisis de QTLs. En este tipo de poblaciones se reduce la probabilidad de detectar QTLs que requieran de interacción epistática de alelos del donador, y aumenta la probabilidad de detectar QTLs aditivos que continúen funcionando en NILs con fondo genético del parental recurrente (Grandillo y Tanksley, 2005).

Para evitar algunos de los problemas mencionados, se pueden utilizar poblaciones de segregación fija, entre las que destacan las líneas recombinantes y los dobles haploides. Las primeras (RILs, *Recombinant Inbred Lines*) se generan a partir de la autofecundación de individuos F_2 y de sus descendientes durante varias generaciones, habitualmente a través del método de *single seed descent* (descendencia de una sola semilla), hasta alcanzar la homocigosis a lo largo de todo el genoma. Los dobles haploides (DH) se obtienen por duplicación de tejidos haploides (polen u ovarios), de modo que también son individuos homocigotos en todos sus genes. En estas poblaciones se pueden conseguir un gran número de individuos con el genotipo idéntico para realizar repeticiones y obtener datos más precisos; es posible, incluso, utilizarlas en diferentes ensayos y por distintos grupos de investigación. Sus principales desventajas son que son más costosas de obtener (en tiempo y trabajo), y que sólo se pueden estimar los efectos aditivos, por no estar presentes los genotipos en heterocigosis.

1.7.3.2. Genotipado y construcción de un mapa de ligamiento

Marcadores genéticos

Un marcador genético es cualquier característica heredable que presenta variantes y que, o bien señala una región genómica concreta, o bien está asociada a un carácter de interés. Aparte de las mencionadas aplicaciones para la localización y evaluación de QTLs, o para la selección indirecta mediante MAS, también tienen gran utilidad en estudios filogenéticos, evolutivos, de genética poblacional, o de la variabilidad genética, así como para diversos análisis de parentesco; finalmente, también pueden ayudar en la certificación de variedades y la determinación de la pureza híbrida en semillas.

Los atributos ideales de un marcador son:

- Alto grado de polimorfismo,
- herencia mendeliana,
- codominancia,
- ausencia de interacciones con otros marcadores,
- independencia de la influencia ambiental,
- ausencia de efecto sobre el fenotipo, y
- posibilidad de detección en las primeras fases de desarrollo del organismo.

Por otra parte, la técnica para analizarlo debería ser altamente reproducible, los polimorfismos fáciles de identificar, el análisis simple y los costes bajos. Para construir un mapa de ligamiento, además, los marcadores deben ser abundantes y estar distribuidos homogéneamente a lo largo del genoma.

Tipos de marcadores

Sax, en 1923, fue el primero en sugerir el uso de marcadores como criterio de selección, pues al observar que había diferencias significativas entre el peso de las semillas de judía según su color, dedujo que el locus del color estaba ligado al locus que afectaba al peso de la semilla. Estas características morfológicas fácilmente observables y controladas generalmente por un solo gen mendeliano, como el color de las judías, se les denominan marcadores morfológicos; pero este tipo de marcadores tiene importantes inconvenientes: son escasos, algunos son epistáticos o sufren interferencia ambiental, generalmente son dominantes y, en muchos casos, sólo pueden ser identificados en planta adulta.

Todas estas limitaciones fueron desapareciendo cuando se empezaron a utilizar los marcadores moleculares; se trata de moléculas, bien proteínas, o bien ADN, en las que se pueden observar variantes alélicas. Se pueden distinguir dos grandes grupos: los marcadores bioquímicos y los de ADN. Los más importantes dentro del primer grupo son las isoenzimas**.** Markert y Møller (1959) fueron los primeros en acuñar este término para describir las múltiples formas moleculares de la misma enzima presentes en una especie; sin embargo, presentan también serias limitaciones.

La posibilidad de detectar polimorfismos directamente en el ADN ha representado un avance muy importante, ya que se encuentran en un número prácticamente ilimitado, algunos pueden ser altamente polimórficos y pueden localizarse incluso en regiones genómicas no codificantes. Además, son independientes de factores ambientales, del estado fenológico y del tejido. Existen y siguen apareciendo nuevas y muy diversas técnicas para generar y analizar marcadores de ADN. Mencionaremos únicamente el tipo de marcadores utilizados en esta Tesis: fundamentalmente, marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats;* Repeticiones de secuencias simples; Hamada *y col.*, 1982); pero también se incluyen algunos RAPDs. Ambas clases de marcadores se basan en Reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Mullis *y col.*, 1986), técnica por la que se obtienen miles o millones de copias de un fragmento de ADN

determinado, con la ayuda de una polimerasa de ADN, mediante una sucesión de ciclos de temperaturas, y en presencia de cebadores (pequeñas secuencias de ADN sencillo que hibridan en las zonas flanqueantes de la secuencia a amplificar y permiten que la polimerasa inicie la síntesis). Los fragmentos amplificados se visualizan después con diferentes metodologías.

Los SSR, también conocidos como microsatélites o STRs (*Short Tandem Repeats*), son secuencias muy cortas de ADN (entre 1 y 6 nucleótidos) que se repiten de forma consecutiva; son muy frecuentes en el genoma (aproximadamente un microsatélite cada 157 kb en el genoma del arroz (McCouch *y col.*, 2002)), no se transcriben y entre sus funciones parece estar la regulación génica o actuar como señales para la recombinación. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos que se distinguen entre sí por la longitud total del fragmento. La tasa de mutación de los SSR es mucho mayor que la de otras regiones genómicas (Sia *y col.*, 2000), lo que explica la alta frecuencia de polimorfismos y el gran poder discriminante de estos marcadores (Schlötterer, 2000). Las causas más probables de los polimorfismos son el sobrecruzamiento desigual durante la meiosis (Strand *y col.*, 1993) y el efecto “resbalón” (*slipagge*) durante la replicación del ADN (Levinson y Gutman, 1987; Schlötterer y Tautz, 1992; Moxon y Wills, 1999; Zane *y col.*, 2002): el deslizamiento de una cadena sobre la otra en al menos un motivo, ocasionaría un mal apareamiento entre las mismas; pero también existen polimorfismos debidos a deleciones o inserciones, tanto en la secuencias repetidas como en las regiones flanqueantes. En ocasiones la duplicación de una secuencia microsatélite en otra región del genoma da lugar a marcadores multiloci que segregan independientemente (Jarne y Lagoda, 1996). Los microsatélites tienen un elevado valor informativo por ser generalmente codominantes, y poseer una alta tasa de polimorfismo (incluso entre genotipos muy relacionados). Además, cuentan con las ventajas de su alta frecuencia y su ubicuidad, y de que la técnica requerida es sencilla, necesita cantidades pequeñas de ADN y es muy reproducible (Chen *y col.*, 1997). La limitación básica ha sido la gran cantidad de trabajo e inversión iniciales para la identificación de nuevos SSRs; pero en casos como el arroz, con la secuencia completa del genoma, en la actualidad se cuenta con una enorme disponibilidad de secuencias que albergan microsatélites (Cho *y col.*, 2000).

Por su parte, los RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*; ADN polimórfico amplificado al azar; Williams *y col.*, 1990), utilizan cebadores cortos (9-10 pb) inespecíficos, por lo que encuentran secuencias homólogas en numerosos puntos del genoma. Su ventaja es no necesitar conocimiento previo de la secuencia del locus, pero tienen un importante inconveniente porque generan, casi siempre, marcadores de tipo dominante.

Mapas de ligamiento

Un mapa de ligamiento es un mapa genético de una especie que muestra la posición relativa entre marcadores genéticos o entre genes. Se basa en la recombinación cromosómica que ocurre durante la meiosis: la distancia entre dos marcadores es determinada calculando la frecuencia de recombinación entre ellos. Marcadores con una frecuencia de recombinación del 50% o mayor se consideran no ligados y se asume que se encuentran muy alejados entre sí en un cromosoma, o en cromosomas distintos y que se

heredan independientemente; por el contrario, si el ligamiento es total, la frecuencia de recombinación entre ambos es del 0%. Sin embargo, las distancias genéticas no siempre son proporcionales a las distancias físicas (Young, 1994), ya que hay regiones cromosómicas en las que las recombinaciones ocurren con alta frecuencia, y otras en las que ocurren con baja frecuencia, como en las proximidades del centrómero (Rick, 1971; Young, 1994; Faris *y col.*, 2000). Además, la existencia de un sobrecruzamiento interfiere en la probabilidad de que se produzca otro cerca (Hartl y Jones, 2001; Kearsey y Pooni, 1996). Por otra parte, la homología entre cromosomas en un cruzamiento determinado influye en la probabilidad de recombinación, razón por la cual es imprescindible realizar un mapa de ligamiento para cada población analizada.

Para construir un mapa de ligamiento, se utilizan "funciones de mapa" que transforman la fracción de recombinación en distancias genéticas; la unidad más frecuente con que se mide es el centiMorgan (cM). Las dos "funciones de mapa" que se utilizan son la de Haldane, que presupone la ausencia de interferencias y la de Kosambi, que presupone una situación intermedia entre interferencia total y ausencia de interferencia; a distancias pequeñas los resultados de ambas funciones son similares, pero a grandes distancias producen resultados distintos. La posición relativa y la distancia genética entre marcadores se determinan mediante programas informáticos, a partir de las estimas de las distancias entre pares de marcadores, y de la probabilidad de que estén ligados. Generalmente calculan el valor de LOD (*logarithm of odds* – logaritmo de probabilidades), que es el logaritmo de la probabilidad de ligamiento respecto a la probabilidad de independencia génica (Risch, 1992); así, se suele considerar que dos o más marcadores están ligados cuando el valor de LOD es superior a 3, lo que indica que la probabilidad de ligamiento es 1000 veces mayor que la de independencia, pero se pueden utilizar valores menores para añadir marcadores que en un principio no aparecen ligados.

Los marcadores ligados entre si se agrupan en "grupos de ligamiento", cada uno de los cuales puede representar un cromosoma o un segmento de él. Se debe tener en cuenta que errores en el genotipado, datos faltantes y marcadores con segregaciones distorsionadas pueden afectar tanto al orden de los marcadores como a la distancia entre ellos (Hackett, 2002). Normalmente, los marcadores segregan de forma mendeliana, aunque no son raras las segregaciones distorsionadas especialmente en regiones genómicas concretas (Sayed *y col.*, 2002; Xu *y col.*, 1997). Tampoco los marcadores se distribuyen siempre uniformemente a lo largo del genoma (Paterson, 1996 a; Kobayashi *y col.*, 2007 a; Tabata *y col.*, 2007), porque hay zonas genómicas con genes y QTLs que determinan caracteres importantes para una especie, por lo que estas regiones están muy conservadas dentro de la especie y apenas existen polimorfismos entre variedades.

Actualmente, se dispone de mapas de marcadores moleculares del arroz muy detallados, con miles de genes y marcadores moleculares. La página "web" Gramene (www.gramene.org) contiene numerosos mapas de marcadores moleculares de arroz con información proporcionada por diversos grupos de investigación e incluye también datos sobre un gran número de QTLs para todo tipo de caracteres, por ejemplo, para resistencia a *Magnaporthe oryzae*. También cabe destacar que se han establecido mapas con marcadores altamente polimórficos en distintas poblaciones (*anchor-* o *core markers*), que sirven de referencia para la comparación entre diferentes estudios (*core maps*), como por ejemplo el de Orjuela *y col.* (2010) entre los recientes.

1.7.3.3. Evaluación fenotípica: El caso de la resistencia parcial a *Magnaporthe oryzae*

Hay que considerar que un análisis de QTLs, como cualquier otro estudio genético, es tan preciso como lo es la evaluación fenotípica y el genotipado de la población segregante. La exactitud de la evaluación fenotípica es, pues, de suma importancia. Para cualquier tipo de evaluación de intensidad de una infección, como es nuestro caso, el entrenamiento es esencial, especialmente cuando trabajan varios evaluadores conjuntamente en un programa de investigación, ya que hay una tendencia a sobreestimar la intensidad de la infección, sobre todo cuando es baja (Kranz, 1970): a menudo las estimaciones duplican o triplican el valor real (Kranz y Rotem, 1988). En estudios de resistencia a enfermedades hay muchos factores a tener en cuenta que son difíciles de controlar y que complican el estudio de QTLs, desde encontrar las cepas adecuadas para la inoculación cuando los análisis se realizan en condiciones controladas, hasta la determinación de la mejor manera de estimar el grado de resistencia. El momento y el método de inoculación, por ejemplo, pueden influir en la expresión de los QTLs.

Los ensayos de resistencia a *Magnaporthe oryzae* en campo se caracterizan por la presencia de una mezcla de linajes del patógeno y la existencia de interferencias con diversos factores ambientales. La susceptibilidad de las plantas de arroz puede verse afectada por fluctuaciones ambientales incontrolables como, p. ej., variaciones en la humedad del suelo o niveles de nitrógeno, etc. (Suzuki, 1934b; Ou, 1985). Otro problema que puede ocurrir es que, al estar presentes varios linajes del patógeno con diferentes espectros de virulencia, es posible confundir una resistencia completa con una resistencia parcial (Ezuka, 1972; Parlevliet, 1983).

Debido a las dificultades asociadas a una correcta evaluación de la resistencia en campo, la mayor parte de los estudios se realizan en invernadero o en cámaras de cultivo. En la resistencia a *M. oryzae*, por ejemplo, Ballini *y col.* (2008) encontraron que sólo 33 de 165 MetaQTLs identificados provenían de ensayos en campo. En invernadero, la resistencia a *M. oryzae* es evaluada mediante inoculación de uno o varios aislados en hojas de pocas semanas de edad. Aunque no es frecuente, también se pueden realizar evaluaciones de la susceptibilidad en panículas en condiciones controladas (Koizumi, 2010). La ventaja principal de las inoculaciones en invernadero es que se pueden controlar las condiciones del ensayo para que la humedad y la temperatura sean las óptimas para la infección, ajustar la dosis del patógeno y evitar la interacción con otros agentes bióticos o abióticos. Aparte, se evitan los altos costes, el espacio, la mano de obra y el tiempo requerido en los ensayos de campo. Otra de las ventajas de la evaluación de la resistencia a una enfermedad en invernadero es que se puede inocular un único individuo F2, comenzando así la selección en una generación muy temprana. El problema principal es que las inoculaciones individuales probablemente no representen la compleja población del patógeno presente en campo y, por ello, no se pueden determinar correctamente los QTLs de resistencia útiles en condiciones de cultivo. Además, es importante la elección del aislado o de los aislados adecuados para la evaluación de la resistencia en las líneas a estudiar; según Roumen (1994) es recomendable tener un stock de aislados con patrones de virulencia distintos.

Otro aspecto crucial a la hora de evaluar la resistencia a *M. oryzae* es que este hongo ataca a varios órganos de la planta, aunque es en las panículas donde el hongo produce verdaderas mermas en la producción y, por tanto, mayores pérdidas económicas (Bonman, 1992). Como ya se ha comentado, en ensayos en invernadero casi siempre sólo se estima la resistencia en hoja, pero, también en los casos en los que la detección de QTLs se realiza en campo y con plantas desarrolladas, la evaluación se suele llevar a cabo a nivel de severidad en hoja, obviando los efectos de la enfermedad sobre las panículas. Se constata pues, que, a pesar de los numerosos estudios de QTLs de resistencia a *M. oryzae* que se han realizado, se sabe poco de la respuesta de las líneas ensayadas en campo, sobre todo en panícula. En este proyecto hemos considerado siempre la evaluación de la incidencia en panícula como un parámetro fundamental para determinar el nivel de resistencia, sin olvidar que conseguir una baja severidad en hoja también es importante para limitar la presencia del patógeno en el cultivo como posible fuente de inóculo para sucesivas oleadas de infección.

Los estudios realizados muestran resultados contradictorios en lo que respecta a la relación entre resistencia en hoja y en panícula: algunos investigadores encontraron una alta correlación entre ambos parámetros (Chang *y col.*, 1965; Torres, 1986; Bonman, 1989a, 1992; Shindo y Asga, 1989; Roumen, 1993; van Quynh y Bong, 1999; Puri *y col.*, 2009); otros sin embargo han descrito diferencias significativas (Willis *y col.*, 1969; Hwang *y col.*, 1987; Ra *y col.*, 1995; Catalá *y col.*, 2010). Ahn (1994) considera que, en estos casos, se debe realizar una comparación crítica de los resultados para eliminar los efectos temporales o climáticos que hayan podido influir estos resultados. Es posible que la resistencia a *M. oryzae* en hoja y en panícula tenga mecanismos diferentes. Esta hipótesis parece estar respaldada por el descubrimiento del gen *Pi24(t)*, que confiere resistencia en hoja, pero no en panícula tanto en inoculación en invernadero como en campo (Zhuang *y col.*, 2002a) y por un ensayo de Leung *y col.* (2011), en el que encontraron mutantes de la variedad resistente SHZ-2 sensibles en hoja y resistentes en panícula y viceversa, lo que podría indicar que, al menos alguna etapa de la respuesta de defensa a *M. oryzae* es distinta en hoja que en panícula.

Se han desarrollado diversos métodos de medición de la susceptibilidad a *M. oryzae* en arroz. En la evaluación de la susceptibilidad en hoja, se puede estimar el porcentaje de área foliar afectada, contar el número de lesiones o el número de hojas afectadas por planta, medir el tamaño de las lesiones, etc. En algunos casos se llega a calcular el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (AUPDC). Pero lo más frecuente, por su sencillez, es utilizar una escala que otorga a la planta un valor según el grado de infección presente, teniendo en cuenta una combinación de algunos de los anteriores parámetros. En lo que respecta la susceptibilidad en panícula, nudo o cuello, por el contrario, se suele evaluar el porcentaje de órganos afectados.

1.7.3.4. Análisis estadístico

Los valores de los caracteres cuantitativos suelen tener una distribución normal, y la mayoría de métodos estadísticos desarrollados para el análisis de QTLs requieren que los datos fenotípicos sigan este tipo de distribución. Pero la incidencia de una enfermedad generalmente se evalúa siguiendo una escala ordinal, cuya distribución no es normal. Para

poder utilizar los métodos de análisis de QTLs adecuadamente con caracteres que no se adaptan a este modelo, se pueden usar distintas funciones de transformación (logaritmo, raíz cuadrada, arcoseno), según las características del parámetro evaluado y de su distribución, que permiten asemejarla a una distribución normal (Wright, 1868; Gómez y Gómez, 1976).

Para detectar asociaciones entre el fenotipo y el genotipo, básicamente se clasifican los individuos según su genotipo en cada locus marcador y se determina si existen diferencias estadísticamente significativas en las medias del carácter dentro de cada grupo genotípico, lo que indicaría que dicho marcador está ligado a un QTL que controla el carácter. Cuanto más cerca se encuentre un marcador de un QTL, menos recombinación habrá entre ellos y mayor será la probabilidad de que se hereden juntos. Si, por el contrario, un marcador y un QTL no se encuentran ligados, ambos se heredan independientemente y no habrá diferencias significativas entre las medias de los grupos genotípicos (Tanskley, 1993).

Se han desarrollado varios métodos estadísticos para mapear QTLs. El más sencillo es el análisis marcador a marcador (*Single-Marker Análisis*, SMA), que analiza la asociación entre el genotipo de un marcador y el valor de un carácter (Zeng, 1994) mediante un test-t, modelos de ANOVA o por regresión lineal. Los dos últimos aportan estimas de los efectos genéticos (aditividad y dominancia), así como la proporción de la variación fenotípica debida al QTL ligado al marcador. El análisis marcador a marcador no requiere un mapa de ligamiento completo, ni que las distancias entre marcadores sean pequeñas y, por tanto, no hacen falta muchos marcadores que segreguen. Pero es el método menos informativo, ya que sólo indica la existencia de un QTL ligado a un marcador y no su localización precisa. Tampoco permite distinguir entre el efecto de la recombinación y los efectos genéticos (aditivo y dominante) del QTL; es decir, para un mismo nivel de significación estadística, no se distingue entre un QTL con efecto genético grande alejado del marcador y uno de efecto genético pequeño próximo al marcador. Por todo ello, este método puede estimar erróneamente tanto la magnitud de los efectos de los QTLs como el número de ellos (McMillan y Robertson, 1974; Lander y Botstein, 1989).

El método de mapeo por intervalos simple (*Interval Mapping,* IM, o *Simple Interval Mapping,* SIM), presentado por Lander y Botstein (1989), utiliza el mapa de ligamiento y busca QTLs en cada intervalo entre dos marcadores adyacentes. A lo largo del intervalo se va calculando un valor de probabilidad LR (*likelihood ratio*) o LOD (*likelihood of odds*), siendo LR la relación entre la probabilidad de que exista un QTL en el intervalo dividida por la probabilidad de que no lo haya, y LOD el logaritmo de esta relación. En las regiones cromosómicas en las que supera un umbral de probabilidad determinado, se declara la presencia de un QTL, asumiendo que se localiza en el punto de mayor probabilidad. El IM se considera estadísticamente más poderoso que el análisis marcador a marcador, ya que, al analizar los intervalos, se compensa el efecto de la recombinación entre marcadores y QTLs, y se pueden estimar con cierta precisión tanto la posición como la magnitud de los efectos genéticos del QTL. No obstante, al considerar los intervalos por separado, el IM puede tener errores de identificación y estimación de los efectos cuando existen varios QTLs próximos en el mismo grupo de ligamiento (Haley y Knott 1992; Zeng, 1994).

El método de mapeo por intervalos compuesto (*Composite Interval Mapping*, CIM; Jansen y Stam, 1994; Zeng, 1994) es una modificación del IM que introduce algunos marcadores ligados a otros QTL del mismo carácter como cofactores en el modelo. Al tener en cuenta la varianza causada por otros QTLs, el CIM proporciona estimas más exactas de los efectos y posición de un QTL dado.

El mapeo por múltiples intervalos (*Múltiple Interval Mapping*, MIM; Kao y Zeng, 1997; Kao *y col.*, 1999) analiza múltiples intervalos simultáneamente para localizar los QTLs, lo que mejora la precisión de las estimas. El MIM posibilita el estudio de la arquitectura genética de un carácter, pues considera los efectos de múltiples QTLs putativos e incluye la probabilidad de que existan efectos epistáticos directamente en el modelo. Con ello se facilita el análisis y la estimación del número, las posiciones, los efectos y las interacciones de todos los QTLs, e, incluso, de la heredabilidad de un carácter cuantitativo.

2 OBJETIVOS

La utilización de variedades resistentes es el método más efectivo, económico y ecológico para controlar la enfermedad causada por el hongo *Magnaporthe oryzae* en los arrozales españoles, ubicados mayoritariamente en zonas húmedas con un alto valor medioambiental. Dado que la resistencia a *M. oryzae* conferida por genes de resistencia completa se ve superada en pocos años, se deben desarrollar estrategias para la obtención de resistencia durable frente al hongo. Para ello, se recomienda utilizar resistencia parcial, carácter complejo controlado por numerosos QTLs.

Conocer el control genético de la resistencia parcial a *M. oryzae* puede ayudar al mejorador a obtener variedades resistentes a este hongo. La gran mayoría de los ensayos realizados para detectar QTLs de resistencia a *M. oryzae* se han llevado a cabo en invernadero, en condiciones que difícilmente reproducen la complejidad de la respuesta de las plantas en campo. Además no se ha realizado ningún estudio de QTLs de resistencia a este hongo con variedades adaptadas a las condiciones de cultivo de las zonas arroceras de España.

Por otro lado, el conocimiento de la población de *M. oryzae* es una gran ayuda a la hora de establecer un programa de obtención de variedades resistentes a dicho patógeno. Una manera sencilla y económica de obtener información sobre la estructura de la población del hongo presente en una región es utilizando un set de variedades diferenciales, que son líneas quasi-isogénicas que difieren una de otra en un gen de resistencia completa; de forma que el patrón de reacción de las distintas variedades de la colección permite inferir el espectro de virulencia de una población concreta.

Por todo ello, los objetivos generales abordados en esta tesis son:

- Estudio de la composición y la dinámica de la población del patógeno *M. oryzae* en el arrozal valenciano, mediante una colección de variedades diferenciales.

- Estudio del control genético de diferentes parámetros relacionados con la resistencia parcial al ataque del hongo *M. oryzae*, en varios fondos genéticos y condiciones ambientales y de análisis diversas.

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de la población del hongo *M. oryzae* presente en los campos de arroz del Parque Natural de la Albufera a lo largo de varios años, utilizando una colección de variedades diferenciales, y comparación con estudios realizados en otras regiones arroceras de España.

- Análisis de diferentes metodologías para evaluar la resistencia a *M. oryzae*: comparación de ensayos por inoculación en invernadero con determinaciones de susceptibilidad en campo, con particular atención a la afectación en los órganos productivos.

- Generación de dos poblaciones segregantes de arroz (dos F2 y sus correspondientes F3) en las que analizar la herencia de la resistencia a *M. oryzae,* en germoplasma adaptado a las condiciones de cultivo españolas, y frente a la población del patógeno característica de nuestros arrozales. Para ello, se evaluará la susceptibilidad en líneas F3, y a ser posible en varias zonas arroceras.

- Genotipado, mediante marcadores SSR, y fenotipado de diversos parámetros que puedan medir la resistencia parcial a *M. oryzae,* de las dos poblaciones segregantes: inoculación con diversos aislados, y evaluaciones en campo en varias localidades.

- Identificación, mediante análisis de QTLs, de regiones cromosómicas involucradas en la resistencia parcial frente a *M. oryzae*; estudio de sus efectos genéticos, las posibles interacciones entre ellas, y si coinciden con genes de resistencia completa o con genes candidatos a intervenir en la respuesta de la planta.

- Hacer recomendaciones, si fuera posible a partir de estos datos, sobre QTLs que puedan ser de utilidad en procesos de selección asistida por marcadores para la obtención de variedades resistentes al hongo.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Poblaciones segregantes

Este estudio se realizó en dos poblaciones segregantes, procedentes del cruzamiento entre un parental femenino con buenas características para el cultivo en la zona mediterránea, y otra variedad con resistencia duradera a *Magnaporthe oryzae*, como parental masculino. La primera población, a la que llamamos SixCNA, procede de la hibridación entre Sivert (Si) y CNA-6159 (CNA); mientras que la segunda, denominada JSxGV, procede del cruzamiento entre JSendra (JS) y Gigante Vercelli (GV), Todos los parentales son de la subespecie *japonica*, salvo CNA, que deriva de un cruzamiento entre *japonica* e *indica*; aunque esto puede limitar la variabilidad para el análisis de marcadores, es más útil para seleccionar y obtener material vegetal mejorado, que además de poseer resistencia duradera sea adecuado para las condiciones de cultivo de las zonas arroceras de España.

JSendra es una variedad registrada en 2004, obtenida en el Departamento del Arroz del IVIA por selección genealógica a partir del cruzamiento entre la variedad californiana M202 y Senia, que también es una variedad del IVIA. Destaca por poseer buenas características agronómicas, como baja estatura (76 cm de media), elevada resistencia al encamado, porte cerrado y ciclo medio (137 días de media entre siembra y maduración); tiene, además, un color verde muy oscuro que se mantiene hasta la maduración, y sus hojas bandera son erectas y sobresalen por encima de las panículas. Todo ello contribuye a una elevada capacidad productiva (sobrepasa los 9.000 Kg/ha). Es resistente al desgrane y posee un alto rendimiento en molino; el grano es de tipo medio muy perlado, con perla grande central, muy apreciado en el mercado español; en lo referente a sus características en la cocción, posee un contenido bajo en amilosa, una consistencia baja y una adhesividad alta. En cuanto a enfermedades, es resistente al esclerocio (*Sclerotium oryzae*), pero se considera susceptible a *M. oryzae* (aunque algunos ensayos en el Delta del Ebro la han catalogado como moderadamente tolerante).

Sivert también es una variedad obtenida en el Departamento del Arroz del IVIA, por selección genealógica a partir del cruzamiento entre Marjal y Senia, y que entró en registro en el año 2006. Comparte con JS numerosas características agronómicas y de calidad favorables, aunque es un poco más alta (82 cm), y tiene un ciclo algo más corto (135 días); pero es una variedad susceptible a *M. oryzae*.

CNA-6159 es una variedad brasileña procedente de un cruzamiento entre una variedad *japonica* y una *indica*, de porte erecto, ciclo medio (139 días) y con un grano de tipo largo A. Es resistente a *M. oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium sp.*, esclerocio, taladro del maíz (*Sesamia nonagroides*) y a la salinidad (Puard *y col.*, 1999) (The Rice Biological Resource Center Database; http://rice-brcdb.mpl.ird.fr/brcdb/index.html?cat=16&term=338),

sus característicacas agronómicas, sin embargo, no son apropiadas para las condiciones de cultivo en la zona mediterránea, concretamente por su altura excesiva (108 cm de media) y baja calidad del grano.

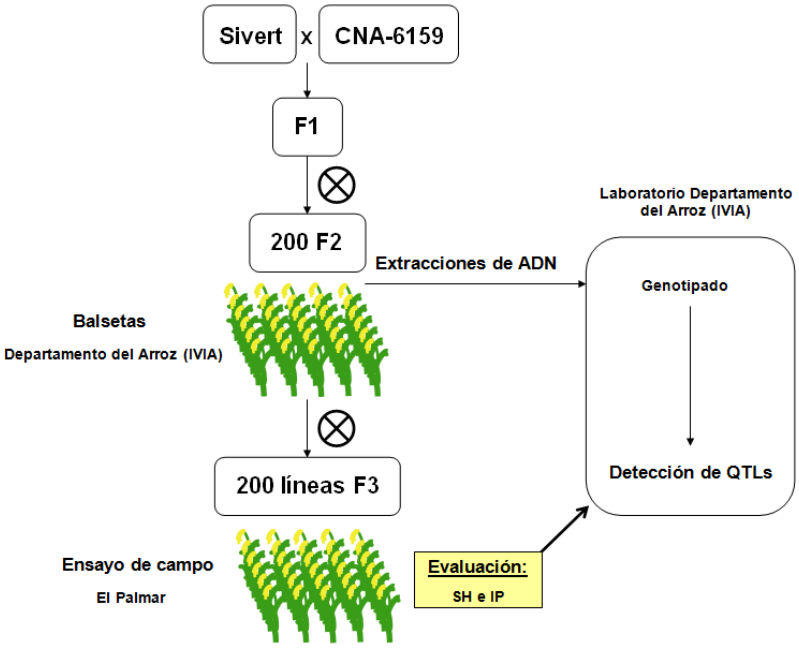
Gigante Vercelli es una antigua variedad italiana registrada en 1946, procedente de un cruzamiento entre las variedades Lady Wright y Vialone, con un grano de tipo largo A, con aristas, ciclo medio (138 días), resistente a *M. oryzae*, *Fusarium sp*., esclerocio y a la plaga del cucat (*Chilo suppresalis*) (The Rice Biological Resource Center Database; http://rice-brcdb.mpl.ird.fr/brcdb/index.html?cat=16& term=301). Por su elevada y duradera resistencia a *M. oryzae*, se utiliza como testigo resistente y donador de resistencia (Smith *y col.*, 1988; Faivre-Rampant *y col.*, 2011); pero sus características agronómicas no son apropiadas para el cultivo actual, principalmente por ser excesivamente alta (136 cm de media) y poco productiva. Roumen *y col*. (1997) inocularon 41 aislados de *M. oryzae* representativos de la población del patógeno en Europa en distintas variedades y sólo Gigante Vercelli y Estrella mostraron resistencia completa para todos los aislados. Recientemente, Urso *y col*. (2015) han identificado dos QTLs de resistencia a *M. oryzae* presentes en Gigante Vercelli. GV se ha utilizado también para estudiar la respuesta inmunológica del arroz al ataque de *M. oryzae* (Forlani *y col.*, 2011; Giberti *y col.*, 2012).

El cruzamiento SixCNA fue realizado en 2004; las plantas F1 se autofecundaron al año siguiente, y la semilla F2 se sembró en balsas de cemento rellenas de suelo arrozal en el Departamento del Arroz del IVIA, en 2006. Se numeraron e identificaron 200 de estos individuos, de los cuales se recolectaron muestras de hoja para realizar extracciones de ADN, y se cosechó el producto de autofecundación para disponer de las correspondientes líneas F3. Las líneas F3 y los parentales se sembraron en semillero en mayo de 2007, y se trasplantaron a un campo de ensayo en la localidad de El Palmar en junio del mismo año para la evaluación de la resistencia en campo, según se describe en el apartado siguiente. De cada línea se cosechó la semilla de autofecundación de una planta al azar, para construir la población F4. En la figura 18 se puede ver un esquema del diseño experimental en la población SixCNA.

Las plantas F1 procedentes del cruzamiento JSxGV, realizado en el IVIA en 2005, se autofecundaron al año siguiente para obtener la correspondiente población F2. 184 individuos F2 se sembraron, en 2007, en un invernadero del Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), en Montpellier (Francia), en un semillero de turba en alvéolos, numerando e identificando cada plántula cuando éstas alcanzaron el estado de 3 hojas; de cada una de ellas se tomó una muestra de hoja para realizar la correspondiente extracción de ADN, y posterior genotipado con marcadores. Las plántulas F2 y 4 plantas de cada uno de los parentales fueron inoculadas sucesivamente con 3 aislados de *M. oryzae*, como se describe en el siguiente apartado. Se cosechó semilla de la autofecundación de los 154 individuos F2 que sobrevivieron a las inoculaciones para generar el mismo número de líneas F3. Éstas, junto con las líneas parentales, se sembraron en un semillero en el IRTA (Institut de Recerca i Tecnología Agraria) en Amposta (Tarragona) a mediados de mayo del 2008. Cada una de las líneas se trasplantó a mediados de junio, siguiendo un diseño descrito en el siguiente apartado, en 4 localidades distintas en 3 zonas arroceras: dos localidades (“El Palmar” y “Sueca”) en el Parque Natural de la Albufera (Valencia), una en el parque Natural del Delta del Ebro, (a la que denominaremos “Delta”) y una en la zona arrocera de las Marismas del Guadalquivir

("Sevilla"). Además, las líneas F3 fueron sometidas a inoculaciones con 6 aislados de *M. oryzae*, tal y como describimos más adelante.

Figura 18. Esquema del diseño experimental en la población SixCNA. SH: Severidad en hoja, IP, IN: Incidencia en panícula o en nudo.



Los resultados de estas evaluaciones fenotípicas se utilizaron para realizar el análisis de QTLs de resistencia a *M. oryzae*. Y, aunque ya no forma parte de la presente Tesis, la información generada se utilizó para la selección de líneas F4 resistentes mediante MAS. La figura 19 muestra un esquema general del diseño experimental en la población JSxGV.

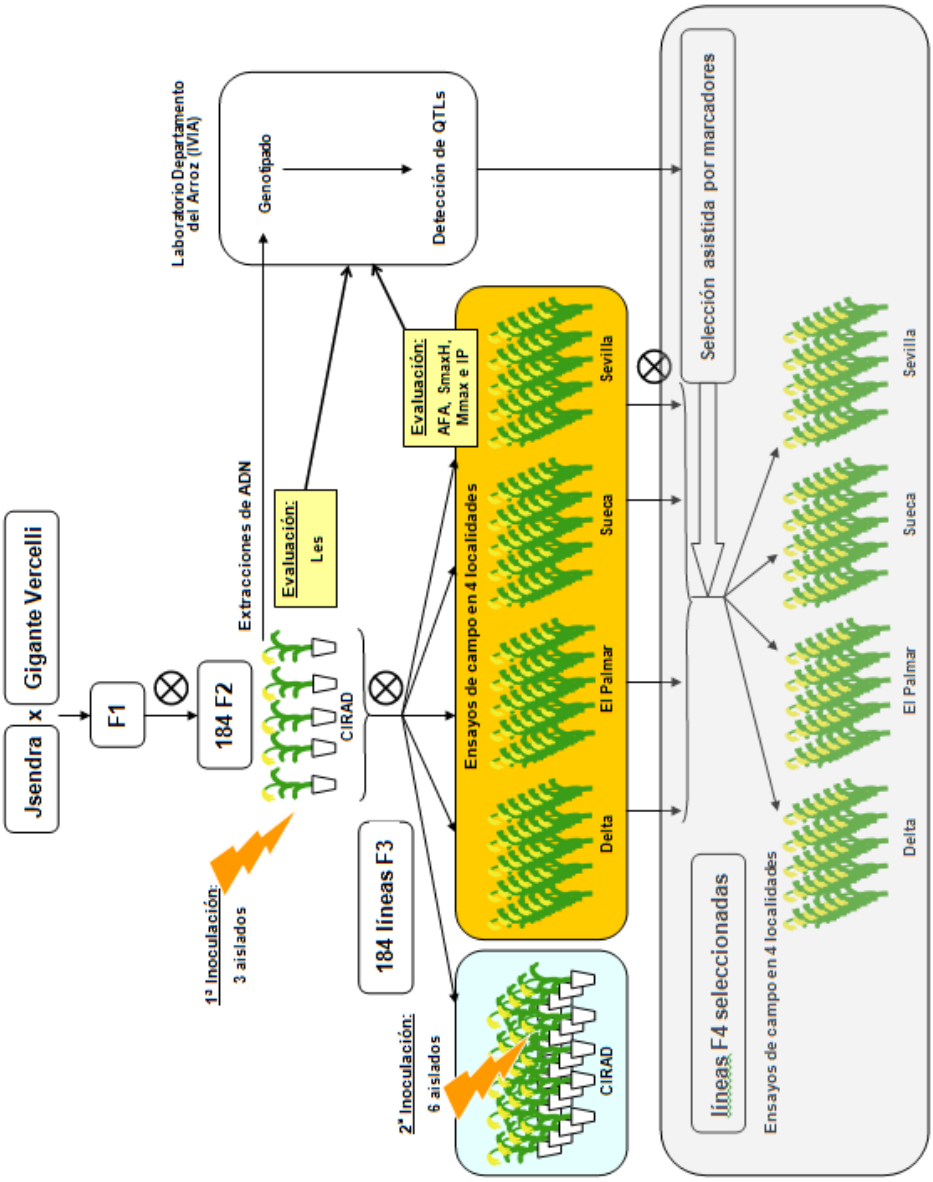


Figura 19. Esquema del diseño experimental en la población JSxGV. Les: Número de lesiones, AFA: Área foliar afectada, SmaxH: Severidad máxima en hoja, Mmax: Tamaño máximo de mancha, IP: Incidencia en panícula. Las operaciones dentro de la zona sombreada inferior no están analizadas en esta Tesis.

Variedades diferenciales

Para determinar los linajes del hongo presentes en las zonas arroceras de los Parques Naturales de la Albufera y del Delta del Ebro, a lo largo de varios años se utilizó una colección de variedades diferenciales (VDs) constituidas por la introgresión de diversos genes *Pi* en el parental recurrente LTH (apartado 1.6.3) (Tsunematsu *y col.*, 2000). Se trata de 31 líneas, cuyos nombres y el gen *Pi* que contiene se enumeran en la tabla 12. Todas ellas se cultivaron en El Palmar el año 2006, y de 2009 a 2011: se sembraron en semillero, y se trasplantaron siguiendo el diseño experimental descrito en el siguiente apartado para las evaluaciones de resistencia en campo.

Tabla 12. Variedades diferenciales utilizadas en los ensayos y genes de resistencia que poseen. (Entre paréntesis, los sinónimos).

Nombre	Gen de resistencia	Nombre	Gen de resistencia
IRBL11-ZH	*Pi11(t)*	IRBLKP-K60	*Pik-p*
IRBL12-M	*Pi12*	IRBLKS-F5	*Pik-s*
IRBL19-A	*Pi19(t)*	IRBLKS-S	*Pik-s*
IRBL1-CL	*Pi1*	IRBLSH-B	*Pish*
IRBL20-IR24	*Pi20(t)*	IRBLSH-S	*Pish*
IRBL3-CP4	*Pi3*	IRBLTA2-PI	*Pita-2*
IRBL5-M	*Pi5*	IRBLTA2-RE	*Pita-2*
IRBL7-M	*Pi7(t)*	IRBLTA-CP1	*Pita*
IRBL9-W	*Pi9*	IRBLTA-CT2	*Pita*
IRBLA-A	*Pia*	IRBLTA-K1	*Pita (=Pi4)*
IRBLA-C	*Pia*	IRBLT-K59	*Pit*
IRBLB-B	*Pib*	IRBLZ5-CA	*Piz-5 (=Pi2)*
IRBLI-F5	*Pii*	IRBLZ5-CA(R)	*Piz-5 (=Pi2)*
IRBLKH-K3	*Pik-h*	IRBLZ-FU	*Piz*
IRBLK-KA	*Pik*	IRBLZT-T	*Piz-t*
IRBLKM-TS	*Pik-m*		

3.2. Evaluación fenotípica

Evaluación de la resistencia a *M. oryzae* en invernadero

Para determinar la resistencia de la población JSxGV a linajes europeos de *M. oryzae*, las plantas F2 fueron inoculadas sucesivamente con 3 aislados del hongo que se consideraron representativos de la población del patógeno en las regiones arroceras de Europa; se trata de los aislados TH12, ES6 y CM28; la inoculación se efectuó en un invernadero del CIRAD de la siguiente manera: tres semanas después de la siembra (estado de 4-5 hojas), se pulverizó cada planta con 30 ml de una suspensión de esporas

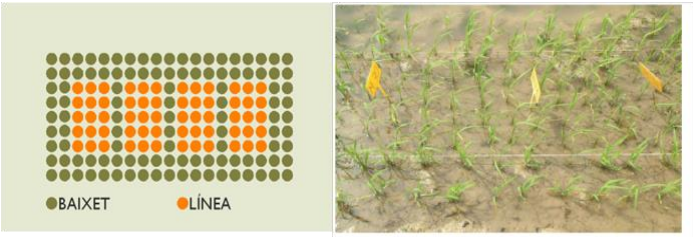
(50.000 conidias/ml) de uno de los aislados. A continuación, las plantas fueron introducidas en una cámara de cultivo y se mantuvieron en oscuridad a 24ºC y 100% de humedad relativa durante 16 horas, tras lo cual se volvieron a llevar al invernadero. Siete días después se contabilizó el número de lesiones que el patógeno había causado por hoja en cada individuo de la población F2 (LES). A continuación se realizó la inoculación con otro aislado.

Al año siguiente, 107 líneas F3 fueron inoculadas de manera similar con 6 aislados de *M. oryzae* (TH12, FR128, CD49, FR13, FR94 y FR95), igualmente representativos de la población europea. De cada línea se inocularon 20 plantas con cada uno de los aislados, realizándose dos repeticiones por aislado. La inoculación se efectuó siguiendo el mismo protocolo del año anterior; pero, en este caso, se evaluaron los porcentajes de área foliar afectada (AFA) por cada aislado y en cada repetición.

Evaluación de la resistencia a M*agnaporthe oryzae* en campo

Todos los ensayos de campo, en las diferentes localidades, se dispusieron y cultivaron de manera idéntica, siguiendo un modelo ampliamente extendido en el mundo para evaluar la resistencia a *M. oryzae* (http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Breeding_for_disease_resistance_Blast.htm). Cada parcela experimental (línea F3, VDs o parentales) consta de 15 individuos en 3 filas de 5 plantas, rodeadas de una variedad “esparcidora”, altamente susceptible, que se utiliza con el fin de obtener un nivel de presión de inóculo elevado y asegurar la igualdad de condiciones en todas las líneas (Figura 20). En todos los experimentos el esparcidor fue la variedad Baixet. Para favorecer al máximo la infección, la siembra y el trasplante son tardíos, la dosis de fertilizante nitrogenado alta (180 o 250 kg N/ha), y la densidad de plantación elevada (marco de plantación de 10 cm x 10 cm). El resto de prácticas agrícolas fueron las estándar para el cultivo y la zona. En la parcela de El Palmar, además, se dispuso un sistema de aspersión que, desde las 21h hasta las 11h, se ponía en marcha durante 10 minutos a intervalos regulares de 2 horas y que mantuvo un nivel elevado de humedad sobre las hojas, lo cual favorece más aún la infección.

Figura 20. Ensayos en campo de resistencia a *M. oryzae* de las VDs y las líneas F3. Izquierda: esquema. Derecha: foto del ensayo (fuente: María del Mar Català).



Cada año, desde mediados de junio hasta principios de octubre, se realizaron varias evaluaciones del grado de afectación por *M. oryzae* en los campos de ensayo, para asegurar que se disponía de datos en el momento de mayor incidencia de la enfermedad, que suele presentarse en picos y no de manera uniforme durante toda la época de cultivo Las determinaciones se realizaron semanalmente desde la aparición de los primeros síntomas. En la población JSxGV también se anotó el estado fenológico en que se encontraba la línea según la codificación BBCH de los estadios fenológicos de desarrollo del arroz (Meier *y col.*, 2001; Lancashire *y col.*, 1991).

Las determinaciones que se realizaron en las líneas F3 de SixCNA fueron:

- Severidad en hoja (SH): valoración de la severidad del ataque en hoja de la planta más afectada de la línea, mediante la escala adoptada en el primer simposio sobre piriculariosis en el IRRI en 1963 (Ou, 1965). Dicha escala va de 0 a 7 de menor a mayor grado de infección, y se puede ver en detalle en el Anexo I.
- Incidencia en panícula (IP): porcentaje de panículas afectadas por *M. oryzae* en 15 plantas de cada línea que hubiera iniciado, al menos, la maduración. Se consideraron panículas afectadas todas aquellas que presentaron lesiones, de mayor o menor gravedad, en nudo, en los raquis y raquillas de la panícula, o en el cuello de ésta.

En las líneas F3 y F4 de la población JSxGV se evaluó:

- La severidad máxima en hoja (SmaxH): porcentaje de área foliar afectada en las hojas de las plantas que presentaron el máximo de enfermedad de cada línea. Puesto que se tomaron varias lecturas, para los análisis posteriores se consideró siempre el valor superior entre los anotados.
- Tamaño máximo de mancha en hoja (Mmax): clasificación de la mancha más grande de la hoja que presenta más síntomas dentro de la línea, según la escala DARP-UdL-IRTA 2007 (definida por el Departament d'Agricultura, Ramadería i Pesca de la Generalitat de Catalunya, la Univeritat de Lleida y el IRTA) que valora el tipo de mancha según su longitud y cuyo rango va de 0 a 6 (Tabla 13). Este parámetro, que se ha mostrado muy útil y más objetivo que otras escalas en el Delta del Ebro, sólo se midió en las 2 localidades de El Palmar y Sueca en las líneas F3. También en este caso se consideró el valor superior entre los anotados.
- Incidencia en panícula (IP): de modo similar al descrito para la población SixCNA.

En las VDs, la susceptibilidad en hoja se evaluó de distintas formas en diferentes años:

- Severidad máxima en hoja (SmaxH): este parámetro se estimó el año 2009 de la forma descrita anteriormente.
- Ese mismo año también se determinó la Severidad media en hoja (SmedH): porcentaje medio de área foliar afectada en cada línea.
- Severidad en hoja (SH): valoración según la escala del simposio sobre piriculariosis (Ou, 1965). Se realizó los años 2006, 2010 y 2011.

Las incidencias en panícula y en nudo, sin embargo, se evaluaron todos los años de la misma manera:

- Incidencia en panícula (IP): se midió de la misma manera que en las poblaciones segregantes, pero, en este caso, no se incluyeron las lesiones en nudos.
- Incidencia en nudo (IN): porcentaje de tallos con al menos un nudo afectado por *M. oryzae* en 15 plantas de cada línea.

Algunas de las VDs resultaron ser muy tardías, por lo que no se pudo evaluar en ellas las incidencias, ya que las panículas estaban aún sin madurar al final del ensayo.

Tabla 13. Escala DARP-UdL-IRTA.

Tipo de mancha	Longitud (cm)
0	No hay síntomas
1	0,1 – 0,4
2	0,5 – 0,9
3	1,0 – 1,5
4	1,6 – 2,9
5	3,0 – 5,0
6	> 3

3.3. Análisis estadístico de los datos fenotípicos

Se realizó para cada parámetro analizado en las poblaciones un análisis estadístico unidimensional (media, varianza, desviación típica, coeficientes de asimetría y de curtosis) mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1® (Statistical Graphics corp. 1994-2000). También se obtuvieron los histogramas para observar las distribuciones de cada uno de los parámetros, y se comprobó la normalidad de las distribuciones con un gráfico de probabilidad normal. En algunos de los caracteres evaluados en la población JSxGV la distribución no fue normal, y se buscó la transformación más adecuada para aproximar los datos a la normalidad: a los datos de las inoculaciones (Les y AFA) se les aplicó la transformación logarítmica; a los de SmaxH de Sueca e IP del Delta, la raíz cuadrada, que es la función de transformación más adecuada para caracteres en que los valores son bajos; y para los de IP en El Palmar se utilizó la transformación arcoseno de la raíz cuadrada, que es la más apropiada para datos expresados en porcentajes. Igualmente, en la población SIxCNA se aplicó la transformación logarítmica para los datos de incidencia en panícula. También se calcularon las correlaciones entre los diferentes parámetros en cada localidad y entre localidades en las líneas F3 y en las variedades diferenciales con el coeficiente de correlación de Pearson:

$$R = \frac{Cov(x,y)}{\sigma_x \sigma_y}$$

donde Cov (x,y) es la covarianza de los caracteres *x* e *y*, y σ_x y σ_y son sus respectivas desviaciones típicas.

Para clasificar los genes de resistencia de las VDs según su respuesta frente a la población de *M. oryzae* presente en los ensayos, se realizó un análisis de clusters con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc. 1982-2011). El método utilizado para estimar la distancia euclídea entre centroides fue el método de varianza mínima, también conocido como método Ward (Ward, 1963).

3.4. Genotipado de las poblaciones F2

Extracción de ADN

Las extracciones del ADN se hicieron siguiendo el protocolo descrito para el Kit de extracción "Master Pure™ Plant Leaf DNA Purification Kit" de Epicentre® Biotechnologies: 100 mg de hoja se trituran con un poco de nitrógeno líquido en un mortero, se recogen en un tubo junto con la solución de extracción, y se incuban durante 30 min a 70ºC. Para eliminar los restos de tejido, se centrifuga dos veces en una microcentrífuga a 13.400 rpm, durante 10 y 5 min, transfiriendo cada vez el sobrenadante a un tubo limpio. Posteriormente, se precipita el ADN añadiendo isopropanol, y se vuelve a centrifugar durante 5 min. Tras eliminar el sobrenadante, se resuspende el *pellet* y se repite la precipitación. Finalmente, se lavan los *pellets* con etanol al 70%, y se suspenden en tampón TE (Tris-EDTA).

La concentración y pureza de los extractos de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro Spectronic GENESYS™ 10 Bio de Termo Scientific y calculando el valor de R, que es el cociente entre ambas absorbancias. Se consideró que la muestra de ADN era suficientemente pura si R se encontraba entre 1,8 y 2. La concentración se obtuvo a partir de la absorbancia a 260 nm, multiplicando por 4,6 y teniendo en cuenta el factor de dilución.

Búsqueda de polimorfismos y cribado de las F2

En primer lugar, se buscaron polimorfismos entre los parentales entre una colección de marcadores microsatélites (o SSR). Los SSR se seleccionaron para cubrir de la forma más homogénea posible todo el genoma del arroz, inicialmente a unos 20 cM de distancia entre cada uno, y con especial atención a zonas en que se habían descrito QTLs de resistencia a *Magnaporthe oryzae* con anterioridad. Posteriormente, se intentó saturar con nuevos marcadores las regiones con una baja cobertura. Las posiciones relativas de los marcadores, así como las secuencias de la mayor parte de los cebadores, se obtuvieron de las bases de datos públicas, como www.gramene.org de la Universidad de Cornell; en unos pocos casos hubo que diseñar algunos cebadores con ayuda del programa informático Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). La nomenclatura de los marcadores ha sido la general (RM –Rice Microsatellite- seguido de un número), y, en los casos en los que un marcador amplifica más de un locus, se han añadido diferentes letras mayúsculas para distinguirlos. Los marcadores que presentaron polimorfismo entre los parentales de cada población fueron cribados en todos los individuos F2. En la población SixCNA también se

analizó un cebador para RAPDs, con el que se detectaron 4 bandas que segregaban claramente, y que se denominaron con distintas letras para cada uno de los loci.

La amplificación de los fragmentos de ADN de los SSR se realizó mediante PCR, en los termocicladores GeneAmp® PCR system 9700 de Applied Biosystems y TC-412 de Techne. Para las reacciones se prepara una mezcla de 50 ng de ADN, 0,5 U de polimerasa termoestable (Netzyme® ADN polymerase de NEED S.L. ©) con su correspondiente tampón, 2 mM de $MgCl_2$, 100 µM de cada dNTP y 0,2 µM de cada cebador (directo y reverso), en un volumen final de 20 µl. El perfil de PCR fue: 94ºC durante 5 min de desnaturalización inicial, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94ºC durante 1 min, hibridación a la temperatura de apareamiento adecuada para el marcador durante 1 min, y una extensión a 72ºC durante otro minuto y, finalmente, una extensión de 5 min a 72ºC. Las temperaturas de apareamiento oscilaron entre 50º y 61ºC, dependiendo del tamaño y la composición en nucleótidos de los cebadores, siendo 55ºC la más utilizada.

Los productos de PCR se mezclaron con 2µl de tampón de carga 10x (50% glicerol, 0,5% de azul de bromofenol, 0,5% de xileno cianol, TBE 1x) y se analizaron los polimorfismos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (Solución stock de acrilamida: N,N'-metilenbisacrilamida AccuGel 29:1, al 40%, de National Diagnostics), en tampón TBE 1x (Tris-borato-EDTA; TBE de National Diagnostics), a una potencia constante de 60W durante al menos 2 horas. Los sistemas de electroforesis vertical utilizados fueron Sequi-Gen® GT (BioRad) y S3S (Owl), con fuentes de electroforesis Power Pac 3000 (BioRad), EV232 (Consort) y E832 (Consort). Si el tamaño de los marcadores a analizar lo permitía, se cargaron secuencialmente dos tandas de muestras por gel, con una separación entre tandas de dos horas, generalmente.

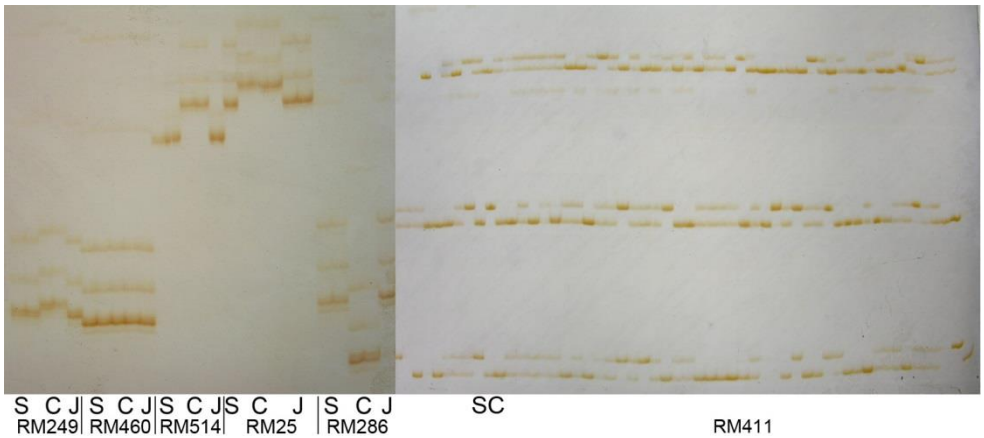
Los geles se mantuvieron fijados al cristal mediante un agente silanizante (0,1% de PlusOne Bind-Silane de GE Healthcare, en etanol al 96% y 0,1% de ácido acético) y se tiñeron con nitrato de plata según el método descrito por Ruiz *y col.* (2000), que es una modificación de Beidler *y col.* (1982): 20 min en una solución de 10% de etanol, 5 min en una de 1% de ácido nítrico, dos lavados con agua, 30 min en una solución del 0,2% de nitrato de plata, 1 lavado, revelado con una solución de Na_2CO_3 al 3% y formaldehído al 0,02%, 30 s en una solución de ácido acético al 5%, y 3 lavados con agua.

3.5. Análisis de ligamiento de los marcadores

En cada marcador se analizó la posible existencia de desviaciones significativas respecto a las frecuencias esperadas (mendelianas) mediante un test χ^2. Los mapas de ligamiento de cada una de las poblaciones se realizaron con el programa informático JoinMap®4 (Van Ooijen, 2006). Se utilizó el LOD de ligamiento (logaritmo de la probabilidad de ligamiento respecto a la probabilidad de independencia génica) para establecer los grupos de ligamiento, y el algoritmo de mapeo de regresión (Stam, 1993) para calcular las distancias entre loci. Para la conversión de fracciones de recombinación a distancias genéticas, se utilizó la función de mapa de Haldane. Consideramos que un conjunto de marcadores estaba realmente ligado cuando su LOD de ligamiento era mayor de 4. La

correspondencia entre grupos de ligamiento y cromosomas del arroz se dedujo de los mapas genéticos y, en algunos casos, de los mapas físicos publicados.

Figura 21. Ejemplo del análisis de marcadores SSR en gel de poliacrilamida. Izquierda: búsqueda de polimorfismos entre los parentales Sivert (S), CNA-6159 (C) y JSendra (J) en cinco marcadores diferentes: se observa polimorfismo entre CNA-6159 y los otros dos parentales en los marcadores RM249, RM514, RM25 y RM286 y no se observa polimorfismo entre los parentales en RM460. Derecha: segregación del marcador RM411 en la población F2 de SixCNA.



3.6. Detección de QTLs

Los QTLs fueron identificados con ayuda del programa Windows QTL Cartographer, versión 2.5 (Wang *y col.*, 2005). Para ello, se emplearon los datos genotípicos de las plantas F2, y como valores fenotípicos, los datos individuales en F2, o la media de los valores de la descendencia F3. El análisis marcador a marcador (SMA) se utilizó para los marcadores que no se encuentran en ningún grupo de ligamiento, mientras que, para los grupos de ligamiento se usó el mapeo por intervalos compuesto (CIM). Para el CIM se aplicó la selección automática de cofactores y el método de regresión directo ("forward"), y se trabajó con la hipótesis de que había tanto efecto aditivo como dominante, estimándose la posición de los QTLs detectados, sus efectos genéticos, y el porcentaje de la variación fenotípica (R^2) explicada por cada uno de ellos. El signo de las estimas de la aditividad y de la dominancia se refiere al efecto del alelo materno respecto al del alelo paterno. Para cada carácter se calculó, mediante 300 permutaciones, el umbral de probabilidad LR (*likelihood ratio*: probabilidad de que exista un QTL en el intervalo dividida por la probabilidad de que no lo haya) para el cual se puede afirmar con un 95% de seguridad que los picos de probabilidad indican QTLs reales y no falsos positivos. La representación gráfica de los grupos de ligamiento y de los QTLs se realizó con el software Mapchart2.2 (Voorrips, 2002).

En varias combinaciones carácter-localidad de la población JSxGV, gran parte de los valores fenotípicos fueron extremos (SmaxH muy bajas en El Palmar e IP muy elevadas en El Palmar y en Sueca), siendo la segregación para dichos caracteres tan distorsionada que no se cumplían las condiciones para realizar un mapeo por intervalos convencional. En tales casos efectuamos un estudio de asociación de los marcadores dentro del grupo de líneas con un fenotipo extremo. Nuestra hipótesis fue que, si hay independencia entre un marcador y un QTL de resistencia, las frecuencias de los diferentes genotipos del marcador en ese grupo de líneas de fenotipo extremo no serán distintas a las del conjunto de la población. Pero si el marcador está ligado a un QTL significativo, las frecuencias genotípicas en ese particular grupo de líneas serán distintas a las observadas en la población completa. Esta hipótesis se comprobó con un test χ^2.

Una vez detectados los QTLs, se buscaron interacciones entre ellos. Para ello se realizó un ANOVA multifactorial en todas las posibles combinaciones entre dos QTLs de un mismo carácter, considerando como factores los genotipos homocigotos de los marcadores asociados a cada QTL (los más próximos al pico de probabilidad del QTL, y/o los flanqueantes). El volumen de análisis a realizar, de haber incluido todas las combinaciones posibles, era ingente; por ello decidimos no incluir los marcadores ubicados en regiones genómicas no asociadas a algún QTL; tampoco los genotipos heterocigotos (pues la heterocigosis acaba desapareciendo en el proceso de selección para obtención de líneas puras); y tampoco se analizaron las interacciones entre los numerosos QTLs de AFA.

4 RESULTADOS

4.1. Caracterización de la población de *Magnaporthe oryzae* con Variedades Diferenciales

En los diversos años en los que se han ensayado las variedades diferenciales (VDs) en la localidad de El Palmar, la respuesta al ataque de la población de *M. oryzae* ha sido distinta, sobre todo en nudo y en panícula (Figuras 22 a 25). Mientras que la respuesta en la severidad en hoja, aunque también con ciertas variaciones interanuales, ha sido más uniforme y similar a las variedades testigo a lo largo de los años, las incidencias en panícula y nudo han sido muy bajas en 2006 y 2010, bajas en 2009 y altas en 2011.

El parental recurrente (LTH) y las líneas IRBLA-A, IRBLA-C (ambas con el gen *Pia*), IRBLI-F5 (*Pii*) e IRBLT-K59 (*Pit*) resultaron ser tardías, y en algunos años el cultivo terminó antes de que hubiese madurado el 50% de los granos, que es la condición que establecimos para evaluar la incidencia, por lo que no se tomaron esos datos. También las líneas IRBLKM-TS, IRBLZT-T, IRBL1-CL y IRBL5-M, con los genes *Pik-m*, *Piz-t*, *Pi1* y *Pi5(t),* son líneas más bien tardías, aunque durante los años de este estudio todas ellas llegaron a ser siempre evaluadas.

Los coeficientes de correlación entre los parámetros en cada año y entre años (Tabla 14) fueron generalmente bajos y menores que los obtenidos en variedades comerciales en la misma parcela en los diferentes años del presente ensayo (datos no mostrados). En 2006 ninguno de los parámetros medidos correlacionaba con otro, mientras que en 2011 los tres parámetros medidos se correlacionaban entre sí. En 2009 las dos medidas de severidad media en hoja estuvieron correlacionadas, así como las incidencias en panícula y en nudo en 2010. Las pocas correlaciones significativas entre años se dan principalmente entre un mismo parámetro: las incidencias en nudo en 2006, 2009 y 2010, la severidad en hoja en 2006 con las severidades media y máxima en 2009, y la severidad media en 2009 con la de 2011; pero también algunas entre parámetros distintos en diferentes años (entre la incidencia en panícula en 2011 y la severidad en hoja en 2009 y en 2010, y entre la incidencia en nudo en 2009 y la severidad en hoja en 2006).

Analizando los resultados del ensayo por años (Figuras 22 a 25), en 2006 (año en el que apenas hubo incidencia en panícula y nudo, la línea IRBLKH-K3 (gen *Pik-h*) fue la única con una alta incidencia en panícula (90%). Sin embargo, esta línea no sufrió ningún ataque particularmente intenso en hoja, mientras que las líneas IRBLTA2-RE (*Pita-2*), IRBL12-M (*Pi12*), IRBL19-A (*Pi19(t)*) e IRBL20-IR24 (*Pi20(t)*) sí que sufrieron fuertes ataques.

En 2009 las incidencias en panícula fueron algo mayores que en 2006. IRBLA-C (*Pia*) e IRBLTA2-PI (*Pita-2*) tuvieron los valores más elevados (33%). En nudo, las incidencias fueron mayores, pero sólo IRBLT-K59 (*Pit*) e IRBLZ5-CA (*Pi z-5*) tuvieron valores altos (55 y 63%, respectivamente). Por otra parte, las líneas IRBLKM-TS (*Pik-m*), IRBLK-KA (*Pik*), IRBLSH-B (*Pish*), IRBLZT-T (*Piz-t*), IRBLZ5-CA (*Piz-5*), IRBL1-CL (*Pi1*), IRBL3-CP4 (*Pi3*), IRBL7-M (*Pi7*), IRBL12-M (*Pi12*) e IRBL20-IR24 (*Pi20(t)*) sufrieron ataques considerables en hoja; sorprende la elevada susceptibilidad de la primera de estas, ya que en otros años, tanto en este ensayo como en otros ensayos realizados en la Albufera y el Delta del Ebro (datos no mostrados), esta VD no sufrió ataques significativos.

Tabla 14. Coeficientes de correlación entre los parámetros de resistencia de las VDs. SH: Severidad en hoja (escala IRRI [Ou, 1965]), IP: Incidencia en panícula (%), IN: Incidencia en nudo (%), SmedH: Severidad media en hoja (%), SmaxH: Severidad máxima en hoja (%). Nivel de significación: * ≤ 0,1; ** ≤ 0,05; *** ≤ 0,01.

		2006			2009				2010			2011	
		SH	IP	IN	SmedH	SmaxH	IP	IN	SH	IP	IN	SH	IP
2006	SH												
	IP	-0,18											
	IN	-0,02	0,04										
2009	SmedH	0,44**	-0,10	-0,15									
	SmaxH	0,33*	-0,10	-0,21	0,60***								
	IP	-0,26	-0,12	0,25	0,09	-0,24							
	IN	0,47***	-0,09	0,59***	0,27	0,03	-0,02						
2010	SH	0,21	0,06	0,27	0,28	0,13	0,13	0,09					
	IP	-0,05	-0,05	0,13	-0,16	0,16	-0,10	-0,20	0,02				
	IN	0,27	0,17	0,34*	0,05	0,20	-0,04	0,36**	0,28	0,32*			
2011	SH	0,03	0,26	-0,25	0,34*	0,04	-0,18	0,19	0,17	-0,06	-0,09		
	IP	0,15	0,10	0,28	0,32*	0,19	-0,26	0,20	0,40**	0,26	0,21	0,62***	
	IN	-0,03	-0,03	0,29	0,31	-0,06	-0,10	0,23	0,26	0,12	-0,00	0,76***	0,74***

Las incidencias en panícula y en nudo en 2010 fueron muy bajas, siendo las líneas de mayor incidencia, con un 25%, IRBLSH-B (*Pish*) e IRBL9-W (*Pi9*) en panícula, e IRBL19-A (*Pi19(t)*) en nudo. No obstante, sufrieron ataques fuertes en hoja las líneas IRBLA-A (*Pia*), IRBL12-M (*Pi12*), IRBL19-A (*Pi19(t)*) e IRBLT-K59 (*Pit*).

Sin embargo, en 2011 fueron muchas las líneas que sufrieron fuertes ataques por *M. oryzae*: IRBLB-B (*Pib*), IRBLKP-K60 (*Pik-p*), IRBLTA-CP1 (*Pita*) e IRBLZ5-CA (*Piz-5*) -que acabó completamente destrozada por la enfermedad- mostraron síntomas severos tanto en hoja como en panícula y en nudo; IRBLKH-K3 (*Pik-h*), IRBL12-M (*Pi12*) e IRBL19-A (*Pi19(t)*), también los tuvieron en hoja y en panícula, pero no en nudo. IRBLA-A (*Pia*) mostró síntomas de piriculariosis en hoja, pero no se pudo evaluar la incidencia en panícula, porque la línea fue tardía. Otras líneas tuvieron altos porcentajes de incidencia en panícula, aunque en hoja los daños no fueron elevados: IRBLSH-B (*Pish*), IRBLKS-F5 (*Pik-s*), IRBLK-KA (*Pik*), IRBLKM-TS (*Pik-m*), IRBLZT-T (*Piz-t*), IRBL3-CP4 (*Pi3*), IRBL5-M (*Pi5(t)*), IRBL7-M (*Pi7*), IRBL9-W (*Pi9*), IRBL11-ZH (*Pi11*) e IRBL20-IR24 (*Pi20(t)*). Entre estas, IRBL9-W (*Pi9*) e IRBLZT-T (*Piz-t*) sufrieron además una elevada incidencia en nudo. Por otra parte, hay que destacar que, a pesar del fuerte ataque de la enfermedad en ese año, tanto las incidencias en panícula y en nudo como la severidad en hoja fueron muy bajas en las líneas IRBLZ-FU (*Piz*) y IRBL1-CL (*Pi1*), por lo que se puede deducir que en la población del patógeno no se hallaron linajes compatibles con los genes *Pi1* y *Piz* en esa parcela en 2011. Los valores de severidad en hoja también fueron bajos en IRBLA-C *(Pia*) y IRBLT-K59 (*Pit*), aunque no se pudo caracterizar por completo su grado de resistencia ya que faltan los datos de incidencias por ser VD tardías.

Figura 22. Respuesta de las Variedades Diferenciales en 2006. IP: Incidencia en panícula, IN: Incidencia en nudo, SH: Severidad en hoja. Las columnas en blanco corresponden a incidencias no evaluadas en VDs tardías.

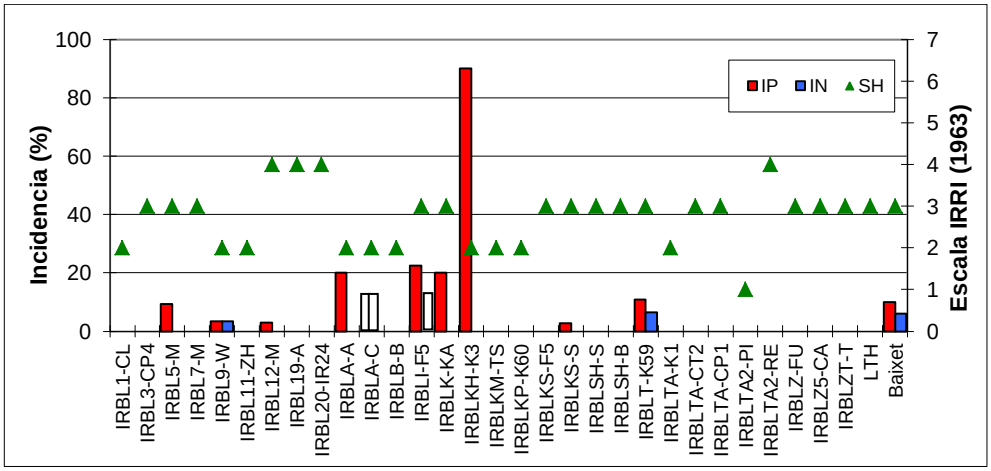


Figura 23. Respuesta de las Variedades Diferenciales en 2009. IP: Incidencia en panícula, IN: Incidencia en nudo, SmedH: Severidad media en hoja, SmaxH: Severidad máxima en hoja.

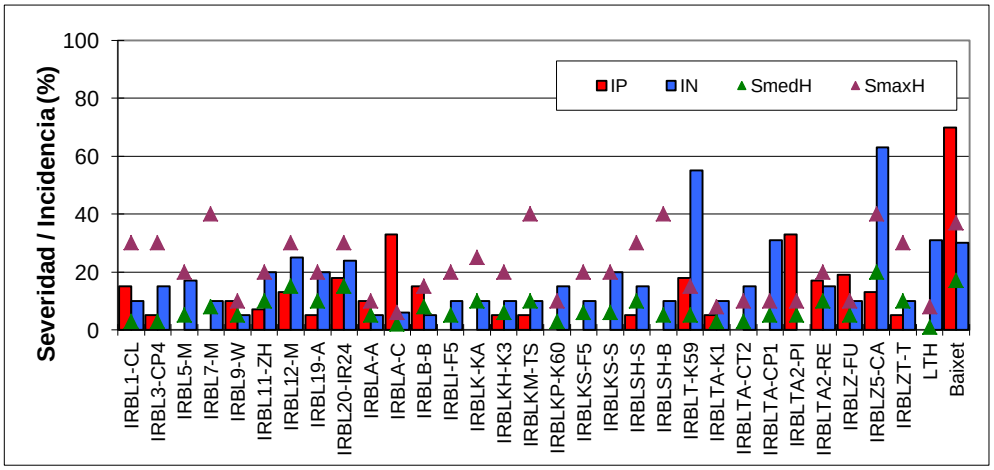


Figura 24. Respuesta de las Variedades Diferenciales en 2010. IP: Incidencia en panícula, IN: Incidencia en nudo, SH: Severidad en hoja.

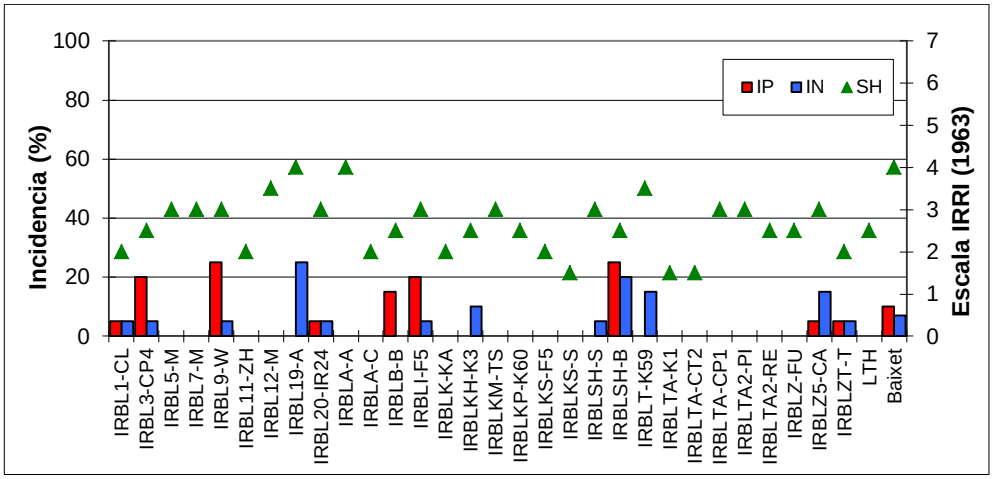
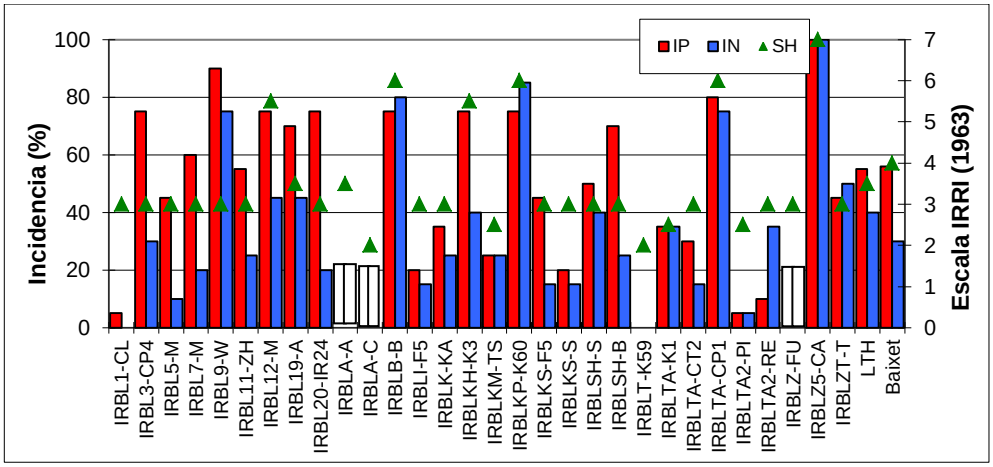


Figura 25. Respuesta de las Variedades Diferenciales en 2011. IP: Incidencia en panícula, IN: Incidencia en nudo, SH: Severidad en hoja. Las columnas en blanco corresponden a incidencias no evaluadas en VDs tardías.



La Tabla 15 resume el comportamiento de las VDs en los distintos años en los que se las evaluó frente a la población de *M. oryzae* en la localidad de El Palmar. Se realizó además un análisis de clusters de los datos de todos los años en que se efectuaron los ensayos: la Figura 26 muestra el dendrograma resultante del análisis, en el que no aparecen los genes *Pia*, *Pii* y *Pit* por faltar algún dato. No obstante, el análisis de clusters de los genes *Pi* restantes ayuda a descubrir relaciones entre algunos de ellos difíciles de

detectar sin este método. Los genes *Pi* se agrupan en dos grandes clusters, estando todos los de las VDs que habitualmente mostraron menos síntomas en el cluster de la izquierda: dentro de este grupo sólo se observaron síntomas intensos de la enfermedad en IRBLTA2-RE (*Pita-2*) en hoja en 2006, y en IRBL7-M (*Pi7*), IRBL11-ZH (*Pi11*) e IRBLZT-T (*Piz-t*) en panícula o nudo en 2011, pero precisamente en ese año todas las líneas del otro cluster se vieron afectadas por la enfermedad de forma aún más grave. En este grupo, *Pita-2*, *Pi1* y *Piz* aparecen estrechamente ligados, lo que se puede explicar porque en 2011, año en el que hubo un fuerte ataque del hongo, la incidencia en panícula de las VDs que contienen estos genes fueron muy bajos en comparación con las otras VDs. Pero en 2006 IRBLTA2-RE, una de las líneas que posee *Pita-2*, tuvo síntomas severos de piriculariosis en hoja, lo que hace dudar de la eficacia de este gen frente a los linajes de *M. oryzae* presentes en el Parque Natural de la Albufera. El análisis de clusters coloca a *Pi7* en el cluster de la izquierda cerca de *Pik-m* y *Pi5(t)*, ya que IRBL7-M (*Pi7*) tuvo valores de susceptibilidad bajos y parecidos a los de IRBL5-M (*Pi5(t)*) y IRBLKM-TS (*Pik-m*), salvo en incidencia en panícula en 2011, aunque se debe considerar que IRBL7-M es bastante tardía, lo que podría haber influido en los valores bajos de incidencia en panícula en los restantes años. El cluster de la izquierda contiene 4 genes más: *Pi11*, *Pik*, *Pik-s*, *Piz-t*, que tuvieron valores de susceptibilidad similares y por lo general bajos.

Figura 26. Análisis de clusters de los genes Pi de la colección internacional de VDs, ensayados en El Palmar durante los años 2006, 2009, 2010 y 2011.

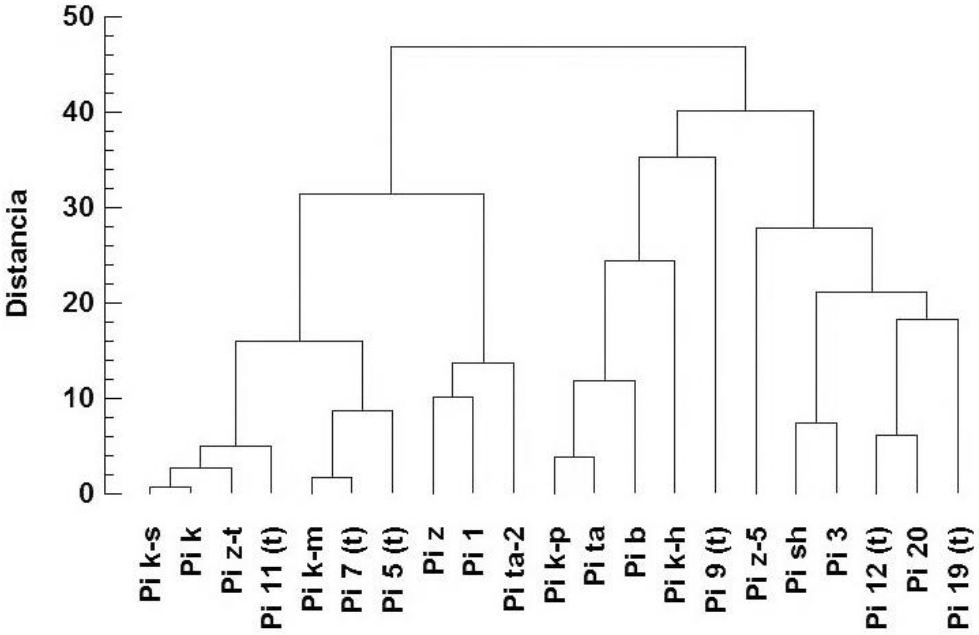


Tabla 15. Comparación de las susceptibilidades a *M. oryzae* en hoja, panícula y nudos de las VDs en los distintos años del ensayo. Pan.: panícula. Tipos de reacción: □: resistente, ◪: moderadamente susceptible; ■: susceptible. El fondo amarillo indica ataque en nudo. Cuando no aparece recuadro significa que no se pudieron evaluar las panículas y los nudos por ser las líneas demasiado tardías. (1) La letra T entre paréntesis indica que se trata de una VD tardía. LTH: parental recurrente, y testigo de susceptibilidad**.**

Gen de resistencia	Línea monogénica (1)	2006		2009		2010		2011	
		Hoja	Pan.	Hoja	Pan.	Hoja	Pan.	Hoja	Pan.
Pi1	IRBL1-CL (T)	□	□	◪	□	□	□	□	□
Pi3	IRBL3-CP4	□	□	◪	□	□	□	□	■
Pi5	IRBL5-M (T)	□	□	□	□	□	□	□	◪
Pi7	IRBL7-M	□	□	◪	□	□	□	□	■
Pi9	IRBL9-W	□	□	□	□	□	◪		■
Pi11	IRBL11-ZH	□	□	□	□	□	□	□	■
Pi12	IRBL12-M	■	□	◪	□	■	□	■	■
Pi19	IRBL19-A	■	□	□	□	■	□	◪	■
Pi20	IRBL20-IR24	■	□	◪	□	□	□	□	■
Pia	IRBLA-A (T), IRBLA-C (T)	□	□	□	◪	■	□	◪	
Pib	IRBLB-B	□	□	□	□	□	□	■	■
Pii	IRBLI-F5 (T)	□	□	□	□	□	□	□	□
Pik	IRBLK-KA	□	□	◪	□	□	□	□	◪
Pik-h	IRBLKH-K3	□	■	□	□	□	□	■	■
Pik-m	IRBLKM-TS (T)	□	□	◪	□	□	□	□	◪
Pik-p	IRBLKP-K60	□	□	□	□	□	□	■	■
Pik-s	IRBLKS-S, IRBLKS-F5	□	□	□	□	□	□	□	◪
Pish	IRBLSH-S, IRBLSH-B	□	□	◪	□	□	◪	□	■
Pit	IRBLT-K59 (T)	□	□			◪	□	□	
Pita	IRBLTA-CP1, IRBLTA-CT2, IRBLTA-K1	□	□	□	□	□	□	■	■
Pita-2	IRBLTA2-PI, IRBLTA2-RE	■	□	□	◪	□	□	□	□
Piz	IRBLZ-FU	□	□	□	□	□	□	□	□
Piz-5	IRBLZ5-CA	□	□	◪		□	□	■	■
Piz-t	IRBLZT-T (T)	□	□	◪	□	□	□		◪
-	LTH (T)	□		□	□	□	□	◪	■
-	Baixet	□	□	◪	■	■	□	■	■

En cuanto a los genes agrupados en el cluster de la derecha, todas las VDs que los contienen sufrieron ataques severos de *M. oryzae* en al menos uno de los años y los valores de susceptibilidad fueron habitualmente más elevados que para las VDs del cluster de la izquierda. Los genes del subgrupo más a la izquierda (*Pik-p*, *Pita*, *Pib*) sólo mostraron una reacción susceptible en 2011, mientras que los tres genes más a la derecha (*Pi12*, *Pi20(t)* y *Pi19(t)*) son los más ineficaces en los 4 años del ensayo. Los restantes componentes del cluster (*Pik-h*, *Pi9*, *Piz-5*, *Pish* y *Pi3*) mostraron síntomas de ataque de *Magnaporthe* en 2011 y en al menos un año más.

4.2. Análisis de la resistencia en la población SixCNA

4.2.1. Evaluación de la resistencia en la población SixCNA

La Tabla 16 muestra un resumen de la evaluación de la severidad en hoja y de la incidencia en panícula en la población F3 derivada del cruzamiento SixCNA, en los parentales (Sivert y CNA-6159) y en la variedad esparcidora y control *Baixet*. De acuerdo con la distinta susceptibilidad en hoja en los parentales, se encontró una clara segregación en este carácter entre las líneas, con un rango de variación de 1 a 4,5. Por el contrario, en un año en que el ataque en los órganos productivos no fue severo, pues *Baixet* tuvo una IP de sólo el 40%, ninguno de los parentales mostró síntomas en panícula o nudo; sin embargo las líneas F3, aún con incidencias bajas (máximo del 33%), sí mostraron segregación en este carácter.

Tabla 16. Susceptibilidad en el cruzamiento SixCNA, en los parentales y en el control Baixet. Severidad en hoja evaluada según la escala (0-7) del simposio sobre piriculariosis de 1963 (Ou, 1965). Incidencia: porcentaje de panículas afectadas.

	Severidad en hoja	Incidencia en panícula
Sivert	4,0	0
CNA-6159	1,5	0
Baixet	4,2	40
Media población F3	3,1	7,5
Rango población F3	1 – 4,5	0 - 33

En la Figura 27 se puede observar la distribución de los dos caracteres evaluados en esta población. También se puede ver que, al intentar aproximar la distribución de la incidencia a la normalidad mediante una transformación logarítmica, se puso de manifiesto una clara separación entre las líneas con incidencia igual a cero, y el resto; por ello, decidimos realizar dos análisis de QTLs para este carácter: por un lado con el conjunto de la población, y por otro lado con el subgrupo de líneas susceptibles (Inc > 0); ambos con los datos transformados.

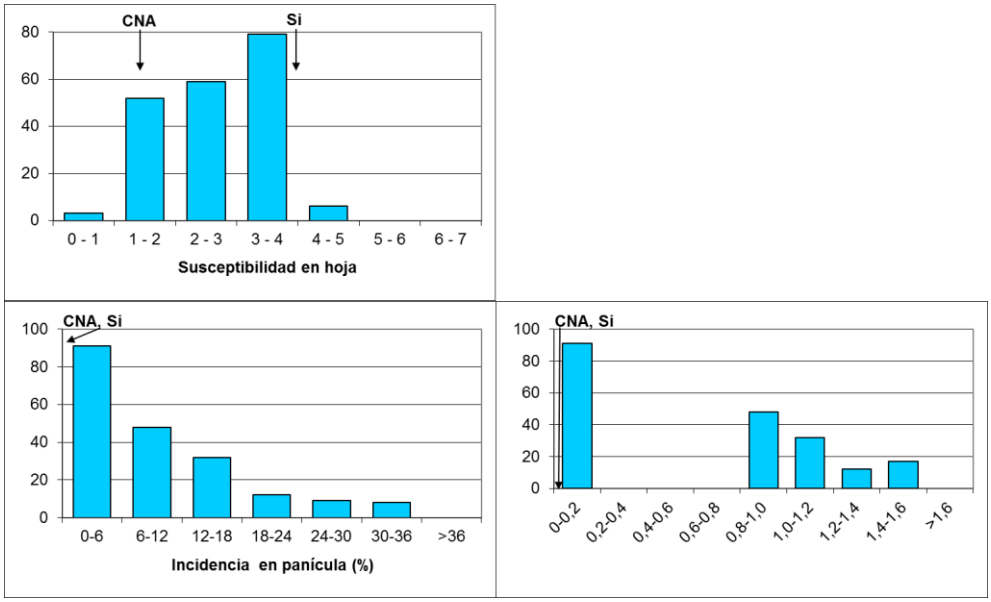
La correlación entre la severidad en hoja y la incidencia en panícula en la población SixCNA es significativa (r = 0,26), aunque menor que la obtenida en variedades comerciales en el mismo año y en los mismos campos (datos no mostrados).

4.2.2. Mapeo de QTLs en la población SixCNA

4.2.2.1. Segregación de los marcadores y mapa de ligamiento

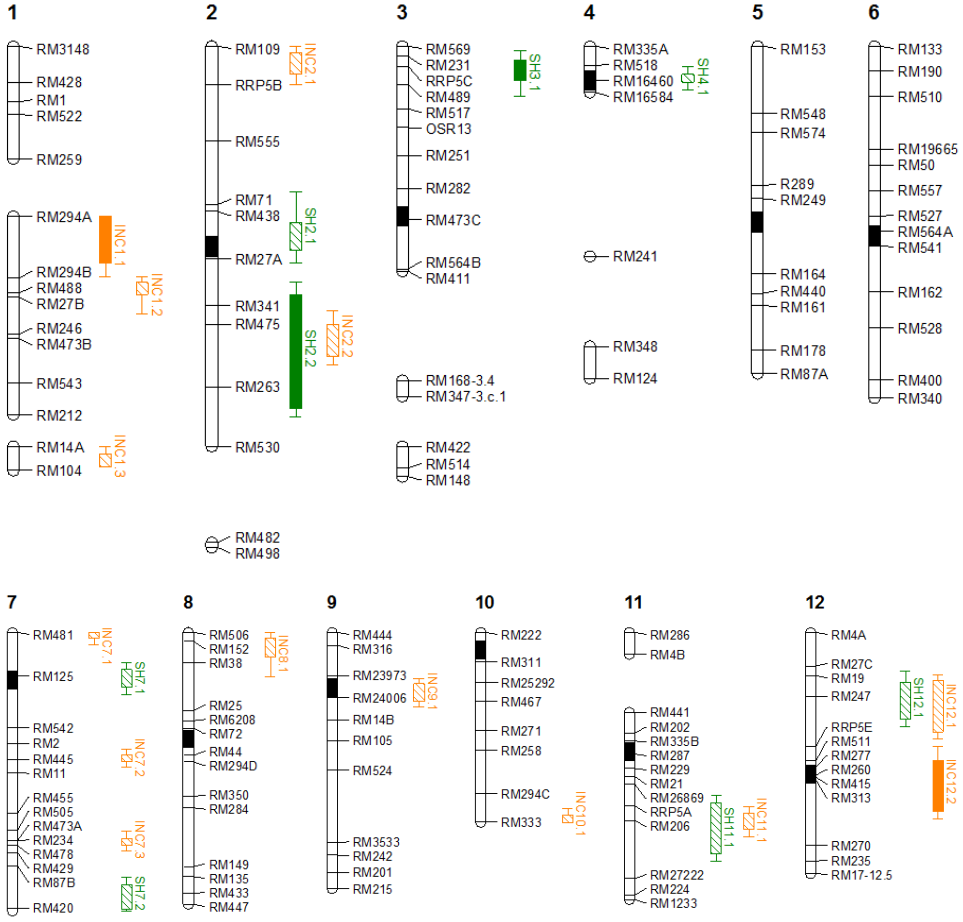
De los 298 marcadores SSR ensayados, 132 (44%) presentaron polimorfismo entre los parentales. Ocho de estos marcadores amplificaron varias bandas polimórficas (RM4, RM14, RM27, RM 87, RM294, RM335, RM473 y RM564), las cuales se cartografiaron mediante análisis de ligamiento, y se añadieron letras por orden alfabético al final del nombre para designar a cada uno de estos loci polimórficos; algunos de ellos se localizaron en regiones en las que no se habían descrito con anterioridad, como ocurre con los marcadores RM14 en el cromosoma 9, RM27 en los cromosomas 1 y 12, RM 87 en el cromosoma 7 y RM335 en el cromosoma 11. También se cribó un cebador para RAPDs, denominado RRP5, con el que se detectaron con claridad 4 bandas que segregaban en la población, y que se denominaron también con distintas letras para cada uno de los loci, que se localizan en los cromosomas 2, 3, 11 y 12.

Figura 27. Distribución de la severidad en hoja y de la incidencia en panículas y nudos en las líneas F3 de la población SixCNA. Arriba: severidad en hoja (escala del simposio sobre piriculariosis de 1963; Ou 1965). Abajo izquierda: incidencia en porcentaje en panículas y nudos. Abajo derecha: datos transformados. Si: Sivert; CNA: CNA-6159.



La Figura 28 muestra el mapa de ligamiento obtenido y los QTLs detectados en esta población. El orden de los marcadores y las distancias entre estos se corresponde bien con los diversos mapas publicados. Pero al exigir un LOD de ligamiento elevado (4), algunos marcadores que pertenecerían al mismo cromosoma según diversos mapas publicados, aparecen en grupos de ligamiento separados; en la representación gráfica, se muestran como grupos contiguos con una distancia relativa entre ellos aproximada, basada en los mapas mencionados. No hemos querido forzar el ligamiento en grupos más largos, pues la existencia de intervalos excesivamente largos afectaría a la precisión del mapeo de QTLs.

Figura 28. Mapa de ligamiento y QTLs de resistencia a *M. oryzae* en la población procedente del cruzamiento Sivert x CNA. Denominación de los QTLs: SH (verde): Severidad en hoja; INC (dorado): Incidencia en panícula. Las barras sólidas indican QTLs con un LR superior a 10, o regiones con un nivel de significación de 0,01 (o menor) en el test χ^2; las barras rayadas indican QTLs con un LR ente 8 y 10, o regiones con un nivel de significación ≤ 0,05 en el test χ^2. Los brazos son el intervalo de confianza del QTL.



De los 136 marcadores cribados en todos los individuos, 36 (27%) tuvieron segregaciones no mendelianas. Casi todos ellos se encuentran agrupados en ciertas regiones cromosómicas: en los cromosomas 3 (de RM569 a RM411), 6 (de RM190 a RM541), 7 (de RM478 a RM429), 8 (de RM44 a RM350), 9 (de RM14B a RM105), 11 (de RM202 a RM21) y 12 (de RM270 a RM17). En algunas regiones cromosómicas no se encontraron polimorfismos entre los parentales y en otras se acumularon numerosos marcadores polimórficos: mientras que en los cromosomas 4, 5, 9 y 10 se hallaron pocos polimorfismos, los cromosomas 1, 3, 6, 7, 8 y 11 presentaron una mejor cobertura de marcadores. La densidad de marcadores dentro de un mismo cromosoma tampoco es homogénea; por ejemplo, en los cromosomas 1 y 3, a pesar de ser los cromosomas en los que se encuentran más polimorfismos, hay dos amplias regiones en las que no se ha detectado ninguno.

4.2.2.2. QTLs de resistencia

Se han encontrado 22 regiones asociadas a los caracteres estudiados: 8 que influyen en la severidad en hoja y 14 en la incidencia en panícula. Los QTLs se denomina con unas siglas según el carácter (SH para severidad máxima en hoja e INC para incidencia en panícula), seguidas por el número del cromosoma en el que se encuentran, y el número de orden en ese cromosoma. Como criterio de veracidad de un QTL, consideramos, por lo general, que su LR fuera superior a 8, si bien algunos loci con LR inferiores se han incluido por presentar interacciones epistáticas significativas. La Tabla 17 muestra las características más importantes de estos QTLs, y el Anexo II las gráficas y los detalles de las interacciones.

Tabla 17. Intervalos cromosómicos asociados con QTLs de resistencia a *M. oryzae* en SixCNA. SH = Severidad en hoja; INC = Incidencia en panícula. Cr: Cromosoma; Tipo: análisis realizados para la incidencia en la población completa (T) o en el grupo con síntomas (S); a = efecto aditivo (a > 0: el alelo de Si aumenta la susceptibilidad; a < 0: la disminuye); d = efecto dominante; R^2 = variación fenotípica explicada; Sign: LR del QTL; Umbr: Umbral de confianza al 95% para LR. Interacc: QTLs con los que interacciona.

QTL	Cr	Tipo	Intervalo	a	d	R^2	Sign	Umbr	Interacc
SH2.1	2		RM555 – RM27A	0,31	0,06	0,05	7,3	17,4	SH7.2 SH11.1
SH2.2	2		RM27A – RM530	0,07	-0,46	0,08	12,2		SH4.1 SH7.2 SH11.1 SH12.1
SH3.1	3		RM569 – RM517	-0,08	0,44	0,07	11,5		SH12.1
SH4.1	4		RM518 – RM16584	-0,22	-0,05	0,04	8,5		SH2.2
SH7.1	7		RM481 – RM542	0,24	0,12	0,04	9,2		
SH7.2	7		RM87B – RM420	-0,16	0,32	0,04	8,9		SH2.1 SH2.2 SH12.1

QTL	Cr	Tipo	Intervalo	a	d	R^2	Sign		Interacc
SH11.1	11		RM26869 – RM27222	-0,28	0,09	0,06	9,1		SH2.1 SH2.2
SH12.1	12		RM19 – RRP5E	0,11	-0,36	0,05	6,9		SH2.2 SH3.1 SH7.2
INC1.1	1	S	RM294A – RM294B	-1,29	4,03	0,09	11,9	17,7	INC7.3
INC1.2	1	S	RM294B – RM27B	-3,02	1,28	0,07	8,6		INC9.1, INC10.1
INC1.3	1	S	RM14A – RM104	-2,38	3,94	0,07	7,4		INC9.1, INC12.1 INC12.2
INC2.1	2	T	RM109 – RRP5B	1,30	-1,62	0,04	7,9		INC2.2
INC2.2	2	S	RM475 – RM263	4,12	-4,18	0,09	7,9		INC2.1 INC7.1 INC12.2
INC7.1	7	T	RM481 – RM125	1,17	-1,70	0,03	6,3		INC2.2 INC7.2, INC11.1
INC7.2	7	T	RM2 – RM11	-1,96	-1,71	0,04	8,5		INC7.1 INC8.1 INC10.1 INC12.2
INC7.3	7	S	RM473A – RM478	-0,21	3,16	0,06	8,4		INC1.1 INC8.1 INC12.1
INC8.1	8	T	RM506-RM38	0,13	-2,75	0,05	9,5		INC7.2 INC7.3
INC9.1	9	S	RM23973 – RM14B	-0,89	5,13	0,09	9,4		INC1.2 INC1.3
INC10.1	10	T	RM294C – RM333	2,62	-0,61	0,04	8,0		INC1.2 INC7.2
INC11.1	11	S	RM26869- RM27222	1,30	3,55	0,07	9,2		INC7.1
INC12.1	12	T	RM19 – RRP5E	-1,98	-3,27	0,09	9,9		INC1.3 INC7.3
INC12.2	12	T/S	RRP5E – RM270	1,14	-3,29	0,11	13,4		INC1.3 INC2.2 INC7.2

QTLs que controlan la severidad en hoja

De los 8 QTLs que influyen en la severidad en hoja, en 4 de ellos (SH3.1, SH4.1, SH7.2 y SH11.1) el alelo de Si aporta una reducción notable de susceptibilidad, en oposición a la menor resistencia observada en este parental en el ensayo; mientras que en los otros 4 (SH2.1, SH2.2, SH7.1 y SH12.1) el aumento de la resistencia lo aportan los alelos de CNA. Por otra parte, SH2.2, SH3.1, SH7.2 y SH12.1 tienen efectos dominantes considerables y de distintos signos. Los efectos son, en todo caso, pequeños, pues la variación fenotípica que explican estos QTLs varía entre el 4 y el 8%. En total, los QTLs hallados explican el 43% de la variación fenotípica del carácter.

En total se han hallado 8 interacciones significativas entre los QTLs de SH en esta población. Todos los QTLs de SH, salvo SH7.1, presentan al menos una interacción significativa. Los QTLs con más interacciones son SH2.2, que interacciona con 4 de los 7 restantes QTLs, y SH7.2 y SH12.1, que interaccionan con otros 3 QTLs.

QTLs que controlan la incidencia en la panícula

Al analizar el conjunto de la población SixCNA se identificaron siete QTLs que afectaron a la incidencia de la enfermedad en panículas; pero cuando se repitió el análisis eliminando los genotipos que no presentaron síntomas se detectaron siete QTLs adicionales. INC12.2 se halló en ambos análisis (en la Tabla 17 se muestran los valores del análisis de mayor significación). Sólo INC1.2 e INC11.1 aparecen como QTLs sólo entre el grupo de líneas susceptibles; mientras que en el caso de INC8.1, INC10.1 e INC12.1 deja de detectarse un efecto sobre la resistencia al eliminar las líneas sin síntomas (sin embargo, en la mayoría de los casos, el otro análisis también indicaba la posible existencia de un QTL en esa región, aunque de baja probabilidad). Se ha incluido INC7.1 aunque tenga una LR bajo (6,3), porque el grupo de líneas susceptibles contiene una proporción de genotipos con el alelo Si significativamente superior a lo esperado, lo cual coincide con el efecto aditivo predicho por el QTL. Los 14 QTLs detectados no se distribuyeron de forma uniforme, sino que se hallaron tres QTLs en los cromosomas 1 y 7 y dos en los cromosomas 2 y 12, mientras que no se detectó ningún QTL en los cromosomas 3, 4, 5 y 6. Cabe destacar que en la mayoría de estos QTLs el efecto dominante es importante, siendo en 8 casos sensiblemente superior a la aditividad. Como en el caso de la severidad en hoja, también en la incidencia en panícula ambos parentales aportan resistencia: concretamente, cada uno en 7 QTLs; aunque en algunos de estos QTLs el efecto aditivo es pequeño, y en muchos el efecto dominante es mayor que el efecto aditivo. Los QTLs encontrados explican entre un 3 y un 11% de la variación fenotípica de la incidencia en la panícula. Mientras que al realizar el análisis de QTLs de toda la población, estos explican sólo el 40% de la variación fenotípica, los QTLs obtenidos analizando el grupo de individuos con síntomas explican el 65% de esta variación.

En esta población se han detectado numerosas interacciones entre los QTLs de incidencia: 16 en total, presentando todos los QTL al menos una interacción significativa. Los QTLs en los que más interacciones se han encontrado son INC7.2 con 4 interacciones e INC1.3, INC2.2, INC7.1, INC7.3 e INC12.2, que tiene 3 interacciones cada uno.

4.3. Análisis de la resistencia en la población JSxGV

4.3.1. Evaluación de la resistencia en la población JSxGV

La Tabla 18 resume los resultados de las evaluaciones fenotípicas en las poblaciones F2 y F3 procedentes del cruzamiento JSxGV en las diferentes localidades. En el ensayo realizado en Sevilla no se detectó un ataque significativo de *Magnaporthe oryzae* en el año 2008, por lo que no se incluyen datos de esa localidad. El tamaño máximo de mancha sólo se evaluó en Sueca y en El Palmar.

Tabla 18. Susceptibilidad en el cruzamiento JSxGV, en los parentales (JS: JSendra; GV: Gigante Vercelli), y en el control Baixet. Año en que se evaluó la F2: Les= número de lesiones por hoja (aislado TH12). Año en que se evaluó la F3: AFAm= Área foliar media afectada en la inoculación con 6 aislados (%); parámetros de campo medidos en tres localidades (Sueca, El Palmar y Delta): SmaxH= Severidad máxima en hoja (% de superficie); IPan= Incidencia en panícula (%); Mmax.= Tamaño máximo de mancha (escala DARP-UdL-IRTA 2007, de 0 a 6).

	F2	**F3**								
			Sueca			**El Palmar**			**Delta**	
	Les	**AFAm**	**SmaxH**	**Mmax**	**IPan**	**SmaxH**	**Mmax**	**IPan**	**SmaxH**	**IPan**
JS	33	8,5	1	4	3	1	5	40	4	6
GV	6	1,4	2	4	10	5	2	75	0	22
Baixet	-	-	-	6	-	80	6	100	8	19
Población										
Media	18,6	5,1	5	3,9	86	4	4,1	79	1	31
Rango	0–80	0-22	0-20	1-6	0-100	0-100	1-6	15-100	0-5	0-83

La población F2 sólo mostró segregación en el número de lesiones provocadas por la inoculación con el aislado TH12, a pesar de que las variedades parentales habían mostrado diferencias de susceptibilidad también frente a los otros 2 aislados ensayados. Puesto que un solo linaje no es representativo de la población del patógeno en Europa, ni se puede determinar con él la amplitud de espectro de resistencia de los QTLs detectados, se decidió volver a realizar un ensayo de inoculación al año siguiente en la población F3, con TH12 y otros 5 aislados (FR128, CD49, FR13, FR94 y FR95), que reflejaran la variación existente. En este segundo ensayo, se hicieron dos repeticiones para evaluar el área foliar afectada (AFA) por cada aislado, y se consideraron diferentes parámetros para medir la resistencia: el AFA media y máxima de cada aislado; un parámetro global, AFAm, promedio de la respuesta a los aislados (el que se indica en la Tabla 18); y AFAmax, es decir, el promedio de los valores máximos de todos los aislados. El Anexo IV detalla todos los parámetros medidos en este segundo ensayo de inoculación.

Se observó una gran variación entre las líneas F3, pero también dentro de cada línea, tanto en los parámetros relativos a la resistencia como en otros caracteres, tales

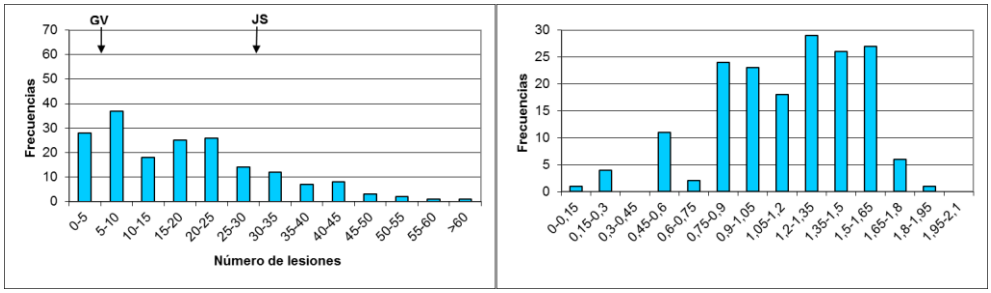
como la altura de las plantas o su ciclo reproductivo. Esto último dificultó la toma de datos en campo, pues algunas de las líneas resultaron ser muy tardías y aún no habían espigado al final del periodo de cultivo, por lo que carecemos de datos de incidencia en panícula en esos casos. En otras líneas, donde hubo segregación en cuanto a ciclo, los datos de incidencia en panícula corresponden a la media de las plantas más tempranas.

La severidad máxima en campo (porcentaje de superficie foliar afectada) fue baja en todas las localidades, sobre todo en el Delta, donde la media de todas las líneas fue de 0,73% y ninguna línea superó el 5%; la variedad testigo *Baixet* también presentó un valor bajo en el Delta, aunque mayor que los parentales. A pesar de esta baja severidad, los tamaños máximos de mancha en Sueca y El Palmar fueron bastante grandes. La incidencia de la enfermedad en panícula fue alta en las 3 localidades, especialmente en Sueca y en El Palmar.

En los dos ensayos de inoculación, como esperábamos, JS fue más susceptible que GV, el parental teóricamente resistente; aunque las AFAm de ambos parentales fueron muy reducidas en casi todos los casos (Figura 30). Pero en la mayoría de los parámetros de campo ocurrió lo contrario de lo esperado, pues GV resultó más susceptible que JS. Esto fue así en las tres localidades en lo que respecta a la incidencia en panícula, y en las 2 localidades de Valencia en lo que respecta a la severidad máxima en hoja, aunque ese año ésta fue baja en todas las localidades. En lo que respecta al tamaño máximo de mancha, en El Palmar fue mayor en JS que en GV, mientras que en Sueca fue similar en ambos parentales. La media de la población F3 tuvo generalmente un valor intermedio entre JS y GV en los parámetros de susceptibilidad en hoja (SmaxH, Mmax, Les y AFA), pero la incidencia en panícula de la población superó a la de los parentales, sobre todo en el ensayo en Sueca. En el Delta, la media de la incidencia en la población F3 llegó a ser incluso mayor que en *Baixet*.

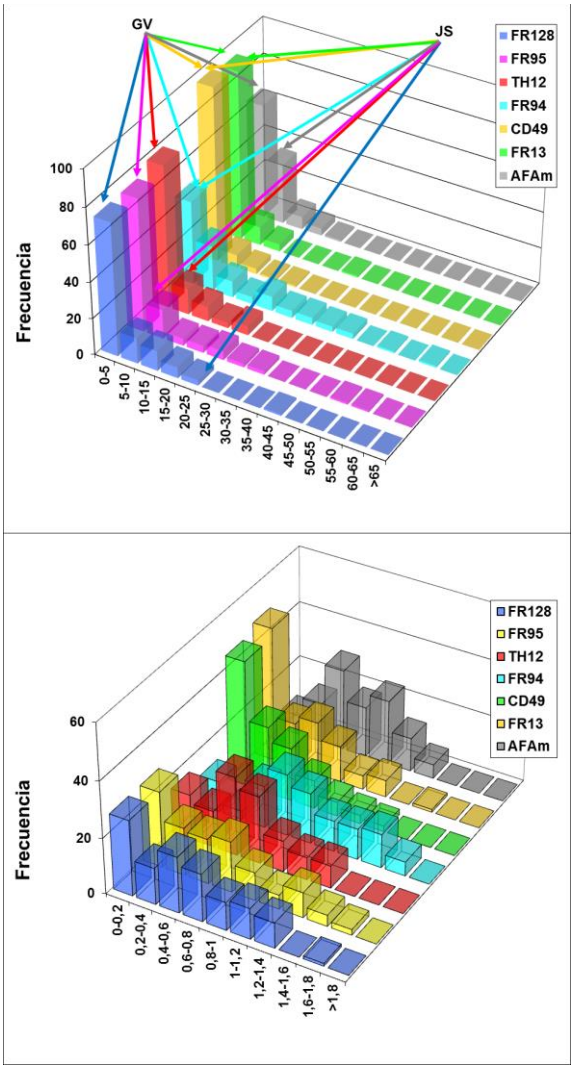
Como se puede observar en las Figuras 29 y 30, las segregaciones tras la inoculaciones con los distintos aislados no muestran una distribución normal, lo que es frecuente en este parámetro, sobre todo si el número de lesiones por planta es bajo (Roumen, 1994). La transformación logarítmica fue la más apropiada en estos casos para aproximar los datos a la normalidad. En las inoculaciones de las líneas F3, un gran número de líneas tuvo valores de AFAm cercanos o iguales a cero con todos los aislados. Pero

Figura 29. Distribución del número de lesiones en hoja después de la inoculación con el aislado TH12 de *M. oryzae* en la población F2 del cruzamiento JS x GV. Izquierda: datos sin transformar; derecha: datos transformados. JS: JSendra; GV: Gigante Vercelli.



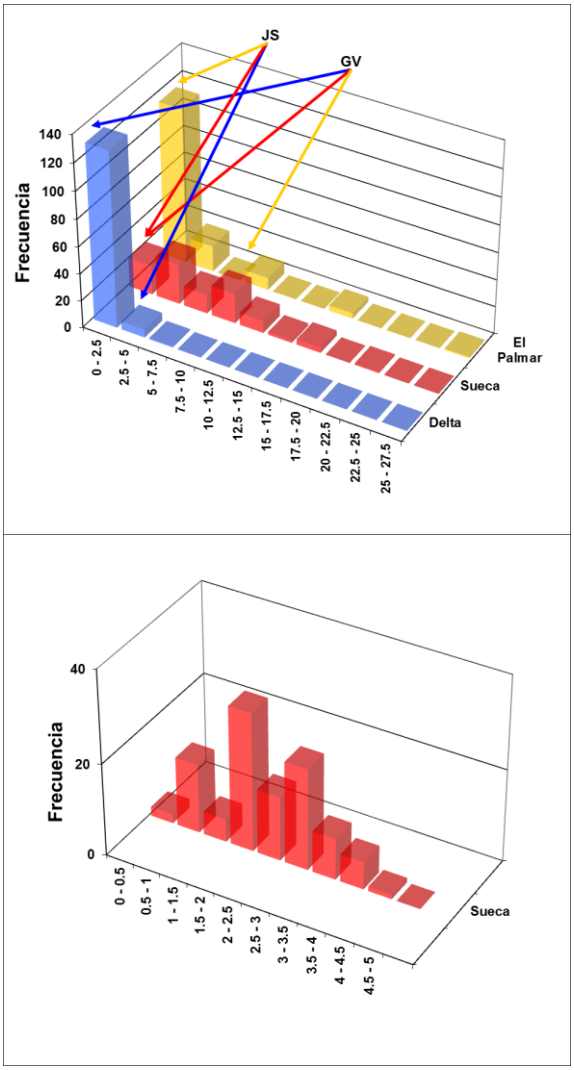
siguió habiendo suficiente segregación para todos los aislados como para poder realizar un análisis de QTLs con el método de mapeo por intervalos compuesto, aunque no en todos los casos la distribución del carácter transformado fuera del todo próxima a la normalidad.

Figura 30. Distribuciones de las medias de los porcentajes de áreas foliares afectadas después de las inoculaciones de 6 aislados de *M. oryzae* en la población F3 del cruzamiento JS x GV. Arriba: datos sin transformar; abajo: datos transformados. JS: JSendra; GV: Gigante Vercelli.



La distribución de la severidad en hoja (porcentaje de superficie afectada) muestra que ésta fue baja, sobre todo en el Delta y en El Palmar, donde 114 líneas presentaron porcentajes inferiores al 1% (Figura 31). En Sueca los porcentajes fueron algo mayores,

Figura 31. Distribución de la severidad en hoja (media del porcentaje de superficie afectada) en las líneas F3 del cruzamiento JSxGV. Arriba: en las tres localidades con los datos sin transformar; abajo: en Sueca con los datos transformados (raíz cuadrada del porcentaje). JS: JSendra; GV: Gigante Vercelli.



pero, en general, estuvieron por debajo del 10%. Sólo en esta localidad se puede considerar que existe una verdadera segregación para este carácter, por lo que es la única para la cual se realizó la identificación de QTLs por CIM (aunque los datos se transformaron

mediante la función raíz cuadrada para aproximarlos a la normalidad). Con los datos de severidad en El Palmar, se realizó un análisis de segregación de marcadores con el test χ^2 sólo entre las líneas con una severidad en hoja inferior al 1%. No se llevó a cabo ningún análisis con los datos de severidad en el Delta.

Una gran proporción de la población tuvo el 100% de panículas afectadas por el ataque de *M. oryzae* en las dos localidades de Valencia, sobre todo en Sueca (Figura 33). Por ello, en esta localidad sólo se realizó el análisis de segregación de marcadores mediante el test de χ^2 en aquellas líneas con incidencia mayor del 80%. En el caso de la incidencia en El Palmar se puede observar que, aparte del gran número de líneas que tienen más del 90% de panículas afectadas, hay una cierta segregación de las restantes líneas; por ello, los datos en esta localidad fueron divididos en 2 grupos para el análisis de QTLs: en las líneas con incidencia en panícula superior al 90% se efectuó un análisis de segregación de marcadores, mientras que en las líneas restantes se realizó el análisis de QTLs mediante CIM (aplicando la función de transformación arcoseno de la raíz cuadrada para aproximar la distribución a la normalidad). En el Delta, por el contrario, hubo pocas líneas con más del 50% de panículas afectadas y ninguna con más del 90%; en este caso, se transformaron los datos mediante la función raíz cuadrada y se realizó el análisis mediante CIM en el conjunto de la población.

Figura 32. Distribución del tamaño máximo de mancha en las líneas F3 del cruzamiento JSxGV medida, en El Palmar y en Sueca. Tamaño máximo según la escala DARP-UdL-IRTA, 2007 (0-6). JS: JSendra; GV: Gigante Vercelli.

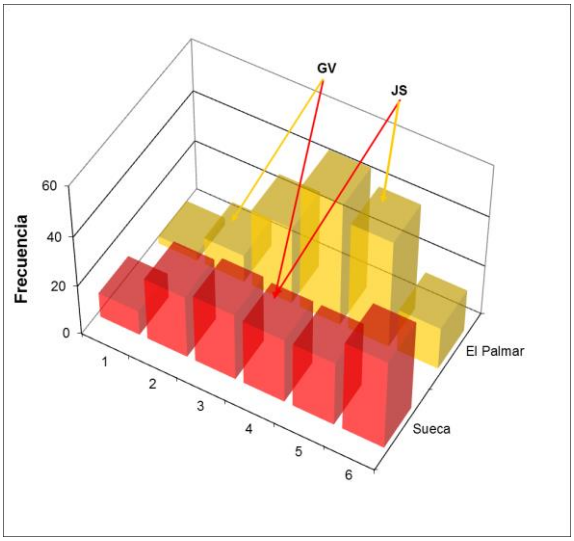
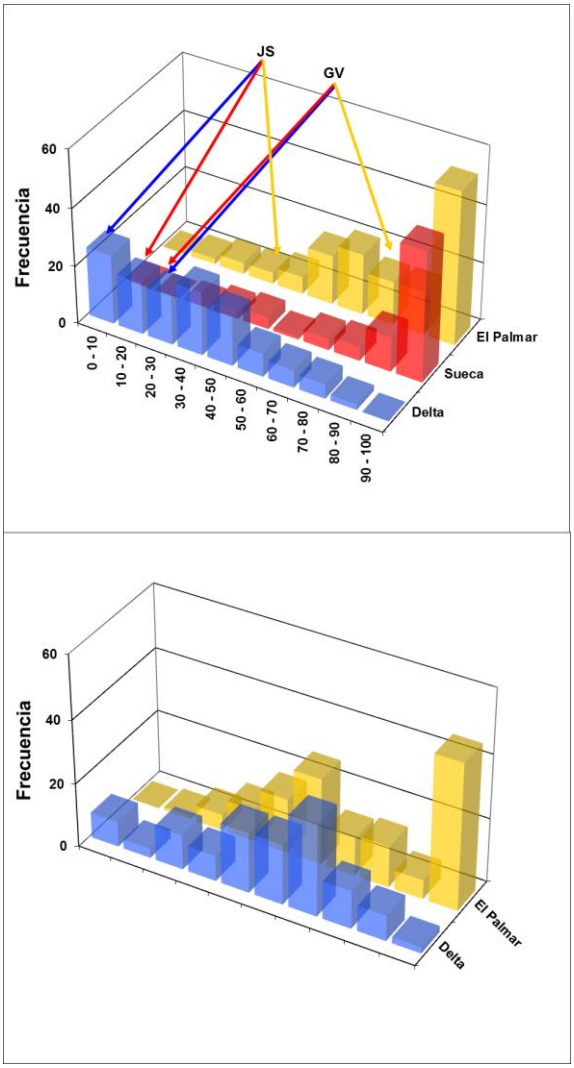


Figura 33. Distribución de la incidencia en panícula (porcentaje de panículas afectadas) en las líneas F3 del cruzamiento JSxGV. Izquierda: en las 3 localidades ensayadas con los datos sin transformar; derecha: en el Palmar (arco seno de la raíz cuadrada) y en el Delta del Ebro (raíz cuadrada) con los datos transformados. JS: JSendra; GV: Gigante Vercelli



4.3.2. Correlación entre caracteres en la población JSxGV

Se calcularon las correlaciones entre cada uno de los parámetros en cada localidad y también entre localidades, sin aplicar ninguna transformación. Las correlaciones obtenidas en las poblaciones F2 y F3 fueron generalmente bajas (Tabla 19), y menores que

las obtenidas en variedades comerciales en el mismo año y en los mismos campos (datos no mostrados). Dentro de una misma localidad, sólo se observaron correlaciones significativas entre incidencia en panícula y tamaño de mancha en Sueca, y entre incidencia y susceptibilidad en hoja en El Palmar.

En cuanto a las correlaciones entre localidades, éstas fueron algo más altas, aunque no significativas para severidad en hoja; el tamaño de mancha sí mostró una correlación significativa entre las dos localidades en que se midió; y hubo correlación entre la incidencia en panícula de Sueca y El Palmar, y entre El Palmar y el Delta. Además hubo algunas correlaciones significativas y positivas entre parámetros distintos en localidades diferentes (por ejemplo, la incidencia en panícula en el Delta y la severidad en hoja en Sueca y El Palmar). Mención aparte merece la correlación entre AFAm y la severidad en hoja en el Delta, pues están correlacionadas negativamente; en las dos localidades de Valencia esta correlación es nula. La resistencia en términos de número de lesiones (LES), provocadas por un único aislado, no aparece claramente correlacionada con ninguno de los parámetros, ni con los medidos en campo ni con AFAm. Es más, no hubo ni siquiera correlación entre el número de lesiones en F2 y el área foliar afectada por el mismo aislado (TH12) en F3.

Tabla 19. Coeficientes de correlación entre los parámetros de resistencia de la población JSxGV. SmaxH: Severidad máxima en hoja (%), I. Pan.: Incidencia en panícula (%), Mmax: Tamaño máximo de mancha (Escala DARP-UdL-IRTA, 2007). Nr. Les. Número de lesiones por hoja, AFAm: Área foliar afectada media (%). Los valores Nr.Les. se refieren a individuos F2, el resto a las líneas F3. Nivel de significación: * ≤ 0,1; ** ≤ 0,05; *** ≤ 0,01.

		Sueca			**El Palmar**			**Delta**		**F2**
		SmaxH	**Mmax**	**I.Pan.**	**SmaxH**	**Mmax**	**I.Pan.**	**SmaxH**	**I.Pan.**	**Nr. Les.**
Sueca	**SmaxH**									
	Mmax	0,11								
	I.Pan.	0,00	0,18*							
El Palmar	**SmaxH**	0,12	0,07	0,06						
	Mmax	0,11	0,19**	0,07	-0,06					
	I.Pan.	0,00	0,06	0,39***	0,23**	0,13				
Delta	**SmaxH**	0,14	-0,14	-0,15	0,13	-0,01	0,17*			
	I.Pan.	0,22**	0,06	0,17	0,27*	-0,13	0,29**	-0,04		
F2	**Nr. les.**	0,02	-0,04	0,05	0,02	-0,06	0,05	-0,03	-0,05	
F3	**AFAm**	0,03	0,42***	0,09	-0,01	0,08	0,02	-0,17*	-0,13	0,04

4.3.3. Mapeo de QTLs en la población JSxGV

4.3.3.1. Segregación de los marcadores y mapa de ligamiento

En total se ensayaron 266 marcadores SSR, pero sólo 92 (35%) presentaron polimorfismos entre los parentales. Dos de ellos amplificaron más de una banda, que se cartografiaron mediante el análisis de ligamiento: RM342 presentó un locus polimórfico en el cromosoma 6, dos loci en el cromosoma 7, y un locus en el cromosoma 8; los loci de los cromosomas 6 y 7 no se habían descrito con anterioridad en los mapas consultados, y pensamos que ello es debido a que las variedades utilizadas en este estudio están bastante alejadas genéticamente del germoplasma usado para construir los mapas publicados previamente. Por su parte, RM473 presentó tres loci polimórficos en los cromosomas 1, 3 y 7, todos descritos previamente.

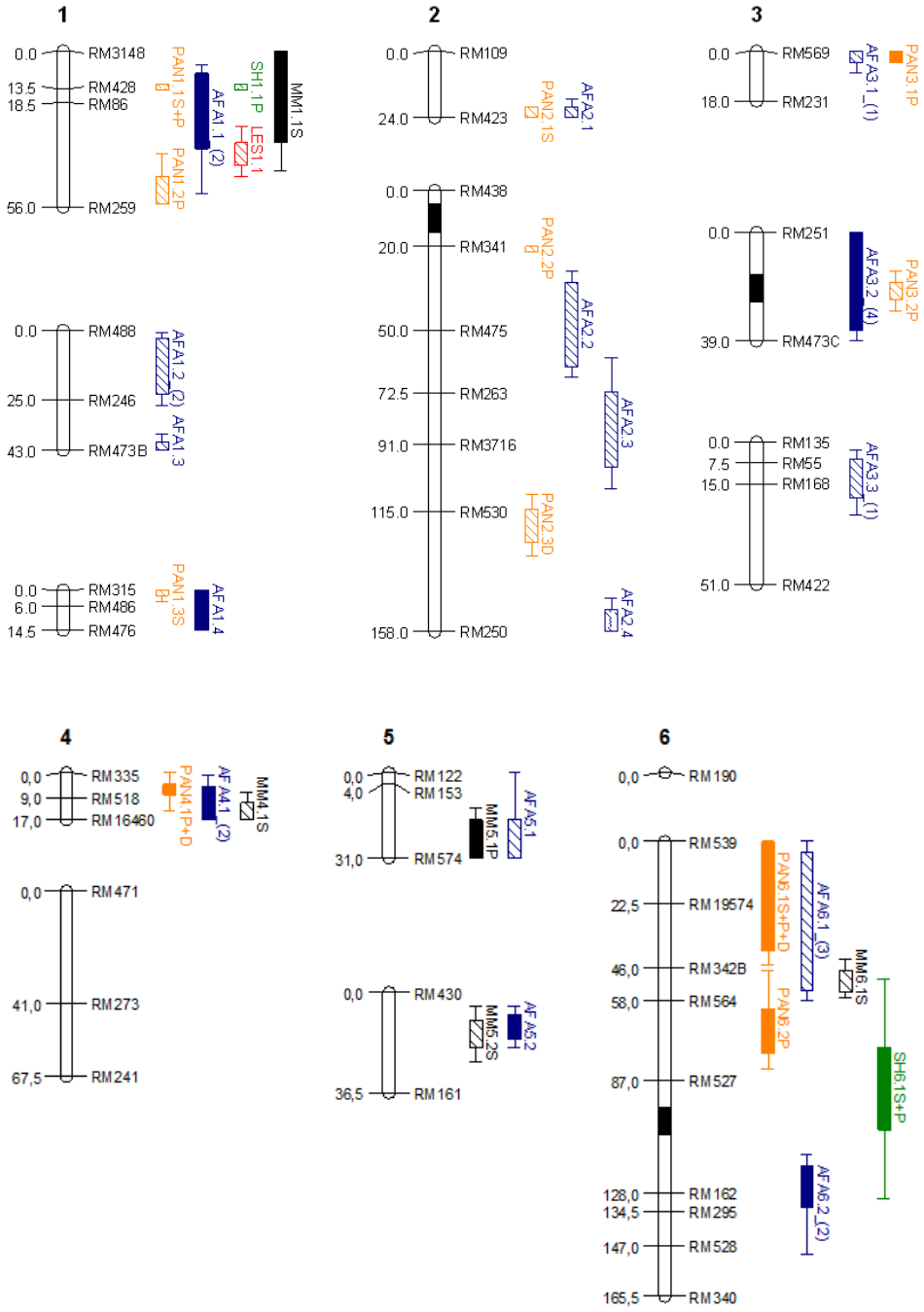
La mayoría de los SSR cribados segregaron mendelianamente de acuerdo con lo esperado, pero 10 de ellos (un 11%), distribuidos en varios cromosomas, tuvieron segregaciones distorsionadas. Se trata de RM3148 y RM86 en el cromosoma 1, RM530 en el cromosoma 2, RM430 en el cromosoma 5, RM2, RM418, RM21822 y RM342C y RM342D en el cromosoma 7, RM284 en el cromosoma 8 y RM101 en el cromosoma 12.

En la figura 34 se puede ver el mapa de ligamiento que hemos obtenido en esta población, junto con los QTLs detectados. Este mapa se corresponde bien con lo esperado, en cuanto al orden de los marcadores y las distancias entre estos, aunque en algunas regiones cromosómicas no se encontraron polimorfismos entre los parentales, por lo que, como ya ocurrió en la población SixCNA, marcadores que pertenecerían al mismo cromosoma según diversos mapas publicados, aparecen en grupos de ligamiento distintos y se representan como grupos contiguos. En algunos casos, el alineamiento de los mapas de JSxGV y SixCNA confirma la pertenencia de grupos de ligamiento separados a un mismo cromosoma (Figura 36).

Al igual que en la población SixCNA, la distribución de los marcadores polimórficos no fue uniforme a lo largo del genoma: en los cromosomas 4, 5, 9, 10 y 12 se hallaron pocos polimorfismos, mientras que éstos son abundantes en los cromosomas 1, 6, 7 y 8. El único cromosoma que en este estudio presenta una completa cobertura de marcadores es el 7. En el cromosoma 8, pese a ser en el que se encuentran más marcadores, hay una amplia región central en la que no se ha detectado ninguno.

4.3.3.2. QTLs de resistencia

Dada la posibilidad de que sean diferentes las condiciones ambientales de cada localidad, y las poblaciones de patógeno en cada una ellas, cada parámetro evaluado en campo en cada localidad se consideró como un carácter independiente en el análisis de QTLs. Del mismo modo, en el ensayo de inoculación en la población F3, se consideraron los parámetros AFAm y AFAmax de cada aislado como un carácter distinto, así como los parámetros promedio. Los QTLs se denominan con la misma nomenclatura, en cuanto a cromosomas y número de orden, que en la población SixCNA; además, en los parámetros


1
0.0 RM3148
13.5 RM428
18.5 RM86
56.0 RM259
PAN1.1S+P
PAN1.2P
AFA1.1_(2)
SH1.1P
LES1.1
MM1.1S
0.0 RM488
25.0 RM246
43.0 RM473B
AFA1.2_(2)
AFA1.3
0.0 RM315
6.0 RM486
14.5 RM476
PAN1.3S
AFA1.4
2
0.0 RM109
24.0 RM423
PAN2.1S
AFA2.1
0.0 RM438
20.0 RM341
50.0 RM475
72.5 RM263
91.0 RM3716
115.0 RM530
158.0 RM250
PAN2.2P
AFA2.2
AFA2.3
PAN2.3D
AFA2.4
3
0.0 RM569
18.0 RM231
AFA3.1_(1)
PAN3.1P
0.0 RM251
39.0 RM473C
AFA3.2_(4)
PAN3.2P
0.0 RM135
7.5 RM55
15.0 RM168
51.0 RM422
AFA3.3_(1)
4
0,0 RM335
9,0 RM518
17,0 RM16460
PAN4.1P+D
AFA4.1_(2)
MM4.1S
0,0 RM471
41,0 RM273
67,5 RM241
5
0,0 RM122
4,0 RM153
31,0 RM574
MM5.1P
AFA5.1
0,0 RM430
36,5 RM161
MM5.2S
AFA5.2
6
0,0 RM190
0,0 RM539
22,5 RM19574
46,0 RM342B
58,0 RM564
87,0 RM527
128,0 RM162
134,5 RM295
147,0 RM528
165,5 RM340
PAN6.1S+P+D
PAN6.2P
AFA6.1_(3)
MM6.1S
SH6.1S+P
AFA6.2_(2)

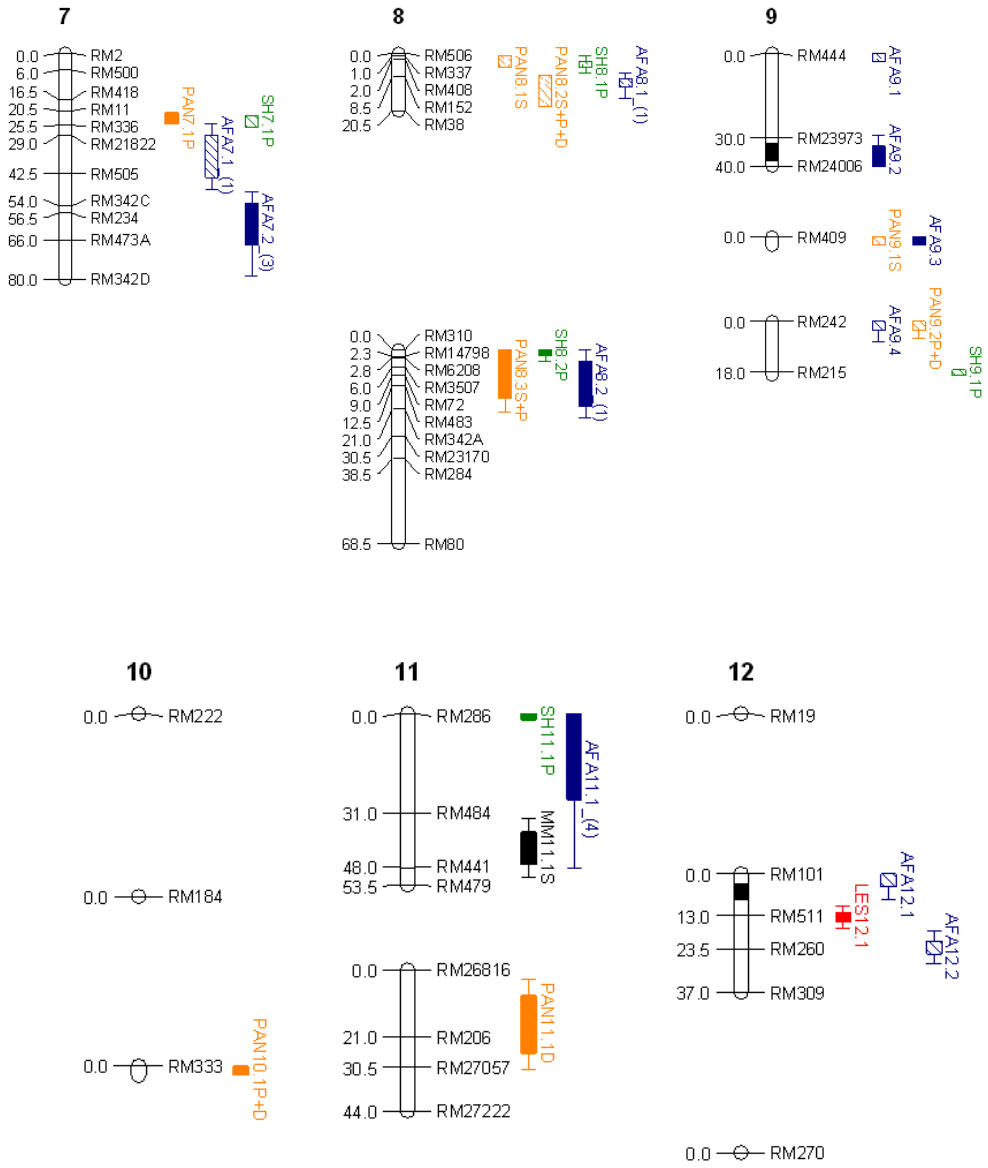


Figura 34. Mapa de ligamiento y QTLs de resistencia a *M. oryzae* en la población procedente del cruzamiento JSendra x Gigante Vercelli. Denominación de los QTLs: LES (rojo): Número de lesiones por hoja; AFA (azul): Área foliar afectada: entre paréntesis, número de aislados en los que se detecta este QTL; SH (verde): Severidad en hoja; MM (negro): Tamaño máximo de mancha; PAN (dorado): Incidencia en panícula. Las barras sólidas indican QTLs con un LR superior a 10, o regiones con un nivel de significación ≤0,01; las barras rayadas indican QTLs con un LR ente 8 y 10, o con una significación ≤0,05. Los brazos son el intervalo de confianza del QTL.

de resistencia en campo, se indican por su inicial la o las localidades en que se detecta. En el análisis por CIM se calculó el umbral de LR de cada carácter para el cual se puede afirmar con un 95% de seguridad que los picos de probabilidad indican QTLs reales y, en el caso del estudio de asociación de marcadores o en el SMA, se declaró un QTL cuando la probabilidad de error del test χ^2 fuera inferior al 5%. No obstante, hemos incluido QTLs potenciales con significaciones inferiores a los umbrales previamente establecidos cuando se han detectado en más de una localidad o se han identificado interacciones epistáticas significativas.

Tabla 20. Intervalos cromosómicos asociados con QTLs de resistencia a *M. oryzae* en el cruzamiento JSxGV. LES = Número de lesiones, AFA = Área foliar afectada, SH = Severidad en hoja, MM = Tamaño máximo de mancha, PAN = Incidencia en panícula. P = El Palmar, S = Sueca, D = Delta. Cr: Cromosoma; Loc: Localidad en que se detecta; a: efecto aditivo (a > 0 ó (+): el alelo de JS aumenta la susceptibilidad; a < 0 ó (-): la disminuye); d: efecto dominante; R^2: variación fenotípica explicada; Sign: Nivel de significación (cuando aparece un número, se refiere al LR; en los otros casos al test $\chi 2$ o al SMA : * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01); Umbr: Umbral de confianza al 95% para LR; Interac: QTLs con los que interacciona.

QTL	Cr	Intervalo	Loc	a	d	R^2	Sig	Umbr	Interac
LES1.1	1	RM86 - RM259		4,56	-6,56	0,10	9,3	16,7	
LES12.1	12	RM101 - RM260		-5,44	-1,52	0,09	10,4		
SH1.1P	1	RM428	P	(+)			*	23,1	SH7.1P
SH6.1S+P	6	RM564 - RM162	S	-2,51	3,14	0,10	10,2		
		RM342B - RM162	P	(-)			**		SH8.2P SH11.1P
SH7.1P	7	RM11 - RM336	P	(-)	(+)		*		SH1.1P
SH8.1P	8	RM408	P	(-)			*		SH8.2P SH9.1P
SH8.2P	8	RM310 - RM6208	P	(+)			**		SH6.1SP SH8.1P
SH9.1P	9	RM215	P	(-)	(-)		*		SH8.1P
SH11.1P	11	RM286	P	(+)			**		SH6.1SP
MM1.1S	1	RM3148 - RM259	S	-0,74	0,05	0,13	24,3	15,2 (P) 16,3 (S)	
MM4.1S	4	RM518 - RM16460	S	0,37	0,34	0,06	9,0		
MM5.1P	5	RM153 - RM574	P	0,16	0,60	0,10	15,4		
MM5.2S	5	RM430 - RM161	S	0,15	0,83	0,09	9,0		
MM6.1S	6	RM19574 - RM564	S	-0,36	0,44	0,06	9,6		
MM11.1S	11	RM484 - RM479	S	0,50	-0,07	0,07	10,3		
PAN1.1P	1	RM428	P	(-)			*	16,3 (P) 17,7 (D)	PAN1.3S
PAN1.2P	1	RM86 - RM259	P	-2,37	-2,51	0,06	8,4		
PAN1.3S	1	RM486	S	(+)			*		PAN1.1P
PAN2.1S	2	RM423	S	(+)			*		PAN2.2P PAN3.2P PAN6.2P

QTL	Cr	Intervalo	Loc	a	d	R2	Sig	Umbr	Interac
									PAN9.2PD
PAN2.2P	2	RM341	P	(-)			*		PAN2.1S PAN6.2P
PAN2.3D	2	RM3716 - RM250	D	-7,67	-2,75	0,04	8,9		
PAN3.1P	3	RM569	P	(-)			**		PAN6.2P
PAN3.2P	3	RM251 - RM473C	P	-1,89	-2,32	0,17	8,7		PAN2.1S PAN6.2P PAN7.1P PAN8.3SP
PAN4.1P+D	4	RM335 - RM518	P	-1,84	6,59	0,07	11,0		PAN6.2P PAN7.1P PAN9.1S
			D	1,51	0,54	0,04	8,0		
PAN6.1S+P+D	6	RM539	S	(+)			*		PAN8.1S PAN8.2SPD
		RM539 - RM19574	P	(+)	(+)		**		PAN9.1S PAN9.2PD
		RM539 - RM342B	D	-1,77	4,67	0,18	16,8		
PAN6.2P	6	RM342B - RM527	P	1,88	4,38	0,21	10,8		PAN2.1S PAN2.2P PAN3.1P PAN3.2P PAN4.1PD PAN11.1D
PAN7.1P	7	RM11 - RM336	P	(-)			**		PAN3.2P PAN4.1PD PAN8.2SPD PAN11.1D
PAN8.1S	8	RM506 - RM408	S	(+)			*		PAN6.1SPD
PAN8.2S+P+D	8	RM152	S		(-)		*		PAN6.1SPD PAN7.1P
		RM152	P	(-)			*		
		RM152 - RM38	D	-1,36	-5,47	0,05	9,2		
PAN8.3S+P	8	RM310 - RM3507	S	(+)	(+)		**		PAN3.2P
		RM310 - RM23170	P	3,89	8,07	0,16	26,2		
PAN9.1S	9	RM409	S	(+)	(+)		*		PAN4.1PD PAN6.1SPD
PAN9.2P+D	9	RM215	P	(-)	(-)		*		PAN2.1S, PAN6.1SPD
		RM242 - RM215	D	-4,11	0,83	0,05	9,0		
PAN10.1P+D	10	RM333	P	7,00			*		
			D	0,70			**		
PAN11.1D	11	RM26816 - RM27057	D	-6,84	-7,06	0,09	13,6		PAN6.2P PAN7.1P

En total, se han identificado 53 regiones relacionadas con los caracteres estudiados: 2 que influyen en el número de lesiones (denominados LES), 20 en el área foliar afectada tras las inoculaciones (AFA), 7 en la severidad máxima en hoja (SH), 6 en el tamaño máximo de mancha (MM) y 19 en la incidencia en panícula (PAN). La Figura 34 muestra la posición de estos QTLs, y la Tabla 20 resume sus características más importantes, salvo los de AFA, cuyas características están descritas en la Tabla 21 y el Anexo V. Por otra parte, el Anexo III muestra las gráficas y los detalles de las interacciones entre QTLs.

QTLs que controlan la resistencia en ensayos de inoculación:

Los 2 QTLs que influyen en el número de lesiones por hoja en la inoculación con el aislado TH12 en la población F2 se localizan en los cromosomas 1 y 12. En LES1.1 es el alelo de GV el que reduce el número de lesiones, aunque el efecto dominante es mayor que el aditivo; y en el caso de LES12.1, es el alelo de JS el que incrementa la resistencia. Ambos QTLs explican sólo el 20% de la variación fenotípica. No se detectó interacción entre ambos QTLs.

Tras las inoculaciones de las líneas F3, se realizó el análisis de QTLs con cada uno de los parámetros de los aislados individuales, y con los promedio. En la tabla 21 se muestran los QTLs encontrados. En algunas regiones cromosómicas coincidieron QTLs para más de una variable de AFA, por lo que se consideraron como un solo QTL, ya que es probable que un locus confiera resistencia a más de un aislado. También se han encontrado regiones en las que los picos de los QTLs están desplazados ligeramente uno de otro, y no se puede afirmar con seguridad si se trata de un QTL único con resistencia a varios aislados o de un clúster de QTLs, en el que cada QTL confiere resistencia a un aislado distinto. En algunos casos aparecieron picos con LR ligeramente inferiores a 8 para más de un aislado en una misma región cromosómica, por lo que consideramos que allí también hay un potencial QTL. Para diferenciarlos de los casos en los que la LR es superior a 8, en la tabla 21 aparecen en una columna aparte como “aislados potenciales”. En los loci que se detectaron en más de un carácter de AFA, en la tabla 21 se ha indicado el valor del QTL en el que dicho locus tiene mayor nivel de significación. En adelante, al hablar de esos loci, nos referiremos a estos valores más significativos; sin embargo, en el Anexo V aparecen detallados todos los QTLs de AFA desglosados por aislados.

Se han hallado 27 regiones cromosómicas que controlan AFA repartidas por todos los cromosomas, excepto en el 10; por el contrario, en los cromosomas 1, 2 y 9 se han encontrado cuatro QTL. Si en cada QTL sólo se tiene en cuenta los aislados para los que el LR es mayor que 8, la resistencia que confieren la mayoría de estos es de un espectro restringido. Sin embargo, en muchos de ellos hemos detectado varios aislados potenciales, por lo que se pueden considerar que bastantes QTLs podrían conferir resistencia de amplio espectro; destacan AFA6.1 y AFA8.2, que afectan a la resistencia frente a todos los aislados del ensayo.

En siete QTLs, el efecto aditivo es claramente superior al dominante, mientras que en catorce la dominancia es el efecto más importante. En algunos casos, los efectos dominantes aumentaron la resistencia y en algunos la redujeron.

Los dos QTLs que explican mayor porcentaje de la variación fenotípica son AFA9.2 y AFA11.1 (el 51 y el 43%, respectivamente). En ambos es el alelo de GV el que aumenta la resistencia, aunque AFA11.1, presenta también un efecto dominante elevado y de signo contrario. Igual que en otros caracteres, tanto JS como GV aportan resistencia: en trece QTLs es el alelo procedente de GV el que incrementa la resistencia; no obstante, sólo en AFA1.4, AFA2.3, AFA2.4 y AFA9.2 este efecto es mayor que el efecto dominante y en AFA3.1 y AFA11.1 es de magnitud similar. Por el contrario, en catorce QTLs es el alelo procedente de JS el que reduce la susceptibilidad a *M. oryzae*, pero sólo en AFA1.1, AFA8.2, AFA9.1 y AFA12.2 este efecto es mayor que el dominante y en AFA6.1 de magnitud similar.

No hemos analizado las posibles interacciones entre diversos QTLs que afectan al AFA tras las inoculaciones, dado que sería extremadamente laborioso al estar este carácter compuesto por diversos subcaracteres que habría que tener en cuenta por separado (AFAs medias y máximas de cada uno de los seis aislados).

Tabla 21. Intervalos cromosómicos asociados con QTLs de área foliar afectada (AFA) por diferentes aislados de *M. oryzae* en el cruzamiento JSxGV. En QTLs detectados con más de un aislado, se presenta la asociación más significativa. Cr: Cromosoma; a: efecto aditivo (a > 0 ó (+): el alelo de JS aumenta la susceptibilidad; a < 0 ó (-): la disminuye); d: efecto dominante; R^2: variación fenotípica explicada. Sig: Nivel de significación (cuando aparece un número, se refiere al LR; en otro caso a SMA: ** ≤ 0,01; Aislado: aquellos sobre los que el QTL tiene un efecto significativo; A. potencial: Aislados potenciales (aquellos en que el QTL se detecta con baja significación).

Cr	QTL	Intervalo	a	d	R2	Sig	Aislado	A. potencial
1	**AFA1.1**	RM3148 - RM259	-1,22	0,72	0,07	10,3	CD49 FR13	
	AFA1.2	RM488 - RM473B	-3,08	-11,13	0,19	9,2	FR94	
	AFA 1.3	RM246 – RM473B	1,13	3,03	0,06	11,9	CD49	
	AFA1.4	RM315 - RM476	2,12	0,28	0,22	28,4	TH12 FR128 CD49	FR13
2	**AFA2.1**	RM109 - RM423	-0,82	3,29	0,06	7,5		CD49
	AFA2.2	RM341 – RM475	-0,80	6,74	0,12	9,0	FR95	
	AFA2.3	RM475 – RM530	1,93	-1,54	0,08	8,3	AFA	
	AFA2.4	RM530 - RM250	8,72	5,21	0,07	9,1	FR94	
3	**AFA3.1**	RM569 - RM231	1,04	-1,93	0,03	9,2	FR94	FR95
	AFA3.2	RM251 - RM473C	-1,78	-5,42	0,15	12,7	TH12 FR128 CD49 FR95	FR94
	AFA3.3	RM135 - RM422	4,06	8,01	0,09	8,1	FR13	
4	**AFA4.1**	RM335 - RM16460	4,02	4,69	0,20	23,0	CD49 FR94	TH12
5	**AFA5.1**	RM122 - RM574	1,37	-2,31	0,09	6,9		CD49
	AFA5.2	RM430 - RM161	1,77	-16,93	0,23	10,7	FR94	

Cr	QTL	Intervalo	a	d	R2	Sig	Aislado	A. potencial
6	**AFA6.1**	RM539 – RM564	-7,41	7,85	0,11	9,7	CD49 FR95	TH12, FR128, FR13, FR94
	AFA6.2	RM527 - RM162	-7,34	-15,58	0,07	10,0	FR94 FR95	
7	**AFA7.1**	RM336 - RM505	- 0,57	1,16	0,06	8,5	CD49	
	AFA7.2	RM505 – RM342D	10,05	-14,51	0,10	13,4	CD49 FR13 FR94	TH12, FR95
8	**AFA8.1**	RM152 - RM38	-2,37	-11,12	0,05	8,2	FR94	
	AFA8.2	RM14798 - RM342A	-5,08	0,78	0,10	13, 5	FR128	TH12, CD49, FR13, FR94, FR95
9	**AFA9.1**	RM444 - RM23973	1,69	5,75	0,32	17,6	FR13	TH12
	AFA9.2	RM2397- RM24006	5,92	-2,47	0,51	27,6	FR13 FR95	
	AFA9.3	RM409	5,91			**	FR94	
	AFA9.4	RM242 - RM215	-0,84	5,51	0,06	8,2	FR13	
11	**AFA11.1**	RM286 - RM441	2,03	-2,61	0,43	30,5	TH12 CD49 FR13 FR95	
12	**AFA12.1**	RM101 – RM511	-0,74	-6,27	0,05	5,9		FR13
	AFA12.2	RM511 – RM309	-2,17	-0,55	0,05	6,4		CD49

QTLs que controlan la severidad en hoja:

En el ensayo del Delta se consideró que no hubo segregación para SmaxH y, por lo tanto, no realizamos el análisis de QTLs correspondiente. En las otras 2 localidades se han identificado siete regiones involucradas: todas ellas influyen en la severidad en el ensayo de El Palmar, y una de ellas también en Sueca. En el caso de El Palmar, debido a que la distribución fue muy sesgada, las regiones cromosómicas implicadas se han detectado mediante un análisis de la segregación de los marcadores entre las líneas F3 más resistentes: en los marcadores que corresponden a SH7.1P, SH8.1P y SH9.1P se puede ver un exceso significativo de genotipos JS entre las líneas más resistentes. En SH1.1P, SH8.2P y SH11.1P, sin embargo, se acumulan los genotipos GV entre las líneas menos susceptibles, por lo que es ese alelo el que aporta resistencia. En otros dos QTLs el efecto dominante es importante: en SH7.1P hay significativamente menos heterocigotos de lo esperado entre las líneas con una severidad menor al 1%, mientras que en SH9.1P ocurre lo opuesto. Con este tipo de análisis no se han estimado las magnitudes de los efectos genéticos, sólo su signo y nivel de significación. SH6.1S+P es el único QTL que se detectó, mediante CIM, en Sueca, donde explica el 10% de la variación fenotípica observada; el alelo de JS es el que incrementa la resistencia en este locus (de forma similar a lo visto en el Palmar con el análisis por segregación), aunque con una dominancia de la misma magnitud y de signo contrario.

En total, se han detectado cinco interacciones aditivas significativas entre estos QTLs de severidad en hoja mediante ANOVA factorial (Anexo III); todos los QTLs presentan una o dos interacciones epistáticas. Por lo general, las interacciones se detectan en las mismas localidades en las que se expresan los QTLs: cuatro de las cinco interacciones se observan en El Palmar. Hay cuatro interacciones que se detectan en 2 localidades, incluyendo también el Delta, pero en ningún caso se encuentra una interacción significativa en las tres localidades.

QTLs que controlan el tamaño máximo de mancha:

Son seis los QTLs relacionados con el tamaño máximo de mancha que se han encontrado. Cinco de ellos se expresaron en el ensayo en Sueca (MM1.1S, MM4.1S, MM5.2S, MM6.1S y MM11.1S), y uno en El Palmar (MM5.1P). Estos QTLs determinan entre el 6 y el 13% de la varianza fenotípica de este carácter en Sueca, (siendo la varianza total explicada en Sueca del 41%), mientras que MM5.1P es responsable del 10% de la varianza de Mmax en El Palmar. Sólo en dos de los QTLs (MM1.1S y MM6.1S) es el alelo de JS el que confiere resistencia, mientras que en los otros cuatro es el alelo de GV el que reduce el tamaño de mancha; esto coincide con lo observado en campo en los parentales, pues JS presenta manchas considerablemente mayores que GV. No obstante, la dominancia es un factor que no se debe desestimar en este carácter, pues es igual o mayor que los efectos aditivos en cuatro de los QTLs; es interesante notar que en estos casos contribuye a aumentar la susceptibilidad. Para este carácter no se ha detectado ninguna interacción significativa entre los QTLs implicados.

QTLs que controlan la incidencia en la panícula:

Se han detectado diecinueve regiones que afectan a la susceptibilidad en la panícula; estos loci no se distribuyen de forma uniforme, sino que se concentran sobre todo en los cromosomas 1, 2 y 8, en cada uno de los cuales se han hallado tres QTLs. Por localidades, en el Delta y en Sueca se expresaron siete QTLs y en El Palmar trece. De los diecinueve QTLs, dos se detectaron en los tres ambientes del ensayo (PAN6.1S+P+D y PAN8.2S+P+D) y cuatro en 2 ambientes diferentes, pero no siempre con efectos genéticos similares. Algunos de los QTLs explican porcentajes de variación fenotípica nada desdeñables (PAN6.1S+P+D el 18% en Sueca y PAN6.2P el 21%, PAN3.2P el 17% y PAN8.3S+P el 16% en El Palmar); y en conjunto, los QTLs relacionados con la incidencia en panícula en el Delta explican el 45% de la variación fenotípica de este carácter, mientras que los QTLs detectados mediante CIM en El Palmar explican el 67% de la variación.

Los siete QTLs que regulan la resistencia a *M. oryzae* en la panícula en la localidad de Sueca se han detectado mediante el análisis de segregación de marcadores dentro del grupo de líneas con susceptibilidad mayor al 80%. Entre las líneas más susceptibles hay un exceso significativo de genotipos JS en los marcadores que corresponden a PAN1.3S, PAN2.1S, PAN6.1S+P+D, PAN8.1S, PAN8.3S+P y PAN9.1S, por lo que se deduce que es el alelo de GV el que aporta resistencia. En los QTLs PAN9.1S y PAN8.3S+P hay una proporción de individuos heterocigotos significativamente mayor en

las líneas más susceptibles que en toda la población, lo que indica que, en estos QTLs, el efecto dominante es notable.

Al contrario que en Sueca, en cinco de los siete QTLs de incidencia en panícula que se expresan en el Delta, es el alelo de JS el que confiere resistencia. Únicamente PAN6.1S+P+D, PAN 8.2S+P+D y PAN11.1D muestran una dominancia destacada, aunque sólo PAN6.1S+P+D contribuye notablemente a la variación observada (con un R^2 de 0,18).

En El Palmar se realizaron 2 análisis por separado. Por un lado, al analizar la segregación de marcadores en el grupo de líneas F3 con más del 90% de panículas afectadas, se detectaron siete QTLs. Por otro lado, con el análisis por SMA y CIM que se efectuó con el grupo de líneas restantes (42 líneas con incidencia menor del 90%) se detectaron seis QTLs adicionales, aunque cuatro de ellos tienen bajos niveles de significación, lo cual no es de extrañar tratándose de pocas líneas. Al igual que en el Delta, en la mayor parte de los QTLs (ocho), el efecto del alelo JS es el de aumentar la resistencia. Por otra parte, la dominancia es notable en seis de los QTLs.

Entre los QTLs de incidencia en panícula encontrados hay 20 interacciones significativas. Todos los QTLs, excepto dos, presentan al menos una interacción significativa entre ellos. Destacan los QTLs de los cromosomas 6 y 7 por tener numerosas interacciones: PAN6.2P presenta seis interacciones, mientras que PAN2.1S, PAN3.2P, PAN6.1S+P+D y PAN7.1P presentan cuatro. Otro QTL con considerable epistasia es PAN4.1P+D, en el que se detectan tres interacciones significativas. La mayoría de estas interacciones (60%) se hallaron únicamente en una localidad, mientras que ocho fueron significativas en dos localidades.

5 DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de la resistencia a *Magnaporthe oryzae*

La presente tesis doctoral se engloba en varios estudios realizados en el Departamento de Arroz del IVIA, que tenían como objetivo último la obtención de nuevas variedades con resistencia duradera al hongo *Magnaporthe oryzae,* adaptadas a las condiciones de cultivo de la zona mediterránea. Este trabajo recoge, por una parte, un estudio sobre la población de este patógeno (su composición y estabilidad) mediante el análisis de una colección de líneas quasi-isogénicas (o variedades diferenciales, VDs) a lo largo de varios años. Y por otra, un análisis de QTLs de resistencia parcial en dos poblaciones segregantes, procedentes de un parental femenino adaptado y productivo en las regiones arroceras españolas, y de un parental masculino considerado resistente.

Para este análisis genético, se decidió que el grado de tolerancia o resistencia de los genotipos se determinaría según el comportamiento de estos en campo, y no por su respuesta en inoculaciones con el patógeno. También se decidió realizar las evaluaciones en la generación F3, aunque es más frecuente utilizar la F2 para el estudio de QTLs, por varios motivos: principalmente, porque la valoración de la susceptibilidad de un determinado individuo F2 en campo está sujeta a un potencial error, debido a la aleatoriedad de la presencia del hongo en ese punto concreto, pudiendo un genotipo susceptible escapar al ataque del patógeno y aparecer como resistente sin serlo; al disponer en la F3 de numerosas plantas descendientes de cada individuo F2, se pueden exponer diversos descendientes a la infección y obtener un promedio que represente el valor del genotipo de cada F2, lo que reduce el error indeterminado. Pero además, con las líneas F3 se pueden realizar repeticiones, como se hizo en la población JSendra x Gigante Vercelli, con lo que se puede estudiar el efecto ambiental, así como hallar QTLs que se expresen en distintos ambientes y por ello, más interesantes.

En el primer análisis, en la población Sivert x CNA-6159 (SixCNA), se evaluó la susceptibilidad en hoja y la incidencia en panícula de la generación F3, en una localidad (El Palmar) y un solo año. Los parentales no mostraron ese año síntomas de ataque del hongo en panícula (Tabla 16), ni siquiera Sivert, teóricamente susceptible, y tampoco gran parte de líneas F3. Ese año el ataque en panícula no fue grave (sólo un 40% en Baixet, la línea altamente susceptible que se utiliza como testigo y como esparcidor), aunque sí se observó un nivel medio-alto de infección en hoja. Es posible que las condiciones no fueran favorables para el ataque del hongo desde el espigado hasta la maduración, pudiendo así Sivert escapar del ataque en los órganos productivos; pero en ese caso, las valoraciones podrían también no reflejar el nivel de resistencia real de las líneas F3.

Vistas entonces la complejidad del carácter “resistencia a *M. oryzae*” y las dificultades para evaluarlo, en el diseño del estudio con la segunda población (JSendra x Gigante Vercelli, JSxGV), se incluyeron nuevos parámetros: por un lado, inoculaciones en invernadero en las generaciones F2 y F3; y para la determinación de la resistencia en campo, se analizó la F3 en varias localidades de tres regiones arroceras de España y se consideró, además de la severidad y la incidencia, el tamaño máximo de las lesiones en hoja. De nuevo, los parentales de este segundo cruzamiento mostraron algunas respuestas inesperadas, y tanto estos como la población F3 se comportaron en ocasiones de forma distinta en las diferentes localidades analizadas (Tabla 18, y Figuras 29 a 33). Así, por

ejemplo, GV, que fue completamente resistente a los 41 aislados europeos de *M. oryzae* ensayados por Roumen *y col*. (1997) en invernadero (entre ellos 6 de España y, en concreto, 4 del Delta del Ebro y 1 de Valencia), no resultó más resistente en hoja que JS en las localidades de Valencia, ni en panícula en todas las localidades. Es posible, pues, que las conclusiones obtenidas de los ensayos de inoculaciones no sirvan para predecir la resistencia frente a un ataque de este hongo en campo, y particularmente en las panículas.

De igual modo, el estudio con las líneas diferenciales señala el importante peso que los factores ambientales pueden tener sobre la aparente resistencia de los genotipos en campo. Se dedica, pues, la primera parte de esta discusión a analizar si los diferentes métodos de evaluación de la resistencia a *M. oryzae* son prácticos, fiables y representativos, así como si existe relación entre ellos.

5.1.1. Medida de la resistencia por inoculación.

El comportamiento de la planta de arroz frente a un ataque de *M. oryzae* viene determinado por una gran cantidad de factores, entre los cuales hay que destacar la virulencia de las razas del hongo presentes en la zona, el genotipo de la planta y las condiciones ambientales que favorezcan más o menos el desarrollo de la enfermedad. Para poder controlar estos factores al máximo, la mayoría de estudios sobre la resistencia se han realizado en invernaderos, o en cámaras de ambiente controlado; pero estos ensayos difícilmente pueden simular fehacientemente la complejidad de la infección por *M. oryzae* en campo. Por otra parte, existen diferentes modos de medir la susceptibilidad tras las inoculaciones, y como se verá no son equivalentes.

Se han realizado muchos estudios para determinar si las inoculaciones en invernadero sirven para predecir la resistencia a *M. oryzae* en campo. Surin y *col*. (1986) y Mousanejad *y col*. (2010b) encontraron una alta correlación positiva entre el área foliar afectada (AFA) y la pérdida de rendimiento en campo. Bonman *y col*. (1989a, b) y Roumen (1992b) observaron que el número de lesiones por hoja (LES) en ensayos de inoculación en invernadero está estrechamente relacionado con la resistencia en campo (medida como el área bajo la curva de progreso de la enfermedad en hoja, y teniendo en cuenta también la incidencia en cuello). También se encontró una gran correlación entre la pérdida en rendimiento y el tamaño de las lesiones, especialmente con las inducidas en panícula por inoculación (Roumen, 1992c). Pero Roumen y De Boef (1993) observaron que el número de lesiones estaba más relacionado con la resistencia parcial en campo que el tamaño de las lesiones. Por ello, se suele afirmar que el número de lesiones en un ensayo de inoculación es un buen predictor para el comportamiento de las líneas en campo, pero no así el tamaño de éstas.

Por otro lado, AFA se utiliza generalmente como medida de la severidad media en hoja y LES como medida de la incidencia de la enfermedad (aquí incidencia se refiere al porcentaje de plantas, o partes de una planta, enfermas en una muestra, independientemente de la severidad de la enfermedad; distinguir del carácter “Incidencia en Panícula” de este trabajo) (Kranz y Rotem, 1988; Roumen, 1992a, b, 1993; Xu y Madden, 2002). Sin embargo, en muchos estudios se ha evaluado la severidad en hoja contando el número de lesiones (Seem 1984, Seem y Gillpatrick 1980, Campbell y Madden, 1990,

Obanor *y col.*, 2005), debido a que se han encontrado correlaciones elevadas entre el número de hojas afectadas, LES y AFA en varios cultivos (James y Shih, 1973; Roumen, 1992a, b, 1993, 1996; Shabi *y col.*, 1994; Freymark *y col.*, 1994; MacDonald, 2000; Abuamsha *y col.*, 2013); además es más rápido y sencillo evaluar LES que AFA y, a menudo, más preciso y reproducible. Y puesto que LES está altamente correlacionado con el número de hojas afectadas en el tallo principal en los ensayos de inoculación, y es más sencillo contar el número de hojas afectadas que el número de lesiones por hoja, en algunos ensayos se han contado las hojas afectadas para evaluar la resistencia parcial a la piriculariosis (Roumen, 1992a, b). No obstante, se ha constatado que la relación entre incidencia y severidad en hoja que han encontrado muchos autores no es aplicable a todos los sistemas planta-patógeno (Seem, 1984; Agrios, 2005) y debe ser establecida empíricamente para cada uno de ellos durante varios años y en varias condiciones (Kranz y Rotem, 1988). Pese a ser más complicado y lento evaluar la severidad en hoja, ésta se considera a menudo una medida más importante y útil que la incidencia en hoja para determinar la eficacia de las estrategias de lucha contra las enfermedades (Campbell y Madden, 1990).

En el presente ensayo no encontramos correlación entre el número de lesiones por hoja y cualquiera de los otros parámetros (incluyendo el AFAmedia de varios aislados, e incluso AFA por el mismo aislado -TH12-). Ello puede ser debido en gran medida a que LES es un parámetro poco informativo en nuestro caso: tras la inoculación secuencial de tres aislados sobre los individuos F2, sólo hubo segregación en el número de lesiones provocadas por el primero de ellos, a pesar de que las variedades parentales habían mostrado diferencias de susceptibilidad también frente a los otros 2 aislados ensayados. Es posible, pues, que TH12 haya provocado una respuesta de resistencia inducida, no observándose niveles significativos de infección en las inoculaciones posteriores. Para evitar este problema, en la población F3 se inocularon 20 plantas de cada línea con cada uno de los 6 aislados, por separado, realizándose dos repeticiones por aislado. En este caso sí se observó segregación, si bien el parámetro medido fue el área foliar afectada. Con este protocolo se redujo el error de las determinaciones y, por otra parte, la combinación de los 6 aislados escogidos simula de una forma más exacta el entorno patogénico al que se enfrenta el arroz en campo. Esto puede contribuir a que la media de AFA sí muestre alguna correlación significativa con parámetros de resistencia en campo, aunque sólo con el tamaño máximo de mancha en Sueca y con la severidad máxima en hoja en el Delta, si bien esta última correlación es negativa. Esto indica que, en nuestro ensayo, la inoculación, incluso realizada con diversos aislados, no ha logrado predecir la resistencia en campo.

5.1.2. Medida de la resistencia en campo.

Una cuestión importante es determinar en qué órgano se evalúa la susceptibilidad de la planta. Como ya se ha comentado, en la mayoría de ensayos se estima la resistencia a la enfermedad sólo en hoja. Si bien este es un parámetro importante, ya que una mayor presencia del patógeno en la hoja puede actuar como nueva fuente de inóculo, e incrementar la probabilidad del ataque a otros órganos o plantas, es en la panícula donde el hongo causa mayores daños para el agricultor. Los estudios sobre la relación entre la

resistencia en hoja y panícula son contradictorios, y además existen dudas sobre si los mecanismos de defensa en ambos órganos son los mismos.

Una razón importante para que sea más habitual estimar la susceptibilidad en hoja es que se puede realizar la evaluación desde un estadio temprano del crecimiento de la planta, mientras que para evaluar la resistencia en órganos como el nudo, el cuello o la panícula, hay que esperar hasta el final del ciclo reproductivo; esto puede ser complicado en ensayos en invernadero o cámara de cultivo, ya que el arroz no siempre espiga bien en estas condiciones. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las hojas, al igual que las panículas, se vuelven más resistentes con el tiempo (Kahn y Libby, 1958; Roumen, 1982c; Roumen *y col.*, 1982): el número de lesiones desciende cuando la inoculación se realiza en plantas de más edad; también lo hace el tamaño de las lesiones, pero de una manera menos pronunciada (Goto *y col.*, 1961; Notteghem y Andriatompo, 1979; Roumen, 1992a); y las hojas de las variedades más susceptibles tienen periodos de susceptibilidad más largos que en las variedades resistentes (Torres, 1986). Puesto que la presión mecánica ejercida por el patógeno es importante para la penetración en los tejidos, el incremento en la resistencia puede ser debido al progresivo endurecimiento de los tejidos o al engrosamiento de la pared celular, o a ambas causas. Por otra parte, aun en hojas de la misma edad, la resistencia parcial no se expresa siempre de la misma forma, y se pueden encontrar a menudo diferentes tipos de lesiones (Roumen, 1993). Kozaka (1979) lo atribuye a la diferencia en susceptibilidad de las distintas células epidérmicas: las células buliformes (células epidérmicas especialmente grandes y de paredes delgadas) son penetradas con relativa facilidad y el crecimiento de las hifas es mayor que en otras células epidérmicas infectadas (Yoshino, 1971; Koga, 1989).

Sin embargo, cuando las determinaciones del grado de afectación se realizan en campo, la intensidad de la enfermedad no depende tanto del grado de resistencia de los diferentes órganos, sino de que las condiciones ambientales sean favorables para el desarrollo del hongo. En campo, la enfermedad suele aparecer en picos, por lo que, para asegurarnos de tener datos en el momento de mayor incidencia, se realizaron varias evaluaciones a lo largo del crecimiento de las líneas. La intensidad de la enfermedad fue aumentando con el tiempo y los valores máximos se dieron en la fase de maduración en casi todas las líneas de ambas poblaciones.

Se han empleado métodos muy diversos para estimar el grado de resistencia a *M. oryzae* en hoja (apartado 1.7.3.3). El método más sencillo, y por ello el más utilizado, es usar alguna escala de valores. En nuestros ensayos hemos empleado dos de estas escalas: la escala adoptada en el primer simposio sobre piriculariosis en el IRRI (Ou, 1965), en la que se consideran varios parámetros como el tamaño, el color y la forma de las lesiones, y el área foliar afectada, que hemos utilizado en la población SixCNA y la colección de líneas diferenciales (parámetro SH); y la escala DARP-UdL-IRTA-2007 en la población JSxGV. La primera se ha estado utilizando durante años para evaluar la gravedad de la infección a *M. oryzae* en ensayos en el Departamento del arroz en el IVIA, aparte de otros autores (Padmanabhan, 1979; Prabhu y Ferreira, 1991; Ahn, 2001; Bastos *y col.*, 2002, entre otros). La segunda fue elaborada a causa de la dificultad para expresar los resultados que encontraba el grupo del IRTA en el Delta del Ebro con las escalas existentes, y está adaptada a las características intrínsecas del patosistema propio (Català *y col.*, 2008). Se ha estado utilizando durante varios años en los campos del IRTA, donde

resultó muy útil y más objetiva para valorar variedades que otras medidas (Català, comunicación personal), entre ellas la escala SES, propuesta por el IRRI en 2002; por ello decidimos utilizarla en la población JSxGV como método de evaluación de la susceptibilidad en hoja.

El uso de escalas para valorar la severidad está, sin embargo, sujeto a un cierto grado de subjetividad por parte de los distintos evaluadores. Además, presentan inconvenientes para realizar estudios genéticos, pues al tener pocas categorías (7 y 8 en las utilizadas en este trabajo), los individuos de la población se distribuyen en esas pocas categorías discretas, lo cual contrasta con los métodos de análisis de caracteres cuantitativos, como es la resistencia parcial, caracterizados por presentar una variación continua. No obstante, se ha de tener en cuenta que, a mayor número de categorías, mayor es la dificultad de atribuir la severidad de una infección a la categoría correcta: Amanat (1977) comprobó que esta habilidad es baja en evaluadores no entrenados. No obstante, se afirma que la utilización de escalas con 7 categorías es lo óptimo en ensayos de epidemiología (Kranz, 1970; Kranz y Rotem, 1988; O'Brien y Van Bruggen, 1992).

La escala del IRRI es una escala bastante completa, pues tiene en cuenta simultáneamente varios aspectos de las lesiones en hoja; por el contrario, la escala DARP-UdL-IRTA-2007 es más sencilla (ver Anexo I y Tabla 14), ya que sólo tiene en cuenta el tamaño de la mancha, parámetro medible y menos propenso a la subjetividad del evaluador. Por otra parte, hay notables diferencias de severidad entre las categorías designadas por la escala IRRI, de modo que casi todos los individuos de la población SixCNA se distribuyeron en sólo 3 de las categorías descritas (Figura 27); por ello, con el fin de disponer de una distribución algo menos discreta para el análisis de QTLs, se añadieron dos categorías ("3,5" y "4,5", donde se incluyeron los individuos con características intermedias entre las categorías 3 y 4, y 4 y 5, respectivamente). Por todo ello, en el estudio posterior de la población JSxGV se decidió usar la escala DARP-UdL-IRTA-2007 (Mmax), y valorar por separado el porcentaje de área foliar afectada (SmaxH). La distribución de Mmax en las dos localidades de Valencia en que se midió fue más continua (Figura 32) que la descrita en el caso de SixCNA, de manera que la escala DARP-UdL-IRTA-2007 parece apropiada para describir los diferentes niveles de susceptibilidad también en los arrozales de Valencia; aunque esta observación debería corroborarse a lo largo de varios años y con diverso material vegetal.

Sin embargo, aunque hubo correlación entre el tamaño máximo de mancha en ambas localidades, no la hubo entre Mmax y las severidades estimadas como % de superficie afectada en las mismas localidades (Tabla 19). Esto no es de extrañar si se consideran la distribuciones tan diferentes de ambos parámetros (Figuras 31 y 32), pues hubo mucha más variabilidad en el tamaño de mancha que en el porcentaje de superficie afectada, que ese año fue muy bajo en todas las localidades; y podría indicar que ambos parámetros miden aspectos diferentes de la susceptibilidad a *M. oryzae*. Pero difícilmente se puede extraer una conclusión al respecto, puesto que con valores tan bajos de % de superficie afectada, las estimas estadísticas pueden ser erróneas.

Para evaluar la susceptibilidad en los órganos productivos, por otra parte, en ocasiones se valoran independientemente los daños producidos en nudo, cuello y panícula. Y así se hizo en el análisis de las VDs, donde se contabilizaron por separado los nudos y

las panículas afectadas. Pero en el estudio con las poblaciones segregantes se englobaron en un único término, ya que un ataque en nudo o cuello también puede acabar afectando al llenado de granos: hemos observado que en las líneas susceptibles una lesión extensa en el nudo o el cuello puede acabar provocando panículas total o parcialmente vanas (Figuras 8 y 12), que a menudo es difícil distinguir de los daños causados en la panícula propiamente dicha. No obstante, en el análisis de las VDs se observaron líneas con elevada incidencia en nudo (IN) en las que no se detectó incidencia en panícula (IP) o ésta fue mucho menor, y viceversa, sobre todo en 2009 y 2010; esto se ve reflejado en la falta de correlación entre IN e IP en varios años (Tabla 15). Por el contrario, las medidas de IN de varios años sí están altamente correlacionadas entre sí (no así las de IP). Esto podría responder a susceptibilidades diferentes entre los tejidos del nudo y de la panícula; hasta donde sabemos, esta posibilidad no ha sido estudiada. Y también señala a la conveniencia de evaluar por separado los daños en los diferentes órganos siempre que sea posible. Sin embargo, llaman la atención dos aspectos: por una parte, que en algunos casos hay más incidencia en nudos que en panículas, a pesar de que las últimas están más expuestas a que se depositen sobre sus tejidos las esporas de *M. oryzae* que llegan por el aire; y, por otra, que algunas lesiones en los nudos parecen haberse producido de dentro hacia fuera, como si el hongo no hubiese atravesado la vaina de la hoja bandera. Por ello, nos atrevemos a especular con la posibilidad de que algunas de las lesiones en nudo procedan de una infección sistémica del hongo por una invasión desde las raíces, como han demostrado que puede ocurrir Sesma y Osbourn (2004) en laboratorio.

Hay mayor correlación entre las incidencias que entre las medidas de susceptibilidad en hoja, tanto en JSxGV en distintas localidades (Tabla 19), como en las VDs en distintos años (Tabla 15). En parte, este fenómeno puede deberse a que la influencia del evaluador en la determinación de la incidencia en panícula no es muy importante, pues se trata de un conteo. Pero también a que, en nuestro estudio, la incidencia es una media y no una máxima como SmaxH y Mmax: al segregar las líneas F3, es posible que los genotipos más susceptibles no estén igualmente representados en las 3 localidades, de modo que el valor máximo de susceptibilidad puede variar entre ellas, mientras que el valor medio es más probable que sea similar. Abundando en la conveniencia de estimar severidades medias y no máximas está lo observado en el ensayo de las VDs el año en que se determinaron tanto el porcentaje medio como el máximo (2009): la severidad media presenta correlaciones significativas con otras medidas de susceptibilidad en otros años, cosa que no ocurre en el caso de la severidad máxima.

También es interesante analizar si las medidas de incidencia y severidad están relacionadas entre sí, o si, por el contrario, reflejan la existencia de mecanismos de defensa distintos o independientes, como se ha sugerido. Observamos que en nuestros estudios se encuentran algunas correlaciones significativas entre ambas estimas de la susceptibilidad: la IP muestra correlación, dentro de la misma localidad, con SH en la población SixCNA, y en la población JSxGV con SmaxH (en El Palmar) o con Mmax (en Sueca). También lo observamos en la parcela de ensayo de las VDs el año 2011. Pero, además, hubo correlación entre incidencias y severidades de localidades distintas (en JSxGV, IPP-SmaxD, IPD-SmaxHP y S) o de distintos años (en las VDs, SH_{2006}-IN_{2009}, $SmedH_{2009}$-IP_{2011}, y SH_{2010}-IP_{2011}). Dado que estas correlaciones entre ambos tipos de variables no son menos, ni menores, que las observadas entre incidencias o entre severidades, se puede concluir

que, si bien la relación entre la susceptibilidad en hojas y en órganos productivos no es estrecha en las experiencias presentadas en este trabajo, sí existen algunas coincidencias entre las medidas que hacen suponer que los mecanismos de defensa no son del todo independientes.

Llama la atención, por lo tanto, que algunas de las correlaciones sea negativas (aunque sólo es significativa en el caso de SmaxHD-AFAm en JSxGV). Pero también observamos algunos valores de r negativos próximos a la significación entre otras variables medidas en el Delta, y también en parámetros evaluados en 2009 en las VDs. La explicación para ello puede encontrarse en los valores de severidad extremadamente bajos que se dieron tanto en la parcela del Delta (hasta el punto que ni siquiera se realizó un análisis de QTLs para este carácter) como entre las VDs ese año; de modo que al intentar extraer conclusiones de tipo estadístico con esos datos estaremos, probablemente, obteniendo estimas erróneas.

5.1.3. Relevancia del ambiente en la evaluación de la resistencia.

Las condiciones ambientales puede afectar a la susceptibilidad de la planta: un estrés hídrico o una fertilización nitrogenada elevada suelen provocar mayores daños (Suzuki, 1934b; Ou, 1985; Roumen, 1994). Pero, principalmente, determinan el momento del ataque y la extensión de éste, como se describe ampliamente en la Introducción (1.5.4), y como demuestra el hecho de que ni las líneas F3, ni las F4, de JSxGV pudieron ser evaluadas en Sevilla, puesto que precisamente esos dos años no se detectó una presencia suficiente de la enfermedad en la parcela de ensayo (cuando *M. oryzae* sí es un problema en otros años). En este estudio, entre los efectos ambientales se encuentran además las diferencias climatológicas y el efecto de los diferentes equipos de evaluadores en cada zona arrocera, a pesar de que se intentó consensuar al máximo posible el protocolo de evaluación. No obstante, la diferencia más importante que se puede esperar entre ambientes sería la existencia de poblaciones del patógeno distintas. Sin embargo, en este caso los resultados de la caracterización molecular de los aislados muestreados en el Delta y en Valencia revelaban que en ambas localidades las poblaciones son similares (comunicación personal de Didier Tharreau, cuyo equipo del CIRAD-CA en Montpellier (Francia) ha llevado a cabo la caracterización de la población de *M. oryzae* en varias zonas y durante varios años). Pero la presencia relativa de linajes más o menos virulentos sí puede cambiar de un año a otro, como se verá más adelante al hablar de la caracterización de la población mediante VDs.

Se ha tratado de igualar al máximo las condiciones de cultivo de los diferentes ensayos, y se han tomado todas las medidas posibles para favorecer al máximo la infección, como fechas de siembra y trasplante tardías, densidades de plantación elevada, presencia de una variedad esparcidora, elevadas dosis de fertilizantes nitrogenados y aumento de la humedad ambiental, ya que, afortunadamente para los productores de arroz en Europa, las condiciones ambientales de la región mediterránea no son siempre las óptimas para el desarrollo de la enfermedad. Aun así, y como se irá detallando a continuación, gran parte de los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser achacables a diferencias ambientales entre ensayos.

Por una parte, como se ha indicado, la incidencia en panícula durante el análisis de la población SixCNA (El Palmar, 2007) fue baja incluso en el testigo Baixet a pesar de que sí hubo síntomas en hoja de intensidad media. Esto se puede deber a que las condiciones climáticas fueran adversas para el desarrollo de la enfermedad en la fase del espigado, o que los picos de la enfermedad se produjeran antes de que emergencia de las panículas. Algo similar puede ocurrir cuando observamos las notables variaciones en el rango de incidencias entre los diferentes años en que se ensayaron las VDs (Figuras 22 a 25); especialmente dado que estas líneas son más bien tardías. Se puede concluir que las evaluaciones de la incidencia de *M. oryzae* en los órganos productivos están particularmente sujetas a las fluctuaciones del nivel de inóculo que puede ocurrir en las fases finales del ciclo de cultivo del arroz, y se debe ser especialmente cuidadoso al asignar los valores de susceptibilidad en el caso de los genotipos más tardíos. Pese a ello, como ya se ha indicado, las estimas de incidencia en panícula, nudo y cuello son de interés, no sólo porque reflejan directamente las potenciales pérdidas de rendimiento, sino porque las correlaciones entre años y localidades suelen ser mayores que las estimas de la susceptibilidad en hojas.

La influencia ambiental también queda patente al observar los resultados en las distintas localidades en el estudio de JSxGV: aunque las diferencias entre el Delta y las dos localidades de Valencia eran hasta cierto punto esperables, sorprende la escasa correlación que se encuentra entre estas dos últimas, pues los tratamientos y los evaluadores fueron los mismos, y la cercanía entre ambas hace esperar que las condiciones climáticas sean bastante similares, así como la población del patógeno. Una probable explicación radica en que para el éxito del ataque del hongo son de gran importancia las condiciones microclimáticas del campo; en ese aspecto ambas localidades difieren, ya que la parcela de El Palmar está rodeada por el lado este por un cañaveral y por el lado norte por un vivero de palmeras, que reducen el paso de vientos y, por lo tanto, pueden aumentar la humedad alrededor de las plantas de arroz; además, en esta parcela se instaló un sistema de aspersión para incrementar la humedad en las horas del día claves para favorecer el ataque del hongo (Figura 35).

Sin embargo, no se pueden achacar las correlaciones bajas exclusivamente al efecto ambiental, pues una colección de variedades comerciales evaluadas simultáneamente mostró mayores correlaciones entre los parámetros y entre localidades (datos no mostrados). En las poblaciones segregantes, es posible que la existencia dentro de cada línea F3 de segregación residual en algunos de los genes que determinan la susceptibilidad justifique en parte las bajas correlaciones: podría ocurrir que las muestras de semilla de cada línea repartidas en las tres localidades no fueran absolutamente uniformes en cuanto a las frecuencias génicas; y al tratarse de QTLs de resistencia parcial que pueden tener efectos pequeños, pueden ser bastante sensibles a la interacción GxE.

Figura 35. Parcela de ensayo de resistencia a *M. oryzae* en El Palmar. Pueden verse los aspersores en el centro, y la barrera de cañas al fondo.

5.2. Ensayos con Variedades Diferenciales: espectro de virulencia de la población de *Magnaporthe oryzae*

Una buena estrategia de obtención de variedades resistentes a *M. oryzae* debe incluir información sobre la composición de la población del patógeno en cada zona arrocera. Una herramienta interesante para ello es una colección de variedades diferenciales (VDs), que al albergar por separado diversos genes de resistencia completa (genes R) en un mismo fondo genético, permite determinar el espectro de genes de avirulencia presentes. Los distintos linajes del patógeno se pueden describir por su caracterización molecular, pero también en función de su patrón de virulencia, por lo que la respuesta combinada de las VDs permite inferir cuales son los linajes a los que se ha enfrentado la colección en un ensayo de campo particular. Además, puede indicar si alguno de los genes R podría ser efectivo para incrementar la resistencia del cultivo en ese entorno patogénico concreto.

5.2.1. Validez de la colección IRBL

La colección de VDs utilizada en este estudio (las líneas IRBL) no ha resultado tan informativa como cabría esperar. Los motivos para ello son tres: su maduración no es sincrónica con las variedades cultivadas en nuestros arrozales, las líneas no son realmente isogénicas, y no todas parecen ser monogénicas. Pese a ello, como veremos más adelante, sí se han podido extraer algunas conclusiones de este estudio.

Muchas de las líneas de esta colección son tardías para los cortos ciclos de cultivo en las regiones de clima templado, como la mediterránea; de modo que algunos años no se evaluó la incidencia en panícula de varias líneas (cuando al final del periodo de cultivo aún no se había alcanzado el 50% de maduración), pues la ausencia de síntomas podría no indicar que fuesen resistentes, sino que ya no hubiera suficiente presión de inóculo para producir infección tras la emergencia de la panícula. De hecho, el parental recurrente, LTH, que es relativamente tardío y se considera altamente susceptible a casi todos los linajes de *M. oryzae* (Shuyuan, 1980), resultó poco susceptible algunos años, especialmente en panículas y nudos. No obstante, todas las VDs se evaluaron para incidencia al menos un año.

Por otra parte, las líneas de esta colección difícilmente se pueden calificar de isogénicas, pues Fukuta y *col*. (2009) determinaron que poseen entre el 10 y el 50% del genoma del donador, siendo la media del conjunto de las líneas del 23%. Este genoma donador, además, es de muy diverso origen, incluso en líneas que tienen el mismo gen *Pi*; así, por ejemplo, IRBLA-A e IRBLA-C, ambas portadoras de *Pia*, tienen como donadores a las variedades Aichi Asahi y CO39, respectivamente (Tsunematsu *y col*., 2000). La falta de uniformidad en el fondo genético hace difícil la comparación de la respuesta susceptible, pues el comportamiento agronómico y el estado fenológico de las diferentes líneas son poco homogéneos. A esto se le suma la posibilidad de que algunas VDs contengan algún gen de resistencia adicional, lo que podría llevar a conclusiones erróneas sobre la existencia o ausencia de reacción compatible. De hecho, Tsunematsu *y col*. (2000) observaron que algunas de las variedades donantes mostraban resistencia a más aislados de los esperados según los genes *Pi* que se sabe que albergan. La incorporación adicional de genes de resistencia desconocidos *a priori*, o las potenciales interacciones entre el gen R y los distintos fondos genéticos puede explicar que varias de las líneas que poseen el mismo gen de resistencia se comporten de manera distinta. Así ocurre, por ejemplo, con las mencionadas líneas que contienen el gen *Pia*: IRBLA-A sufrió un ataque severo en hoja en los años 2010 y 2011, mientras que en IRBLA-C fue moderado; por el contrario, IRBLA-C tuvo una incidencia en panícula en 2009 del 33% frente a una incidencia de sólo el 10% en IRBLA-A. Del mismo modo, las tres VDs que poseen el gen *Pita* (IRBLTA2-RE, IRBLTA-K1 e IRBLTA-CT2) presentaron valores de severidad e incidencias notablemente diferentes entre sí (Figuras 22-25). También Cho *y col*. (2005) observaron comportamientos desiguales entre VDs que contienen el mismo gen de resistencia.

Además de lo expuesto, y como se describe en el apartado 5.2.3, la colección IRBL carece de algún gen *Pi* posiblemente interesante para proteger los cultivos de arroz en Europa del ataque de *M. oryzae* (en concreto, *Pi33*). Ya en 1986, Bonman *y col*. recomendaron utilizar sets diferenciales basados en variedades ampliamente cultivadas en la misma región geográfica en la que se pretende describir la virulencia de la población de *M. oryzae.* Sin embargo, no se ha construido una colección adaptada a los arrozales occidentales (y, en particular, europeos), por lo que hemos usado la que viene siendo empleada en las zonas arroceras en las que predomina la ssp. *japonica*; y nos permite, al menos, la comparación con resultados de otros puntos de España.

5.2.2. Composición y estabilidad de la población de *Magnaporthe oryzae* en el arrozal valenciano.

Se observaron cambios en la respuesta de las VDs entre los 4 años en que se realizó el ensayo, sobre todo en nudo y en panícula. Así, por ejemplo, IRBL12M (*Pi12*) estuvo entre las líneas de mayor severidad en hoja en 2006, 2010 y 2011, pero sólo este último año estuvo entre las más afectadas en cuanto a incidencias (Figuras 22-25). Otro ejemplo es la línea IRBLKH-K3 (*Pik-h*), que sufrió una incidencia en panícula extrema en 2006, mientras que apenas la padeció en 2009 o 2010. Por otra parte, los genes *Pia*, *Pish* y *Pita-2* están presentes en varias líneas cada uno, las cuales no siempre mostraron el mismo grado de susceptibilidad. Aunque esta variación interanual puede deberse en parte a que las condiciones climáticas no fueran siempre las más favorables para el ataque de *M. oryzae*, especialmente durante el espigado y en las VDs más tardías, se constata que hubo suficiente presión de inóculo en el ensayo por los valores de severidad en hoja y el comportamiento de las variedades testigo (Baixet y LTH). Esto, unido a que el ranking de susceptibilidad de las líneas no fue siempre el mismo, indica que la estructura de la población del hongo varió en los diferentes años, lo cual está de acuerdo con las observaciones de otros autores, como veremos más adelante.

Los cambios observados de uno a otro año han hecho difícil el análisis de los resultados, pero el análisis de clusters ha contribuido a interpretarlos. Por un lado, las VDs que albergan los genes *Pi3*, *Pi9*, *Pi12*, *Pi19*, *Pi20, Pik-h*, *Pit* y *Piz-5* han sufrido daños severos varios de los años estudiados (Tabla 16), por lo que se puede deducir que la población de *M. oryzae* de la zona de Valencia contiene linajes con genes de avirulencia compatibles con estos genes *Pi*. La población del patógeno debe estar compuesta también por cepas con genes de avirulencia compatibles con los genes *Pia*, *Pish* y *Pita-2* (presentes en más de una VD), pues hubo síntomas de piriculariosis en una u otra línea en varios años. Estos genes se encuentran agrupados en la parte derecha del dendrograma (Figura 26), excepto *Pia* y *Pit*, no incluidos en el análisis de clusters, y *Pita-2*, que se localiza en el cluster de la izquierda.

Por otro lado, algunas líneas tuvieron generalmente valores bajos de susceptibilidad, tanto en hoja como en panícula y en nudo, durante los años en los que se realizó el ensayo. Los genes de estas VDs se localizan en la parte izquierda del dendrograma, pero formando agrupaciones no siempre fáciles de interpretar. Sin atender estrictamente al análisis de clusters, los podemos clasificar en 3 tipos: en el primero están las VDs que contienen los genes *Pi1*, *Pi5, Pii*, *Pik-m* y *Piz-t*, que son tardías, por lo que no se pueden extraer conclusiones sobre las bajas incidencias observadas; aunque a nivel de severidad en hoja muestran pocos síntomas. Otro grupo de VDs, las que llevan los genes *Pi11, Pib*, *Pik-p* y *Pita,* únicamente mostraron síntomas severos en 2011 (el año de mayor ataque del hongo), lo cual podría señalar a un aumento de la frecuencia de las razas compatibles con estos genes durante ese año. Y el tercer grupo lo forman las líneas que albergan los genes *Pi7*, *Pik*, *Pik-s*, y *Piz*, que sólo sufrieron ataques destacables alguno, o ninguno, de los años en que se ensayaron; en particular *Piz,* con una susceptibilidad baja o moderada durante los 4 años de ensayo. Se puede deducir, por tanto, que la población de *M. oryzae* del arrozal valenciano contiene genes de avirulencia que son incompatibles con los genes *Pi* de este último grupo, de modo que aparece una respuesta de tipo resistente.

La variación interanual está de acuerdo con lo observado en los arrozales de las marismas del Guadalquivir (Lara-Álvarez *y col.*, 2010), donde se han producido cambios en la población del patógeno a lo largo de los años. Este estudio, uno de los más detallados para caracterizar la presencia de diferentes aislados y linajes en una determinada zona arrocera (186 aislados, 4 años), tanto a nivel molecular como patogénico, demostró por primera vez que tales cambios pueden ser drásticos de un ciclo de cultivo al siguiente. Así, por ejemplo, mientras el linaje E4 estuvo presente los 4 años estudiados -aunque con frecuencias que variaron entre el 82% (año 1999) y el 9% (2000)-, el linaje E2 fue el predominante (91%) en 2000, pero estuvo ausente en 1999, 2002, y sólo representó el 6% de los aislados en 2003.

Deducir con precisión la composición en linajes de la población de *M. oryzae* en la zona de la Albufera es, sin embargo, bastante difícil sólo con los datos de nuestros ensayos. Como se indicó en la Introducción (apartado 1.5.6), en los arrozales españoles se puede esperar encontrar aislados de los linajes E1, E2, E4 y E5, y quizá también del E6, hasta ahora hallado sólo en las Marismas del Guadalquivir. Lara-Álvarez *y col.* (2010) describen para cada linaje un determinado patotipo o patrón de virulencia, que hemos intentado aplicar a nuestros resultados; así, la frecuente aparición de susceptibilidad en las VDs de nuestro estudio que llevan los genes *Pia*, *Pit, Pik-m* y *Pis-h* coincidiría con la presencia de cualquiera de los 5 linajes arriba mencionados; pero hay otras características que no se cumplen: según estos autores, todos estos linajes no deberían causar lesiones en las líneas que llevan los genes *Pik*, *Pik-p* y *Pita*, y sin embargo en nuestro estudio las VDs que los llevan fueron susceptibles en el año 2011. La causa podría ser la aparición durante ese año de algún nuevo y virulento linaje en los arrozales valencianos (en Italia parecen existir otros dos linajes adicionales; Piotti *y col.*, 2005). Pero no se puede afirmar con rotundidad dado que las diferentes metodologías empleadas también pueden jugar un papel: estos estudios se vienen realizando mediante la inoculación de VDs con los aislados obtenidos en cada región, mientras que nuestros resultados proceden del análisis en campo; y como hemos discutido ampliamente en el apartado anterior, la respuesta de las plantas en campo no siempre se corresponde con lo que predicen los ensayos por inoculación. Sin embargo, sí nos parece recomendable una caracterización similar a la realizada en Sevilla de la población de *M. oryzae* presente en la zona de la Albufera.

Los mencionados autores discuten las posibles causas de los rápidos y masivos cambios observados en la estructura de la población de *M. oryzae*, y los achacan a la introducción de semillas como nueva fuente de inóculo: algunas variedades se incorporaron al arrozal sevillano durante el periodo de estudio, y sugieren que sus semillas pueden haber introducido el nuevo linaje E6, que apareció en 2002 y 2003 con una elevada frecuencia. Curiosamente, una de estas variedades, Fonsa, pasó también a formar una parte importante de la estructura varietal en la zona de la Albufera a partir del cambio de siglo y, popularmente, se acusa a esta introducción del fuerte incremento de la enfermedad observado a partir de ese momento en el arrozal valenciano.

Por último, la posibilidad de que la población del patógeno pueda cambiar con relativa facilidad puede ser una parte importante de las diferencias ambientales que describimos en el apartado 5.1.3, y podría explicar, al menos en parte, el diferente comportamiento observado en parentales y poblaciones segregantes en las diferentes

localidades de nuestro estudio, que suponíamos *a priori* bastante similares a nivel patogénico.

5.2.3. Genes *Pi* potencialmente útiles para mejorar la resistencia de las variedades cultivadas en España.

Hemos comparado los resultados de esta tesis con otros ensayos realizados con estas mismas VDs en años recientes en los parques naturales del Delta del Ebro, (Català *y col.*, 2008) y la Albufera de Valencia, aunque en una localidad diferente a la empleada en nuestros ensayos (Osca, comunicación personal). Y hemos podido comprobar que las conclusiones a las que llegan no siempre coinciden con las nuestras. Creemos que las importantes variaciones anuales en la respuesta de las líneas, junto con potenciales diferencias en la composición de la población del patógeno entre las diversas zonas arroceras, e incluso entre localidades de una misma zona, limitan considerablemente la utilidad de la colección de líneas diferenciales para la comparación de resultados; y, particularmente, para determinar si un determinado gen *Pi* puede aportar una resistencia eficaz, y ser candidato a ser incorporado en los programas de mejora de la resistencia. No obstante, estos otros estudios han servido para corroborar o completar algunos de nuestros resultados, como que los genes *Pii* y *Pita* no pueden considerarse entre los que aportan resistencia (el primero nos parecía dudoso por encontrarse en una VD tardía, y el segundo sólo había mostrado síntomas en 2011); y también que la VD con el gen *Pi7* no tuvo síntomas de piriculariosis en casi ningún ensayo, incluidos los nuestros.

También hemos comparado nuestros resultados con un estudio sobre el espectro de virulencia de 30 aislados europeos de *M. oryzae* (Tharreau, comunicación personal), y con el anteriormente citado estudio de caracterización en el arrozal sevillano. Según estos trabajos, los genes que confieren resistencia a todos los aislados europeos ensayados son ***Pib, Piz-t, Pita-2*** **y** ***Pi33***; mientras que otros provocarían una resistencia de amplio espectro, efectiva contra la mayor parte de los aislados ensayados: *Pi1, Piz-5, Pik, Pik-h, Pik-p, Pita* y *Piz*. Y en el caso de la zona sur de España, serían los genes subrayados los que procurarían resistencia a todos los aislados. Aunque la efectividad de los genes *Pi33* y *Pi7* no se ha podido comparar (el primero no se encuentra en la colección IRBL, y el segundo no estaba entre las VDs de los estudios de inoculación), nuestro trabajo coincide en varios casos: *Pik* y *Piz* serían eficaces; *Pib, Pik-p* y *Pita* sólo resultaron ineficaces en el año de mayor ataque del hongo; y no podemos afirmar rotundamente si los genes *Pi1* y *Piz-t* lo fueron por encontrarse en VDs de maduración tardía. Pero hay 3 genes, *Pik-h, Pita-2* y *Piz-5,* que en nuestros estudios ya se ven claramente superados por el patógeno (como lo ha sido *Pita* en los ensayos en las otras regiones arroceras españolas).

Estos cambios en la virulencia de las poblaciones de *M. oryzae* que infestan actualmente los cultivos son las responsables de la rotura de la resistencia que se observa aunque se hayan piramidado varios genes *Pi* de resistencia completa en una misma variedad. En los últimos 10-15 años se consideraba que la combinación de *Pi1, Pi33* y *Piz-5* era suficiente para controlar la infección en los arrozales de América Latina (Correa-Victoria *y col.*, 2002; Correa-Victoria y Martínez, 2009) y Europa (Tharreau, comunicación personal); y por ello se generaron líneas y variedades con esta configuración genética. Pero en 2009

la resistencia a *Pi1* y *Piz-5* ya había sido superada por el hongo (como hemos comprobado que ocurre en Valencia con el segundo de estos genes). Por ello, con posterioridad, se propuso piramidar los 4 genes señalados en negrita en el párrafo anterior. Pero nuestro trabajo demuestra que ya hay aislados capaces de superar, al menos, a *Pita-2*. Ésta es la causa de que la estrategia de incorporación de resistencia parcial, cuantitativa, parezca más prometedora; los siguientes apartados analizarán la genética de este tipo de resistencia.

5.3. Detección de QTLs de resistencia a *Magnaporthe oryzae*

5.3.1. Mapas de ligamiento

Aunque los SSR se consideran marcadores con un alto nivel de polimorfismo, la tasa de polimorfismo encontrada en la población JS y GV fue del 35%, y algo superior en la población SixCNA: 44%. Pero la bibliografía muestra frecuencias iguales o incluso inferiores en estudios similares: Yamagishi y *col*. (2004) encontraron un 23% de polimorfismo en un cruzamiento entre *japonica templado* y *japonica tropical*, y Kwon *y col*. (2008) un 19,5% entre dos variedades de *japonica templado*. La mayor proporción de loci polimórficos entre Sivert y CNA-6159 se debe probablemente a que la segunda procede de un cruzamiento entre *japonica* e *indica*; y coincidiría con el 48% de SSRs polimórficos hallados por Zhang *y col*. (2001) en un cruzamiento entre *japonica* e *indica*.

La escasez de marcadores polimórficos ha sido más notable en algunas regiones de los cromosomas 4, 5, 9, 10 y 12, en las dos poblaciones que hemos analizado (Figuras 28 y 34); lo cual ha sido también observado en otros cruzamientos entre líneas *japonica* (Tabata *y col*., 2007; Kobayashi *y col*., 2007a; Kown *y col*., 2008). Igualmente, en otros estudios del Departamento del Arroz en el IVIA, en cruzamientos que comparten germoplasma con nuestras poblaciones, Torró (2010) halló también un alta tasa de polimorfismo en los cromosomas 1, 2, 3 y 6, y baja en los cromosomas 4, 8, 9 y 11. Estas coincidencias indican que estas regiones genómicas están altamente conservadas en esta subespecie, quizá porque contengan genes que determinen algunos de los rasgos propios de la subespecie; y también permiten pensar que, si bien pueden quedar sin detectar QTLs ubicados en ellas, es probable que estos no estén segregando y no contribuyan a la variación fenotípica observada.

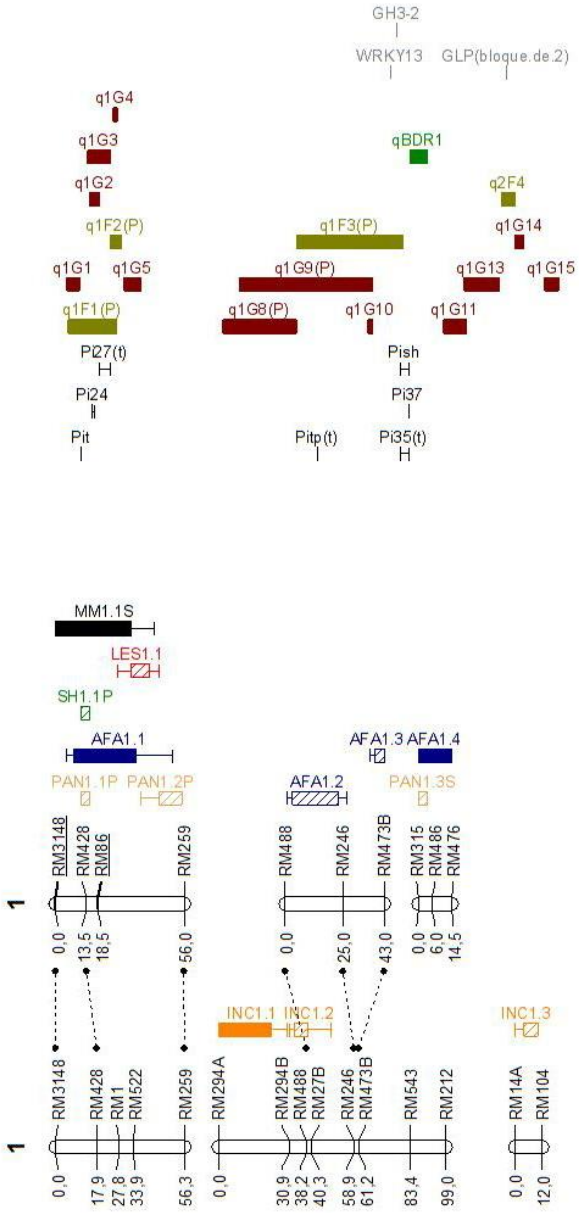
En ambas poblaciones, algunos marcadores presentaron una segregación distorsionada: un 27% en SixCNA y un 11% en JSxGV. La mayor proporción de frecuencias alélicas que se apartan de lo esperado en la primera población puede ser debida, de nuevo, a la mayor distancia genética que se le puede suponer a CNA-6159 respecto al resto de parentales, por incluir parte de germoplasma *indica. Se* han observado frecuentes desviaciones como éstas en descendencias de cruzamientos inter-subespecíficos (Harushima *y col*., 1996; Xu *y col*., 1997; Sirithunya *y col*., 2002). La distancia genética entre los parentales es probablemente también la causa de que en numerosas plantas de la población SixCNA se observara cierto grado de esterilidad, que se mantuvo en sucesivas

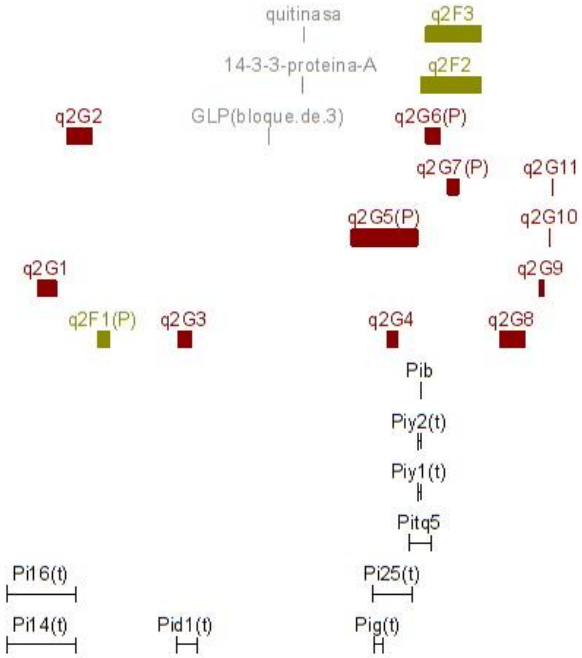
generaciones; de hecho se abandonó la selección de genotipos resistentes al continuar este problema en F5.

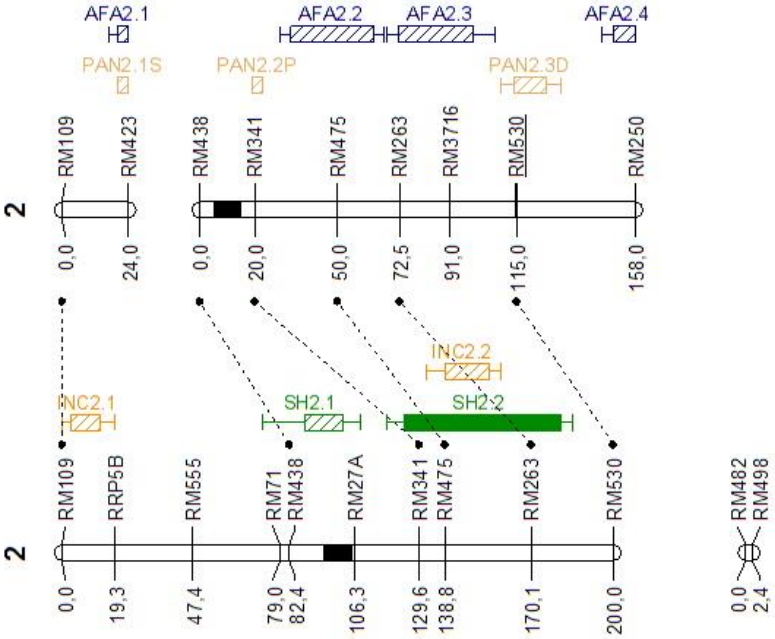
La segregación distorsionada es un fenómeno muy extendido en plantas, incluyendo el arroz, y cada vez más se considera como una posible fuerza evolutiva. La desviación respecto a las frecuencias mendelianas puede ser provocada por numerosos mecanismos, pero en la mayoría de casos se trata de selección gamética, esterilidad o translocación cromosómica (Sandler y Novitski, 1957; Nakagahra 1972; Maekawa y Kita, 1985; Hedrick y Muona, 1990; Sano 1990; Lyttle, 1991; Lorieux *y col.*, 1995; Harushima *y col.*, 1996, 2001, 2002; Xu *y col.*, 1997; Luo y Xu, 2003; Matsushita *y col.* 2003; Taylor e Ingvarsson, 2003; Zhu *y col.*, 2007; Li *y col.*, 2007c; Koide *y col.*, 2008a, b, 2011b; Wang *y col.*, 2009b; Liu *y col.*, 2010b; Reflinur *y col.*, 2014). Otra característica de este fenómeno es que la mayoría de loci afectados suelen agruparse en ciertas regiones cromosómicas, como se ha observado ocurre en numerosas especies (Tai *y col.*, 2000; Xu, 2008; Li *y col.*, 2010). Así, por ejemplo, tanto en SixCNA como en el ensayo de Reflinur *y col.* (2014), se encontraron abundantes casos en los cromosomas 3 y 8. La existencia de frecuencias genéticas anómalas influye en la precisión del mapa de ligamiento y del análisis de QTLs (Wu *y col.*, 2010), aunque se ha observado que, salvo que la distorsión sea extremadamente elevada, la influencia sobre las estimas de la posición y efecto de los QTLs, así como sobre el número de falsos positivos, es prácticamente nula (Kuang *y col.*, 1999; Cervera y *col.*, 2001; Fishman *y col.*, 2001; Hackett y Broadfoot, 2003; Doucleff *y col.*, 2004; Xu, 2008; Xu y Hu, 2009; Zhang *y col.*, 2010). Además, algunos programas informáticos, entre los que se encuentran los utilizados en esta Tesis, tienen opciones que permiten detectar y corregir la existencia de tales segregaciones.

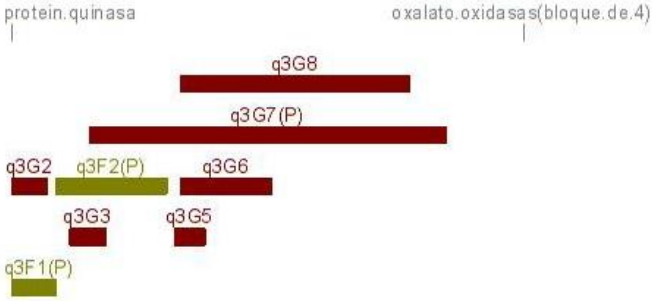
Los mapas de ligamiento calculados para las poblaciones SixCNA y JSxGV se corresponden bien con lo esperado según los diferentes mapas publicados, en cuanto al orden de los marcadores y las distancias entre estos. La figura 36 permite comprobar la colinearidad de ambos mapas, así como la coherencia, generalmente alta, en las distancias genéticas entre marcadores.

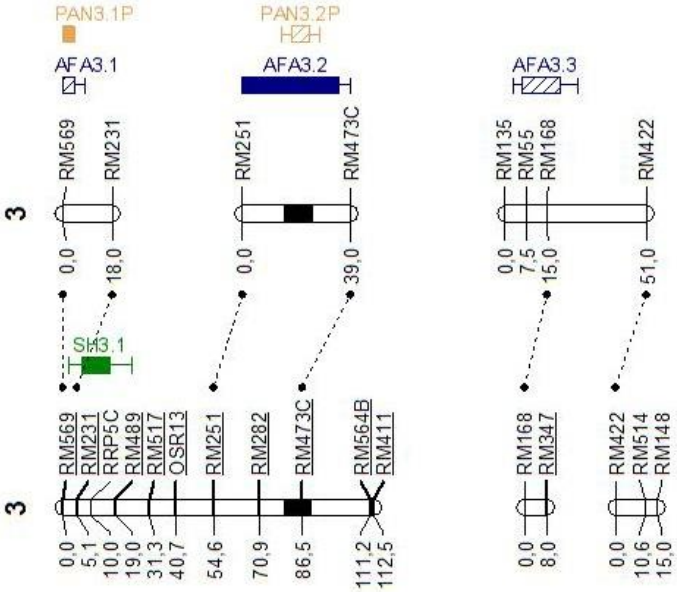
Figura 36. Alineación de los mapas de ligamiento de las poblaciones SixCNA (izq.) y JSxGV (der.); los marcadores con segregación distorsionada aparecen subrayados. Se muestran también sus QTLs (según formato y nomenclatura de las Figuras 28 y 34), y la localización de genes de resistencia completa (*Pi*), genes candidatos (en gris), y metaQTLs del estudio de Ballini *y col*. (2008); estos últimos están representados por barras verdes (QTLs de campo) o marrones (QTLs de invernadero); (P) indica metaQTLs de resistencia parcial; en los restantes, la naturaleza de la resistencia no ha sido determinada

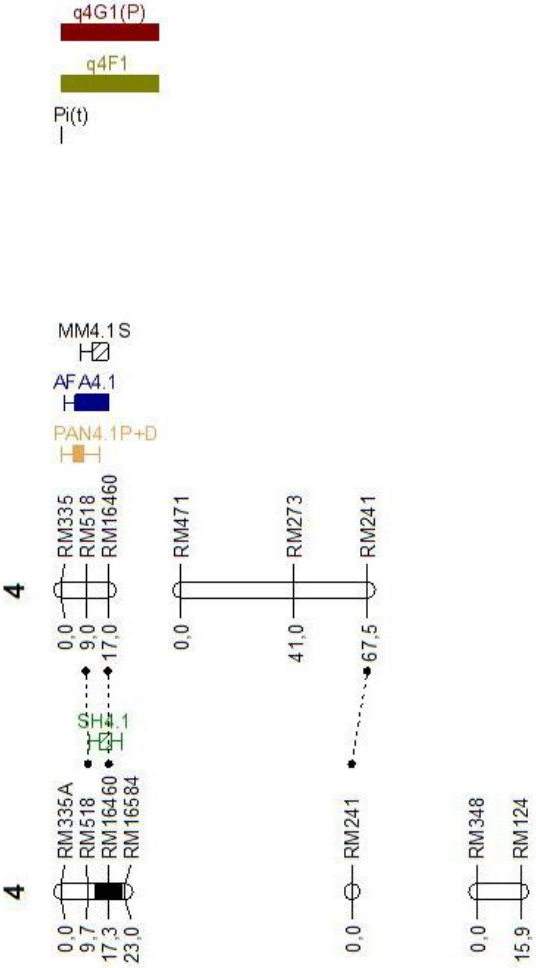


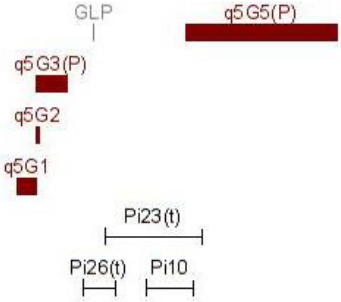

quitinasa
q2F3
14-3-3-proteina-A
q2F2
q2G2
GLP(bloque.de.3)
q2G6(P)
q2G7(P)
q2G11
q2G5(P)
q2G10
q2G1
q2G9
q2F1(P)
q2G3
q2G4
q2G8
Pib
Piy2(t)
Piy1(t)
Pitq5
Pi16(t)
Pi25(t)
Pi14(t)
Pid1(t)
Pig(t)

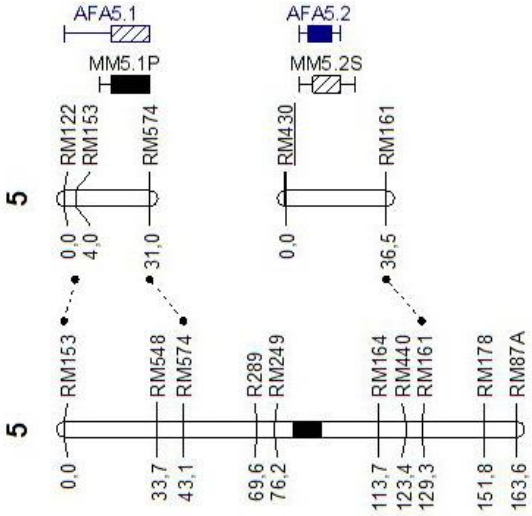

AFA2.1
AFA2.2
AFA2.3
AFA2.4
PAN2.1S
PAN2.2P
PAN2.3D
2
RM109
RM423
RM438
RM341
RM475
RM263
RM3716
RM530
RM250
0,0
24,0
0,0
20,0
50,0
72,5
91,0
115,0
158,0
INC2.2
INC2.1
SH2.1
SH2.2
2
RM109
RRP5B
RM555
RM71
RM438
RM27A
RM341
RM475
RM263
RM530
RM482
RM498
0,0
19,3
47,4
79,0
82,4
106,3
129,6
138,8
170,1
200,0
0,0
2,4

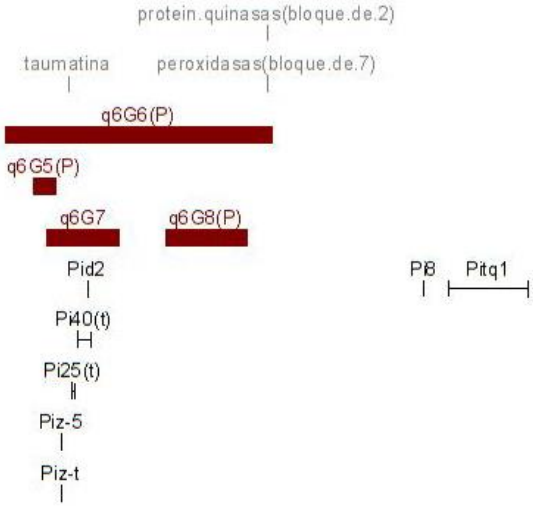

protein.quinasa
oxalato.oxidasas(bloque.de.4)
q3G8
q3G7(P)
q3G2
q3F2(P)
q3G6
q3G3
q3G5
q3F1(P)

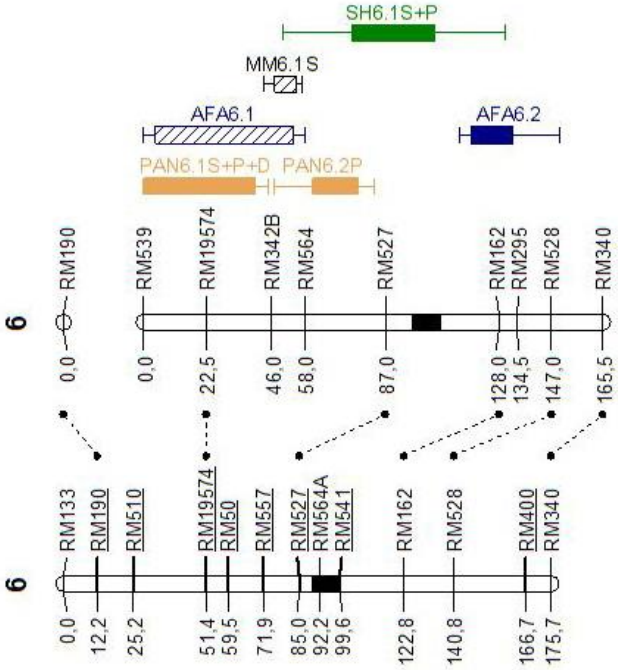

3
PAN3.1P
AFA3.1
RM569
RM231
0,0
18,0
SH3.1
PAN3.2P
AFA3.2
RM251
RM473C
0,0
39,0
AFA3.3
RM135
RM55
RM168
RM422
0,0
7,5
15,0
51,0
3
RM569
RM231
RRP5C
RM489
RM517
OSR13
RM251
RM282
RM473C
RM564B
RM411
0,0
5,1
10,0
19,0
31,3
40,7
54,6
70,9
86,5
111,2
112,5
RM168
RM347
0,0
8,0
RM422
RM514
RM148
0,0
10,6
15,0

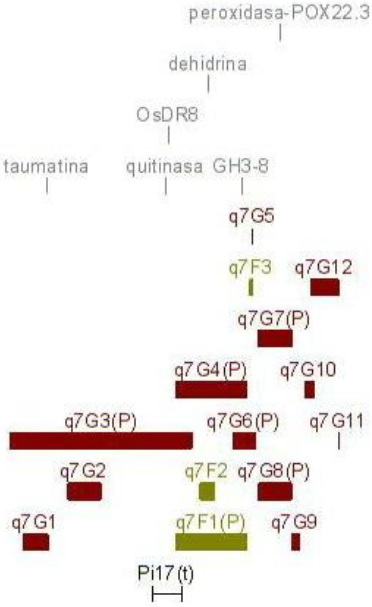

q4G1(P)
q4F1
Pi(t)
MM4.1S
AFA4.1
PAN4.1P+D
4
RM335
RM518
RM16460
0,0
9,0
17,0
SH4.1
RM471
RM273
RM241
0,0
41,0
67,5
4
RM335A
RM518
RM16460
RM16584
0,0
9,7
17,3
23,0
RM241
0,0
RM348
RM124
0,0
15,9

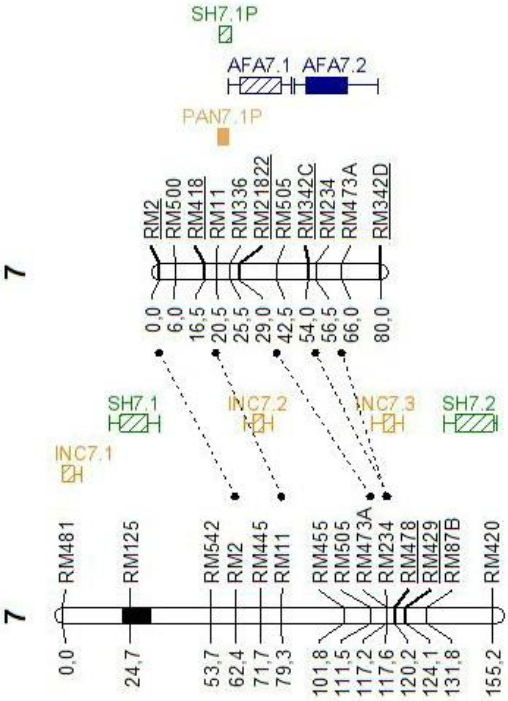

GLP
q5G5(P)
q5G3(P)
q5G2
q5G1
Pi23(t)
Pi26(t)
Pi10

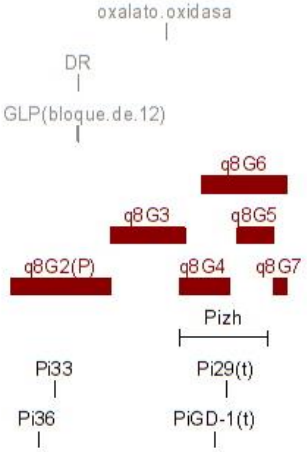

5
AFA5.1
MM5.1P
RM122
RM153
RM574
0,0
4,0
31,0
RM153
RM548
RM574
R289
RM249
RM164
RM440
RM161
RM178
RM87A
0,0
33,7
43,1
69,6
76,2
113,7
123,4
129,3
151,8
163,6
5
AFA5.2
MM5.2S
RM430
RM161
0,0
36,5

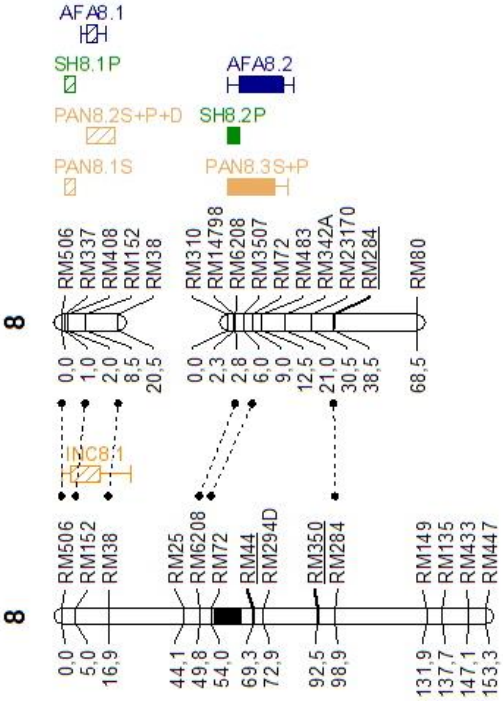

protein.quinasas(bloque.de.2)
taumatina
peroxidasas(bloque.de.7)
q6G6(P)
q6G5(P)
q6G7
q6G8(P)
Pid2
Pi40(t)
Pi25(t)
Piz-5
Piz-t
Pi8
Pitq1

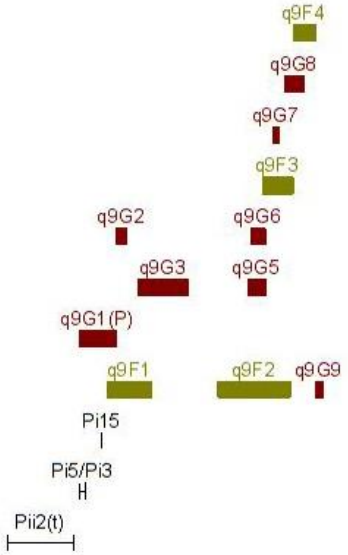

SH6.1S+P
MM6.1S
AFA6.1
AFA6.2
PAN6.1S+P+D
PAN6.2P
6
RM190
RM539
RM19574
RM342B
RM564
RM527
RM162
RM295
RM528
RM340
0,0
0,0
22,5
46,0
58,0
87,0
128,0
134,5
147,0
165,5
6
RM133
RM190
RM510
RM19574
RM50
RM557
RM527
RM564A
RM541
RM162
RM528
RM400
RM340
0,0
12,2
25,2
51,4
59,5
71,9
85,0
92,2
99,6
122,8
140,8
166,7
175,7

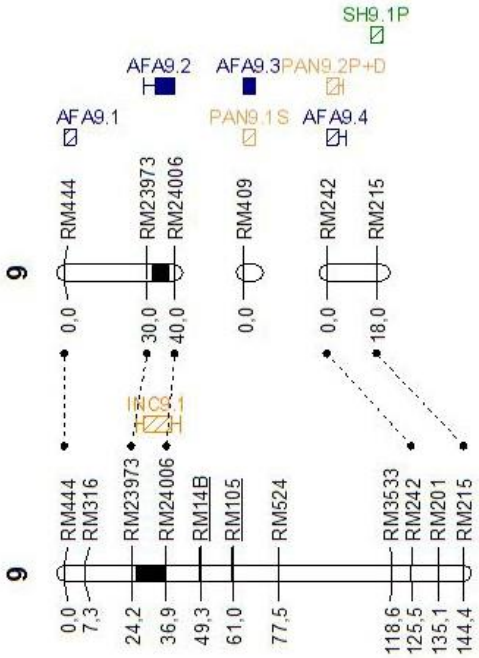

peroxidasa-POX22.3
dehidrina
OsDR8
taumatina
quitinasa GH3-8
q7G5
q7F3
q7G12
q7G7(P)
q7G4(P)
q7G10
q7G3(P)
q7G6(P)
q7G11
q7G2
q7F2
q7G8(P)
q7G1
q7F1(P)
q7G9
Pi17(t)

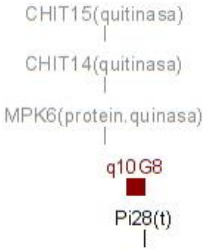

7
SH7.1P
AFA7.1
AFA7.2
PAN7.1P
RM2
RM500
RM418
RM11
RM336
RM21822
RM505
RM342C
RM234
RM473A
RM342D
0,0
6,0
16,5
20,5
25,5
29,0
42,5
54,0
56,5
66,0
80,0
SH7.1
INC7.2
INC7.3
SH7.2
INC7.1
7
RM481
RM125
RM542
RM2
RM445
RM11
RM455
RM505
RM473A
RM234
RM478
RM429
RM87B
RM420
0,0
24,7
53,7
62,4
71,7
79,3
101,8
111,5
117,2
117,6
120,2
124,1
131,8
155,2

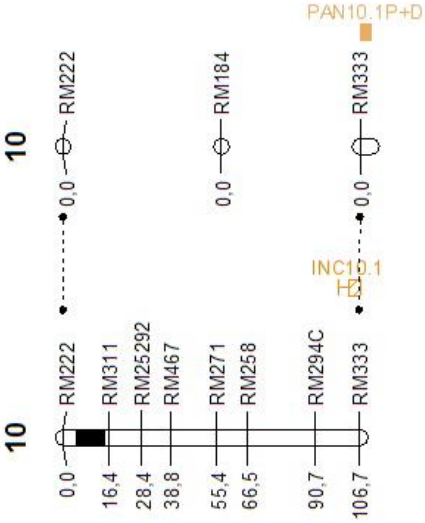

oxalato.oxidasa
DR
GLP(bloque.de.12)
q8G6
q8G3
q8G5
q8G2(P)
q8G4
q8G7
Pizh
Pi33
Pi29(t)
Pi36
PiGD-1(t)

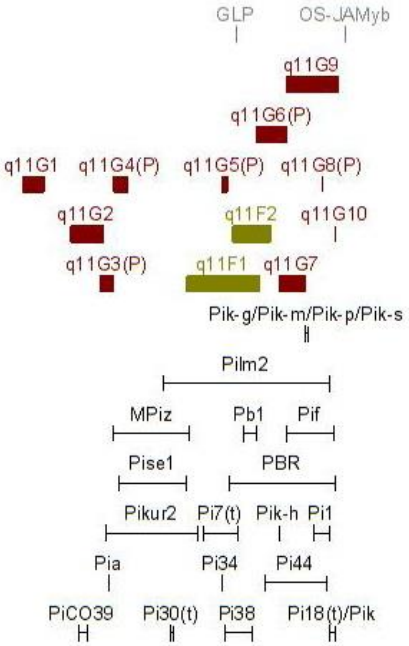

AFA8.1
SH8.1P
AFA8.2
PAN8.2S+P+D
SH8.2P
PAN8.1S
PAN8.3S+P
8
RM506
RM337
RM408
RM152
RM38
RM310
RM14798
RM6208
RM3507
RM72
RM483
RM342A
RM23170
RM284
RM80
0,0
1,0
2,0
8,5
20,5
0,0
2,3
2,8
6,0
9,0
12,5
21,0
30,5
38,5
68,5
INC8.1
8
RM506
RM152
RM38
RM25
RM6208
RM72
RM44
RM294D
RM350
RM284
RM149
RM135
RM433
RM447
0,0
5,0
16,9
44,1
49,8
54,0
69,3
72,9
92,5
98,9
131,9
137,7
147,1
153,3

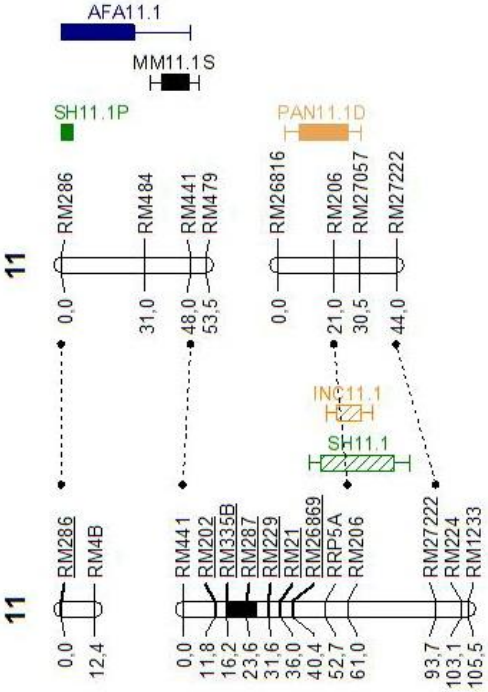

q9F4
q9G8
q9G7
q9F3
q9G2
q9G6
q9G3
q9G5
q9G1(P)
q9F1
q9F2
q9G9
Pi15
Pi5/Pi3
Pii2(t)

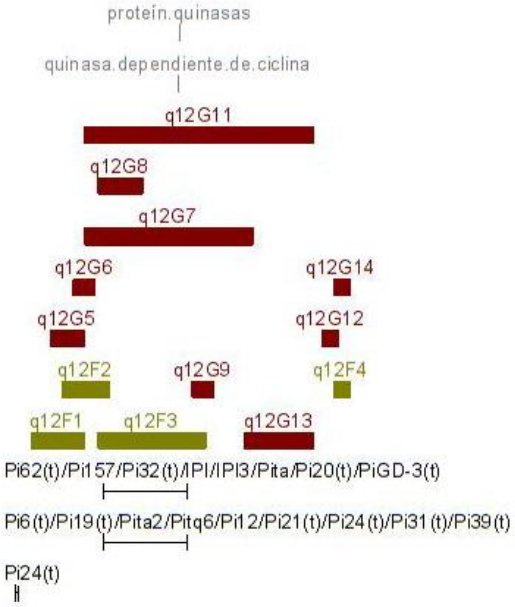

9
0,0
7,3
24,2
36,9
49,3
61,0
77,5
118,6
125,5
135,1
144,4
RM444
RM316
RM23973
RM24006
RM14B
RM105
RM524
RM3533
RM242
RM201
RM215
INCS9.1
9
0,0
30,0
40,0
0,0
0,0
18,0
RM444
RM23973
RM24006
RM409
RM242
RM215
AFA9.1
AFA9.2
AFA9.3
PAN9.1S
AFA9.4
PAN9.2P+D
SH9.1P

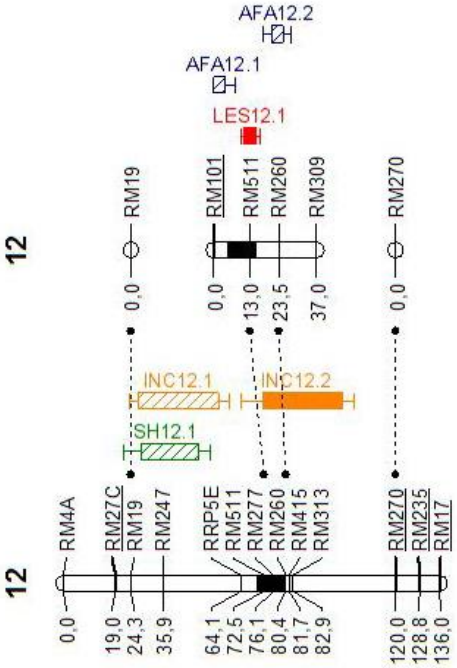

CHIT15(quitinasa)
CHIT14(quitinasa)
MPK6(protein.quinasa)
q10G8
Pi28(t)


10
10
0,0
16,4
28,4
38,8
55,4
66,5
90,7
106,7
RM222
RM311
RM25292
RM467
RM271
RM258
RM294C
RM333
0,0
RM222
0,0
RM184
PAN10.1P+D
INC10.1
H2
0,0
RM333


GLP
OS-JAMyb
q11G9
q11G6(P)
q11G1
q11G4(P)
q11G5(P)
q11G8(P)
q11G2
q11F2
q11G10
q11G3(P)
q11F1
q11G7
Pik-g/Pik-m/Pik-p/Pik-s
Pilm2
MPiz
Pb1
Pif
Pise1
PBR
Pikur2
Pi7(t)
Pik-h
Pi1
Pia
Pi34
Pi44
PiCO39
Pi30(t)
Pi38
Pi18(t)/Pik


AFA11.1
MM11.1S
SH11.1P
PAN11.1D
11
RM286
RM484
RM441
RM479
0,0
31,0
48,0
53,5
RM26816
RM206
RM27057
RM27222
0,0
21,0
30,5
44,0
INC11.1
SH11.1
11
RM286
RM4B
0,0
12,4
RM441
RM202
RM335B
RM287
RM229
RM21
RM26869
RRP5A
RM206
0,0
11,8
16,2
23,6
31,6
36,0
40,4
52,7
61,0
RM27222
RM224
RM1233
93,7
103,1
105,5


proteín.quinasas
quinasa.dependiente.de.ciclina
q12G11
q12G8
q12G7
q12G6
q12G14
q12G5
q12G12
q12F2
q12G9
q12F4
q12F1
q12F3
q12G13
Pi62(t)/Pi157/Pi32(t)/IPI/IPI3/Pita/Pi20(t)/PiGD-3(t)
Pi6(t)/Pi19(t)/Pita2/Pitq6/Pi12/Pi21(t)/Pi24(t)/Pi31(t)/Pi39(t)
Pi24(t)


12
AFA12.2
AFA12.1
LES12.1
RM19
RM101
RM511
RM260
RM309
RM270
0,0
0,0
13,0
23,5
37,0
0,0
INC12.1
INC12.2
SH12.1
12
RM4A
RM27C
RM19
RM247
RRP5E
RM511
RM277
RM260
RM415
RM313
RM270
RM235
RM17
0,0
19,0
24,3
35,9
64,1
72,5
76,1
80,4
81,7
82,9
120,0
128,8
136,0

5.3.2. Resultados generales del análisis de QTLs de resistencia

Muy pocos estudios sobre resistencia a *M. oryzae* se han realizado evaluando la resistencia en campo y ninguno con variedades adaptadas a las condiciones del cultivo del arroz en el área mediterránea. Por otro lado, la mayoría de estos estudios se ha realizado con la subespecie *indica* o a partir de cruzamientos entre *indica* x *japonica*, en diferentes tipos de poblaciones y en diferentes condiciones ambientales. Nuestro estudio es el primero que se ha realizado con una amplia base de germoplasma *japonica* y en el entorno patológico de nuestra zona.

Fuentes de resistencia y segregación en las poblaciones

Los cuatro parentales utilizados en este estudio, no solo los teóricamente resistentes, aportan cierto grado de resistencia a *Magnaporthe oryzae* en hoja y/o en panícula. Esto se puede observar en los ensayos de campo: ni Sivert ni CNA-6159 mostraron síntomas de enfermedad en panícula, y el segundo tuvo una baja susceptibilidad en hoja (Figura 27); y JSendra fue igual o más resistente que Gigante Vercelli al menos en una localidad en cuanto a susceptibilidad en hoja (severidad y tamaño de mancha), y en todas las localidades en cuanto a incidencias (Figuras 31 a 33). El análisis de QTLs corrobora esto: en bastantes casos, encontramos que son los alelos de Si y JS los que aportan resistencia. Esto explica que JS haya tenido buena respuesta frente a *M. oryzae* en ensayos en la zona del Delta del Ebro (Català *y col.*, 2008). El sorprendente comportamiento en campo, respecto a lo que predecían los ensayos de inoculación, de las variedades que considerábamos susceptibles confirmaría también que este tipo de estudios falla al predecir la compleja interacción que ocurre entre la planta de arroz y el hongo en los campos de cultivo, y especialmente cuando se trata de pronosticar la respuesta en los órganos productivos.

Mientras que algunos de los caracteres segregaron con una aproximación suficiente a una distribución normal (los valores directos, o con alguna transformación algebraica), en algunos otros hay una clara tendencia a que los fenotipos se acumulen en un extremo de la distribución, pese a que los parentales muestren, en algunos casos, valores intermedios; esto ha llegado al extremo en SmaxH e IP en el Palmar, e IP en Sueca, dónde hemos realizado el análisis como si las variables fueran de tipo discreto en lugar de continuas (por ejemplo: SmaxH inferior al 1%, frente a susceptibilidades mayores). Por último, no hubo segregación suficiente en la SmaxH en el Delta para realizar el análisis, de acuerdo esta vez con unos parentales que no mostraron síntomas apreciables en este parámetro.

Algunos caracteres mostraron segregación transgresiva, es decir, una frecuencia notable de líneas F3 que exceden claramente los valores de los parentales: en SixCNA, la incidencia; y en JSxGV, las AFAs por diversos aislados, el tamaño de mancha en Sueca, y las incidencias en las 3 localidades. Varios autores han encontrado también segregaciones transgresivas en la resistencia a *M. oryzae* (Marchetti y Bonman, 1989; El Hissewy *y col.*, 1997; Li *y col.*, 1998; Ali *y col.*, 2004; Noenplab *y col.*, 2006; Lestari *y col.*, 2011; Selvaraj *y col.*, 2011). Se trata de un fenómeno frecuente: Rieseberg *y col.* (1999) lo hallaron en el 44% de los caracteres y el 91% de los estudios con poblaciones segregantes, tanto en

plantas como en animales. Y se debe fundamentalmente a la existencia en cada parental de QTLs con efectos antagónicos, de modo que en ambos parentales hay alelos con efectos en la misma dirección; ello facilita la obtención de genotipos mejorados, pues en algunos individuos pueden combinarse los QTLs de una forma más favorable que en el parental con el valor más positivo (de Vicente y Tanksley 1993; Rieseberg *y col.*, 1999). Esto coincide plenamente con lo que hemos observado en nuestros estudios, pues los 4 parentales presentan alelos de los QTLs detectados con efectos opuestos: unos loci aumentan la resistencia y otros la susceptibilidad, en todos los parámetros considerados.

Limitaciones del diseño experimental

Un factor importante para un análisis de QTLs, aparte de disponer de datos fenotípicos y genotípicos fiables, es el tamaño de la población: cuanto mayor sea, más potentes y robustos serán los análisis estadísticos, pues influye en la significación y los límites de confianza de las estimas de los efectos y las posiciones de los QTLs. Pero, por otro lado, cultivar y evaluar las poblaciones segregantes, especialmente en campo y hasta la maduración, requiere un esfuerzo considerable, y una disponibilidad de espacio y recursos no siempre accesible. Por ello, el tamaño poblacional siempre es un compromiso entre lo teóricamente adecuado y lo realizable en la práctica. En nuestro caso, consideramos que no era viable trabajar con más de 200 líneas F3 en cada población a analizar, en particular al evaluar la población JSxGV en 4 localidades diferentes. En esta población, desafortunadamente, el número de líneas F3 se redujo finalmente a 154 por la intensidad de la enfermedad en las inoculaciones sobre los 200 individuos F2. Por otro lado, también en JSxGV, en los caracteres en los que la distribución no fue uniforme (severidad en hoja e incidencia en panícula en El Palmar, e incidencia en Sueca) los análisis de QTLs se pudieron llevar a cabo con sólo una parte de la población; ello provocó que los QTLs detectados en estos casos tuvieran, en general, una baja significación.

Lander y Botstein (1989) establecieron que generalmente, para asegurar que la tasa de falsos positivos no superase el 5%, se necesitaba un LOD entre 2 y 3 (lo que equivale aproximadamente a un LR entre 9 y 14); no obstante, en cualquier análisis de QTLs siempre aparecerán falsos positivos. Los umbrales que ha calculado el programa QTL Cartographer para una tasa de falsos positivos no superior al 5% en los caracteres estudiados en esta Tesis son algo mayores (LRs entre 15,2 y 17,7 con la excepción de SmaxH en Sueca, en que se requeriría un 23,1). Sólo unos pocos QTLs de JSxGV (dos de tamaño máximo de mancha y uno de incidencia en panícula en El Palmar) tuvieron LR mayores que los umbrales calculados. Esto se debe, con una alta probabilidad, al reducido tamaño muestral que hemos mencionado: como es de esperar, una disminución del tamaño de la población está linealmente relacionada con un descenso en el LOD de los QTLs detectados (Li *y col.*, 2006b). Aun así decidimos establecer, como criterio general para proponer la existencia de un QTL, que su LR fuese mayor que 8, conscientes de que algunos de los picos de probabilidad no reflejarían un QTL real. Creemos que tal falta de exigencia puede estar justificada en los siguientes casos: por una parte, cuando un pico con LR bajo (en ocasiones algo menores que 8) muestra alguna interacción significativa con otro QTL, considerándolo entonces un QTL epistático; y por otra, cuando coinciden en una misma región cromosómica picos de probabilidad para más de un aislado de los ensayos

de inoculación; pese a la poca robustez estadística de estos QTLs, la repetición de un mismo patrón corroboraría la presencia de un QTL en esa región (que podría aportar, además, una resistencia no del todo específica).

Por último, el diseño experimental se basó en la utilización de líneas F3 en lugar de F2, por los motivos expuestos en el apartado 5.1. Pero este tipo de población presenta un inconveniente a la hora de realizar el análisis de QTLs: en estos casos el genotipado se realiza con tejido de las F2, y se asume que el valor fenotípico medio de cada línea F3 representa el valor del individuo F2; pero a menudo no se tiene en cuenta que se reduce a la mitad la heterocigosis respecto a la F2, con lo que los promedios de las líneas F3 sí representan los valores aditivos de su correspondiente F2, pero no así los valores dominantes.

Importancia de la dominancia

La dominancia es un factor nada desdeñable en la genética de la resistencia a *M. oryzae*, ya que tanto en los parámetros que miden la susceptibilidad en hoja como en panícula y en las dos poblaciones, numerosos QTLs (en ocasiones la mitad) muestran dominancia, e incluso sobredominancia (Tablas 17 y 20). Hay que tener en cuenta que se trata de líneas F3, que todavía poseen un elevado grado de heterocigosis (teóricamente, un promedio del 25% de los loci) y, por tanto, el peso del efecto dominante aún puede ser importante. Aunque la existencia de dominancia no afecta a los intereses de un programa de mejora de líneas puras, ya que sólo los efectos aditivos van a ser mantenidos en futuras variedades, la existencia de una dominancia considerable sí puede afectar a la detección y las estimas del efecto y la significación del resto de QTLs que determinan un carácter.

Aproximadamente en la mitad de los casos, en ambas familias, los efectos dominantes de los QTLs aumentaron la resistencia, y en el resto la redujeron. Pero es interesante notar que, en JSxGV, la dominancia contribuye a aumentar la susceptibilidad en 4 de los 6 QTLs de tamaño de mancha, y en 2 de los 3 QTLs de incidencia más significativos. La combinación de QTLs en los que la dominancia reduzca la resistencia podría ser una de las causas por las que muchas variedades de arroz híbrido resulten susceptibles a la piriculariosis (Reddy *y col.*, 1998; Prabhu *y col.*, 2002; Ni *y col.*, 2015; Jiang *y col.*, 2012; 2015; Ni *y col.*, 2015; http://www.reuters.com /article/2015/04/12/china-rice-idUSL4N0X903620150412)

QTLs pleiotrópicos

Es destacable que, en ambas poblaciones, hay muchas co-localizaciones entre QTLs de diferentes caracteres, incluso entre los que miden la resistencia en hoja y en panícula. Aunque se describen los casos concretos más adelante, en resumen en la población SixCNA, 3 de los 7 QTLs de severidad coinciden con un QTL de incidencia (figura 28); y en JSxGV 6 de los 13, (figura 34), si consideramos las diferentes medidas de la susceptibilidad en hoja (severidad y tamaño de mancha). Ello está de acuerdo con la existencia de correlaciones significativas entre los dos grupos de parámetros, y corrobora que, en nuestros experimentos, hay relación entre la resistencia en hoja y en panícula.

En lo que respecta a las diferentes medidas de susceptibilidad en hoja, sólo 1 de los 6 QTLs de Mmax solapa con un QTL de Smax, coincidiendo con la nula correlación entre ambos caracteres, que indicaría que miden aspectos diferentes de la susceptibilidad. Por el contrario, 3 de los QTLs de Mmax coinciden claramente con QTLs de AFA, precisamente los detectados en la localidad de Sueca, donde se encuentra una correlación significativa entre ambos parámetros.

Ahora bien, estas regiones con QTLs solapados no tiene porqué corresponder necesariamente a QTLs pleiotrópicos, pues en ocasiones los QTLs tienen efectos aditivos de signo contrario, y porque es probable que se trate de agrupaciones de QTLs en regiones cromosómicas concretas, igual que ocurre con los genes de resistencia completa (Monosi *y col.*, 2004). Un ejemplo de ello son clusters de QTLs de resistencia a *M. oryzae* que Li *y col.* (2007b) encontraron en los cromosomas 8, 9 y 12, o la frecuente agrupación de genes candidatos y RGAs (Monosi *y col.* 2004; Vergne *y col.*, 2008), que se encuentran no sólo en arroz.

QTLs epistáticos

A pesar de las cada vez mayores evidencias de la importancia de las interacciones epistáticas en el control genético de diversos caracteres, raramente se encuentran indicaciones de cómo estas pueden afectar a la toma de decisiones a la hora de aplicar los resultados de un estudio de QTLs, pues de existir habría que considerar su magnitud y dirección para elegir qué alelos seleccionar. En el caso de la resistencia a *M. oryzae*, Talukder *y col.* (2004), Noenplab *y col.* (2006), y Li *y col.* (2008b) encuentran que las interacciones digénicas son un importante componente de su control genético, y que pueden contribuir a la inestabilidad observada en muchos QTLs.

Cuando decidimos investigar la existencia de tales interacciones en nuestros experimentos, lo hicimos teniendo en cuenta únicamente las interacciones aditivas, y entre QTLs de un mismo carácter dentro de una sola población. No podemos descartar la existencia de epistasia con otros loci (potenciales QTLs de efecto indetectable, o pleiotrópicos, o entre efectos dominantes,…) pero hubiera sido imposible analizar todas las combinaciones posibles entre dos loci mediante ANOVA factorial. Decidimos utilizar este método dado que el módulo de cálculo de interacciones de Windows QTL Cartographer mostró dificultades para el análisis en los caracteres con un reducido tamaño muestral. Somos conscientes de que la probabilidad de que algunas de las interacciones significativas pueden ser falsos positivos no es desdeñable; especialmente cuando, en algunos casos, se han aceptado significaciones bajas cuando el patrón de la interacción se repitió en más de una localidad. Pero precisamente la repetición de una misma respuesta, como veremos más adelante, hace que aumente nuestra confianza en que la mayor parte de las interacciones sean fenómenos reales. Nuestra conclusión es, pues, similar a la de los trabajos anteriormente citados: la epistasia es un importante factor a considerar en la genética de la resistencia, que Talukder *y col.* (2004) estimaron en un 24%, como media, de la variación observada en varios caracteres e inoculaciones.

Los Anexos II y III muestran todas las interacciones significativas encontradas. A continuación analizamos las respuestas más destacadas; en primer lugar, respecto a los

efectos genéticos, utilizando como ejemplo las interacciones entre QTLs de severidad en hoja en SixCNA: en muchas ocasiones, la combinación de alelos que consideraríamos favorables al observar los QTLs por separado no es la que aporta mayor resistencia al tener en cuenta la interacción. Así, por ejemplo, para limitar la severidad, hubiésemos seleccionado el alelo CNA en SH2.1 si solo atendiésemos a este QTL; pero al interaccionar con SH7.2 y SH11.1 observamos que el alelo Si es el que produce el genotipo más resistente cuando se combina con el alelo Si en los otros dos QTLs (Is.1 del Anexo II).

Por el contrario, otras interacciones confirman el alelo a seleccionar; sería el caso de las 2 interacciones significativas de SH11.1 en SixCNA (Is.6), pues el alelo Si en combinación con su homólogo en SH2.1 y SH2.2 confiere una resistencia notablemente mayor que cualquier otro genotipo. Pero casos como este hacen cuestionarse si el valor aditivo obtenido en ese QTL es real, o equivale a la suma del valor de las interacciones, de modo que el QTL sería, quizá, más epistático que individual.

De los casos en que se detectan interacciones significativas en un QTL cuyo principal efecto es la dominancia, podemos extraer dos conclusiones: por un lado, que pese a que no hubiésemos considerado ese QTL para obtener variedades resistentes, por ser básicamente heterótico, determinadas combinaciones de genotipos en este y los otros loci con los que interacciona pueden mejorar la respuesta de la planta. Así, por ejemplo, SH2.2 no se hubiese incluido en la selección, pues su principal efecto es una dominancia negativa; pero aprovechando sus 4 interacciones significativas podemos reducir la severidad considerablemente si elegimos el alelo Si en dicho locus, acompañado del alelo adecuado en los otros 4 loci (Is.2). Y por otro lado, que es posible que en tales QTLs la aditividad no sea tan despreciable como aparenta, sino que son las interacciones las que pueden anular los efectos aditivos al actuar en sentidos contrapuestos.

Respecto a los efectos relacionados con el ambiente, pueden servirnos de ejemplo las interacciones entre QTLs de incidencia en JSxGV:

La mayoría (14) de las interacciones encontradas fueron significativas en una o dos de las localidades en que se detectaron los QTLs, pero otras 2 sólo en una de ellas y una distinta, y 3 se identificaron en una localidad en la que no se expresaron los QTLs correspondientes; curiosamente, estas 5 interacciones se detectan en Sueca, pese a que ninguno de los QTLs implicados lo hizo en dicha localidad. Esto señala a una posible explicación para la falta de estabilidad de los QTLs en las diferentes localidades del ensayo, pues los QTLs epistáticos son más proclives a mostrar interacciones con el ambiente: de variar la magnitud o dirección de las interacciones en los diferentes ambientes, las estimas de los valores de cada QTL por separado se verán afectadas.

En 6 de las 8 interacción que fueron significativas en dos localidades, el patrón de la interacción es el mismo en los dos ambientes (Ij.13, Ij.15, Ij,23, Ij.24 e Ij.40, Anexo III), o igual para uno de los QTLs que interacciona, pero no para el otro (Ij.11 e Ij.12). Pero, además, en los dos casos en que la interacción es diferente según el ambiente (Ij.30 e Ij.39), uno de los alelos muestra el mismo comportamiento en ambas localidades. Estas coincidencias sugieren que las interacciones epistáticas encontradas en esta Tesis no siempre, al menos, son apariciones espurias.

Estabilidad de los QTLs en varios ambientes

En el ensayo de JSxGV realizado en varias localidades, sólo 7 QTLs se han detectado en más de una, y sólo dos se hallaron en las tres localidades (Tabla 20). Esta inconsistencia coincide con la escasa correlación observada en los tres ensayos (Tabla 19), y señala la poca similitud entre localidades, incluso entre las dos localidades de Valencia, ya que hay más QTLs hallados tanto en El Palmar como en el Delta, que en El Palmar y en Sueca; y ningún QTL de MM se detectó en las dos localidades de la Albufera.

Sin embargo, hay otras causas que pueden explicar la falta de estabilidad de los QTLs: una de ellas es la posible diferencia en el estado fenológico de las plantas en el momento en que se dio el pico de infección en cada campo de ensayo, de modo que líneas con los mismos QTLs no los hayan expresado de igual modo. También podría deberse a que la generación F3 aún segregaba para los caracteres analizados y que existiera una variación sensible entre las líneas de las diferentes parcelas. Por último, que los efectos de un mismo QTL fuesen de diferente magnitud en cada localidad, de modo que en algunas no se alcanzase la significación suficiente para ser detectado; así, por ejemplo, en varios loci en los que se ha detectado un QTL de incidencia en El Palmar por el estudio de asociación de marcadores, se han observado diferencias similares en la proporción de alelos en Sueca, aunque no resultaron estadísticamente significativas. Esta causa es especialmente probable, dadas las circunstancias que se han descrito anteriormente: los efectos generalmente pequeños de los QTLs, las limitaciones del análisis (tamaño muestral y distribuciones no normales), y también el importante peso de las interacciones epistáticas.

Coincidencia de QTLs en las poblaciones estudiadas, y con estudios previos. ¿Representan estos QTLs resistencia parcial?

La Figura 36 muestra que en muchas regiones se han detectado QTLs tanto en SixCNA como en JSxGV; pero también coincidencias con QTLs de estudios previos, con genes candidatos, y con genes *Pi*. Aunque las regiones más destacadas se describen con detalle en el siguiente apartado, es interesante hacer una revisión global de estas co-localizaciones.

Por una parte, se observa que nueve de los catorce QTLs de INC y cinco de los ocho QTLs de SH en SIxCNA solapan con QTLs en JSxGV (principalmente de AFA y PAN). Mientras que hay cinco regiones cromosómicas en las que se han detectado QTLs de incidencia en panícula en ambas poblaciones, en ningún caso ocurre esto con los QTLs de la medida directa de la severidad de hoja (aunque en algún caso sí coinciden QTLs de SH de SixCNA con los de tamaño de mancha o AFA de JSxGV). Esto puede deberse, en gran medida, a que la severidad en hoja se evaluó de forma distinta en ambas poblaciones; pero también a las dificultades para el análisis de QTLs de la SH en JSxGV causadas por la escasa variación observada para este carácter.

A pesar de las diferencias en el germoplasma utilizado y en las condiciones ambientales, los QTLs que hemos hallado suelen coincidir espacialmente con metaQTLs de estudios previos Ballini *y col*. (2008 y 2009). Dado que estos se han realizado, principalmente, con variedades de la subespecie *indica*, mientras que en esta Tesis se ha

utilizado una amplia base de germoplasma *japonica*, el solapamiento de regiones cromosómicas implicadas en la resistencia al hongo apunta a que estas regiones están conservadas en el genoma del arroz, incluso entre ambas subespecies. Es más, Chen *y col*. (2003) encontraron cuatro QTLs de resistencia a *M. oryzae* en posiciones correspondientes de los genomas de arroz y cebada. El alto grado de conservación puede explicarse por la naturaleza de la resistencia parcial, e indicaría que efectivamente los QTLs detectados reflejan este tipo de resistencia, pues se ha observado que la expresión constitutiva de genes de defensa es responsable de gran parte de la resistencia parcial en el sistema arroz – *M. oryzae* (Vergne *y col*., 2010). Al regular mecanismos de defensa comunes, es de esperar que estos loci estén más conservados en el genoma del arroz que los mecanismos más específicos de resistencia completa.

Abundando en la posibilidad de que estemos ante resistencia parcial, a la que generalmente se supone un control poligénico y efectos inespecíficos, observamos que en ninguno de los caracteres analizados en campo se han detectado QTLs con efectos mayores, pues tanto la variación fenotípica explicada (R^2) como los efectos genéticos son pequeños: sólo PAN6.2P en JSxGV alcanza un R^2 del 20%. Sin embargo, no siempre se puede afirmar con seguridad que la ausencia de efectos mayores responda a la ausencia de genes de resistencia completa, puesto que las reacciones compatibles y específicas propias de los genes R pueden quedar diluidas ante la mezcla de patotipos a los que está expuesta la población en condiciones naturales. En ese sentido es interesante notar que, a menudo, los QTLs de resistencia a *M. oryzae* se localizan en regiones en las que se han cartografiado genes de resistencia completa (genes *Pi*), como puede observarse en la Figura 36. Sin embargo, esto también se puede interpretar como lo hacen Li *y col.* (1999) o Talukder *y col.* (2004): al menos algunos de los QTLs detectados sí proporcionarían resistencia parcial, pero en realidad se trataría de alelos de genes *Pi* que han dejado de ser eficaces para provocar la respuesta hipersensible, debido a cambios en la virulencia del hongo, pero que conservan cierta efectividad residual ("genes derrotados"). Estos segundos autores encuentran también que la mayoría de los QTLs de su estudio retienen cierta especificidad. Por otra parte, se puede esperar que los QTLs que co-localizan con genes de defensa candidatos sí aporten resistencia parcial, puesto que este grupo de genes regulan mecanismos de defensa, a menudo basal, y en general inespecíficos.

La situación es distinta en el caso de los QTLs detectados tras la inoculación con aislados concretos, pues el porcentaje de variación fenotípica explicada por los QTLs de AFA suele ser mayor, llegando al 51% en AFA9.2 (este QTL tiene R^2 superiores al 23% para tres aislados). Hay otros QTLs con elevados R^2, y que generalmente muestran efectos significativos para varios aislados (Anexo V). En varios de estos loci el alelo de GV es el que incrementa la resistencia, y es interesante notar que GV fue totalmente resistente a la inoculación por 4 de los 6 aislados ensayados. Podría argumentarse que estos QTLs de efectos tan significativos corresponden a la presencia de un gen de resistencia completa en esa localización; pero ello se contradice con la resistencia mostrada por los QTLs que es, si no de amplio espectro, al menos poco específica, frente a aislados pertenecientes a diferentes linajes; sin duda sería interesante caracterizar la variedad Gigante Vercelli para ver si es portadora de algún gen *Pi*.

Implicaciones para la Mejora de la resistencia a *Magnaporthe oryzae*

Este trabajo, al igual que muchos anteriores, ha demostrado la dificultad de la evaluación y del estudio genético de la resistencia a *M. oryzae*. El objetivo de identificar QTLs a introgresar en un programa de mejora de la resistencia se ve gravemente obstaculizado por la naturaleza compleja del carácter: se identifican numerosos QTLs de efecto pequeño (en concordancia con los estudios previos), y con abundantes interacciones, tanto intragénicas (dominancia) como intergénicas (epistasia); además presentan efectos pleiotrópicos que no siempre repercuten en la misma dirección, así como una falta de estabilidad en diferentes ambientes.

Sin embargo, algunas regiones cromosómicas concretas muestran efectos consistentes en varios ambientes, y/o sobre varios componentes de la resistencia, por lo que son candidatas interesantes a ser introgresadas para la obtención de variedades resistentes a *M. oryzae*. Y, de hecho, en un trabajo que no se presenta en esta tesis, se realizó selección genotípica con los QTLs identificados en la población JSxGV, y se obtuvieron líneas F4 con una respuesta positiva a la selección. Ello indica que la combinación en un mismo genotipo de diversos factores que ayudan a controlar el hongo, aunque su efecto individual sea poco significativo, puede ser eficaz.

5.3.4. Regiones cromosómicas importantes para la resistencia a *Magnaporthe oryzae*

Cromosoma 1, intervalo 1: RM3148 – RM259

En la región distal del brazo corto del cromosoma 1 se han detectado 4 QTLs en la población JSxGV, que influyen tanto sobre la incidencia, como sobre varios parámetros de la susceptibilidad en hoja. Dos son QTLs robustos, explicando el 13% de la variación en el caso del de MM, y 3 de ellos actúan en la misma dirección (el alelo de JS es el que aporta resistencia), aunque AFA1.1 es básicamente dominante para uno de los dos aislados en que se detecta; el efecto aditivo de signo opuesto de SH1.1P puede ser debido a su interacción epistática (Ij.1,Anexo III), pues según la combinación de genotipos con el otro QTL, el alelo de JS también puede aportar resistencia. No se encuentra ningún QTL en esta región en la población SixCNA.

En el mismo intervalo se encuentran varios metaQTLs (Ballini *y col.* (2008): q1F1(P) y q1F2(P), que agrupan QTLs de resistencia parcial detectados en campo (de ahí la F, por “Field”), y q1G1, q1G2, q1G3, q1G4, que agrupan QTLs identificados en invernadero (G, por “Greenhouse”); y también se encuentran en esa región los genes *Pit*, *Pi24* y *Pi27(t)* (de los dos últimos existen genes homónimos en otros cromosomas). Al menos AFA1.1 (que se detecta para 2 de 6 aislados) no parece corresponder a q1G1 y q1G2, que confieren resistencia de amplio espectro (Ballini *y col.*, 2009), al igual que *Pit.* Aunque los ensayos con VDs han probado que la población del patógeno presente en la zona de Valencia contiene linajes compatibles con *Pit*, una versión atenuada de este gen podría ser un candidato para los QTLs identificados.

En conjunto, esta región tiene loci con efectos importantes que confieren resistencia en panícula y en hoja, tanto en ensayos en invernadero como en campo, y que puede ser interesante introgresar en un programa de obtención de variedades de resistencia a *M. oryzae*.

En la proximidad se localizan otros 2 QTLs, pero de baja significación y que podrían ser distintos del grupo anterior (LES1.1 y PAN1.2P).

Cromosoma 1, intervalo 2: RM294B – RM246

Entre RM294B y RM246 se encuentran INC1.2 en SixCNA y AFA1.2 en JSxGV; en ambos, el alelo que mejora la resistencia es el de las variedades locales, aunque AFA1.2 tiene un efecto dominante muy elevado; además, muestra resistencia a un solo aislado. Estos QTLs solapan con los metaQTLs q1F3(P) y q1G9(P), y con el gen de resistencia completa *Pitp*. Aunque los efectos no son tan consistentes ni robustos como en la región anterior, el hecho de que se manifieste en las dos poblaciones sugiere que puede ser una zona de interés.

Cromosoma 1, intervalo 3: RM315 – RM476

En el extremo del brazo largo de este cromosoma se ha hallado dos QTLs en JSxGV: PAN1.3S y AFA1.4, interesante este último por aportar resistencia frente a 3 aislados (además de para la media y otro aislado, aunque en este con muy baja significación); y siempre con efectos similares: GV aumenta la resistencia. Aunque en el QTL de incidencia el efecto aditivo es poco significativo, se puede aprovechar, al menos en este fondo genético, la interacción entre PAN1.3S y PAN1.1P, que en la combinación adecuada permite el control de la incidencia con el alelo GV en PAN1.3S.

Hay varios datos que avalan el interés de esta zona: co-localiza con el metaQTL q1G11, y con qBDR1, un QTL de resistencia a *M. oryzae* hallado precisamente en ensayos por inoculación con Gigante Vercelli (Urso *y col.*, 2015), y con un espectro de resistencia amplio, coincidiendo así con AFA1.4. También se encuentran en esta región los genes *Pi35*, *Pish* y *Pi37*; los dos primeros son alélicos: *Pi35* se identificó como un QTL en la variedad Hokkai 188 en 1961 y su resistencia parcial y de amplio espectro ha sido duradera hasta la actualidad (Nguyen *y col.*, 2006) y *Pish* es un alelo con resistencia completa, pero de espectro reducido (Fukuoka *y col.*, 2014). Podemos descartar que estemos ante *Pish*, pues este no confirió resistencia a las VDs que lo contenían frente a los linajes de *M. oryzae* presentes en la Albufera de Valencia. Finalmente, *Pi37* se expresa constitutivamente y se induce ligeramente por la infección por *M. oryzae* (Lin *y col.*, 2007). En la misma zona se encuentran dos genes candidatos: WRKY13 y GH3-8, que también co-localizan con QTLs de resistencia a piriculariosis detectados por distintos grupos de investigación (Wang *y col.*, 1994; Chen *y col.*, 2003; Hu *y col.*, 2008): WRKY13 regula la respuesta de las rutas de transducción mediadas por SA y JA (Ácidos salicílico y jasmónico; Qiu *y col.*, 2007; 2008; 2009) y su expresión es inducida en interacciones incompatibles entre la planta de arroz y *M. oryzae* o *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Wen *y col.*, 2003); mientras que GH3-2 regula

mecanismos de defensa basal: reduce la producción de expansinas, proteínas que debilitan la pared celular, mediado por IAA (Ácido indol-acético, Fu *y col.*, 2011).

Cromosoma 2, intervalo 1: RM109 – RM423

La región en el extremo del brazo corto del cromosoma 2, entre RM109 y RM423, podría ser interesante porque en ambas poblaciones se ha hallado un QTL de incidencia en panícula (INC2.1 y PAN2.1S); ambos solapan, además, con un QTL de AFA. Aunque en ambos QTLs el alelo que reduce la incidencia es el de la variedad local (Si y JS), es difícil afirmar si se trata del mismo QTL; por otra parte, en AFA2.1 sólo se detecta, para los dos aislados en que se manifiesta, efecto dominante. Tampoco es favorable que PAN2.1S presente 4 interacciones epistáticas significativas (Ij.13, 14, 15 y 16), aunque se da la circunstancia de que en todas ellas una determinada combinación del alelo GV reduce considerablemente la incidencia. Los tres QTLs solapan con los metaQTLs q2G1 y q2G2 y con los genes *Pi14(t)* y *Pi16(t*).

Cromosoma 2, intervalo 2: RM 341– RM 530

Esta es, sin duda, una región cromosómica interesante, con QTLs identificados en ambas familias, metaQTLs y genes candidatos. Pero es una región amplia, y probablemente estemos ante varios QTLs próximos entre sí. Por una parte, entre RM341 y RM263 coinciden en SIxCNA un QTL robusto de severidad de hoja (SH2.2) y un QTL de incidencia en panícula (INC2.2), mientras que en JSxGV se encuentra otro QTL de incidencia (PAN2.2P) y uno de AFA (AFA2.2; detectado para dos aislados, aunque con efectos genéticos diferentes en cada uno de ellos). Los efectos aditivos de estos QTLs no son del todo consistentes, pero lo que sí se repite es una notable dominancia. Esto, unido a las frecuentes interacciones epistáticas identificadas en esta región (4, 3 y 2 en los tres primeros QTLs, respectivamente), haría difícil tomar decisiones sobre los fragmentos a introgresar para mejorar la resistencia. Aunque sería recomendable intentar mejorar la cobertura de marcadores en esta zona y con ello la localización de los QTLs, pues en la región se localizan 3 genes candidatos de interés: un cluster de tres GLP (germin like proteins), la proteína-A 14-3-3 y una quitinasa. Las GLP se suponen implicadas en el proceso de producción de H_2O_2, aunque a diferencia de las germinas de cereales carecen de actividad oxalato-oxidasa, y se han asociado con resistencia a patógenos en arroz, entre ellos a *M. oryzae* (Manosalva *y col.*, 2009; Breen y Bellgard, 2010); en algunos estudios han co-localizado con QTLs de resistencia a este hongo. Las proteínas 14-3-3 son transductores de señales que están involucradas en la respuesta a estreses (Sehnke *y col.* 2002), y las quitinasas hidrolizan la quitina de hongos e insectos y se ha observado que aumenta la resistencia a *M. oryzae* (Nishizawa *y col.,* 1999). Todos estos genes candidatos se han visto relacionados con QTL de resistencia a este hongo (Kou *y col.*, 2010, Liu *y col.*, 2004a). Además, este intervalo es de las pocas regiones en las que co-localizan QTLs de severidad en hoja y de incidencia en panícula, lo que lo hace interesante para programas de mejora.

Por otra parte, el QTL AFA2.3, situado entre RM263 y RM530, también solapa con SH2.2 de SixCNA, aunque aparentemente es un QTL distinto a los anteriores. La

importancia de AFA2.3 radica en que reduce el área foliar afectada media y máxima, considerando la media de los 6 aislados ensayados; así, aunque no tiene un efecto específico significativo, podría aportar algún factor limitante de amplio espectro. Además, en esta zona coinciden varios genes R (*Pib, Pig(t), Pi25(t), Pitq5, Piy1(t) y Piy2(t)*) y metaQTLs: entre los genes de resistencia completa, *Pib* es de interés pues se supone que confiere resistencia frente a todos los aislados de *M. oryzae* presentes en Europa, aunque en el ensayo con VDs resultó ineficaz el año en que hubo el mayor ataque del hongo. Los metaQTLs son q2G4, q2G5(P) y q2G6(P), de resistencia en invernadero (los dos últimos de resistencia parcial), y q2F2 y q2F3 de resistencia en campo (el primero robusto por agrupar QTLs de cuatro ensayos); aunque es posible que estos últimos estén más relacionados con un QTL de incidencia en JSxGV, PAN2.3D, que aparece al final del intervalo; en SixCNA no encontramos marcadores en esta parte distal.

Cromosoma 3, intervalo 1: RM 569 – RM 517

En este intervalo coinciden un QTL en SixCNA (SH3.1) y dos en JSxGV (PAN3.1P y AFA3.1). Aunque no es evidente que los QTLs de las dos poblaciones correspondan al mismo factor, tienen en común que tanto SH3.1 como PAN3.1P son QTLs robustos (mientras que AFA3.1 muestra efectos menos significativos, pero similares, para dos aislados, y la media de los seis), y que SH3.1 y AFA3.1 muestran una importante sobredominancia. Por otra parte, los efectos aditivos de los dos QTLs en JSxGV son antagónicos, aunque la aditividad es poco relevante en AFA3.1. Las interacciones epistáticas son poco importantes en esta región: sólo una entre QTLs de severidad, o de incidencia.

Estos QTLs solapan con metaQTLs de invernadero, y de resistencia parcial en campo (q3G2, q3G3, q3F1(P) y q3F2(P)), así como una protein-quinasa; este grupo de proteínas juegan un papel importante en los procesos de transducción de señales como respuesta al ataque de un patógeno (Mishra *y col.*, 2006).

Cromosoma 3, intervalo 2: RM 251 – RM 473C

En las proximidades del centrómero del cromosoma 3 coinciden dos QTL en JSxGV: AFA3.2 y PAN3.2P. El QTL de AFA es uno de los más destacados para aumentar la resistencia a la piriculariosis debido a su amplio espectro de resistencia, pues es robusto y aporta resistencia frente a 5 de los 6 aislados ensayados. Además, coincide con un QTL de incidencia en panícula que, aunque de menor significación, explica un 17% de la variación observada en El Palmar. Ambos QTLs tienen efectos similares: es el alelo de JS el que aumenta la resistencia; en el de AFA es así frente a casi todos los aislados (para uno de ellos la aditividad es despreciable, al igual que al considerar el AFA media); aunque también en ambos QTLs los efectos dominantes son mayores que los aditivos, y son negativos. El interés en este intervalo viene avalado por coincidir con 4 metaQTLs (q3G5, q3G6, q3G7(P) y q3G8), el primero de los cuales es bastante robusto, ya que agrupa a QTLs de cuatro ensayos diferentes.

Cromosoma 4, intervalo 1: RM 335 – RM 16584

En el estrecho intervalo que constituye el brazo corto del cromosoma 4 se localizan otros tanto QTLs: uno de severidad en SixCNA y otros de tamaño de mancha, de incidencia y de AFA en JSxGV; además, en diferentes localidades: el de incidencia en El Palmar y el Delta (PAN4.1P+D) y el de mancha en Sueca (MM4.1S). En el primer cruzamiento, el alelo a seleccionar sería el de Sivert (mejora la resistencia en SH4.1). En el segundo, el alelo de GV es el que aporta la resistencia en AFA4.1, MM4.1S y PAN4.1P+D en el Delta; pero en El Palmar tiene el efecto opuesto; en este fondo genético, además, los QTLs muestran dominancia positiva, aunque de diversas magnitudes. Los QTLs de severidad e incidencia son, además, epistáticos.

La presencia de QTLs de resistencia frente a inoculaciones, y en campo, tanto en hoja como en panícula, hacen que este intervalo sea de gran interés para la mejora de la resistencia a este carácter. Lo corroboran dos metaQTLs que co-localizan, uno de campo (q4F1) y otro de resistencia parcial en invernadero, q4G1(P), que confiere resistencia de amplio espectro. También se localiza en esta región el gen *Pi(t)*, que es diferente del gen *Pit* incluido en el estudio de las VDs.

Cromosoma 5, intervalos 1 y 2: RM122– RM574 y RM430 – RM161

En el cromosoma 5 encontramos dos zonas muy similares: en ambas coinciden, en JSxGV, un QTL de AFA que se detecta para un único aislado, y un QTL de tamaño máximo de mancha. En ambas regiones es el alelo de GV el que aumenta la resistencia al hongo, si bien este efecto aditivo es de poco peso comparado con la dominancia, que es negativa en el caso de AFA, y positiva en el de MM. La única diferencia entre las dos regiones es que AFA5.1 se detecta para el aislado CD49 (tanto en AFAmed como en AFAmax), y AFA5.2 para el aislado FR94 (en AFAmax). Tantas coincidencias hacen dudar si estos QTLs no estarán reflejando, en realidad, a otro/otros en la región intermedia para la que no se han encontrado marcadores en esta población. De hecho, los QTLs del primer intervalo presentan su máximo de probabilidad sobre el marcador RM574, en el extremo del intervalo, apuntando al siguiente intervalo o la zona entre ambos (ver figura 36). Entre esta región intermedia y el segundo intervalo se encuentra el metaQTL de resistencia parcial q5G5(P), que es robusto por agrupar a QTLs de 4 diferentes ensayos de inoculación; y también los genes *Pi23* y *Pi10*.

Cromosoma 6, intervalo 1: RM 539 – RM 564

De nuevo, en el cromosoma 6 sólo detectamos QTLs de resistencia en el cruzamiento JSxGV. En el primer intervalo destacado se hallan PAN6.1S+P+D, AFA6.1 y MM6.1S. PAN6.1S+P+D es un QTL robusto, que se detecta en las tres localidades del ensayo, aunque su efecto varía según localidad: en Sueca y El Palmar es el alelo de GV el que aumenta la resistencia, mientras que en el Delta es JS quien, como en AFA6.1 y MM6.1S, aporta la resistencia. AFA6.1 es un QTL muy interesante, pues confiere resistencia a los 6 aislados ensayados, y siempre con efectos similares entre sí y con MM6.1: la aditividad es negativa (excepto en FR13, dónde es nula), y con una dominancia

positiva de la misma magnitud, o superior. Esta es una zona que podía ser de interés en un programa de obtención de variedades resistentes a *M. oryzae*, por el amplio espectro de resistencia de AFA6.1, que se acompaña con una reducción del tamaño de las manchas; pero habría que confirmar su repercusión sobre la incidencia de la enfermedad en la panícula.

Este intervalo coincide con varios metaQTLs identificados a partir de ensayos por inoculación, dos de ellos de resistencia parcial: q6G5(P) y q6G6(P). Entre los genes candidatos en esta región encontramos los de resistencia completa *Piz-t, Piz-5, Pi25(t), Pi40(t)* y *Pid2*, los dos primeros, presentes en las VDs ensayadas, siendo susceptibles las líneas que contenían *Piz-5*, y sin datos suficientes en el caso de *Piz-t*, por ser tardía la VD que lo porta; y también se encuentra una taumatina, proteína que se ha asociado a QTLs de resistencia a piriculariosis en arroz (Ramalingam *y col.*, 2003). Las taumatinas son proteínas PR (de la clase PR-5), que al ser sobreexpresadas en arroz lo hacen más resistentes frente a *M. oryzae* que sus correspondientes tipos naturales (Hiroyuki y Terauchi, 2008). La actividad antifúngica que muestran este grupo de moléculas es efectiva contra un amplio espectro de hongos (Vigers *y col.*, 1992), y se ha propuesto que podría deberse a que permeabilizan la membrana celular del hongo (Roberts y Selitrennikoff, 1990).

Cromosoma 6, intervalo 2: RM 342B – RM 162

Más cerca del centrómero, encontramos un QTL de incidencia y otro de severidad solapados; pero mientras que en PAN6.2P el alelo de GV ayudaría a controlar la enfermedad, en el caso de SH6.1SP este alelo provocaría una mayor susceptibilidad, en las dos localidades en que resultó significativo. Este es un intervalo bastante amplio con pocos marcadores, por lo que es posible que un mejor cartografiado de la zona indicara que en realidad ambos QTLs son contiguos. Para ambos QTLs, sin embargo, la dominancia positiva es considerable y, además, ambos tienen un elevado número de interacciones significativas. En el mismo intervalo se encuentran dos metaQTLs de resistencia parcial en invernadero, q8G6(P) y q8G8(P); el último es un metaQTL robusto, pues agrupa QTLs de 5 diferentes ensayos. Por otro lado, también se han localizado en esta zona un cluster de genes de protein-quinasas (importantes en las rutas de señalización) y otro de genes de peroxidasas; estas últimas participan en la defensa de la planta catalizando reacciones que producen especies reactivas de oxígeno, que dañan a los patógenos (Lamb y Dixon, 1997).

Cromosoma 7, intervalo 1: RM 481 – RM 542

En el brazo corto y la región centromérica del cromosoma 7 solo se han encontrado polimorfismos en SixCNA; y se detectan un QTL de incidencia (INC7.1) y uno de severidad (SH7.1), que parecen corresponder a regiones genómicas diferentes pese a presentar efectos aditivos similares (el alelo de Si aumenta la susceptibilidad). Es posible que este intervalo sea interesante, pues en él coinciden varios metaQTLs de inoculaciones (uno de ellos, q7G3(P), de resistencia parcial, y otro, q7G2, robusto, pues agrupa QTLs de 4 estudios independientes); y un gen candidato que codifica para una taumatina; pero la falta de polimorfismo en el cruzamiento JSxGV podría indicar que esta región esté

conservada en las variedades *japonica*, de modo que no añadiría variación ni, por tanto, resistencia.

Cromosoma 7, intervalo 2: RM 2 – RM 505

En esta región co-localizan dos QTLs de incidencia (uno en cada población) con otros dos en JSxGV: un de severidad de hoja, y uno de AFA (para un único aislado). Los dos QTLs de JSxGV en campo se han expresado sólo en El Palmar. En todos ellos es el alelo de la variedad cultivada (Si o JS) el que aumenta la resistencia, aunque la dominancia también puede ser importante, y de distinto signo según el cruzamiento. Los QTLs de incidencia de ambas poblaciones presentan un elevado número de interacciones (4 y 5, respectivamente); y se da la circunstancia de que ambos lo hacen con otros sendos QTLs de incidencia localizados en el cromosoma 8, intervalo 1 (Is.14 e Ij.39); esta interacción debe ser importante, al repetirse en ambas poblaciones.

No es de extrañar haber identificado QTLs en esta zona, pues aquí se encuentran cuatro metaQTLs (dos en campo -q7F1(P) y q7F2- y dos en invernadero -q7G3(P) y q7G4(P)-, que, excepto q7F2, son de resistencia parcial), y varios genes candidatos: OsDR8, el gen de resistencia parcial *Pi17(t),* y genes de quitinasas y dehidrina. OsDR8 está implicado en la resistencia a enfermedades al controlar, supuestamente, la síntesis de tiamina, un co-factor para la acumulación de proteínas relacionadas con la defensa (Wang *y col.*, 2006); y en varios estudios ha co-localizado con QTLs de resistencia a *M. oryzae* (Wang *y col.*, 1994; Wen *y col.*, 2003). Las dehidrinas están relacionadas con la respuesta a diversos estreses bióticos y abióticos (Yang *y col.*, 2012), y también concretamente en la resistencia a *M. oryzae* (Liu *y col.*, 2004a).

Cromosoma 7, intervalo 3: RM 505 – RM 342D

Un poco más alejado del centrómero que el intervalo anterior, un QTL de incidencia en SixCNA (INC7.3) solapa con uno de AFA en JSxGV; AFA7.2 es un QTL interesante, pues interviene en la resistencia a 3 de los aislados ensayados de forma significativa, pero también se detecta con baja probabilidad para los otros 3. Aunque los efectos genéticos sobre los aislados son variables en magnitud y dirección, al analizar el promedio de las respuestas (AFAmed) se observa que el alelo de GV aporta resistencia. El inconveniente de esta región es que ambos QTLs presentan dominancia, y que, al menos INC 7.3, es un QTL epistático.

En este intervalo se agrupan una gran cantidad de metaQTLs, varios de los cuales son de resistencia parcial; entre ellos destacan q7G5 por conferir resistencia de amplio espectro, y q7G10 por ser robusto, ya que se ha hallado en 4 ensayos diferentes. Además, en este intervalo se localizan dos genes candidatos interesantes: GH3-8 que, al igual que GH3-2, inactiva al IAA, evitando así el debilitamiento de la pared celular (Ding *y col.*, 2008); y el gen que codifica para la peroxidasa POX22.3, que co-localiza con un QTL de número de lesiones (Ramalingam *y col.*, 2003).

Cromosoma 8, intervalo 1: RM 506 – RM 38

Varias zonas del cromosoma 8 aparecen con frecuencia en los estudios de QTLs de resistencia a *M. oryzae*; también ocurre en este estudio, donde encontramos dos regiones implicadas en el control genético de varios caracteres relacionados con la resistencia. En la primera, un estrecho intervalo en el extremo del brazo corto, encontramos 3 QTLs de incidencia (uno en SixCNA, y dos en JSxGV, uno de los cuales se detecta en las tres localidades, PAN8.2S+P+D); y otros 2 QTLs en JSxGV: uno de severidad y otro de AFA, que afecta a dos aislados. Aunque ninguno de los QTLs es muy robusto, los efectos son coincidentes con la excepción de PAN8.1S de JSxGV, que podría ser un QTL diferente (situado en el extremo del intervalo); en el resto, el efecto aditivo del alelo de JS disminuye la susceptibilidad o es nulo, y si hay dominancia, es negativa. Es probable que INC8.1 de SixCNA coincida con PAN8.2S+P+D de JSxGV (y los de severidad y AFA), pues ambos presentan una interacción significativa, anteriormente mencionada, con la misma región del cromosoma 7 (en el intervalo 2), y presentan dominancia negativa. Este es otro intervalo interesante por la agrupación de QTLs que controlan la resistencia a *M. oryzae* en inoculaciones en invernadero, y en campo, tanto en hoja como en panícula, y por expresarse PAN8.2S+P+D en todos los ambientes ensayados. También se encuentra en esta región el metaQTL de resistencia parcial y de amplio espectro q8G2(P), además de los genes *Pi33* (también de amplio espectro, incluidos numerosos aislados europeos) y *Pi36*; así como un cluster de 12 genes GLP. Manosalva *y col.* (2009) observaron que cuantas más copias dentro de este cluster se silencian, mayor es la susceptibilidad de las plantas frente a *M. oryzae*.

Cromosoma 8, intervalo 2: RM 310 – RM 342A

Más próximos al centrómero, pero también en un intervalo corto, y sólo en JSxGV en este caso, co-localizan QTLs de incidencia (en dos localidades), severidad y AFA (aunque frente a un único aislado), y con efectos similares: el alelo de GV aumenta la resistencia, y la dominancia es positiva. Los tres son robustos, y de hecho PAN8.3S+P es uno de los QTLs de efecto destacado en este estudio, con un LR de 26,2, y explicando el 16% de la variación de la incidencia de la enfermedad en El Palmar. Sin embargo, es interesante notar que el efecto de AFA8.2 es diferente cuando se analiza la respuesta promedio de los 6 aislados ensayados, pues la aditividad es de signo contrario, y no se detecta dominancia; es posible, pues, que haya dos QTLs contiguos, uno de ellos de resistencia significativa pero restringida, y que coincidiría con PAN8.3S+P y SH8.2P, y otro de baja significación, pero con un espectro de resistencia más amplio.

En este intervalo se agrupan los metaQTLs q8G4, q8G5, q8G6, así como los genes de resistencia *Pizh, Pi29(t) y PiGD-1(t)* y un gen de oxalato oxidasa. Las oxalato oxidasas, involucradas en los procesos oxidativos, han sido relacionados con QTLs de resistencia a *M. oryzae* en arroz (Carrillo *y col.*, 2009). Pero en esta región, además, se localiza un QTL de gran efecto sobre la fecha de maduración (datos no mostrados), por lo que habría que considerar la introgresión de esta región con precaución.

Cromosoma 9, intervalo 1: RM 23973 – RM 14B

En la región centromérica del cromosoma 9 se han hallado INC9.1 en SixCNA y AFA9.2 en JSxGV. AFA9.2 es un QTL robusto que afecta, de manera similar, a la resistencia frente a 2 aislados, en los que explica una gran proporción de variación fenotípica (51% de FR95med, y 25% de FR13max): el alelo de GV es el que aporta resistencia, junto con cierta dominancia negativa. En INC9.1 la dominancia, positiva, es el efecto más importante, aunque el alelo de Si también contribuye ligeramente a la resistencia. Con estos QTLs coinciden los 3 metaQTLs, destacando q9G1(P) por identificarse para resistencia parcial de amplio espectro; y los genes *Pi3, Pi5*, *y Pi15*. Los dos primeros, con amplio espectro de resistencia, están presentes en el ensayo con VDs: el alelo de resistencia completa de *Pi3* no aportó resistencia frente a la población del patógeno presente en la Albufera; y la línea que contiene *Pi5* es tardía, por lo que no se pueden extraer conclusiones respecto a su respuesta en la fase productiva, si bien la severidad en hoja fue moderada en los cuatro años de ensayo.

Cromosoma 9, intervalo 2: RM 409

El marcador RM409 teóricamente se encuentra en el brazo largo del cromosoma 9, pero no aparece ligado a otros marcadores, y sólo ha sido polimórfico en JSxGV, por lo cual no podemos precisar su posición. Su interés radica en que el alelo de GV ha resultado asociado con un aumento de la resistencia, tanto en panícula en la localidad de Sueca, como frente al aislado TH12; por ello hemos declarado sendos QTLs asociados a este marcador, que solaparían, de ser correcta la posición, con el metaQTL q9G3 (que agrupa QTLs detectados en dos ensayos en invernadero).

Cromosoma 9, intervalo 3: RM 242 – RM 215

En este intervalo, que se sitúa el extremo del brazo largo del cromosoma 9, coinciden tres QTLs en la población JSxGV: SH9.1P, AFA9.4 y PAN9.2P+D. En los QTLs de campo es el alelo de JS el que incrementa la resistencia (también en las dos localidades en el caso del QTL de incidencia); mientras que el QTL de AFA se caracteriza por su efecto exclusivamente dominante, y sobre un solo aislado; la dominancia también es importante en los otros QTLs, aunque con signo variable según localidades. Esta región debe ser de gran importancia en el control de la resistencia a *M. oryzae*, pues en ella se localizan numerosos metaQTLs, tanto de campo (q9F2, q9F3 y q9F4) como de invernadero (q9G5, q9G6- un metaQTL robusto, que agrupa a QTLs detectados en cuatro ensayos distintos-, q9G7 y q9G8). Este intervalo es, pues, bastante interesante porque su efecto contribuye a la resistencia en campo (hoja y panícula), y también en ensayos de inoculación.

Cromosoma 10, intervalo 1: RM 294C – RM 333

Pese a la escasa variabilidad hallada en el cromosoma 10 en el cruzamiento JSxGV, se ha detectado un QTL de incidencia en ambas poblaciones, sobre el mismo marcador en el extremo del brazo largo. Además, PAN10.1P+D se expresa en dos

localidades (aunque la magnitud del efecto aditivo es bastante diferente en cada una de ellas, probablemente debido a la incidencia mucho más elevada en El Palmar que en el Delta). En ambos cruzamientos, el alelo de la variedad local causa una mayor susceptibilidad. Estos QTLs coinciden espacialmente con el metaQTL q10G8, y con 4 genes candidatos: el gen de resistencia completa *Pi28(t)*, dos genes de quitinasas y otro para una proteín-quinasa.

Cromosoma 11, intervalo 1: RM 286 – RM 441

En el brazo corto del cromosoma 11 hay una zona con una pobre cobertura de marcadores, pero en la que se localizan los QTL robustos SH11.1P, AFA11.1 y MM11.1S en JSxGV. A pesar de que parecen QTLs diferentes atendiendo a los picos de máxima probabilidad, en los 3 QTLs (y en los 3 aislados para los que se detecta AFA11.1, así como para el promedio de AFA) los efectos genéticos son similares, apuntando a un único QTL de gran efecto: es el alelo de GV el que aporta resistencia, existiendo también dominancia negativa. AFA11.1 explica además un gran porcentaje de la variación fenotípica en los 3 aislados (desde un 15 hasta un 43%), lo cual resalta el interés de este intervalo al aportar una resistencia poco específica en las inoculaciones, y contribuir también al control de la susceptibilidad en campo en lo que respecta a los parámetros medidos en hoja (SH y MM), aunque no parece repercutir sobre la incidencia en panícula. Se encuentran en esta zona los metaQTLs q11G1, q11G2, q11G3(P) y q11G4(P) de resistencia en invernadero (los dos últimos de resistencia parcial), y los genes de resistencia completa *Pia*, *PiCO39, Pikur2, Pise* y *MPiz*. La población de *M. oryzae* de los arrozales de la Albufera debe contener linajes con genes de avirulencia compatibles con *Pia*, ya que una u otra de las dos VDs que poseen este gen presentaban síntomas de ataque del hongo varios años; sin embargo, una versión atenuada de este gen es un candidato para los QTLs hallados.

Cromosoma 11, intervalo 2: RM 26816 – RM 27222

En el brazo largo del cromosoma 11 co-localizan QTLs de incidencia en las dos poblaciones estudiadas, junto con uno de severidad en SixCNA. En los dos QTLs de incidencia existe dominancia o sobredominancia, aunque de distinto signo. A pesar de que en SixCNA coinciden QTLs de severidad e incidencia, lo hacen con efectos opuestos en lo que se refiere a la aditividad: el alelo de Si aumenta la susceptibilidad en panícula, pero disminuiría la de hoja; pero ello podría explicarse por las dos interacciones epistáticas que presenta SH11.1 con dos regiones, distintas, del Cromosoma 2 (Is.6): en ambas, el alelo de Si sólo se asocia con una reducida severidad en combinación con su homólogo en los otros dos loci; en el QTL de incidencia (INC11.1), sin embargo, no se observa ninguna interacción que afecte al alelo Si. Dada la coincidencia de QTLs de incidencia, un buen candidato en esta región es el gen *Pb1*, que se caracteriza por conferir resistencia duradera y de amplio espectro en las panículas (Hayashi *y col.*, 2010). En esta región también coinciden varios metaQTLs de invernadero y de campo, algunos de ellos de resistencia parcial; destacan como QTLs robustos q11G7 y q11F2, pues agrupan QTLs de 4 ensayos distintos. Además, es esta zona se localizan al menos 16 genes R, varios de los cuales están presentes en las VDs ensayadas en esta tesis: *Pik-h* no resultó efectivo, mientras que *Pi7*, *Pik* y *Pik-s*

confirieron resistencia a las VDs en los años ensayados, y la VD de *Pik-p* mostró síntomas sólo en 2011 (indicando el posible aumento de linajes compatibles con el gen); por otro lado, las VDs con *Pik-m* o *Pi1* (que tiene una resistencia de amplio espectro) mostraron cierta susceptibilidad, aunque sin resultados concluyentes en cuanto a incidencia por ser variedades tardías. Finalmente, también se hallan en esta zona otro GLP y un gen JAMyb, un factor de transcripción inducido por JA, asociado con la respuesta de defensa de la planta de arroz frente a la infección por *M. oryzae* (Lee y *col.*, 2001), y que co-localiza con QTLs de resistencia a piriculariosis en otros estudios (Ramalingam *y col.*, 2003).

Cromosoma 12, intervalo 1: RM 19 – RRP5E

En este intervalo, de nuevo, encontramos dos QTLs de efectos antagónicos en SixCNA: el alelo de Si en INC12.1 disminuye la incidencia, mientras que en SH12.1 aumenta la severidad; no obstante en ambos casos hay sobredominancia de signo negativo. Aunque es posible que se trate de dos QTLs contiguos, cabe la posibilidad de que los efectos contrapuestos respondan también en este caso a la epistasia: ambos QTLs presentan varias interacciones significativas cada uno (con regiones diferentes entre sí; Is.7 e Is.20), que pueden alterar notablemente la respuesta, especialmente, del alelo de Sivert. La población JSxGV muestra un escaso polimorfismo en esta zona; sin embargo, en ella se detecta un QTL que también podría co-localizar con los anteriores: AFA12.1, que se detecta para un solo aislado, y que también muestra sobredominancia negativa. De todos modos, es difícil establecer una demarcación clara entre este intervalo y el siguiente.

En esta región coinciden un importante grupo de metaQTLs, tanto de campo (q12F1, q12F2 y q12F3) como de invernadero (q12G5, q12G6, q12G7, y q12G8, este último muy robusto), así como un cluster de al menos 16 genes de resistencia completa. Algunos de estos genes (*Pita, Pita-2, Pi12, Pi19* y *Pi20*) se ensayaron en la colección de VDs, aunque en su versión como genes de resistencia completa no resultaron claramente eficaces para controlar los linajes presentes en la población de *M. oryzae* en la Albufera; sin embargo alelos atenuados de estos genes Pi son candidatos para esta zona rica en QTLs.

Cromosoma 12, intervalo 2: RM 101 – RM 270

Por último, encontramos una región próxima al centrómero, en la que se han detectado un QTL de incidencia en la población SIxCNA y dos QTLs para las inoculaciones en JSxGV: LES12.1 y AFA12.1 son significativos para un solo aislado, diferente entre sí; además, sus efectos genéticos son bastante distintos, en magnitud y signo; esto podría reflejar que, efectivamente, LES y AFA estiman dos aspectos diferentes, y poco relacionados, de la respuesta de la planta a la infección. Los dos QTLs más robustos, INC12.2 y LES12.1, aun en poblaciones distintas, coinciden en una importante dominancia negativa. INC12.2 se detectó, además, en el análisis con la población SixCNA completa y también en el que se hizo eliminando los genotipos que no presentaron síntomas. Los QTLs de este intervalo coinciden con tres metaQTLs de ensayos en invernadero (q12G9, un metaQTL robusto que engloba a QTLs de siete experimentos distintos, q12G11 y q12G13). Aparte de ello, en la región se localizan dos genes candidatos que codifican para quinasas.

6 CONCLUSIONES

Caracterización de la población de *Magnaporthe oryzae* mediante variedades diferenciales (VDs)

- La colección de VDs utilizada en este estudio (las líneas IRBL) no es del todo adecuada para la caracterización de la población de *Magnaporthe oryzae* en nuestra zona, principalmente porque su maduración no es sincrónica con las variedades cultivadas en nuestros arrozales y porque no está presente al menos uno de los genes que podrían ser interesante frente a los linajes europeos: *Pi33*. Pese a ello, se pueden extraer algunas conclusiones.

- La considerable variación en la respuesta de las VDs a lo largo de los 4 años de ensayos, sobre todo en nudo y panícula, denota que la estructura de la población de *M. oryzae* en el Parque Natural de la Albufera no es estable, al menos en cuanto a la prevalencia de los diferentes aislados. Pero hay indicios de que estos cambios también pueden reflejar la aparición de algún nuevo linaje virulento, de acuerdo con la recientemente observada variación en los arrozales de las marismas del Guadalquivir.

- La población de *M. oryzae* del arrozal valenciano contiene genes de avirulencia incompatibles con *Pi7*, *Pik*, *Piz*, y *Pik-s*. Los tres primeros, al menos, coinciden con estudios en otras zonas arroceras españolas y de Europa, por lo que son buenos candidatos a ser utilizados en la mejora de la resistencia de las variedades europeas. Por el contrario, se han identificado en la Albufera aislados capaces de superar ya la resistencia conferida por otros genes que habían sido propuestos para este fin: *Piz-5* y *Pita-2.*

Análisis de los métodos de evaluación de la resistencia a *Magnaporthe oryzae*

- Los ensayos de inoculación en invernadero no predijeron adecuadamente, en nuestro caso, la respuesta de líneas F3 de JSxGV frente a la población de *M. oryzae* en campo, según se deduce de la falta de correlación entre los parámetros de cada ámbito experimental. Incluso, pese a haber inoculado seis aislados que se consideraban representativos de la población del patógeno en Europa.

- Al evaluar la severidad de la enfermedad en hoja, es más recomendable considerar el valor medio que el máximo, al menos en genotipos que presenten algún grado de segregación, como las líneas F3.

- Las estimas de la incidencia de la enfermedad en panícula, nudo y cuello se deben valorar con cautela en variedades de maduración tardía, pues dependen de que haya suficiente presión de inóculo al final del cultivo, fase en que las condiciones

climáticas son menos favorables para el hongo que a lo largo del periodo vegetativo. No obstante, la incidencia en los órganos productivos del arroz es de gran interés, no sólo porque es dónde el hongo causa las mermas de producción, sino también porque presenta mayores correlaciones entre años y localidades que las medidas de susceptibilidad en hoja, y porque, correspondientemente, se encuentran más co-localizaciones entre QTLs de incidencia de ambas poblaciones segregantes que entre QTLs de severidad.

Identificación de QTLs de resistencia a *Magnaporthe oryzae*

- Se han detectado QTLs de resistencia a *M. oryzae* que afectan a todos los caracteres estudiados. Los cuatro parentales utilizados en este estudio, Sivert, CNA-6159, JSendra y Gigante Vercelli, poseen alelos de QTLs que aportan resistencia. Las distintas combinaciones de QTLs con efectos antagónicos en los parentales y en las poblaciones segregantes explican la moderada susceptibilidad en Sivert y JSendra, así como la aparición de segregaciones transgresivas en ambas poblaciones y en varios de los caracteres estudiados.

- La mayoría de QTLs se expresan sólo en una localidad, lo cual está de acuerdo con la baja correlación encontrada entre localidades, e indica una importante influencia ambiental en la resistencia, al menos en población JSxGV.

- La baja contribución a la variación fenotípica de la mayor parte de los QTLs detectados en este estudio confirman que la resistencia parcial a *M. oryzae* es un carácter complejo, controlado por numerosos genes con efecto menor. Muchos de ellos, además, presentan importantes efectos dominantes que, con frecuencia contribuyen a aumentar la susceptibilidad al ataque de *M. oryzae*.

- La mayoría de QTLs hallados al inocular las líneas F3 de JSxGV con seis aislados confieren resistencia a uno o muy pocos aislados; pero la resistencia de algunos loci es más inespecífica, y estos estarían de acuerdo con la hipótesis según la cual la resistencia parcial es de amplio espectro. Sin embargo, algunos QTLs, que explican una elevada proporción de la variación fenotípica tras la inoculación y que co-localizan con genes *Pi*, podrían corresponder a algún gen de resistencia completa, cuyo efecto quede enmascarado por la mezcla de linajes en campo.

- Las coincidencias espaciales entre QTLs de resistencia en hoja y en panícula, en ambas poblaciones estudiadas, junto con algunas correlaciones significativas entre los parámetros de severidad e incidencia, apoyan la hipótesis de que los mecanismos de defensa en ambos órganos están relacionados o tienen procesos en común.

- La frecuente coincidencia entre los QTLs encontrados tanto con metaQTLs hallados en estudios con germoplasma genéticamente distante, como con genes de defensa candidatos, sugiere que existen regiones con QTLs de resistencia a *M. oryzae* conservadas en muy diversas variedades de arroz; y es coherente con la naturaleza de la resistencia parcial, en la que prima la expresión constitutiva de genes de defensa comunes.

Implicaciones para la selección asistida por marcadores de genotipos resistentes

- Algunos de los QTLs detectados pueden ser útiles en programas de mejora para la obtención de variedades europeas con resistencia a *M. oryzae,* especialmente los siguientes:

    - Entre los QTLs hallados en los ensayos en invernadero, destacan por su amplio espectro de resistencia AFA1.4, AFA3.2, AFA6.1, AFA7.2 y AFA 11.1.

    - Para la resistencia en hoja son candidatos, por su efecto aditivo o/y por su expresión en varios ambientes, los QTLs identificados en SixCNA SH4.1, SH7.1 y SH11.1; así como SH6.1P+S, MM1.1S y MM11.1S entre los identificados en JSxGV.

    - Por los mismos motivos, para la resistencia en panícula son interesantes INC1.1, INC1.2, INC7.2, INC10.1, INC11.1, INC12.1 e INC12.2 de SixCNA, y los QTLs PAN 1.2P, PAN2.3D, PAN4.1P+D, PAN6.1S+P+D, PAN 6.2P, PAN8.2S+P+D, PAN8.3S+P, PAN9.2P+D, PAN10.1P+D y PAN11.1D de JSxGV; algunos co-localizan en ambas poblaciones.

- Pero destacan algunas regiones cromosómicas en las que se agrupan varios QTLs que afectan a diferentes parámetros, con efectos que van mayoritariamente en el mismo sentido, y que por lo tanto son interesantes porque se pueden mejorar varios aspectos de la resistencia introgresando una única región. Se trata de los segmentos flanqueados por RM3148 y RM259 en el cromosoma 1, RM539 y RM564 en el cromosoma 6, RM506 y RM38 en el cromosoma 8, RM310 y RM342A también en el cromosoma 8, RM242 y RM215 en el cromosoma 9 y RM286 y RM441 en el cromosoma 11.

- Sin embargo, la interacción entre QTLs ha mostrado ser un elemento importante, que ayuda a explicar la expresión diferencial de los QTL de resistencia en las

diversas localidades en que se realizó el ensayo. Tales interacciones epistáticas afectan al valor final de los genotipos, y por tanto deben tenerse en cuenta a la hora de determinar qué QTLs y alelos de estos deben incorporarse a un programa de mejora de la resistencia a *M. oryzae*.

7 BIBLIOGRAFÍA

Abe S (2004). Breeding of a blast resistant multiline variety of rice, Sasanishiki BL. Japon. Agric. Res. Q. 38:149-154

Abumiya S y Kobayashi H (1955). Contents of amino acids and amides in rice leaves in relation to blast disease. Annals of the Phytopathological Society of Japan 18, 75.

Abuamsha R, Abueid M, Hajjeh H y Salman M (2013). Evaluation of the incidence and severity of olive leaf spot caused by *Spilocaea oleagina* in different olive cultivars in Palestine. Journal of Agriculture and Environment for International Development, 107 (2), 201–212.

Aguilar M (2001). El cultivo del arroz en el sur de España. Caja de Ahorros El Monte. 189 pp.

Agrios GN (2005). Plant Pathology. Fifth Ed. Elsevier Academic Press, 984 pp.

Ahn SW (1994). International Collaboration on Breeding for Resistance to Rice Blast. En: Zeigler, RS, Leong, SA, Teng, PS (eds.): Rice Blast Disease, CBA y IRRI, Wallingford, Oxon, Reino Unido, 137–153.

Ahn S, Kim NYK, Hong HC, Han SS, Choi HC, Moon HP, y McCouch SR (1997). Molecular mapping of genes for resistance to Korean isolates of rice blast, harmonizing agricultural productivity and conservation of biodiversity. Breeding and ecology. p 435-436. En: 8th SABRAO Congr. Annu. Meet. Korean Breed. Soc.

Ahn SN, Kim YK, Hong HC, Han SS, Kwon SJ, Choi HC, Moon HP y McCouch SR (2000). Molecular mapping of a new gene for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). Euphytica, 116: 17–22.

Ahn SN (2001). Evaluation of genetic resistance to rice blast: searching for varietal resistance stable over space and durable over time. En: Sreenivasaprasad S, Johnson R (eds.): Major Fungal Diseases of Rice. Recent Advances. Springer Netherlands. 365pp.

Allard RW (1960). Principles of plant breeding. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY.

Allard RW (1988). Genetic changes associated with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. J. Hered. 79: 225—238.

Ali MS, Khatun S, Bashar MK, Alam MS, Purba D, Kawase M, Okuno K y Kiyosawa S (2004). Genetic Analysis for Two Components of Field Resistance: Lesion Size and Number, to Rice Blast. Journal of Biological Sciences, 4: 62-71.

Amanat P (1977). Modellversuche zur Ermittlung individueller und objektabhängiger Schätzfehler bei Pflanzenkrankheiten. Universität Gießen. Springer-Verlag Heidelberg. 299p.

Amante-Bordeos A, Sitch LA, Nelson R, Damacio RD, Oliva NP *y col*. (1992). Transfer of bacterial blight and blast resistance from the tetraploid wild rice *Oryza minuta* to cultivated rice, *Oryza sativa*. Theor. Appl. Genet. 84: 345–354.

Amin KS y Venkatorao G (1979). Rice blast control by nitrogen management. Phytopathol. 96:140-145.

Andersen AL, Henry BW y Tullis EC (1947). Factors affecting infectivity, spread, and persistence of *Pyricularia oryzae*. Cav. Phytopathology. 37: 94-110.

Anónimo (1887). Informe de la mayoría de la comisión nombrada por el Real Decreto de 20 de Julio de 1886, para estudiar la crisis de la producción arrocera en las provincias de Levante. Valencia.

Ashikawa I, Hayashi N, Yamane H, Kanamori H, Wu JZ, Matsumoto T, Ono K y Yano M (2008). Two adjacent NBS-LRR class genes are required to confer *Pikm*-specific rice blast resistance. Genetics 180:2267–2276.

Asins M (2002). Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. Plant Breed 121: 281–291.

Astolfi G (1828). Congettura sulla malattia del brusone che infesta del riso. Ann Univ. Tecnol., Milan 6: 198. (Publicación especial: Sector Mycology Disease Survey. US Department of Agriculture 6: 13, 1954).

Asuyama H (1965). Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *Pyricularia oryzae*. En: Ou SH (ed.). The rice blast disease: Proc. Symp. At IRRI, 1963: 9 – 22. Baltimore, Maryland, John Hopkins Press.

Atkins JG y Johnston TH (1965). Inheritance in rice of reactions to races 1 and 6 of *Pyricularia oryzae*. Phytopathology 55: 993-995.

Atkins JG, Robert AL, Adair CR, Goto K, Kozaka T, Yanagida R, Yamada M y Matsumoto S (1967). An international set of rice varieties for differentiating races of *Pyricularia oryzae*. Phytopahology 57, 297-301.

Bai JF, Pennill, LA, Ning, JC, Lee SW, Ramalingam J, Webb CA, Zhao BY, Sun Q, Nelson JC, Leach JE y Hulbert SH (2002). Diversity in nucleotide binding site—leucine-rich repeat genes in cereals. Genome Res 12:1871–1884.

Ballini E, Berruyer R, Morel JB, Lebrun M, Nottéghem JL y Tharreau D (2007). Modern elite rice varieties of the 'Green Revolution' have retained a large introgression from wild rice around the *Pi33* rice blast resistance locus. New phytologist, 175 (1): 340-350.

Ballini E, Morel JB, Droc G, Price A, Courtois B, Notteghem JL y 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. Mollecular Plant Microbe Interaction. 2008 Jul; 21(7):859-68.

Ballini E, Vergne E, Tharreau D, Nottéghem JL y Morel JB (2009). ARCHIPELAGO: Towards bridging the gap between molecular and genetic information in rice blast disease resistance. En: Wang GL y Valent B (eds.). Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. New York : Springer, p. 417-425.

Barksdale T y Asai GN (1961). Diurnal spore release of *Piricularia oryzae* from rice leaves. Phytopathology 51: 313–17.

Bastos CR, Azzini LE, Gallo PB, Soave J, Mello de Castro LHS y Tulmann-Neto A (2002). Improving rice through somaculture and induced mutation. En: Hill JE y Hardy B

(eds). Proceedings of the Second Temperate Rice Conference. Sacramento, CA, EEUU, 13-17 June 1999, p. 535-544. IRRI, Los Baños, Filipinas.

Beavis W (1998). QTL Analyses: power, precision and accuracy. En: Paterson AH (Ed.), Molecular Dissection of Complex Traits. CRC Press, Boca Raton

Beidler LL, Hilliard PR, y Rill RL (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. Analytical Biochemistry 126:374-380.

Bennetzen JL (2000). Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. Plant Mol. Biol. 42, 251–269.

Berruyer R, Adreit H, Milazzo J, Gaillard S, Berger A, Dioh W, Lebrun MH y Tharreau D (2003). Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1. Theor. Appl. Genet. 107:1139-1147.

Blair MW, Panaud O y McCouch SR (1999). Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 98: 780-792.

Bolton MD (2009). Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. Mol. Plant-Microbe Interact. 22:487-497.

Bonman JM, Dedios TIV y Khin MM (1986). Physiological specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. Plant Dis. 70: 767-769.

Bonman JM y Mackill DJ (1988). Durable resistance to rice blast disease. Oryza 25: 103-110.

Bonman JM, Estrada BA y Bandong JM (1989a). Leaf and neck blast resistance in tropical lowland rice cultivars. Plant Disease. 73:388-390.

Bonman JM, Bandong JM, Lee YH y Lee EJ (1989b). Racespecific partial resistance to blast in temperate japonica rice cultivars. Plant Disease. 73:496-499.

Bonman JM (1992). Durable resistance to rice blast disease- environmental influence. Euphytica, 63: 115–123.

Bonman JM, Khush GS y Nelson RJ (1992). Breeding rice for resistance to pests. Annu. Rev. Phytopathol. 30:507-528.

Bourett TM y Howard RJ (1990). In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Can. J. Bot. 68:329–42

Boyd LA (2006). Can the durability of resistance be predicted? J Sci Food Agric 86:2523-2526.

Breen J y Bellgard M (2010). Germin-like proteins (GLPs) in cereal genomes: gene clustering and dynamic roles in plant defence. Funct Integr Genomics, 10, 463-476.

Brem RB y Kruglyak L (2005). The landscape of genetic complexity across 5,700 gene expression traits in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 102, 1572–1577.

Briz J, de Felipe I y Guerrero L (1997). Rice consumer attitudes in Spain: case of Madrid and Catalonia. pp: 165-196. En: International Symposium in Rice Quality. Nottingham.

Bryan GT, Wu K, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R y Valent B (2000). A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. Plant Cell 12:2033-2045.

Brodny U *y col*. (1986). Residual and interactive expressions of 'defeated' wheat stem rust resistance genes. Phytopathology 76, 546–549.

Burns M (1997). Quantitative trait loci mapping in *Arabidopsis*. University of Birmingham.

Burr B *y col*. (2005). The map-based sequence of the rice genome. Nature, 436: 793-800.

Burrel MM y Rees T (1974). Carbohydrate metabolism of rice leaves infected by *Pyricularia oryzae*. Physiol. Plant Pathol. 4:489-496.

Büschges R *y col*. (1997). The barley *mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. Cell 88, 695–705.

Butler EJ (1914). The cultivation of rice in Spain and the recent International Rice Congress at Valencia. Agr. J. India 9 326 – 348.

Caicedo AL, Schaal BA y Kunkel BN (1999). Diversity and molecular evolution of the RPS2 resistance gene in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 96: 302–30.

Caicedo AL *y col*. (2007). Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. PLoS Genet 3:1745–1756.

Campbell CL y Madden LV (1990). Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons, New York, NY, EEUU.

Candole BL, Siebenmorgen TJ, Lee FN, Cartwright RD (1999). The effect of panicle blast on the physical properties and milling quality of rice cultivar 'M202'. Res Ser-Arkansas Agric Exp Stn 468:142–147.

Cantrell RP y Reeves, TG (2002). The Cereal of the World's Poor Takes Center Stage. Science. 296: 56.

Cao G y Zhu J (2001). Impact of epistasis and QTL environment interaction on the developmental behavior of plant height in rice. Theor Appl Genet 103:153–160.

Carbonell EA, Asíns MJ, Baselga M, Balansard E y Gering TM (1993). Power studies in the estimation of genetic parametres and the localization of quantitative trait loci for backcross and doubled haploid population. Theor. Appl.Genet. 86: 411-416.

Carlborg Ö y Haley CS (2004). Epistasis: too often neglected in complex trait studies? Nature Rev Genet, Vol. 5, No. 8. 618-625.

Carrasco J (1952). Compendio Arrocero. Ed. Guerri, S.A., Valencia.

Carreres R (1997). Cultivo del arroz: Problemática de la germinación y enfermedades de la planta. En: Jornadas del arroz. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. 69-80.

Carreres R, Ballesteros R y Sendra JB (1997). Rice diseases in the region of Valencia and methodologies for testing varieties resístanse. Cahiers Options Méditerranéennes, vol. 15, n° 3.

Carreres R (2001). Enfermedades del Arroz. En: Ballersteros R (ed.): El arroz: su entorno y su futuro. Universidad Internacional Menéndez Pelayo. Valencia, 2001.Tomo I: 36-45.

Carreres R (2003). El cultivo del arroz. En: Jornadas sobre el genoma del arroz. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados. pp: 17-36.

Carreres R (2005). Enfermedades del arroz, técnicas de cultivo y control químico. Vida Rural. 214: 53-57.

Carreres R (2007). Characteristics of rice cultivation in Valencia Region (Spain). En: Ferrero A y Vidotto F (eds.). Agro-economical traits of rice cultivation in Europe and India. 148-186 Edizioni Mercurio, Vercelli (Italia).

Carreres R, Dominguis V, García A y Juan M (2010). Punta blanca: enfermedad del arroz ocasionada por el nematodo "*Aphelenchoides besseyi*". Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura. 334: 24-31.

Carrillo MGC, Goodwin PH, Leach JE, Leung H y Cruz CMV (2009). Phylogenomic relationships of rice oxalate oxidases to the cupin superfamily and their association with disease resistance QTL. Rice 2: 67-79.

Cassman KG (1999). Ecological intensification of cereal production systems: Yield potential, soil quality, and precision agriculture. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 5952-5959.

Castilla NP, Vera Cruz CM, Mew TW y Zhu Y (2003). Using rice cultivar mixtures: A sustainable approach for managing diseases and increasing yield. IRRI. Rice Res. News, 28: 5-11.

Català MM, Jardí M, Marín JP y Almacellas J (2008). Reacción varietal a *Pyricularia grisea* y determinación de los genes de virulencia del patògeno en el Delta del Ebro. Período 2000-2006. Phytoma España, 196: 48-57.

Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu KS, Xiao JH, Yu ZH, Ronald PC, Harrington SE, Second G, McCouch SR y Tanksley SD (1994). Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. Genetics 138:1251-1274.

Cervera MT, Storme V, Ivens B, Gusmao J, Liu BH *y col* (2001). Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. Genetics 158:787–809.

Chang WL, Wang MK y Yang SC (1965). Reaction of rice varieties and strains to blast in the uniform blast nursery. Journal of Taiwan Agricultural Research, 14(3): 1-10.

Chardon F, Virlon B, Moreau L, Falque M, Joets J, Decousset L, Murigneux A, y Charcosset A (2004). Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. Genetics 168: 2169-2185.

Chaudhary RC y Tran DV (2001). Speciality rices of the world: a prologue. 3-12. En Chaudhary RC, Tran DV y Duffy R (eds). Speciality Rices of the World: Breeding, Production and Marketing. Science Publisher Inc, Enfield, EEUU.

Chen D (1993). Population structure of *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. In two screening sites in the Philippines and characterization of resístanse genes. University of the Philippines. Los Baños, Laguna, Filipinas. 161 pp.

Chen D, Zeigler RS, Leung H y Nelson RJ (1995). Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. Phytopathology 85: 1011-1020.

Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG y Mccouch SR (1997). Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 95: 553-555.

Chen HL, Chen BT, Zhang DP, Xie YF y Zhang QF (2001). Pathotypes of *Pyricularia grisea* in rice fields of central and southern China. Plant Dis. 85: 843–850.

Chen H, Wang S, Xing Y, Xu C, Hayes PM y Zhang Q (2003). Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia grisea* in rice and barley. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 100: 2544–2549.

Chen X, Shang J, Chen D, Lei C, Zou Y, Zhai W, Liu G, Xu J, Ling Z, Cao G, Ma B, Wang Y, Zhao X, Li S, y Zhu L (2006). A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. Plant J. 46: 794-804.

Cheng C *y col*. (2003). Polyphyletic origin of cultivated rice: Based on the interspersion pattern of SINEs. Mol Biol Evol 20: 67–75.

Chisholm ST, Coaker G, Day By Staskawicz BJ (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. Cell 124: 803-814.

Cho YG, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch SR, Park WD, Ayres N y Cartinhour S (2000). Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.) Theor. Appl. Genet. 100: 713-722.

Cho YC, Roh JH, Kim BR, Choi IS, Kim MK, Han SS, Fukuta Y, Hwang HG y Kim YG (2005). Reaction of Resistance Genes of Monogenic Lines to Rice Blast (*Magnaporthe grisea*). Korean Journal of Breeding. 37 (3): 155–161.

Clergeot PH, Gourgues M, Cots J, Laurans F, Latorse MP, Pépin R *y col.* (2001). PLS1 a gene encoding a tetraspanin-like protein is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. Proc Natl Acad Sci EEUU 98: 6963–6968.

Cockerham CC y Zeng ZB (1996). Design III with marker loci. Genetics. 143:1437–1456.

Collinge DB, Gregersen P y Thordal-Christensen H (1994). The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. En: Basra AS (Ed). Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches. New York, Marcel Dekker. 391-433.

Consolo VF, Cordo CA y Salerno GL (2008). DNA fingerprint and pathotype diversity of *Pyricularia oryzae* populations from Argentina. Australian Plant Pathology 37: 357-364.

Correa F y Zeigler R (1991). Manejo integrando del anublo del arroz (*Pyricularia oryzae*). Fitopatol. Colomb. 15:35-39.

Correa-Victoria FJ, Zeigler RS y Levy M (1994). Virulence characteristics of genetic families 500 of *Pyricularia grisea* in Colombia. En: Zeigler RS, Leong SA y Teng PS (eds). Rice Blast 501 Disease. Wallington, Oxon, REINO UNIDO: CABI/IRRI, 211-229.

Correa-Victoria FJ, Tharreau D, Martínez C, Vales M, Escobar F, Prado G y Aricada G (2002). Combinación de genes en arroz para el desarrollo de resistencia durable a *Pyricularia grisea* en Colombia. Fitopatología Colombiana 26: 47–54.

Correa-Victoria FJ y Martínez C (2009). Breeding Rice Cultivars with Durable Blast Resistance in Colombia. En: Wang GL, Valent B (eds) Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. Springer, Netherlands, 375-383.

Couch BC y Kohn LM (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. Mycologia 94: 683–93.

Couch BC, Fudal I, Lebrun MH, Tharreau D, Valent B *y col*. (2005). Origins of hostspecific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. Genetics 170: 613–30.

Dangl JL y Jones JDG (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411: 826–833.

Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI y Soller M (1993). Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. Genetics 134: 943-951.

Datta K, Muthukrishan S y Datta SK (1999). Expression and function of PR-protein genes in transgenic plants. En: Datta SK y Muthukrishan S (eds). Pathogenesis related proteins in plants. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, EEUU, 261-278.

De Vicente MC y Tanksley SD (1993). QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. Genetics 134, 585–596.

De Wit PJGM (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition.Trends in Plant Science 2: 452 – 458.

Deng YW, Zhu XD, Shen Y y He ZH (2006). Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety. Theor Appl Genet 113: 705–713.

Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S y Marco Y (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 100: 8024–8029.

Devos KM y Gale MD (1997). Comparative genetics in the grasses. Plant Mol.Biol. 35: 3-15.

Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X y Wang S (2008). Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. Plant Cell 20: 228–240.

Dobermann A, Witt C y Buresh R (2008). Ecological intensification of irrigated rice systems in Asia. En: Recognizing past achievements, meeting future needs: Proc. 5th International Crop Sci. Congress, 13–18 April 2008, Jeju, Korea (CD).

Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Teh T, Wang CI, Ayliffe, MA, Kobe B y Ellis JG (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 103: 8888–8893.

Don LD, Urashima AS, Tosa Y, Nakayashiki H y Mayama S (1999a). Population structure of the rice blast fungus in Japan examined by DNA fingerprinting. Annual Phytopathological Society of Japan 65: 15-24.

Don LD, Tosa Y, Nakayashiki H y Mayama S (1999b). Population structure of the rice blast pathogen in Vietnam. Annual Phytopathological Society of Japan 65: 475-479.

Doucleff M, Jin Y, Gao F, Riaz S, Krivanek AF y Walker MA (2004). A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. Theor Appl Genet. 109: 1178–1187.

Durrant WE y Dong X (2004). Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 42:185–209.

East EM (1910). A Mendelian interpretation of variation that is apparently continuous. Am. Nat. 44: 65-82.

Ebbole DJ (2007). *Magnaporthe* as a model for understanding host–pathogen interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 45, 437–456.

Ebron LA, Fukuta Y, Imbe T, Kato H, T-Yanoria JM, Tsunematsu H, Khush GS y Yokoo M (2004). Estimation of genes in blast resistance in elite Indica-type rice (*Oryza sativa* L.) varieties bred at the International Rice Research Institute. Breed Sci 54:381–387.

Efferson JN (1985). Rice quality in world markets. pp: 1-13. En IRRI (ed.). Rice Grain Quality and Marketing. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Ekwamu A (1991). Influence of head blast infection on seed germination and yield components of finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn) Trop. Pest Manag. 37:122–23.

El Hissewy AA, El Kady A y Salem EA (1997). Breeding for partial resistance to rim blast caused by *Pyricularia oryzae* Cav., in Egypt. En: Chataigner J (ed.). Maladies du riz en région méditerranéenne et les possibilités d'amélioration de sa résistance . Montpellier : CIHEAM, 1997. 148 p. (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 15(3)).

Ellis JG, Lawrence GJ, Luck JE y Dodds PN (1999). Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene L that determine differences in gene-for-gene specificity. Plant Cell. 11:495–506.

Ellis J, Dodds P y Pryor T (2000). The generation of plant disease resistance gene specificities.Trends in Plant Science. 5:373-379.

Ellis JG y Jones DA (2003). Plant disesae resistance genes. En: Ezekowitz RAB y Hoffmannt JA (eds.): Innate immunity. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2003. 410 pp.

Ezuka A (1972). Field resistance of rice varieties to blast disease. Review of Plant Protection 5, 1-12.

Ezuka A (1979). Breeding for and genetics of blast resistance in Japan. En: IRRI The rice blast workshop. 27-48.

Faris JD, Haen KM y Gill BS (2000). Saturation mapping of a gene-rich recombination hot spot region in wheat. Genetics 154: 823–835.

Fasoulas AC y Allard RW (1962). Nonallelic Gene Interactions in the Inheritance of Quantitative Characters in Barley. Genetics 47, 899–907.

Faure J y Mazaud F (1995). La calidad del arroz en la Unión Europea. Agriculture et development (numero especial): 2-13.

Faivre-Rampant O, Thomas J, Allègre M, Morel JB, Tharreau D, Nottéghem JL, Lebrun M, Schaffrath U y Piffanelli P (2008). Characterization of the model system rice–*Magnaporthe* for the study of nonhost resistance in cereals. New phytologist, 180 (4) : 899-910.

Faivre-Rampant O, Bruschi G, Abbruscato P, Cavigiolo S, Picco AM, Borgo L, Lupotto y Piffanelli P (2011). Assessment of genetic diversity in Italian rice germplasm related to agronomic traits and blast resistance (*Magnaporthe oryzae*). Molecular Breeding.27, (2), 233-246.

Feys B y Parker J (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. Trends Genet. 16, 449–455.

Fisher RA (1918). The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. Philosophical Transactions of the Royal Society of Edinburgh. 52: 399–433.

Fishman L, Kelly AJ, Morgan E y Willis JH (2001). A Genetic Map in the *Mimulus guttatus* Species Complex Reveals Transmission Ratio Distortion due to Heterospecific Interactions. Genetics 159: 1701–1716.

Flor HH (1955). Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications.*Phytopathology* 45:680-685.

Font de Mora R (1939). El aroz, su cultivo, molinería y comercio. Salvat Edit. S. A., Barcelona.

Forlani *y col*. (2011). *Magnaporthe oryzae* cell wall hydrolysate induces ROS and fungistatic VOCs in rice cell cultures. Journal of Plant Physiology 168: 2041– 2047.

Freymark PJ, Lee M, Martinson CA y Woodman WL (1994). Molecular-marker-facilitated investigation of host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.): components of resistance. Theor Appl Genet 88: pp. 305-313.

Fu D, Uauy C, Distelfeld A, Blechl A, Epstein L *y col*. (2009). A kinase START gene confers temperature dependent resistance to wheat stripe rust. Science 323:1357–60.

Fu J, Liu HB, Li Y, Yu HH, Li XH, Xiao JH y Wang SP (2011). Manipulating broad-spectrum disease resistance by suppressing pathogen-induced auxin accumulation in rice. Plant Physiology 155, 589–602.

Fujii K, Hayano-Saito Y, Shumiya Ae e Inoue M (1995). Genetical mapping based on the RFLP analysis for the panicle blast resistance derived from a rice parental line St. No. 1. Breed. Sci. 45:209 (en japonés).

Fujii K, Hayano-Saito Y, Saito K, Sugiura N, Hayashi N, Tsuji T, Izawa T e Iwasaki M (2000). Identification of a RFLP marker tightly linked to the panicle blast resistance gene, Pb1, in rice. Breed. Sci. 50: 183–188.

Fukuoka S y Okuno K (1997). QTL analysis for field resistance to rice blast using RFLP markers. Rice Genet. Newsl. 14: 99.

Fukuoka S y Okuno K (2001). QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. Theor Appl Genet 103:185-190.

Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K *y col*. (2009). Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. Science 325: 998–1001.

Fukuoka S, Yamamoto SI, Mizobuchi R, Yamanouchi U, Ono K, Kitazawa N, Yasuda N, Fujita Y, Nguyen TTT, Koizumi S, Sugimoto K, Matsumoto T y Yano M (2014). Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. Scientific Reports 4: 4550.

Fukuta Y, Telebanco-Yanoria MJ, Imbe T, Tsunematsu H, Kato H, Ban T, Ebron LA, Hayashi N, Ando I y Khush GS (2004). Monogenic lines as an international standard differential set for blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Rice Genetics Newsletter. 21: 70-72.

Fukuta Y, Xu D, Telebanco-Yanoria MJ, Hairmansis A, Hayashi N y Kobayashi N (2009). Genetic Characterization of Universal Differential Variety Sets Developed Under the IRRI-Japan Collaborative Research Project. Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease. Springer. 325-335.

Fuller DQ *y col*. (2010). Consilience of genetics and archaeobotany in the entangled history of rice. Archaeol Anthropol Sci 2: 115–131.

Gabriel DW (1999). Why do pathogens carry avirulence genes?. Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 205-214.

Galton F (1889). Natural Inheritance. Macmillan. London.

Gao LZ y Innan H (2008). Nonindependent domestication of the two rice subspecies, *Oryza sativa* ssp. *indica* and ssp. *japonica*, demonstrated by multilocus microsatellites. Genetics 179: 965–976.

García-Más J, Arús P y Monfort A (2004). Base molecular de la resistencia. En: Nuez F, Pérez de la Vega M y Carrillo JM (eds). “Resistencia genética a patógenos vegetales”. Universidad Politécnica de Valencia. 77-136.

Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S y McCouch S (2005). Genetic structure and diversity in O*ryza sativa* L. Genetics 169: 1631-1638.

Gebhardt C y Valkonen JPT (2001). Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. Annu. Rev. Phytopathol. 39, 79–102.

Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Womack JE y Hoeschele I (1995). Mapping Quantitative Trait Loci Controlling Milk Production in Dairy Cattle by Exploiting Progeny Testing. Genetics, Vol 139, 907-920.

Giberti S, Bertea CM, Narayana R, Maffei ME y Forlani *G* (2012). Two phenylalanine ammonia lyase isoforms are involved in the elicitor-induced response of rice to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. J Plant Physiol.169(3): 249-54.

Girona P (1998). Valores agroecológicos de la agricultura tradicional valenciana: el arroz. Actas del III Congreso de la SEAE. Valencia, 31–39.

Glaszmann JC (1987). Isozymes and classification of Asian rice varieties. Theoretical and Applied Genetics. 4: 21-30.

Glazebrook J (2001). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis-2001 status. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 301-308.

Gnanamanickam SS (2009). Biological Control of Rice Blast. Biological Control of Rice Disease. Vol. 8: 53-65.

Gómez KA y Gómez AA (1976). Statistical procedures for agricultural research with emphasis on rice. IRRI, LosBaños, Filipinas.pp. 294.

Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong JP, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A y Briggs S (2002). A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica). Science 296:92-100.

Goffinet B y Gerber S (2000). Quantitative trait loci: A meta-analysis. Genetics 155:463-473.

Goto K (1955). History of the blast disease and changes in methods of control. Agric. Improv. Bur., Minist. Agric. For., Japón 5: 1-2.

Goto K, Hirano K y Ohata K (1961). Susceptibility of leaf of rice to blast in reference to leaf age and position. I. Variation of dudceptibility among different leaf positions and grades of

emergence of top leaf. Special Bulletin Okayama Prefecture Agricultural Experiment Station, Japón. 58, 77-88.

Goto K (1965). Estimating Losses from Rice Blast in Japan, En: "The Rice Blast Disease". The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland. pp. 195- 202.

Goto I (1970). Genetic studies on the resistance of rice plant to the blast fungus I. Inheritance of resistance in crosses Sensho x H-79 and Imochishirazu x H-79, Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 36 (1970) 304–312.

Goto I (1988). Genetic studies on resistance of rice plant to blast fungus, (VII): blast resistance genes of Kuroka. Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 54 (1988) 460–465.

Gowda M, Jantasuriyarat C, Dean RA y Wang GL (2004). Robust-LongSAGE (RL-SAGE): a substantially improved LongSAGE method for gene discovery and transcriptome analysis. Plant Physiol 134, 890-897.

Grandillo S y Tanksley SD (2005). Advanced backcross QTL analysis: Results and perspectives. En: Tuberosa R, Phillips RL y Gale M (eds.), Proceedings of the International Congress “In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution”, 27-31 May 2003, Bologna, Italy, 115-132.

Grant M y Mansfield J (1999). Early events in host–pathogen interactions. Curr. Opin. Plant Biol. 2, 312–319.

Guerrero A (1990). El suelo, los abonos y la fertilización de los cultivos. Madrid, Mundiprensa.

Hackett C (2002). Statistical methods for QTL mapping in cereals. Plant Mol Biol 48: 585–599.

Hackett CA y Broadfoot LB (2003). Effects of genotyping errors, missing values and segregation distortion in molecular marker data on the construction of linkage maps. Heredity;90: 33-8.

Haley CS y Andersson L (1997). Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals. En: Dear PH (Ed.), Genome Mapping. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, pp: 49-71.

Haley CS y. Knott SA (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. Heredity 69: 315–324.

Hamada H, Petrino M y Kakunaga T (1982). A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 79, 6465-6469.

Hamer JE, Howard RJ, Chumley FG y Valent B (1988). A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. Science 239:288–90.

Hammond-Kosack KE y Kanyuka K (2007). Resistance Genes (R Genes) in Plants. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 1-21.

Hanocq E, Laperche A, Jaminon O, Laine AL y Le Gouis J (2007). Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL meta-analysis. Theor. Appl. Genet. 114:569-584.

Hanzawa Y, Money T y Bradley D (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 102: 7748–7753.

Hartl D y Jones E (2001). Genetics: Analysis of Genes and Genomes. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.

Harushima Y, Kurata N, Yano M, Nagamura Y, Sasaki T, Minobe Y y Nakagahra M (1996). Detection of segregation distortions in an indica-japonica rice cross using a high-resolution molecular map. Theor Appl Genet 92:145–150.

Harushima Y, Yano M, Shomura A, Sato M, Shimano T, Kuboki Y, Yamamoto T, Lin SY, Antonio BA, Parco A, Kajiya H, Huang N, Yamamoto K, Nagamura Y, Kurata N, Khush GS y Sasaki T (1998). A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. Genetics 148:479-494.

Harushima Y, Nakagahra M, Yano M, Sasaki T y Kurata N (2001). A genome-wide survey of reproductive barriers in an intraspecific hybrid. Genetics 159:883–892.

Harushima Y, Nakagahra M, Yano M, Sasaki T y Kurata N (2002). Diverse variation of reproductive barriers in three intraspecific rice crosses. Genetics 160:313–322.

Hausladen A y Stamler JS (1998). Nitric oxide in plant immunity. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 95, 10345–10347.

Hayashi N, Li CY, Li JL, Naito H (1997a). In vitro production on rice plants of perithecia of *Magnaporthe grisea* from Yunnan, China. Mycological Research 101:1308–1310.

Hayashi N, Li CY, Li JR, Iwano M, Naito H, Yoshino R y Kato H (1997b). Distribution of fertile *Magnaporthe grisea* fungus pathogenic to rice in Yunnan Province, China. Annals of thePhytopathological Society of Japan 63:316–323.

Hayashi K, Yoshida H y Ashikawa I (2006). Development of PCR-based allele specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. Theor. Appl. Genet. 113: 251–260.

Hayashi N y 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.). En: Fukuta Y, Vera Cruz CM y Kobayashi N (eds) Development and characterization of blast resistance using differential varieties in rice. JIRCAS working report No 63. Tsukuba, Ibaraki, Japan, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, pp 11–15.

Hayashi K y Yoshida H (2009). Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene *Pit* by the recruitment of a retrotransposon as a promoter. The Plant Journal. 57: 413–425.

Hayashi N, Inoue H, Kato T, Funao T, Shirota M, Shimizu T, Kanamori H, Yamane H, Hayano-Saito Y, Matsumoto T, Yano M y Takatsuji H (2010). Durable panicle blast-

resistance gene Pb1 encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. Plant J. 64: 498–510.

He YY, Li J, Li C, Kiyosawa S, Higashi T y Horisue N (1989). Gene analysis of blast resistance of Yunnan upland rice variety, Haonaihuan. Oryza, 26: 173–182.

Heath MC (1991). The role of gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. In Phythopathology, pp. 127-130.

Hedrick PW y Muona O (1990). Linkage of viability genes to marker loci in selfing organisms. Heredity 64:67–72.

Hiei Y, Ohta S, Komari T y Kumashiro T (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J. 6, 271-282.

Higashi T y Kushibuchi K (1978). Genetic analysis of field resistance to leaf blast (*Pyricularia oryzae*) in Japan. Japanese Journal of Breeding, 28: 277–286.

Higashi T y Saito S (1985). Linkage group of field resistance genes upland rice variety Sensho to leaf blast caused by *Pyricularia oryzae* Cav. Japanese Journal of Breeding, 35: 438–448.

Hirano T (1994). Studies on the field resistance of rice varieties to blast disease. Bulletin Akita Preferential College of Agriculture, 20: 1–41.

Hirochika H,Guiderdoni E, An G, Hsing YI, Eun MY, Han CD, Upadhyaya N, Ramachandran S, Zhang Q, Pereira A, Sundaresan V y Leung H (2004). Rice mutant resources for gene discovery. Plant Mol. Biol. 54: 325-334.

Hiroyuki K y Terauchi R (2008). Regulation of expression of rice thaumatin-like protein: inducibility by elicitor requires promoter W-box elements. Plant Cell Rep 27: 1521–1528.

Hori S (1898). Blast disease of rice plants. Special Report, Imperial Agricultural Experiment Station, Tokio 1, 1 – 36 [en japonés].

Hossain M y Narciso JH (2003). New rice technologies and challenges for food security in Asia and the Pacific. Sustainable rice production for food security. Proceedings of the 20th Session of the International Rice Commission (Bangkok, Thailand, 23–26 July 2002).

Howard RJ, Ferrari MA, Roach DH y Money NP (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 88:11281–84.

Howard RJ y Valent B (1996). Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen, *Magnaporthe grisea*. Annual Review of Microbiology. 50:491-512.

Hu G, Webb CA y Hulbert SA (1997). Adult plant phenotype of the Rp1–DJ compound rust resistance gene in maize. Phytopathology 87, 236–241.

Hu KM, Qiu DY, Shen XL, Li XH y Wang SP (2008). Isolation and manipulation of quantitative trait loci for disease resistance in rice using a candidate gene approach. Mol Plant 1: 786–793.

Hua L, Wu J, Chen C, Wu W, He X, Lin F, Wang L, Ashikawa I, Matsumoto T, Wang L y Pan Q (2012). The isolation of *Pi1*, an allele at the *Pik* locus which confers broad spectrum resistance to rice blast. Theor Appl Genet. 125:1047–1055.

Hulbert SH, Webb CA, Smith SM y Sun Q (2001). Resistance gene complexes, evolution and utilization. Ann. Rev. Phytopath., 39, 285–312.

Hwang BK, Koh YJ y Chung HS (1987). Effects of adult-plant resistance on blast severity and yield of rice. Plant Disease 71:1035-1038.

Hyne V y Kearsey MJ (1995). QTL analysis: Further uses of marker regression. Theor. Appl. Genet. 91, 471—476.

Ikeda M (1933). Influence of application of various nitrogenous fertilizers on silica content od rice plants. Tottori Society of agriculturalk Sciences 4, 265–270 [resúmen en inglés].

Ishizuka Y y Hayakawa Y (1951). Resístanse of rice plant to the imochi disease (rice blast disease) in relation to its silica and magnesia contents. J. Sci. Soil Manule, Tokio. 21: 252-260 [Jap.; resumen en inglés].

Ito S y Kuribayashi K (1931). Studies on rice blast disease. Farm Bulletin, Department of Agriculture and Forestry, Japón Nº 30, 81pp.

James WC y Shih CS (1973). Relationships between incidence and severity of powdery mildew and leaf rust on winter wheat. Phytopathology 63:183-187.

Jansen R y Stam P (1994). High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. Genetics 136: 1447-1455.

Jarne P y Lagoda J (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol. Evol. 11: 424-430.

Javan-Nikkhah M, McDonald BA, Banke S y Hedjaroude GA (2004). Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR Fingerprinting. European Journal of Plant Pathology 110: 909-919.

Jeanguyot M (1983). Lutte contre la pyricularoise du riz. IRAT. Memoires et Travaux de l'IRAT 2. 55 pp.

Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Jeong DH, Lee J, Kim C, Jang S, Lee S, Yang K, Nam J, An J, Han MJ, Sung RJ, Choi HS, Yu JH, Choi JH, Cho SY, Cha SS, Kim SI y AnG (2000). T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics of rice. Plant J. 22: 561-570.

Jeon J, Chen D, Yi G, Wang G y Ronald P (2003). Genetic and physical mapping of *Pi5(t)*, a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast. Mol Gen Genomics 269:280–289.

Jeung JU, Kim BR, Cho YC, Han SS, Moon HP, Lee YT y Jena KK (2007). A novel gene, *Pi40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance on rice. Theoretical and Applied Genetics, 115: 1163–1177.

Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, y Valent B (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. Eur. Mol. Biol. Org. J. 19: 4004- 4014.

Jia Y y Martin R (2008). Identification of a new locus, *Ptr(t*), required for rice blast resistance gene *Pi-ta*-mediated resistance. Mol Plant Microbe Interact, 21: 396–403.

Jiang HC, Feng YT, Bao L, Li X, Gao GJ, Zhang QL, Xiao JH, Xu CG, He YQ (2012). Improving blast resistance of Jin 23B and its hybrid rice by marker-assisted gene pyramiding. Mol Breed 30(4):1679–1688.

Jiang J, Mou T, Yu H y Zhou F (2015). Molecular breeding of thermo-sensitive genic male sterile (TGMS) lines of rice for blast resistance using *Pi2* gene. Rice 8, 11.

Johal GS y Briggs SP (1992). Reductase activity encoded by the *Hm1* disease resistance gene in maize. Science 258, 985–987.

Johannsen WL (1909). The elements of heredity.

Johnson R (1981). Durable resistance: Definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. Phytopathology 71:567-568.

Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ y Jones JDG (1994). Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. Science, 266, 789-793.

Jones DA y Jones JDG (1996). The roles of leucine rich repeats in plant defences. Adv. Bot. Res. Adv. Plant Pathol. 24: 90-167.

Jones JDG y Dangl JL (2006). The plant immune system. Nature. 444, 323–329.

Jorge V (1996). Analyse génétique de la structure des populations européennes de *Magnaporthe grisea*. Master in Plant Pathology, University of Paris-Sud, France.

Kahn RP y Libby JL (1958). The effect of environmental factors and plant age on the infection of rice by the blast fungus, *Pyricularia oryzae*. Phytopathology 48, 25-30.

Kajava AV (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. J. Mol. Biol. 277: 519-527.

Kato H y Kozaka T (1974). Effect of temperature on lesion enlargement and sporulation of *Pyricularia oryzae* in rice leafs. Phytopathology 64: 828-830.

Kankanala P, Czymmek K y Valent B (2007). Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. Plant Cell. 19:706–24

Kankanala P, Mosquera G, Khang CH, Valdovinos-Ponce G y Valent B (2009). Cellular and molecular analyses of biotrophic invasion by the rice blast fungus. En: Wang GL, Valent B. Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease. Springer Science and Business Media, New York, New York, pp 83-91.

Kao CHZ y B Zeng (1997). General formulas for obtaining the MLEs and the asymptotic variance-covariance matrix in mapping for QTL. Genetics 152: 1203-1216.

Kao CHZ, B Zeng y Teasdale RD (1999). Multiple interval mapping for QTL. Genetics 139: 1203-1216.

Katagiri F y Tsuda K (2010). Understanding the Plant Immune System. Molecular Plant-Microbe Interactions. 23: 1531–1536.

Katsube T y Koshimizu Y (1970). Influence of blast disease on harvest in rice plant. I. Effect of panicle infection on yield components and quality. Bulletin of the Tohoku National Agricultural Experiment Station (Morioka: Japón) 39: 55–96.

Kawashima R (1927). Influence of silica on rice blast disease. J. Sci. Soil Manure, Tokio. 1: 86-91 [en japonés].

Kearsey MJ y Farquhar GL (1998). QTL analysis in plants; where are we now? Heredity 80, 137—142.

Kearsey M y Pooni H (1996). The genetical analysis of quantitative traits. Chapman & Hall, London. 133-164.

Keen NT (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. 24: 447–473.

Keen NT (1992). The molecular biology of disease resistance. Plant Molecular Biology. 19:109-122.

Kershaw MJ, Wakley G y Talbot NJ (1998). Complementation of the Mpg1 mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. The EMBO Journal Vol.17 No.14 pp.3838–3849.

Khush GS, Coffman WR y Beachell HM (2001). The history of rice breeding: IRRI's contribution. En: W.G. Rockwood (ed.).Rice Research and Production in the 21st Century: Symposium Honoring Robert F. Chandler, Jr. pp. 117-135. International Rice Research Institute.

Khush GS y Jena KK (2009). Current Status and Future Prospects for Research on Blast Resistance in Rice (*Oryza sativa* L.).Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease 1–10.

Kikuchi S, Satoh K, Nagata T, Kawagashira N, Doi K, Dishimoto N, Yazaki J, Ishikawa M, Yamada H, Ooka H, Hotta I, Kijima K, Namiki T, Ohneda E, Yahagi W, Suzuki K, Li CJ, Ohtsuki K, Shishiki T, Otomo Y, Murakami K, Iida Y, Sugano S, Fujimura T, Suzuki Y, TsunodaY, Kurosaki T, Kodama T, Masuda H, Kobayashi M, Xie Q, Lu M, Narikawa R, Sugiyama A, Mizuno K, Yokomizo S, Niikura J, Ikeda R, Ishibiki J, Kawamata M, Yoshimura A, Miura J, Kusumegi T, Oka M, Ryu R, Ueda M, Matsubara K, Kawai J, Carninci P, Adachi J, Aizawa K, Arakawa T, Fukuda S, Hara A, Hashidume W, Hayatsu N, Imotani K, Ishii Y, Itoh M, Kagawa I, Kondo S, Konno H, Miyazaki A, Osato N, Ota Y, Saito Rl, Sasaki D, Sato K, Shibata K, Shinagawa A, Shiraki T, Yoshino M, Hayashizaki Y, Yasunishi A (2003). Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. In Science,pp. 376-379.

Kinoshita T, Inukai T y Toriyama K (1994). Reports form coordinators; gene symbols for blast resistance newly revised. Rice Genet. Newsl., 11, 16–17.

Kiyosawa S (1984). Establishment of differential varieties for pathogenicity test of rice blast fungus. Rice Genet Newsl 1:95–96.

Kliebenstein DJ *y col*. (2005). Secondary metabolites influence *Arabidopsis/Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. Plant J. 44, 25–36.

Kobayashi A, Genliang B, Shenghai Y y Tomita K (2007 a). Detection of quantitative trait loci for white-back and basal-white kernels under high temperatura stress in japonica rice varieties. Breed. Sci. 57: 107-116.

Kobayashi N, Telebanco-Yanoria MJ, Tsunematsu H, Kato H, Imbe T y Fukuta Y (2007 b). Development of New Sets of International Standard Differential Varieties for Blast Resistance in Rice. JARQ. Japan International Research Center for Agricultural Sciences. 41, 31–37.

Koga H (1989). Histopathology of resistant and susceptible rice plants inoculated with *Pyricularia oryzae* Cavara. J. Agr. Res. Quarterly 23:8-16.

Koide Y, Ikenaga M, Sawamura N, Nishimoto D, Matsubara K, Onishi K, Kanazawa A y Sano Y (2008a). The evolution of sex-independent transmission ratio distortion involving multiple allelic interactions at a single locus in rice. Genetics 180:409–420.

Koide Y, Onishi K, Nishimoto D, Baruah AR, Kanazawa A y Sano Y (2008b). Sex-independent transmission ratio distortion system responsible for reproductive barriers between Asian and African rice species. New Phytol 179:888–900.

Koide Y, Kobayashi N, Xu D y Fukuta Y (2009). Resistance Genes and Selection DNA Markers for Blast Disease in Rice (*Oryza sativa* L.). JARQ 43 (4), 255–280

Koide Y, Telebanco-Yanoria MJ, Fujita D, Tagle AG, Fukuta Y y Kobayashi N (2010). Fine mapping and identification of tightly linked DNA markers of blast resistance gene *Pia* by using an introgression line. Molecular Breeding. Springer Netherlands, Vol 28. 3: 359-366.

Koide Y, Telebanco-Yanoria MJ, De La Peña F, Fukuta Y y Kobayashi N (2011a). Characterization of Rice Blast Isolates by the Differential System and their Application for Mapping a Resistance Gene, *Pi19(t)*. J Phytopathol 159:85–93.

Koide Y, Shinya Y, Ikenaga M, Sawamura N, Matsubara K, Onishi K, Kanazawa A y Sano Y (2011b). Complex genetic nature of sex-independent transmission ratio distortion in Asian rice species: the involvement of unlinked modifiers and sex-specific mechanisms. Heredity 108:242–247.

Koizumi S (2010). Ecological and genetic studies on durable use of blast resistance in rice. J Gen Plant Pathol. 76:406–410.

Komari T, Hiei Y, Ishida Y, Kumashiro T y Kubo T (1998). Advances in cereal gene transfer. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 161-165.

Koornneef A y Pieterse CMJ (2008). Cross talk in defense signaling.Plant Physiol. 146, 839–844.

Kou Y, Li X, Xiao J y Wang S (2010). Identification of genes contributing to quantitative disease resistance in rice. Sci. China Life Sci. 53, 1263–1273.

Kozaka T (1965). Control of rice blast by cultivation practices in Japan. En: The rice blast disease: Proc. Symp. At IRRI, Julio 1963: 421-438. Baltimore, Maryland, Johns Hopkins Press.

Kozaka T (1979). Breeding for and genetics of blast resistance in Japan. En: IRRI, The rice blast workshop, pp. 3-25. IRRI, Los Bafios, Laguna, Filipinas.

Kranz J (1970). Schätzklassen für Krankheitsbefall. Journal of Phytopathology. 69: 131–139. Citado en: Kranz J y Rotem J (1988). Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology. Springer-Verlag Heidelberg. 299pp.

Kranz J y Rotem J (1988). Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology. Springer-Verlag Heidelberg. 299pp.

Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeyer W, Singh RP, Huerta-Espino J *y col*. (2009). A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. Science 323:1360–63.

Kuang H, Richardson T, Carson S, Wilcox P y Bongarten B (1999). Genetic analysis of inbreeding depression in plus tree 850.55 of *Pinus radiata* D. Don. I. Genetic map with distorted markers. Theor Appl Genet. 98: 697-703

Kunkel BN y Brooks DM (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Curr. Opin. Plant Biol. 5, 325–331.

Kumar J, Nelson RJ y Zeigler RS (1999). Population structure and dynamics of *Magnaporthe grisea* in the Indian Himalayas. Genetics 152:971–984.

Kuribayashi K (1928). Studies on overwintering, primary infection, and control of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 2: 99–117.

Kürschner E, Bonman JM, Garrity DP, Tamisin MM, Pabale D y Estrada BA (1992). Effects of nitrogen timing and split application on blast disease in upland rice. Plant Dis. 76:384-389.

Kwon SJ, Cho YC, Kwon SW, Oh CS, Suh JP, Shin YS, Kim YG, Holligan D, Wessler SR, Hwang HG y Ahn SN (2008). QTL mapping of agronomic traits using an RIL population derived from a cross between temperate japonica cultivars in rice (*Oryza sativa* L.). Breeding Science 58: 271-279.

Lai XH, Marchetti MA y Petersen HD (1999). Comparative slow-blasting in rice grown under upland and flooded blast nursery culture. Plant Dis. 83:681-684.

Lamb C y Dixon RA (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:251-275.

Lan L, Chen W, Lai Y, Suo J, Kong Z, Li C, Lu Y, Zhang Y, Zhao X, Zhang X, Zhang Y, Han B, Cheng J y Xue Y (2004). Monitoring of geneexpression profiles and isolation of candidate genes involved in pollination andfertilization in rice (*Oryza sativa* L.) with a 10K cDNA microarray. Plant Mol. Biol.54: 471-487.

Lancashire PD, Bleiholder H, Van Den Boom T, Langelüddeke P, Stauss R, Weber E y Witzenberger A (1991). A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. Ann. Applied Biol., 119: 561-601.

Lander ES y Botstein D (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121:185-199.

Lara-Álvarez I, Tharreau D, Aguilar-Portero M y Castejón-Muñoz M (2010). Evidence for rapid changes in the population genetic structure of *Magnaporthe oryzae* in Southern Spain. Journal of Phytopathology. 158: 785-791.

Lark KG, Chase K, Adelf F, Mansur LM y Orf JH (1995). Interactions between quantitative trait loci in soybean in which trait variation at one locus is conditional upon a specific allele at another. Proc Natl Acad Sci EEUU 92:4656–4660.

Latterell FM, Marchetti MA y Grove RB (1965). Coordination of effort to establish an international system for RACE identification in *Pyricularia oryzae*. En Ou S (ed.). The rice blast disease. Proceedings of a symposium at IRRI, July, 1963. John Hopkins Press. Baltimore, Maryland, EEUU. 257-274.

Leach CM (1980). Influence of Humidity, Red-Infrared Radiation, and Vibration on Spore Discharge by *Pyricularia oryzae.* Ecology and Epidemology Vol. 70, No. 3, 201-204.

Lee MW, Qi M y Yang Y (2001). A novel jasmonic acid-inducible rice myb gene associates with fungal infection and host cell death. Mol. Plant-Microbe Interact. 14: 527-535.

Lee K, Singh P, Chung WC, Ash J, Kim TS *y col*. (2006). Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Fungal Genet. Biol. 43:694–706.

Lee SK, Song MY, Seo YS, Kim HK, Ko S, Cao PJ, Suh JP, Yi G, Roh JH, Lee S, An G, Hahn TR, Wang GL, Ronald P y Jeon JS (2009). Rice *Pi5*-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled-coil-nucleotide-binding-leucine-rich repeat genes. Genetics. 181: 1627–1638.

Lestari P, Trijatmiko KR, Warsun A, Ona I, Vera-Cruz CM y Bustamam M (2011). Mapping quantitative trait loci conferring blast resistance in upland indica rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Crop Science and Biotechnology, 14(1), 57-63.

Leung H, Wu C, Baraoidan M, Bordeos A, Ramos M, Madamba S, Cabauatan P, Vera-Cruz C, Portugal A, Reyes G, Bruskiewich R, McLaren G, Lafitte R, Gregorio G, Bennett J, Brar D, Khush G, Schnable P, Wang G y Leach J (2001). Deletion mutants for functional genomics: progress in phenotyping, sequence assignment, and database development. En: Khush GS, Brar DS y Hardy B (Eds.), Rice Genetics IV. Proceedings of the Fourth International Rice Genetics Symposium, 22-27 October 2000, Los Baños, Philippines, Science Publishers, Inc., New Delhi, India and International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines: 239-251.

Leung H, Zhu Y, Revilla-Molina I, Fan JX, Chen H, Pangga I, Vera-Cruz C, y Mew TW (2003). Using genetic diversity to achieve sustainable rice disease management. Plant Dis. 87:1156-1169.

Leung H, Liu Y, Mauleon R, Satoh K, Kikuchi S, Leach L, Yang J, Zhu XY, Zhao J, Zhang S y Liu B (2011). Dissecting The Molecular Basis Of Broad-Spectrum Disease Resistance In Rice. Plant & Animal Genomes XIX Conference. January 15-19, 2011. Town & Country Convention Center. San Diego, CA. EEUU.

Levinson G y Gutman GA (1987). Slippedstrand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. Molecular and Biology Evolution 4:203-221.

Levy M, Romao J, Marchetti MA y Hamer JE (1991). DNA fingerprinting with a dispersal repeated séquense resolve pathotype diversity in the Rice Blast fungus. The Plant Cell 3: 95–102.

Levy M, Correa-Victoria FJ, Zeigler RS, Xu S y Hamer JE (1993). Genetic diversity of the Rice Blast fungus in disease nursery in Colombia. Phytopathology 82: 1427-1433.

Li CC (1977). Diallel analysis of yield and its component traits in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Breed. Abstract 47: 45.

Li Z, Pinson SR, Park WD, Paterson AH y Stansel JW (1997a). Epistasis for three grain yield components in rice (*Oryza sativa* L.). Genetics 145, 453–465.

Li ZK, Pinson SRM, Patemon AH, Parks WD, Stanselt JW (1997b). Genetics of Hybrid Sterility and Hybrid Breakdown in an Intersubspecific Rice (*Oryza sativa* L.) Population. Genetics 145 1139-1148.

Li ZK, Pinson SRM, Stansel JM y Paterson AH (1998). Genetic dissection of the source-sink relationship affecting fecundity and yield in rice (*Oryza sativa* L.). Mol Breed 4: 419–426.

Li ZK, Luo LJ, Mei HW, Paterson AH, Zhao XH, Zhong DB, Wang YP, Yu XQ, Zhu L, Tabien R, Stansel JW y Ying CS (1999). A “defeated” rice resistance gene acts as a QTL against a virulent strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol. Gen. Genet. 261:58-63.

Li C, Zhou A y Sang T (2006a). Rice domestication by reducing shattering. Science 311: 1936–1939.

Li XM, Quigg RJ, Zhou J, Xu SZ, Masinde G, Mohan S y Baylink DJ (2006b). A critical evaluation of the effect of population size and phenotypic measurement on QTL detection and localization using a large F2 murine mapping population. Genetics and Molecular Biology, 29(1):166-173.

Li LY, Wang L, Jing JX, Li ZQ, Lin F *y col*. (2007a). The *Pik-m* gene, conferring stable resistance to isolates of *Magnaporthe oryzae*, was finely mapped in a crossover-cold region on rice chromosome 11. Mol. Breed. 20: 179–188.

Li YB, Wu CJ, Jiang GH, Wang LQ y He YQ (2007b). Dynamic analysis of rice blast resistance for the assessment of genetic and environmental effects. Plant Breeding, 126: 541–547.

Li W, Lin Z y Zhang X (2007c). A Novel Segregation Distortion in Intraspecific Population of Asian Cotton (*Gossypium arboretum* L.) Detected by Molecular Markers. Journal of Genetics and Genomics. 34(7): 634-640.

Li YB, Wu CJ, Xing YH, Chen HL y He YQ (2008a). Dynamic QTL analysis for rice blast resistance under natural infections conditions.Australian Journal of Crop Science, 2: 73–82.

Li L, Lu K, Chen Z, Mu T, Hu Z y Xinqi L (2008b). Dominance, overdominance and epistasis condition the heterosis in two heterotic rice hybrids. Genetics 180. 1725-1742.

Li H, Kilian A, Zhou M, Wenzl P, Huttner E, Mendham N, McIntyre L y Vaillancourt RE (2010). Construction of a high-density composite map and comparative mapping of segregation distortion regions in barley. Mol Genet Genomics. 284(5):319-31.

Liao CY, Wu P, Hu B y Yi KK (2001). Effects of genetic background and environment on QTLs and epistasis for rice (*Oryza sativa* L.) panicle number. Theor. Appl. Genet. 103: 104-111.

Lin SC (1986). Genetic analysis of minor gene resistance to blast in japonica rice, pp. 451-469. En: Rice Genetics. International Rice Research Institute, Filipinas.

Lin HX, Yamamoto T, Sasaki Ty Yano M (2000). Characterization and detection of epistatic interactions of 3 QTLs, Hd1, Hd2, and Hd3, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. Theor. Appl. Genet. 101: 1021-1028.

Lin F, Chen S, Que Z, Wang L, Liu X y Pan Q (2007). The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. Genetics 177:1871-1880.

Lindhout P (2002). The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. Euphytica 124:217–26.

Ling KC y Ou SH (1969). Standardization of the international race numbers of *Pyricularia oryzae*. Phytopathology. 82, 746-749.

Ling ZZ, Mew TV, Wang JL, Lei CN y Huang N (1995). Development of near-isogenic lines as international differentials of the blast pathogen. Int. Rice Res. Note. 20: 13-14.

Liu G, Lu G, Zeng L y Wang GL (2002). Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. Molecular Genetics and Genomics, 267: 472–480.

Liu PY, Zhu J, Lou XY y Lu Y (2003). A method for marker assisted selection based on QTL with epistatic effects. Genetica 119: 75-86.

Liu B, Zhang SH, Zhu XY, Yang QY, ShZh Wu, Mei MT, Mauleon R, Leach JE, Mew T y Leung H (2004a). Candidate defense genes as predictors of quantitative blast resistance in rice. Mol Plant Microbe Interact 17:146–152.

Liu, PY, Zhu J y Yan L (2006). Impact of QTLxEnvironment Interactions on Genetic Response to Marker-Assited-Selection. Acta Genetica Sinica. 33: 63-71.

Liu G, Yang J, Xu H y Zhu J (2007a). Influence of Epistasis and QTL × Environment Interaction on Heading Date of Rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Genetics and Genomics. 34(7): 608-615.

Liu X, Lin F, Wang L y Pan Q (2007b). The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice CC-NBS-LRR gene which confers race-specific resistance to the blast fungus. Genetics 176:2541-2549.

Liu B, Zhu XY, Zhang SH, Wu JL, Han SS, Cho YC, Roh JH, Leach JE, Liu Y, Madamba S, Bordeos A, Baraoidan M, Oña I, Vera-Cruz CM y Leung H (2009). What it takes to achieve durable resistance to rice blast? En: Wang GL y Valent B (eds) Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease. Springer, Netherlands, 385–402.

Liu J, Wang X, Mitchell T, Hu Y, Liu X, Dai LY y Wang GL (2010a). Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. Mol Plant Pathol 11:419–427.

Liu X, Guo L, You J, Liu X, He Y, Yuan J, Liu G y Feng Z (2010b). Progress of Segregation Distortion in Genetic Mapping of Plants. Research Journal of Agronomy, 4: 78-83.

Liu Y, Zhu XY, Zhang S, Bernardo M, Edwards J, Galbraith DW, Leach J, Zhang G, Liu B y Leung H (2011). Dissecting quantitative resistance against blast disease using heterogeneous inbred family lines in rice. Theor Appl Genet. 122(2):341-53.

Loan LC, Du PV y Li Z (2003). Identification of genes conffering resistance to some Philippine and Vietnamese races of blast. Omonrice 11: 49-62.

Londo JP, Chiang YC, Hung KH, Chiang TY y Schaal BA (2006). Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. Proc Natl Acad Sci EEUU 103:9578–9583.

Long DH, Lee FN y TeBeest DO (2000). Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. Plant Dis 84, 403–409.

Long DH, Correll JC, Lee FN y TeBeest DO (2001). Rice blast epidemics initiated by infested rice grain on the soil surface. Plant Disease 85: 612-616.

López G, Ballesteros R, Castells J y Batalla JA (1975). El arroz en España. Federación Sindical de Agricultores Arroceros. Valencia, España.

Lopez-Gerena J (2006). Mapping QTL controlling durable resistance to rice blast in the cultivar Oryzica Llanos 5. Manhattan, Kansas, Kansas State University. 128 pp.

Lorang JM, Sweat TA y Wolpert TJ (2007). Plant disease susceptibility conferred by a 'resistance' gene. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 104, 14861–14866.

Lorieux M, Goffinet B, Perrier X, González de León D y Lanaud C (1995). Maximum-likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion. 1. Backcross populations. Theor. Appl. Genet. 90: 73 – 80.

Lu CF, Shen LS, Tan ZB, Xu YB, He P, Chen Y y Zhu LH (1996). Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled-haploid population. Theor. Appl. Genet. 93: 1211-1217.

Luangsa-Ard J, Mekwatanakarn P, Surin A y Roumen E (1997). Identification of hermaphroditic isolates and the start of fungal genetic studies on the rice blast pathogen

(*Magnaporthe grisea*) in Thailand. En Toenniessen G. (compilador). General Meeting of the International Program for Rice Biotechnology. Malacca, Malaysia, p. 234. Rockefeller Foundation.

Luck JE, Lawrence GJ, Dodds PN, Shepherd KW y Ellis JG (2000). Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. Plant Cell 12: 1367–1377.

Luján N (1997). Historia de la gastronomía. Ed. Folio.

Luo L y Xu S (2003). Mapping viability loci using molecular markers. Heredity. 90, 459–467.

Lynch M, y Walsh B (1988). Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sunderland, MA, Sinauer.

Lyttle TW (1991). Segregation distorters. Annu. Rev. Genet. 25: 511-557.

MacDonald AJ, Walter M, Trought M, Frampton CM y Burnip G (2000). Survey of olive leaf spot in New Zealand. New Zealand Plant Protection 53: 126–132.

Mackay TFC (2009). Q&A: Genetic analysis of quantitative traits. Journal of Biology 2009, 8:23.

Mackill DJ y Bonman JM (1992). Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. Phytopathology 82, 746-749.

Madriz-Ordeñana K (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63 p. 22-32.

Maekawa M y Kita F (1985). New gametophyte genes located in the third linkage group (chromosome 3) of rice. Jpn. J. Breed. 35, 25–31.

Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ y Cameron RK. (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. Nature 419:399–403.

Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL y Dietrich RA (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. Nat. Genet. 26: 403-410.

Manandhar HK, Shrestha K y Amatya P (1992). Seed-borne diseases. En: Mathur SB *y col.* (eds) Plant diseases, seed production and seed health testing in Nepal. Danish Government, Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen, pp 59–74.

Manosalva PM, Davidson RM, Liu B, Zhu XY, Hulbert SH, Leung H y Leach JE (2009). A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. Plant Physiol 149:286–296.

Marcel TC *y col*. (2008). Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. New Phytol. 177, 743–755.

Marchetti MA y Bonman JM (1989). Rice Blast Disease Management. En: Sreenivasaprasad S y Johnson R (eds.). Major Fungal Diseases of Rice: Recent Advances.

Markert CL y Møller F (1959). Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic, and species specific patterns. Biochem. 45:753-763.

Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganal MW, Spivey R, Wu T, Earle ED y Tanksley SD (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistence in tomato. Science, 262: 1432-1436.

Matsumura H, Nirasawa S y Terauchi R (1999). Technical advance: transcript profiling in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE). Plant J 20, 719-726.

Matsushita S, Iseki T, Fukuta Y, Araki E, Kobayashi S, Osaki M y Yamagishi M (2003). Characterization of segregation distortionon chromosome 3 induced in wide hybridization between indica and japonica type rice varieties. Euphytica 134, 27–32.

Matsuyama N y Dimond AE (1973). Effect of nitrogenous fertilizer on biochemical processes that could affect lesion size of rice blast. Phytopathology 63:1202-1203.

Matsuyama N (1975). The effect of ample nitrogen fertilizer on cell-wall materials and its significance to rice blast disease. Annals of the Phytopathological Society of Japan 41, 56 – 61.

Maughan PJ, Saghai Maroof MA y Buss GR (1996). Molecularmarker analysis of seed-weight: genomic locations, gene action, and evidence for orthologous evolution among three legume species. Theor Appl Genet 93:574–579.

McCouch SR y Doerge RW (1995). QTL mapping in rice. Trends Genet 11: 482–487.

McCouch S (1998). Toward a plant genomics initiative: thoughts on the value of cross-species and cross-genera comparisons in the grasses. Proc Natl Acad Sci EEUU 95:1983-1985.

McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D y Stein L (2002). Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). DNA Research 2002 9(6):199-207.

McDonald BA y Linde C (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annu Rev Phytopathol. 40: 349-379.

McDowell JM, Dhandaydham M, Long TA, Aarts MG, Goff S *y col*. (1998). Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of Arabidopsis. Plant Cell 10: 1861–1874.

McDowell JM y Dangl JL (2000). Signal transduction in the plant immune response. Trends In Biochemical Science 25:79-82.

McMillan I y Robertson A (1974). The power of methods for the detection of major genes affecting quantitative characters. Heredity 32: 349-356.

McNally KL, Bruskiewich R, Mackill D, Buell CR, Leach JE y Leung H. (2006). Sequencing multiple and diverse rice varieties. Connecting whole-genome variation with phenotypes. Plant Physiol 141, 26-31.

Mehrotra RS, (1998). Plant Pathology, Tata MC Grow Hill Pub. Co. Ltd., New Delhi.

Mei HW, Li ZK, Shu QY, Guo LB, Wang YP, Yu XQ, Ying CS y Luo LJ (2005). Gene actions of QTLs affecting several agronomic traits resolved in a recombinant inbred rice population and two backcross populations. Theor Appl Genet. 110(4):649-59.

Meier U *y col*. (2001). Growth stages of mono-and dicotyledonous plants – BBCH Monograph. Centro Federal de Investigaciones Biológicas para Agricultura y Silvicultura. Blackwell Wissenschafts-verlag. Berlin.

Mekwatanakarn P, Kositratana W, Phromraksa T y Zeigler RS (1999). Sexualy fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. Plant Disease 83:939–943.

Mekwatanakarn P, Kositratana W, Levy M y Zeigler RS (2000). Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice lines near-isogenic for major resistance genes. Plant Dis. 84:60–70.

Mew TV, Parco AS, Hittalmani S, Inukai T y Nelson R (1994). Fine-mapping of major genes for blast resistance in rice. Rice Genet. Newsl. 11:126-128.

Meyers BC, Shen KA, Rohani P, Gaut B y Michelmore R (1998). Receptor-like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. Plant Cell. 10: 1833-1846.

Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW y Young ND (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. Plant J 20:317–332.

Michelmore RW y Meyers BC (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. Genome Res, 8:1113-1130.

Mishra NS, Tuteja R y Tuteja N (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. Arch Biochem Biophys. 452(1):55-68.

Miya A *y col*. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 104, 19613–19618.

Miyamoto M, Yano M y Hirasawa H (2001). Mapping quantitative trait loci conferring blast field resistance in the Japanese upland rice variety Kahei. Breeding Science, 51: 257–261.

Miyao A, Tanaka K, Murata K, Sawaki H, Takeda S, Abe K, Shinozuka Y, Onosato K y Hirochika H (2003). Target site specificity of the Tos17 retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon rich regions of the genome. Plant Cell, 15, 1771–1780.

Mohan M, Nair S, Bhagwat A, Krishna TG, Yano M, Bhatia CR y Sasaki T (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Mol Breed 3: 87–103.

Molina J, Sikora M, Garud N, Flowers JM, Rubinstein S, Reynolds A, Huang P, Jackson S, Schaal BA, Bustamante CD, Boyko AR y Purugganan MD (2011). Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 May 17;108(20):8351-6.

Monosi B, Wisser RJ, Pennill L y Hulbert SH (2004). Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. Theor. Appl. Genet. 109:1434-1447.

Mousanejad S, Alizadeh A y Safaie N (2010b). Assessment of Yield Loss Due to Rice Blast Disease in Iran. J. Agr. Sci. Tech. (2010) Vol. 12: 357-364.

Moxon ER y Wills C (1999). DNA microsatellites: agents of evolution. Scientific American 1: 94-99.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263-73.

Murata J, Kuribayashi K y Kawai I (1933). Studies on the control of rice blast. III. Influence of homemade manure on blast disease. Nogi Kairyo Sirio 64, 1 – 138.

Muthukrishan S, Liang GH, Trick HN y Gill BS (2001). Pathogenesis-Related proetins and their genes in cereals. Plant Cell Tiss Organ Cult, 64: 93-114.

Nagy ED *y col*. (2007). Fine mapping of the Pc locus of *Sorghum bicolor*, a gene controlling the reaction to a fungal pathogen and its host-selective toxin. Theor. Appl. Genet. 114, 961–970.

Nakagahra M (1972). Genetic mechanism on the distorted segregation of marker genes belonging to eleventh linkage group in cultivated rice. Jpn. J. Breed. 22, 232–238.

Nass HA *y col*. (1981). The residual effects of some defeated powdery mildew *Erysiphe graminis f sp tritici* resistance genes in isolines of winter wheat. Phytopathology 71, 1315–1318.

Nguyen TT, Koizumi S, La TN, Zenbayashi KS, Ashizawa T, Yasuda N, Imazaki I y Miyasaka A (2006). *Pi35(t)*, a new gene conferring partial resistance to leaf blast in the rice cultivar Hokkai 188. Theor Appl Genet 113:697–704.

Ni D, Song F, Ni J, Zhang A, Wang C, Zhao K, Yang Y, Wei P, Yang J y Li L (2015). Marker-assisted selection of two-line hybrid rice for diseaseresistance to rice blast and bacterial blight. Field Crops Research 184. 1–8.

Nilsson-Ehle H (1909). Kreuzungsuntersuchungen an Halfer und Weizen. Acta Univ. Lund. Ser. II, 5: 1-122.

Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, Soma M, Nakajima E, Ugaki M y Hibi T (1999). Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. Theor. Appl. Genet. 99:383-390.

Noenplab A, Vanavichit A, Toojinda T, Sirithunya P, Tragoonrung S, Sriprakhon S y Vongsaprom C (2006). QTL Mapping for leaf and neck blast resistance in Khao Dawk Mali105 and Jao Hom Nin recombinant inbred lines. ScienceAsia 32:133–142.

Notteghem JL y Andriatompo GM (1977). Mesure au champ de la resistance horizontale du riz a *Pyricularia oryzae*. Agronomie Tropicale 32, 400-412.

Notteghem JL y Andriatompo GM (1979). Étude de quelques facteurs de la résistance horizontale du riz à la Pyriculariose. Agron. Trop. 34:180-195.

Notteghem JL, Tharreau D, Silue D y Roumen E (1994). Present knowledge on rice resistance genetics and strategies for analysis of M. grisea pathogenicity and avirulence genes. En: Zeigler RS, Leong SA y Teng PS (eds). Rice Blast Disease, Wallingford: CAB International, pp. 155-166.

Nürnberger T y Scheel D (2001). Signal transmission in the plant immune response. Trends Plant Sci. 6, 372-379.

Nuque FL (1970). Panicle blast outbreak in Laguna and Quezon provinces. Report to the IRRI Director General. 2.

Obanor FO, Walter M, Jones EE y Jaspers MV (2005). Sources of variation in a field evaluation of the incidence and severity of olive leaf spot. N. Z. Plant Prot. Soc., Vol. 58: 273-277.

O'Brien RD y Van Bruggen AHC (1992). Accuracy, precision, and correlation to yield loss of disease severity scales for corky root of lettuce. Phytopathology 82: 91–96.

Odjo T, Ahohuendo BC, Onasanya A, Akator K y Séré Y (2011). Analysis of *Magnaporthe oryzae* population structure in Benin. African Journal of Agricultural Research Vol. 6(28), 6183-6188.

Oka HI y Morishima H (1982). Phylogenetic differentiation of cultivated rice, XXIII. Potentiality of wild progenitors to evolve the indica and japonica types of rice cultivars. Euphytica 31:41–50.

Okamoto H (1958). Potassium in relation to rice blast and *Helminthosporium* leaf spot. Symposium on potassium fertilizer: 54-62.

Okuyama Y, Kanzaki H, Abe A, Yoshida K, Tamiru M, Saitoh H, Fujibe T, Matsumura H, Shenton M, Galam Clark D, Undan J, Ito A, Sone T y Terauchi R (2011). A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. Plant J, 66: 467–479

Osbourn AE (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense agains fungal attack. The Plant Cell 8: 1821-1831.

Osca-Lluch JM (2001). Cultivos herbáceos extensivos: Cereales. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia.

Orjuela J, Garavito A, Bouniol M, Arbelaez JD, Moreno L, Kimball J, Wilson G, Rami JF, Tohme J, McCouch SR y Lorieux M (2010). A universal core gentic map for rice. Theor. Appl. Gen. 120: 563-572.

Ou SH (1965). A proposal for an International Program of Research on the rice blast disease. En: Ou SH (ed.). The rice blast disease, pp. 441-446, Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins Press.

Ou SH (1985). Rice Diseases, 2a ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, Reino Unido.

Padhi B, Chakrabarte NK y Nayak SK (1978). Effect of blast on the photosysnthetic activity of rice seedlings. Bio. Plant. 20:418-420.

Padmanabhan SY (1979). Blast resistance in India. En: International Rice Research Institute, 1979. Rice Blast Workshop. Los Baños, Laguna, Filipinas.

Pajerowska-Mukhtar K, Stich B, Achenbach U, Ballvora A, Lübeck J, Strahwald J, Tacke E, Hofferbert HR, Ilarionova E, Bellin D, Walkemeier B, Basekow R, Kersten B y Gebhardt C (2009). Single Nucleotide Polymorphisms in the Allene Oxide Synthase 2 Gene Are Associated With Field Resistance to Late Blight in Populations of Tetraploid Potato Cultivars. Genetics 181: 1115–1127.

Pan Q, Wendel J y Fluhr R (2000). Divergent Evolution of Plant NBS-LRR Resistance Gene Homologues in Dicot and Cereal Genomes. Journal of Molecular Evolution 50: 203-213.

Park SY, Milgroom MG, Han SS, Kang y Lee YH (2003). Diversity of pathotypes and DNA fingerprint haplotypes in populations of *Magnaporthe grisea* in Korea over two decades. Phytopathology 93: 1378-1385.

Parker JE y Coleman M (1997). Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. Trends in Biochemical Science 22:291-296.

Parlevliet JE y van Ommeren A (1975). Partial resistance of barley to leaf rust Puccinia hordei. II. Relationship between field trials microplot tests and latent period. Euphytica 24:293-303.

Parlevliet JE y Zadoks JC (1977). The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. Euphytica 26, 5–21.

Parlevliet JE (1978). Race-specific aspects of polygenic resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei.* Eur. J. Plant Pathol. 84, 121–126.

Parlevliet JE (1983). Can horizontal resistance be recognized in the presence of vertical resistance in plants exposed to a mixture of pathogen races? Phytopathology. 73:379.

Parlevliet JE (1995). Genetic and breeding aspects of durable resistance of crops to pathogens. Agrican Crop Science Journal 3(1):1-13.

Parlevliet JE (2002). Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. Euphytica 124, 147–156.

Pantoja A, Fischer A, Correa-Victoria F, Sanint LR, Ramírez A, Tascón E y García E (1997). MIP en arroz: manejo integrado de plagas: artrópodos, enfermedades y malezas. CIAT, Caracas. 144pp.

Paterson AH (1996a). Making genetic maps. En: Paterson AH (Ed.), Genome Mapping in Plants, pp. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.

Paterson AH (1996b). Mapping genes responsible for differences in phenotype, En: Paterson AH (Ed.), Genome Mapping in Plants, pp. 41–54. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press; Austin, Texas.

Peng S y Khush GS (2003). Four decades of breeding for varietal improvement of irrigated lowland rice in the International Rice Research Institute. Plant Prod. Sci. 6:157-164.

Penning BW *y col*. (2004). A major suppressor of cell death, slm1, modifies the expression of the maize (Zea mays l.) lesion mimic mutation les23. Genome 47, 961–969.

Petersen M *y col*. (2000). *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. Cell 103, 1111–1120.

Piotti E, Rigano MM, Rodino D, Rodolfi M, Castiglione S, Picco AM y Sala F (2005). Genetic Structure of *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. Isolates from Italian Paddy Fields. Journal of Phytopathology, Vol. 153, No. 2., pp. 80-86.

Pinnschmidt HO, Teng PS y Yong L (1994). Methodology for quantifying rice yield effects of blast. En: Zeigler RS y col. (eds). Rice blast disease. CAB International, Wallingford, en asociación con IRRI, Manila, pp 381–408.

Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC y Nelson RJ (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. Trends Plant Science 14: 21–29.

Prabhu AS y Ferreira RP (1991). Avaliação e seleção no melhoramento de arroz visando resistência a brusone e mancha parda. En: Puignau JP (ed.). Mejoramiento de arroz. Montevideo (Uruguay): IICA-PROCISUR, 1991. p75-85.

Prabhu AS, Guimaraes EP, Filippi MC, Araújo LG y Cutrim VA (2002). Expression of resistance in rice hybrids to *Pyricularia grisea*. Fitopatol. bras. 27(5). 454-460.

Puard M, Clément G y Roux-Cuvelier M (1999). Strategies for rice salinity tolerance in Mediterranean France . En Chataigner J (ed.). Future of water management for rice in Mediterranean climate areas: Proceedings of the Sakha Workshops, 5-6 Sep 1998, Egypt. Montpellier CIHEAM-IAMM. 83-96.

Puri K, Shrestha SM, Khhatri-Chhetri GB y Joshi KD (2009). Leaf and neck blast resistance reaction in tropical rice lines under greenhouse conditions. Euphytica. 165: 523-532.

Qin Y, Kim SM y Sohn JK (2008). Detection of Main-effect QTLs, Epistatic QTLs and QE Interactions for Grain Appearance of Brown Rice (*Oryza sativa* L.). J. Crop Sci. Biotech. 11 (2): 151-156.

Qiu D, Xiao J, Ding X, Xiong M, Cai M, Cao Y, Li X, Xu C y Wang S (2007). *OsWRKY13* mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. Mol Plant Microbe Interact. 20:492-499.

Qiu D, Xiao J, Xie W, Liu H, Li X, Xiong L y Wang S (2008). Rice gene network inferred from expression profiling of plants overexpressing *OsWRKY13*, a positive regulator of disease resistance. Mol Plant. 1:538-551.

Qiu D, Xiao J, Xie W, Cheng H, Li X y Wang S (2009). Exploring transcriptional signalling mediated by *OsWRKY13*, a potential regulator of multiple physiological processes in rice. BMC Plant Biol 9: 74.

Qu S, Liu G, Zhou B, Bellizzi M, Zeng L, Dai L, Han B y Wang GL (2006). The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. Genetics 172:1901-1914.

Ra DS, Oh JH, Han SS y Kim CK (1995). Temporal and spacial blast incidence in new cultivars and elite lines of rice in Korea (III). Korean Journal Plant Pathology 11:338-343.

Rakshit S *y col*. (2007). Large-scale DNA polymorphism study of *Oryza sativa* and *O. rufipogon* reveals the origin and divergence of Asian rice. Theor Appl Genet 114: 731–743.

Ramalingam J, Vera Cruz CM, Kukreja K, Chittoor JM, Wu JL, Lee SW, Baraoidan M, George ML, Cohen MB, Hulbert SH, Leach JE y Leung H (2003). Candidate defence genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. Mol. Plant-Microbe Interact. 16:14-24.

Ramkumar G, Biswal AK, Madhan Mohan K, Sakthivel K, Sivaranjani AKP, Neeraja CN, Ram T, Balachandran SM, Sundaram RM, Prasad MS, Viraktamath BC y Madhav MS (2010). Identifying novel alleles of rice blast resistance genes *Pikh* and *Pita* through allele mining. *International Rice Research Notes* 117 (4185). (http://beta.irri.org/publications/ima...)

Ramonell K *y col*. (2005). Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. Plant Physiol. 138, 1027–1036.

Rasmusson JM (1933). A contribution to the theory of quantitative character inheritance. Hereditas 18: 245-261.

Reddy APK, Krishnaiah K, Zhang ZT y Shen Y (1998). Managing vulnerability of hybrid rice to biotic stresses in China and India. En: Virmani SS, Siddiq EA y Muralidharan K (Eds.). Advances in Hybrid Rice Technology. Manila. IRRI. pp.147-156.

Reflinur *y col.* (2014). Analysis of segregation distortion and its relationship to hybrid barriers in rice. Rice 2014 7:3.

Richly E, Kurth J y Leister D (2002). Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. Mol Biol Evol 19:76–84.

Richter TE y Ronald PC (2000). The evolution of disease resistance genes. Plant Mol Bio. 42: 195-204.

Rick CM (1971). Some cytological features of the genome in diploid plant species. Stadler Genet. Symp. 1: 153-174.

Rieseberg LH, Archer MA y Wayne RK (1999). Transgressive segregation, adaptation, and speciation. Heredity 83, 363–372.

Risch N (1992). Genetic linkage: Interpreting LOD scores. Science 255: 803–804.

Roberts WK y Selitrennikoff CP (1990). Zeamatin, anantifungal protein from maize with membranepermeabilizingactivity. J. Gen. Microbial., 136 1771-1778.

Robertson A (1967). The nature of quantitative genetic variation. En: Heritage From Mendel, ed. A Brink, pp. 265–80. Madison, WI: Univ. Wisc.

Robertson DS (1985). A possible technique for isolating genie DNA for quantitative traits in plants. J. Theor. Biol. 117: 1-10

Romer P *y col*. (2007). Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *bs3* resistance gene. Science 318, 645–648.

Romero-Severson J, Lotzer J, Brown C y Murray M (1989). Use of RFLPs for analysis of quantitative trait loci in maize. En: Helentjaris T y Burr B (eds.). Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor. Nueva York. pp: 97-102.

Rong J, Feltus FA, Waghmare VN, Pierce GJ, Chee PW, Draye X, Saranga Y, Wright RJ, Wilkins TA, May OL, Smith CW, Gannaway JR, Wendel JF y Paterson AH (2007). Meta-analysis of polyploid cotton QTL shows unequal contributions of subgenomes to a complex network of genes and gene clusters implicated in lint fiber development. Genetics 176:2577-2588.

Roselló J (2002). Manejo y gestión de cultivos cerealistas de regadío: el arroz. En Manual de Agricultura y Ganadería Ecológica. Edición coordinada por SEAE. Editado por Eumedia SA. Madrid. Con la colaboración de la Diputación de Córdoba.

Roumen EC (1992a). Effect of leaf age on components of partial resistance in rice to leaf blast. Euphytica 63: 271-279.

Roumen EC (1992b). Small differential interactions for partial resistance in rice cultivars to virulent isolates of the blast pathogen. Euphytica. 64:143- 148.

Roumen EC (1992c). Partial resistance to neck blast influenced by stage of panicle development and rice genotype. Euphytica. 64, 173-182.

Roumen EC, Bonman JM y Parlevliet JE (1992c). Leaf age related partial resistance to *Pyricularia oryzae* in tropical lowland rice cultivars as measured by the number of sporulation lesions. Phytopathology 82: 1414–1417.

Roumen EC (1993). Selection for Partial Resistance in Rice to Rice Blast. Landbouwuniversiteit Wageningen. 108 pp.

Roumen EC y de Boef WS (1993). Latent period to leaf blast in rice and its importance as a component of partial resis-tance. Euphytica 69,185–90.

Roumen EC (1994). A strategy for accumulating genes for partial resistance to rice blast disease within a conventional breeding program. En: Ziegler RA, Leong SA y. Teng PS (eds). Rice Blast Disease. CAB International, Wallingford, Reino Unido.

Roumen EC (1996). Response to selection for high and low partial resistance to leaf blast in F2 populations of three rice crosses. Euphytica 89:243-248.

Roumen E, Levy M y Notteghem JL (1997). Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype análisis. European Journal of Plant Pathology 103: 363 – 371 (también en: Cahiers Options Méditerranéennes, vol. 15, nº 3: 119 – 124.)

Rozen S y Skaletsky HJ (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds). Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.

Rubiales D y Niks RE (2004). Durabilidad de la resistencia genética a las enfermedades. En: Nuez F, Pérez de la Vega M, Carrillo JM (eds). Resistencia genética a patógenos vegetales. Universidad Politécnica de Valencia.69-300.

Ruiz C, Bretó MP y Asins MJ (2000). A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. Euphytica 112: 89-94.

Ryu CH, You JH, Kang HG, Hur J, Kim YH, Han MJ, An K, Chung BC, Lee CH y An G (2004). Generation of T-DNA tagging lines with a bidirectional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database. Plant Mol. Biol. 54: 489-502.

Sakamoto M (1940). On the facilitated infection of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cav. Due to the wind. I. Ann phtopath Soc. Japan 10: 119-126.

Sallaud C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau D, Berruyer R, Svestasrani P, Garsmeur O, Ghesquiere A y Notteghem JL (2003). Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. Theor Appl Genet 106:794–803.

Sallaud C, Gay C, Larmye P, Bès M, Piffanelli P, Piégu B, Droc G, Regad F, Bourgeois E, Meynard D, Périn C, Sabau X, Ghesquière A, Glaszmann JC, Delseny M y Guiderdoni E (2004). High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. Plant J. 39: 450-464.

Saleh D, Xu P, Shen Y, Li C, Adreit H, Milazzo J, Ravigné V, Bazin E, Nottéghem JL, Fournier E y Tharreau D (2012). Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. Molecular Ecology. 21, 1330–1344.

Sandler LE y Novitski E (1957). Meiotic drive as an evolutionary force. Am Nat 91:105–110.

Sang T y Ge S (2007a). Genetics and phylogenetics of rice domestication. Curr Opin Genet Dev 17:533–538.

Sang T y Ge S (2007b). The puzzle of rice domestication. J Integr Plant Biol 49:760–768.

Sano Y (1990). The genetic nature of gamete eliminator in rice. Genetics 125, 183–191.

Sasaki R (1923). Existence of strains in rice blast fungus II. Ibid. 10, 1 – 10.

Sax K (1923). The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics. 1923 November; 8(6): 552–560.

Sayed H, Kayyal H, Ramsey L, Ceccarelli S y Baum M (2002). Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat markers. Euphytica 225: 265–272.

Schaefer CH, Miura T, Dupras EF Jr., Wilder WH (1981). Environmental impact of fungicide triphenyltin hydroxide after application to rice fields. J. Econ. Entomol. 74: 597–600.

Schlötterer C y Tautz D (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research, 20: 211-215.

Schlötterer C (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromossoma 109:365-371.

Scofield SR, Tobias CM, Rathjen JP, Chang JH, Labelle DT, Michelmore RW y Staskwicz BJ (1996). Molecular basis of genefor- gene specificity in bacterial speck disease of tomato. Science 268:661-667.

Seem RC y Gilpatrick JD (1980). Incidence and severity relationships of secondary infections of powdery mildew on apple. Phyopathology 70: 851-854.

Seem RC (1984). Disease incidence and severity relationships. Annual Review of Phytopathology 22: 133–150.

Sehnke PC, DeLille JM y Ferl RJ (2002). Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signalinduced transitions in protein activity. Plant Cell 14 (Supl.):339-354.

Selvaraj IC, Pothiraj N, Thiyagarajan K, Bharathi M y Rabindran R (2011). Identification of microsatellite (SSR) and RAPD markers linked to rice blast disease resistance gene in rice (*Oryza sativa* L.) Afr. J. Biotechnol.10:3301–3321.

Sesma A y Osbourn AE (2004). The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. Nature 431:582-586.

Shabi E, Birger R, Lavee S y Klein I (1994). Leaf spot (*Spilocaea oleagina*) on olive in Israel and its control. Acta Hortic., Vol. 356: 390-394.

Shang JJ, Tao Y, Chen XW, Zou Y, Lei CL, Wang J, Li XB, Zhao XF, Zhang MJ, Lu ZK, Xu JC, Cheng ZK, Wan JM y Zhu LH (2009). Identification of a new rice blast resistance gene, *Pid3*, by genome-wide comparison of paired NBS-LRR genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. Genetics 182:1303–1311.

Shindo K y Asaga K (1989). Studies on a new method to evaluate panicle resistance of rice [*Oryza sativa*] varieties to rice blast. Bulletin of the Tohoku National Agricultural Experiment Station. 80: 1-51. [Jap; sumario en inglés]

Shinoda H (1971). Studies on the varietal resistance of rice to blast. 6. Linkage relationship of blast resistance genes, Bull. Chugoku Agric. Exp. St. Ser. A 20 (1971) 1–25 (en japonés).

Shirasu K y Schulze-Lefert P (2000). Regulators of cell death in disease resistance. Plant Mol Biol. 44: 371-385.

Shuyuan S (1980). Fungus diseases of rice in China. En: Rice improvement in china and other Asian countries. International Rice Research Institute and Chinese Academy of Agricultural Sciences. Los Baños, Filipinas.

Sia EA, Butler CA, Dominska M, Greenwell P, Fox TD y Petes TD (2000). Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences 97:250-255.

Silué D y Notteghem JL (1990). Production of perithecia of *Magnaporthe grisea* on rice plants. Mycological Research 94:1151–1152.

Sirithunya P, Tragoonrung S, Vanavichit A, Pa-In N, Vongsaprom C y Toojinda T (2002). Quantitative trait loci associated with leaf and neck blast resistance in recombinant inbred line population of rice (*Oryza sativa*). DNA Res. 9:79-88.

Smith IM, Dunez J, Lelliot RA, Phillips DH y Archer SA (1988). Manual de enfermedades de las plantas. 1ª Edición. Editorial Blackwell Scientific Publications LTD. Oxford. 627 pp.

Sobrizal S y Anggiani S (2007). Rice blast disease in Indonesia. En JIRCAS (Japan International Rice Research Center for Agricultural Services) Working Report (53): 71-79.

Somerville S (2004). Non-host resistance in Arabidopsis. (http://carnegiedpb.stanford.edu/research/shauna/nonhost_resistance_mm.html.)

Song WY, Pi LY, Wang GL, Gardner J, Holsten T y Ronald PC (1997). Evolution of the rice Xa21 disease resistance gene family. Plant Cell, 9, 1279–1287.

Song FM y Goodman RM (2001). Molecular biology of disease resistance in rice. Physiol Mol Plant Pathol 59:1–11.

Sorrells ME *y col*. (2003). Comparative DNA Sequence Analysis of Wheat and Rice Genomes. Genome Research. 13:1818–1827.

Spickett SG y Thoday JM (1966). Regular response to selection. 3. Interaction between located polygenes. Genet Res 7: 96–121.

Stam P (1993). Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. Plant J. 3:739–744.

Strand M, Prolla TA, Liskay RM y Petes TD (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature 365:274-276.

Strasburger E, Noll F, Schenk M y Schimper AWF (2004). Tratado de Botánica. Barcelona. Ed. Omega.

Suarez-Serrano A, Ibáñez C, Lacorte S y Barata C (2010). Ecotoxicological Effects of Rice Field Waters on Selected Planktonic Species: Comparison between Conventional and Organic Farming. Ecotoxicology; Vol. 19 (8), 1523.

Stuber CW, Polacco M y Senior ML (1999). Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential. Crop Sci. 39: 1571-1583.

Sitch LA, Amante AD, Dalmacio RD y Leung H (1989). *Oryza minuta*, a source of blast and bacterial blight resistance for rice improvement, pp. 315–322 En: Mujeeb-Kazi A y Sitch LA (eds). Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985–1988, International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico City, and International Rice Research Institute, Manila, Filipinas.

Sueda H (1928). Studies on the rice blast disease. Rep. Dep. Agric. Govt Res. Inst., Formosa 36: 1 – 30. [en japonés].

Sun Q, Collins NC, Ayliffe M, Smith SM, Drake J *y col*. (2001). Recombination between paralogues at the rp1 rust resistance locus in maize. Genetics 158: 423–438.

Sun X, Cao Y, Yang Z, Xu C, Li X, Wang S y Zhang Q (2004). *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. Plant J. 37:517-527.

Surin A, Arunyanart P, Dhitikiattipong R, Rojanahosdin W, Munkong S y Disthaporn S (1986). Yield Loss Due to Rice Blast (Bl) Disease at Different Crop Stages. Int. Rice Res. Newsletter, 14: 34-35.

Suzuki H (1934 a). Studies on the influence of some environmental factors on the susceptibility of the rice plant to blast and Helminthosporium diseases and on the anatomical characters of the plant. I. Influence of differences in the soil moisture. Journal of the College of Agriculture, Imperial University of Tokio. 13, 45–108.

Suzuki H (1934b). Studies on the influence of some environmental factors on the susceptibility of the rice plant to blast and Helminthosporium diseases and on the anatomical characters of the plant. II. Influence of differences in the soil moisture and amounts of nitrogenous fertilizer given Journal of the College of Agriculture, Imperial University of Tokio. 13, 235-275.

Suzuki H (1934c). Studies on the influence of some environmental factors on the susceptibility of the rice plant to blast and Helminthosporium diseases and on the anatomical characters of the plant. III. Influence of differences in the soil moisture and amounts of fertilizer and silica given. Journal of the College of Agriculture, Imperial University of Tokio. 13, 277-331.

Sy AA, Albertini L y Moletti M (1994). Biological control of rice leaf blast. En: Zeigler RS, Leong SA y Teng PS (ed.). Rice Blast Disease. CAB INTERNATIONAL. Wallingford, Reino Unido. 521-527.

Tabata M, Hirabayashi H, Takeuchi Y, Ando I, Iida Y y Ohsawa R (2007). Mapping of quantitative trait loci for the occurrence of white-back kernels associated with high temperatures during the ripening period of rice (*Oryza sativa* L.). Breed. Sc. 57: 47-52.

Tai GCC, Seabrook JEA y Aziz AN (2000). Linkage analysis of anther derived monoploids showing distorted segregation of molecular markers. Theor Appl Genet 101:126–130.

Takahashi Y (1965). Genetic of resistance to the rice blast disease. En The Rice Blast Disease. Proceedings of a Symposium at International Rice Research Institute, Los Baños, Filipinas. 303-329. John Hopkins press, Baltimore, Maryland.

Takahashi A, Hayashi N, Miyao A y Hirochika H (2010). Unique features of the rice blast resistance *Pish* locus revealed by large scale retrotransposon-tagging. BMC Plant Pathol. 175: 1–14.

Takehisa H, Yasuda M, Fukuta Y, Kobayashi N, Hayashi N, Nakashita H, Abe T y Sato T (2009). Genetic analysis of resistance genes in an Indica-type rice (*Oryza sativa* L.), Kasalath, using DNA markers. Breed Sci 59:253–260.

Talbot NJ (2003). On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. Annu. Rev. Microbiol. 57, 177–202.

Talukder ZI, Tharreau D y Price AH (2004). Quantitative trait loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions. New Phytol. 162:197-209.

Tameling WI, Elzinga SD, Darmin PS, Vossen JH, Takken FL, Haring MA y Cornelissen BJ (2002). The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. Plant Cell, 14, 2929–2939.

Tan L *y col*. (2008). Control of a key transition from prostrate to erect growth in rice domestication. Nat Genet 40:1360–1364.

Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y y Martin GB (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase. Science 274:2060-2063.

Tang T *y col*. (2006). Genomic variation in rice: Genesis of highly polymorphic linkage blocks during domestication. PLoS Genet. 2006, 2:1824-1833.

Tang L, Lu G, Cu Y, Zhang C, Zhang F y Zheng Y (2009). Effect of N level on rice yield, nitrogen accumulation and rice blast occurrence under rice intercropping system. Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI. Universidad de California, Davis, Estados Unidos.

Tanksley SD, Medina-Filho H y Rick CM (1982). Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. Heredity. 49, 11–25.

Tanksley SD y Hewitt J (1988). Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato - a re-examination. Theor Appl Genet 75:811–823.

Tanksley SD (1993). Mapping polygenes. Annual Review of genetics, 27: 205-233.

Tanksley SD y Nelson JC (1995). Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. Theoretical and Applied Genetics. 92: 191-203.

Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G y Katagiri F (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. Plant Cell 15:317-330.

Taylor DR e Ingvarsson PK (2003). Common features of segregation distortion in plants and animals. Genetica 117: 27–35.

Telebanco-Yanoria MJ, Osawa R, Senoo S, Kobayashi N y Fukuta Y (2008). Diversity analysis for resistance of rice (*Oryza sativa* L.) to blast disease [*Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr.] using differential isolates from the Philippines. Plant Breed 127:355–363.

Telebanco-Yanoria MJ, Koide Y, Fukuta Y, Imbe T, Kato H, Tsunematsu H y Kobayashi N (2010). Development of near-isogenic lines of Japonica-type rice variety Lijiangxintuanheigu as differentials for blast resistance. Breeding Science. 60: 629–638.

Templeton GE, Wells BR y Johnston TH (1970). N-fertilizer application closely related to blast at nodes and resultant lodging of rice. Rice J. 73:1.

Tharreau D, Fudal I, Andriantsimialona S, Utami D, Fournier E, Lebrun MH y Nottéghem JL (2009). World Population Structure and Migration of the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. En: Wang GL, Valent B (eds.). Advances in Genetics and Control of Rice Blast Disease. Springer Science+Business Media B.V.

Thoday JM (1961). Location of polygenes. Nature, 191: 368-370.

Thompson JN (1975). Quantitative variation and gene number. Nature 258: 665-668.

Tochinai Y y Shimamura M (1932). Studies on the physiologic specialization in *Pyricularia oryzae* Br. et Cav. Ann phtopath Soc. Japan 2: 414–441.

Tornero P, Chao RA, Luthin WN, Goff SA y Dangl JL (2002). Large scale structure-function analysis of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. Plant Cell, 14, 435–450.

Torres CQ (1986). Effect of Plant Age on the Expression of Resistance to *Pyricularia oryzae* Cav. En: Upland Rice Varieties. University of the Philippines at Los Banos, Laguna, Filipinas.

Torres CQ y Teng PS (1993). Path coefficient and regresión analysis of the effects of leaf and panicle blast on tropical rice yield. Crop Prot. 12: 296-302.

Torró I (2010). Análisis de los factores que determinan la resistencia al encamado y características de grano en arroz (*Oryza sativa* L.), y su asociación con otros caracteres, en varias poblaciones y ambientes: bases genéticas y QTLs implicados. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología.

Tsuda K, Sato M, Stoddard T, Glazebrook J y Katagiri F (2009). Network properties of robust immunity in plants. PLoS Genet.

Tsunematsu H, Telebanco-Yanoria MJ, Ebron LA, Hayashi N, Ando I, Kato H, Imbe T y Khush GS (2000). Development of monogenic lines for rice blast resistance. Breed Sci 50:229–234.

Ueda H, Yamaguchi Y y Sano H (2006). Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATPbound resistance protein, N factor, during the hypersensitive response in tobacco plants. Plant Mol. Biol. 61: 31–45.

Urso S, Desiderio F, Biselli C, Bagnaresi P, Crispino L, Piffanelli P, Abbruscato P, Assenza F, Guarnieri G, Cattivelli L, Valè G (2015). Genetic analysis of durable resistance to *Magnaporthe oryzae* in the rice accession Gigante Vercelli identified two blastresistance loci. Molecular Genetics and Genomics. 1-16

Valasubramanian R (1994). Biological control of rice blast with *Pseudomonas fluorescens* Migula: Role of antifungal antibiotic in disease suppression. Universidad de Madras. India.

Valent B (1990). Rice blast as a model system for plant pathology. Phytopathology 80:33-36.

Valent B, Farrall L y Chumley FG (1991). *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. Genetics 127:87–101.

van der Biezen EA y Jones JDG (1998). Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. Trends Biochem. Sci. 23, 454–456.

van der Plank JE (1968). Disease Resistance in Plants. Academic Press.

van der Hoorn RAL y Kamoun S (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. The Plant Cell. 20: 2009–2017.

Van Deynze AE, Nelson JC, Yglesias ES, Harrington SE, Braga DP, McCouch SR y Sorrells ME (1995a). Comparative mapping in grasses. Wheat relationships. Mol. Gen. Genet. 248: 744-754.

Van Deynze AE, Nelson JC, O'Donoughue LS, Ahn SN, Siripoonwiwat W, Harrington SN, Yglesias ES, Braga D, McCouch SR y Sorrells ME (1995b). Comparative mapping in grasses. Oat relationships. Mol. Gen. Genet. 249: 349-356.

Van Loon LC (1997). Induced resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins. Eur J Plant Pathol 103, 753-765.

Van Loon LC (1999). Occurence and properties of plant pathogenesis related proteins. En: Datta SK y Muthukrishan S (eds).Pathogenesis related proteins in plants. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, EEUU, 1-20.

Van Loon LC, y Van Strien EA (1999). The families of pathogenesis- related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. and Mol. Plant Pathol. 55: 85-97.

Van Loon LC, Rep M y Pieterse CMJ (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu. Rev. Phytopathol. 44: 135-162.

Van Ooijen JW (2006). JoinMap®4, Software for calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B. V., Wageningen, Netherlands.

Van Quynh L y Bong BB (1999). Study on durable resístanse of rice varieties to blast disease in the Mekong delta of Vietnam. Omonrice 7: 9-14.

Vaughan DA, Lu B y Tomooka N (2008). The evolving story of rice evolution. Plant Science 174 (4): 394–408.

Veldboom LR y Lee M (1996). Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments I. Grain yield and yield components. Crop Sci 36: 1310–1319.

Veneault-Fourrey C y Talbot NJ (2005). Moving toward a systems biology approach to the study of fungal pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Adv. Appl. Microbiol. 57:177-215.

Vergne E, Ballini E, Droc G, Tharreau D, Nottéghem JL y Morel JB (2008). Archipelago: a dedicated resource for exploiting past, present, and future genomic data on disease resistance regulation in rice. Mol Plant Microbe Interact 21: 869–878.

Vergne E, Grand X, Ballini E, Chalvon V, Saindrenan P, Tharreau D *y col*. (2010). Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to riceblast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. BMC Plant Biol. 10, 206.

Vigers AJ, Wiedemann S, Roberts WK, Legrand M, Selitrennikoff CP y Fritig B (1992). Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. Plant Sci. 83:155-161.

Vleeshouwers VGAA, Van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S y Colon LT (2000). Does basal PR gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? Physiol. Mol. Plant Pathol. 57:35–42.

Voorrips RE (2002). MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. The Journal of Heredity 93 (1): 77-78.

Wakimoto S y Yoshii H (1958). Relation between polyphenols contained in plants and phytopathogenic fungi (1). Polyphenols contained in rice plants. Annals of the Phytopathological Society of Japan 23, 79–84.

Walsh B (2001). Quantitative genetics. En: Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group.

Wan J *y col*. (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 20, 471–481.

Wang ZY y Tanksley SD (1989). Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. Genome 32: 1113-1118.

Wang Z, Mackill DJ y Bonman JM (1989). Inheritance of partial resistance to blast in Indica rice cultivars. Crop Science 29: 848-853.

Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Champoux MC y Nelson RJ (1994). RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136:1421-1434.

Wang GL, Ruan DL, Song WY, Sideris S, Chen L, Pi LY, Zhang S, Zhang Z, Fauquet C, Gaut BS, Whalen MC, Ronald PC (1998). *Xa21D* encodes a receptor-like molecule with leucine rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. Plant Cell, 3: 1085-1094.

Wang Z, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Katayose Y y Sasaki T (1999). The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. Plant J. 19:55-64.

Wang S, Basten CJ y Zeng ZB (2005). Windows QTL Cartographer. 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm). 2.5.

Wang G, Ding X, Yuan M, Qiu D, Li X, Xu C y Wang S (2006). Dual function of rice OsDR8 gene in disease resistance and thiamine accumulation. Plant Molecular Biology, 60: 437-449.

Wang L, Xu X, Lin F y Pan Q (2009a). Characterization of rice blast resistance genes in the *Pik* cluster and fine mapping of the *Pik-p* locus. Phytopathology 99: 900–905.

Wang SH, Tan XL, Tan YL, Zhang ZL, Wen JC y Kou SY (2009b). Segregation distortion detected in six rice F2 populations generated from reciprocal hybrids at three altitudes. Genet Res 91: 345–353.

Ward JH (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. Journal of the American Statistical Association, 58, 236–244.

Wei F, Wing RA y Wise RP (2002). Genome dynamics and evolution of the Mla (powdery mildew) resistance locus in barley. Plant Cell, 14, 1903–1917.

Wen N, Chu Z y Wang S (2003). Three types of defense-responsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. Mol. Genet. Genomics. 269, 331–339.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA y Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 22: 6531-6535.

Willis GM, Allowitz RD y Menvielle ES (1969). Differential susceptibility of rice leaves and panicles to *Piricularia oryzae*. (http://www.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/852671.pdf) / Resumen: Phytopathology 58: 1072.

Wilson RA y Talbot NJ (2009). Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae.* Nat. Rev. Microbiol. **7:** 185–195.

Wisser RJ, Sun Q, Hulbert SH, Kresovich S, y Nelson RJ (2005). Identification and characterization of regions of the rice genome associated with broad-spectrum, quantitative disease resistance. Genetics 169: 2277-2293.

Wright S (1968). Evolution and the Genetics of Populations, Vol. I, Genetic and Biometric Foundations. University of Chicago Press, Chicago.

Wu JL, Fan YY, Li DB, Zheng KL, Leung H y Zhuang JY (2005). Genetic control of rice blast resistance in the durably resistant cultivar Gumei 2 against multiple isolates. Theoretical and Applied Genetics, 111: 50–56.

Wu YP, Ko PY, Lee WC, Wei FJ, Kuo SC, Ho SW, Hour AL, Hsing YI y Lin YR (2010). Comparative analyses of linkage maps and segregation distortion of two F2 populations derived from *japonica* crossed with *indica* rice. Hereditas 147: 225–236. Lund, Suecia.

Xia JQ, Correll JC, Lee FN, Ross WJy Rhoads DD (2000). Regional population diversity of *Pyricularia grisea* in Arkansas and the influence of host selections. Plant Dis. 84: 877-884.

Xiao W *y col*. (2007). Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (*Zea mays* l.). Theor. Appl. Genet. 115, 501–508.

Xiong LZ y Yang YL (2003). Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. Plant Cell. 15: 745–759.

Xu Y, Zhu L, Xiao J, Huang N y McCouch SR (1997). Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). Mol Gen Genet 253: 535–545.

Xu XM y Madden LV (2002). Incidence and density relationships of powdery mildew on apple. Phytopathology 92:1005-1014.

Xu S (2008). Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. Genetics 180:2201–2208.

Xu X, Hayashi N, Wang CT, Kato H, Fujimura T y Kawasaki S (2008). Efficient authentic fine mapping of the rice blast resistance gene *Pik-h* in the *Pik* cluster, using new *Pik-h*-differentiating isolates. Mol Breed 22:289–299.

Xu S y Hu Z (2009). Mapping Quantitative Trait Loci Using Distorted Markers. International Journal of Plant Genomics.pp 1-11.

Xu *y col*. (2011). Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields markers for identifying agronomically important genes. Nature Biotechnology. 30, 105–111.

Yaegashi H (1994). Use of resistant varieties and disease control for paddy rice. Agric. Hortic. 69(1): 149-154.

Yamada MS, Kiyosawa S, Yamaguchi T, Hirano T, Kobayashi T, Kushibuchi K y Watanabe S (1976). Proposal of a new method for differentiating races of *Pyricularia oryzae* Cavara in Japan. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 42: 216-219.

Yamagishi J, Miyamoto N, Hirotsu S, Laza RC y Nemoto K (2004). QTLs for branching, floret formation, and pre-flowering floret abortion of rice panicle in a temperate *japonica* x tropical *japonica* cross. Theor. Appl. Genet.109: 1555-1561.

Yan J, Zhu J, He C, Benmoussa M y Wu P (1999). Molecular marker-assisted dissection of genotype x environment interaction for plant type traits in rice (*Oryza sativa* L.). Crop Sci. 39: 538-544.

Yang Q, Lin F, Feng S, Wang L y Pan Q (2009). Identification and mapping of *Pi41*, a major gene conferring resistance to rice blast in the *Oryza sativa* subsp. *indica* reference cultivar, 93-11. Theor Appl Genet. 118:1027–1034.

Yang Y, He M, Zhu Z, Li S, Xu Y, Zhang C, Singer S y Wang Y (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness of various forms of abiotic and biotic stress. BMC Plant Biology 54 (5): 743–53.

Ying S, Peiliang Z, Xiaoping Y,Xinhua Z, Levy M (1998). Genetic diversity and geographic distribution of *Magnaporthe grisea* in China. Acta Agriculturae Universitatis Chekianensis. 24(5):493-501.

Yoshihiro T, Mituso H, Hayato H y Futoshi K (2003). Biological control of rice blast disease by *Bacillus subtilis* IK-1080. Annals of the Phytopathological Society of Japan. Vol.69 (2): 85-93.

Yoshino R (1971). A method for detecting hyphae of rice blast in leaf blade epidermis. Proc. Assoc. Plant Prot. Hokuriku Japón 19:14-17.

Young ND (1994). Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers, pp. 39-57. En: Ronald IKV y Phillips L (Eds.), DNA-based markers in plants. Kluwer, Dordrecht/Boston/London.

Young ND (1996). QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. Annu. Rev. Phytopathology. 34: 479-501.

Yu SB, Li JX, Xu CG, Tan YG, GaoYJ, Li XH, Zhang Q y Saghai-Maroof MA (1997). Importance of epistasis as the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU. 94: 9226–9231.

Yu *y col*. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). Science 296: 79-92.

Yuan Q, Ouyang S, Wang A, Zhu W, Maiti R, Lin H, Hamilton J, Haas B, Sultana R, Cheung F, Wortman J y Buell CR (2005). The institute for genomic research osa1 rice genome annotation database. Plant Physiol 138, 18-26.

Yuan B, Zhai C, Wang W, Zeng X, Xu X, Hu H, Lin F, Wang L y Pan Q (2011). The *Pik-p* resistance to *Magnaporthe oryzae* in rice is mediated by a pair of closely linked CC-NBS-LRR genes. Theor Appl Genet. 122: 1017–1028.

Yunoki T, Ezuka A, Sakurai Y, Shinoda H y Toriyama K (1970). Studies on the varietal resistance to rice blast. 3. Testing methods for field resistance on young seedling grown in greenhouse. Bull. Chugoku Natl. Agric. Exp. Stn. E6:1-19.

Zane L, Bargelloni L y Paternello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11: 1-16.

Zaragoza S (2011). Origen y actividades del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 1868 – 2000. Ed. Salvador Zaragoza Adriaenses. Moncada.

Zeigler RS, Tohme J, Nelson R, Levy M y Correa-Victoria FJ (1994). Lineage Exclusion: A proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. pp 267-292. En: Zeigler RS, Leong SA y Teng PS (eds). Rice Blast Disease. CAB INTERNATIONAL. Wallingford, Reino Unido.

Zeigler RS, Cuoc LX, Scott RP, Bernardo MA, Chen D, Valent B y Nelson RJ (1995). The relationship between phylogeny and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. Phytopathology 85: 443-445.

Zeigler RS, Scott RP, Leung H, Bordeos AA y Kumar J (1997). Evidence of parassexual exchange of DNA in rice blast fungus challenges its clonality. Phytopatology 87: 248-287.

Zeigler RS (1998). Recombination in *Magnaporthe grisea*. Annual Review of Phytopathology 36: 245-249.

Zeigler RS y Barclay A (2008). The Relevance of Rice. Rice 1: 3-10.

Zenbayashi K, Ashizawa T, Tani T y Koizumi S (2002). Mapping of the QTL (quantitative trait locus) conferring partial resistance to leaf blast in rice cultivar Chubu 32. Theor. Appl. Genet. 104:547-552.

Zenbayashi-Sawata K, Ashizawa T y Koizumi S (2005). *Pi34- AVRPi34*: a new gene-for-gene interaction for partial resistance in rice to blast caused by *Magnaporthe grisea*. J. Gen. Plant Pathol. 71:395-401.

Zenbayashi-Sawata K, Fukuoka S, Katagiri S, Fujisawa M, Matsumoto T, Ashizawa T y Koizumi S (2007). Genetic and physical mapping of the partial resistance gene *Pi34*, to blast in rice. Phytopathology 97:598-602.

Zeng ZB (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136:1457-1468.

Zhai C, Lin F, Dong Z, He X, Yuan B, Zeng X, Wang L y Pan Q (2011). The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene that emerged after rice domestication. New Phytologist. 189: 321–334.

Zhang QF, Maroof MAS, Lu T y Shen BZ (1992). Genetic diversity and differentiation of *indica* and *japonica* rice detected by RFLP analysis. Theor. Appl. Genet. 83: 495-499.

Zhang WP, Shen XY, Wu P, Hu B y Liao CY (2001). QTLs and epistasis for seminal root length under a different water supply in rice. Theor Appl Genet 103:118–125.

Zhang L, Wang S, Li H, Deng Q, Zheng A, Li S, Li P, Li Z, Wang J (2010). Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F2 populations. Theor Appl Genet 121:1071–1082.

Zhou T, Wang Y, Chen JQ, Araki H, Jing Z, Jiang K, Shen J, Tian D (2004). Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. Molecular Genetics and Genomics, 271: 402–415.

Zhou B, Qu SH, Liu GF, Dolan M, Sakai H, Lu GD, Bellizzi M y Wang G (2006). The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity to *Magnaporthe grisea*. Mol. Plant-Microbe Interact. 19:1216-1228.

Zhu XY, Yang QY, Huo CB y Wu SZ (1996). Studies on the qualitative and quantitative resistance of rice cultivars to blast disease. Chin J Rice Sci 10:181–184.

Zhu Y, Chen H, Fan J, Wang Y, Li Y, Chen J, Fan J, Yang S, Hu L, Loung H, Mow TW, Teng PS, Wang Z y Mundt CC (2000). Genetic diversity and disease control in rice. Nature 406:718-722.

Zhu XY, Yang QY, Liu B, Zhang SH y Wu SZ (2003). The characteristics of resistance to rice blast of SHZ-2 and its derivative varieties. Guangdong Agric Sci 2:37–40.

Zhu YY, Fang H, Wang YY, Fan JX, Yang SS, Mew TW y Mundt CC (2005). Panicle blast and canopy moisture in rice cultivar mixtures. Phytopathology, 95, 433-438.

Zhu QH y Ge S (2005). Phylogenetic relationships among A-genome species of the genus *Oryza* revealed by intron sequences of four nuclear genes. New Phytol 167: 249–265.

Zhu C, Wang C y Zhang YM (2007). Modeling segregation distortion for viability selection. I. Reconstruction of linkage maps with distorted markers. – Theor. Appl. Genet. 114: 295–305.

Zhuang JY, Lin HX, Lu J, Qian HR, Hittalmani S, Huang N y Zheng KL (1997). Analysis of QTL x environment interaction for yield components and plant height in rice. Theoretical and Applied Genetics. 95: 799-808.

Zhuang JY Ma WB Wu JL Chai RY Lu J Fan YY Jim MZ, Leung H *y col.* (2002a). Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and AFLP in rice. Euphytica 128, 363-70.

Zipfel C *y col*. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. Nature 428, 764–767.

8 ANEXOS

Anexo I: Escala adoptada en el primer simposio sobre piriculariosis en el IRRI en 1963 (Ou, 1965)

Valor 1: Muy resistente. Sólo se encuentran pequeñas motas marrones del tamaño de una cabeza de alfiler en las hojas. Su número puede ser variable; a veces, son difíciles de visualizar. Ninguna mota tiene puntos necróticos.

Valor 2: Resistente. En esta categoría las motas marrones son ligeramente mayores (alrededor de ½ mm de diámetro); no hay manchas necróticas.

Valor 3: Moderadamente resistente. Hay pequeñas manchas redondas de color gris, de alrededor de 1-2 mm de diámetro, rodeadas por un borde marrón de forma redonda o elíptica. Puede haber muchas lesiones, pero, normalmente, el tejido foliar no está muerto por la infección.

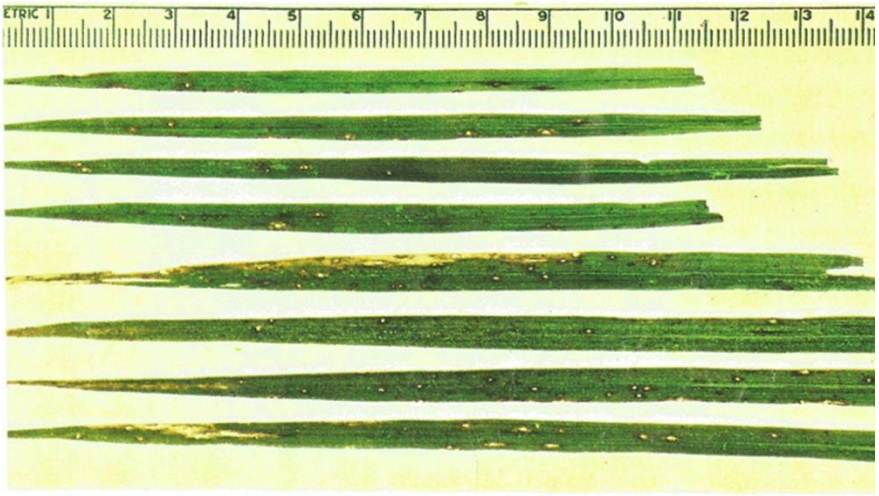
Valor 4: Moderadamente susceptible. Aparecen las lesiones típicas de *M. oryzae*: son elípticas, de 1-2 cm de longitud y, generalmente, están confinadas al área entre las dos venas principales; hay un gran núcleo necrótico de color gris con un borde de color marrón o rojizo. Generalmente, menos del 5% del área foliar está dañada; hay relativamente pocas lesiones en cada hoja.

Valor 5: Susceptible. Hay muchas lesiones grandes, a menudo más largas y anchas que en la categoría anterior. Las puntas de unas pocas hojas pueden estar completamente marchitas por la fusión de las lesiones, pero el área total destruida no supera el 25%.

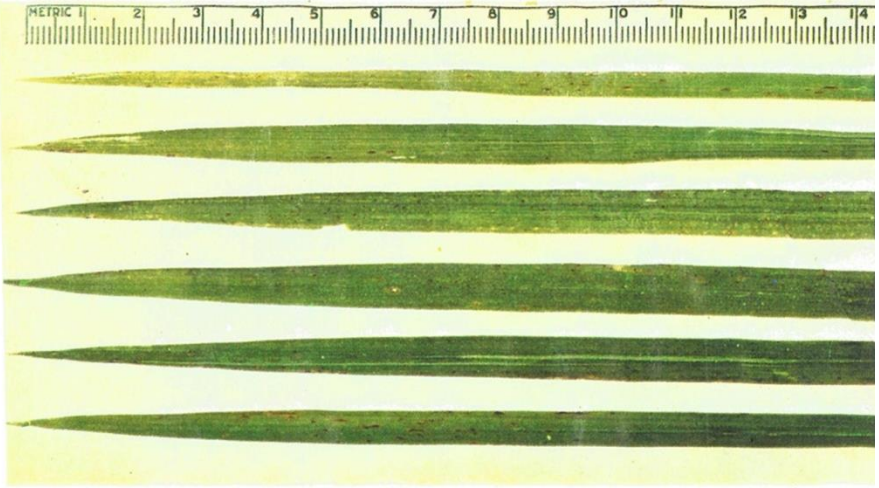
Valor 6: Muy susceptible. Las lesiones son iguales que en la categoría anterior, pero son más numerosas. Unas pocas hojas pueden estar completamente marchitas y el área total destruida puede alcanzar el 50%. Los bordes de las lesiones a menudo tienen un color marrón más amarillento o grisáceo que en la categoría anterior.

Valor 7: Muy susceptible. Se caracteriza por grandes lesiones que se expanden rápidamente, y cuyos bordes son principalmente grises con un matiz marrón; muchas de las hojas desarrolladas están muertas, pero las jóvenes sobreviven. La proporción de hojas muertas oscila entre el 50 y el 100%. La imagen de la izquierda muestra una planta con alrededor del 75% de las hojas muertas; la de la derecha, una con el 100% de hojas muertas.

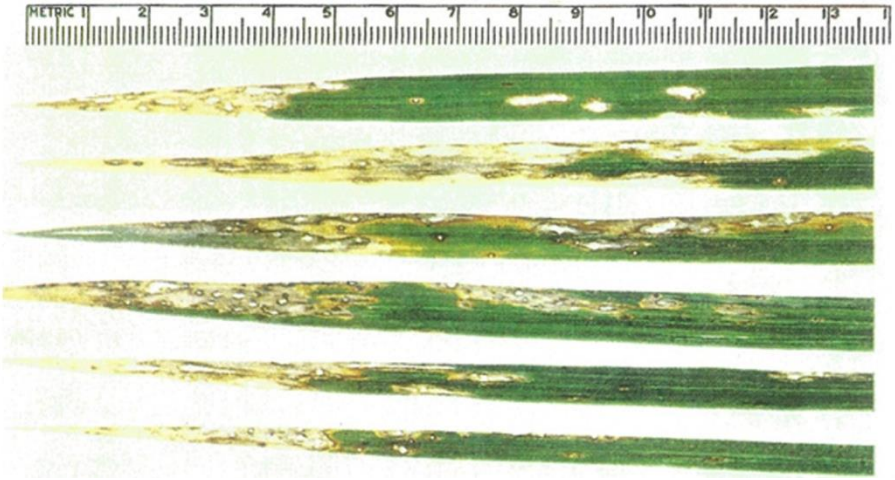
Valor 1: Muy resistente



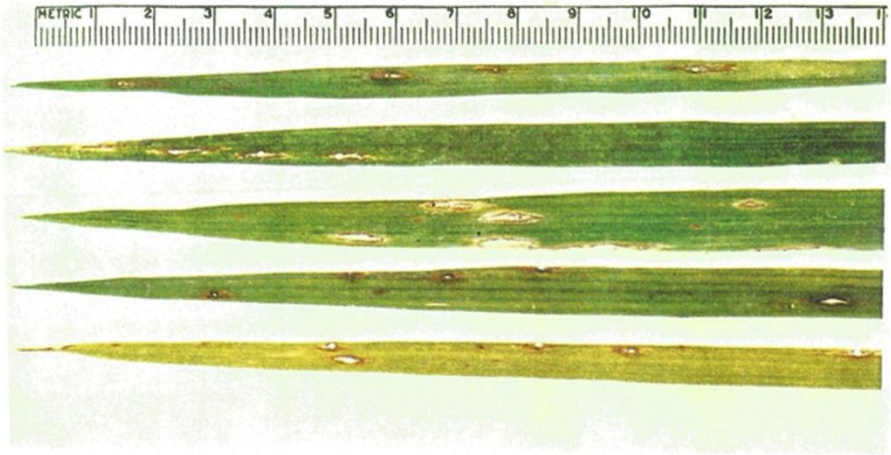
Valor 3: Moderadamente resistente



Valor 2: Resistente



Valor 5: Susceptible



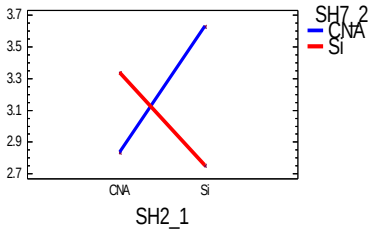
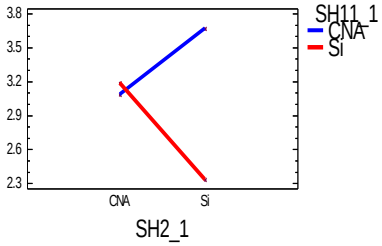
Valor 4: Moderadamente susceptible

Valor 7: Muy susceptible

Valor 6: Muy susceptible

Anexo II: Interacciones aditivas significativas entre QTLs de severidad (SH) y de incidencia en panícula (INC) en el cruzamiento SixCNA

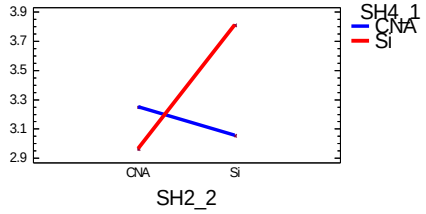
a = valor aditivo (a > 0: el alelo de Si aumenta el carácter, es decir, la susceptibilidad; a < 0: Si disminuye el carácter, es decir, aumenta la resistencia). d = valor dominante. LR: significación del QTL. Significación: Nivel de significación de la interacción.

Is.1	SH2.1				
SH7.2		a	d	LR	
	SH2.1	0,31	0,06	7,3	
	SH7.2	-0,16	0,32	8,9	
	Significación: 0,03				
SH11.1		a	d	LR	
	SH2.1	0,31	0,06	7,3	
	SH11.1	-0,28	0,09	9,1	
	Significación: 0,002				

Is.2 SH2.2

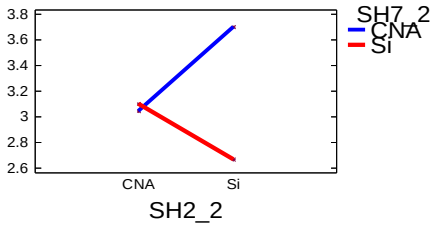
SH4.1

	a	d	LR
SH2.2	0,07	-0,46	12,2
SH4.1	-0,22	-0,05	8,5
Significación: 0,05			



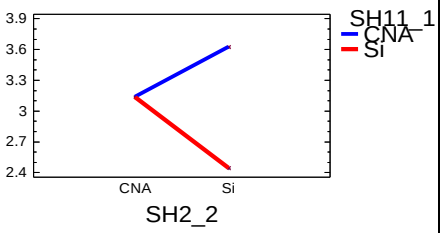
SH7.2

	a	d	LR
SH2.2	0,07	-0,46	12,2
SH7.2	-0,16	0,32	8,9
Significación: 0,05			



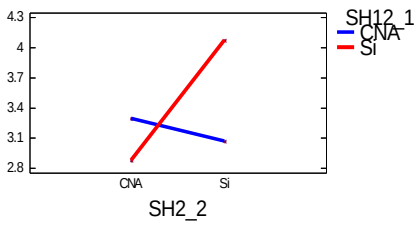
SH11.1

	a	d	LR
SH2.2	0,07	-0,46	12,2
SH11.1	-0,28	0,09	9,1
Significación: 0,004			



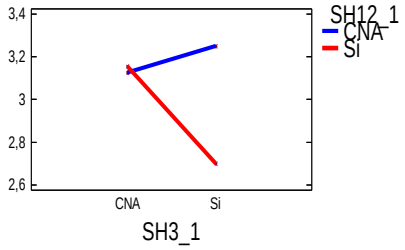
SH12.1

	a	d	LR
SH2.2	0,07	0,46	2,2
SH12.1	0,11	0,36	,9
Significación: 0,01			



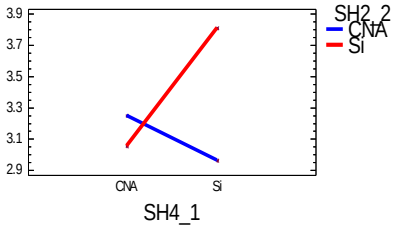
Is.3 SH3.1

		a	d	LR
SH12.1	**SH3.1**	-0,08	0,44	11,5
	SH12.1	0,11	-0,36	6,9
	Significación: 0,02			



Is.4 SH4.1

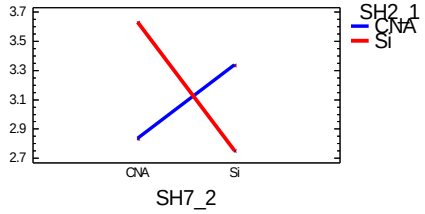
		a	d	LR
SH2.2	**SH4.1**	-0,22	-0,05	8,5
	SH2.2	0,07	-0,46	12,2
	Significación: 0,05			



Is.5 SH7.2

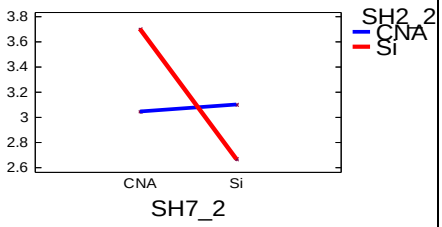
SH2.1

	a	d	LR
SH7.2	-0,16	0,32	8,9
SH2.1	0,31	0,06	7,3
Significación: 0,03			



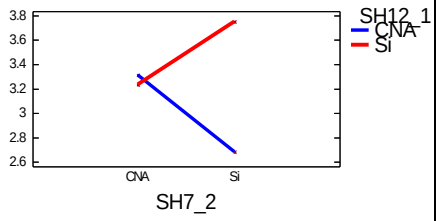
SH2.2

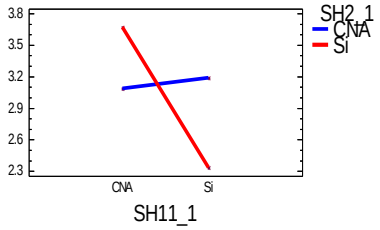
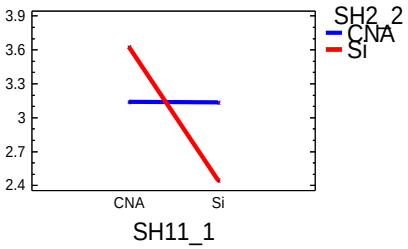
	a	d	LR
SH7.2	-0,16	0,32	8,9
SH2.2	0,07	-0,46	12,2
Significación: 0,05			



SH12.1

	a	d	LR
SH7.2	-0,16	0,32	8,9
SH12.1	0,11	-0,36	6,9
Significación: 0,03			

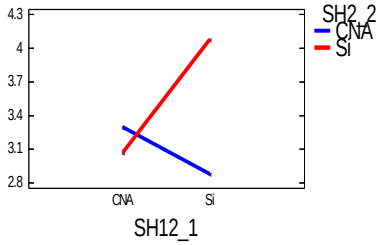


Is.6	SH11.1				
SH2.1		**a**	**d**	**LR**	
	SH11.1	-0,28	0,09	9,1	
	SH2.1	0,31	0,06	7,3	
	Significación: 0,002				
SH2.2		**a**	**d**	**LR**	
	SH11.1	-0,28	0,09	9,1	
	SH2.2	0,07	-0,46	12,2	
	Significación: 0,004				

Is.7 SH12.1

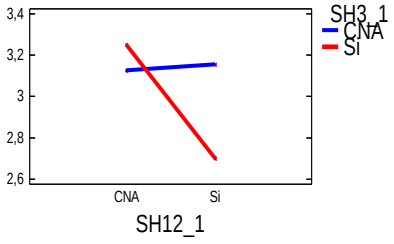
SH2.2

	a	d	LR
SH12.1	0,11	-0,36	6,9
SH2.2	0,31	0,06	7,3
Significación: 0,001			



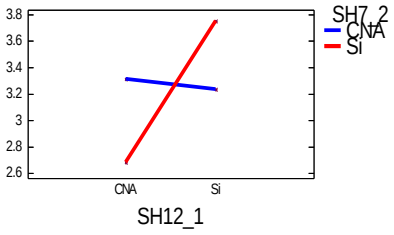
SH3.1

	a	d	LR
SH12.1	0,11	-0,36	6,9
SH3.1	-0,08	0,44	11,5
Significación: 0,02			



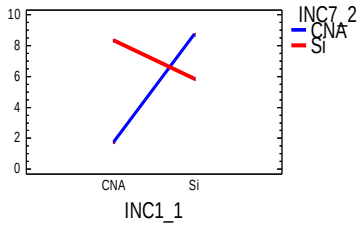
SH7.2

	a	d	LR
SH12.1	0,11	-0,36	6,9
SH7.2	-0,16	0,32	8,9
Significación: 0,03			



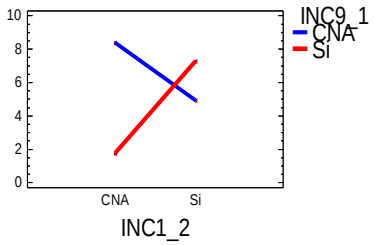
Is.8 INC1.1

INC7.3		a	d	LR
	INC1.1	-1,29	4,03	11,9
	INC7.3	-0,21	-3,16	8,4
	Significación: 0,03			

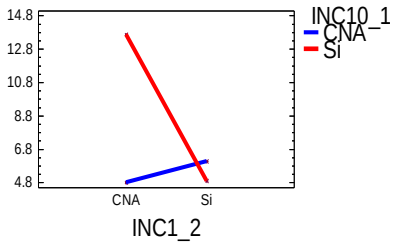


Is.9 INC1.2

INC9.1		a	d	LR
	INC1.2	-3,02	1,28	8,6
	INC9.1	-0,89	5,13	9,4
	Significación: 0,03			

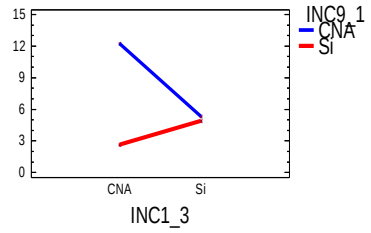


INC10.1		a	d	LR
	INC1.2	-3,02	1,28	8,6
	INC10.1	-2,62	-0,61	8,0
	Significación: 0,04			

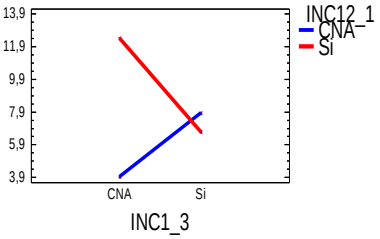


Is.10 INC1.3

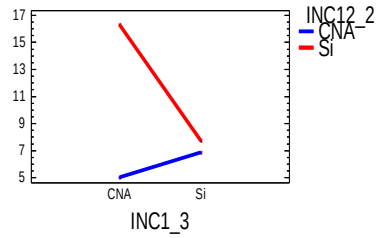
		a	d	LR
INC9.1	**INC1.3**	-2,38	3,94	7,4
	INC9.1	-0,89	5,13	9,4
	Significación: 0,04			



		a	d	LR
INC12.1	**INC1.3**	-2,38	3,94	7,4
	INC12.1	-1,98	-3,27	9,9
	Significación: 0,05			

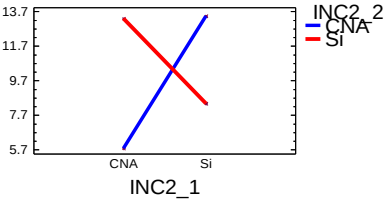


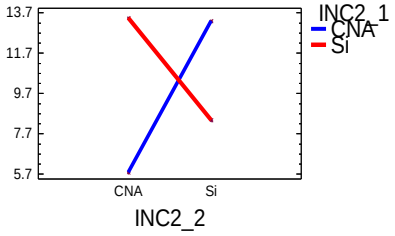
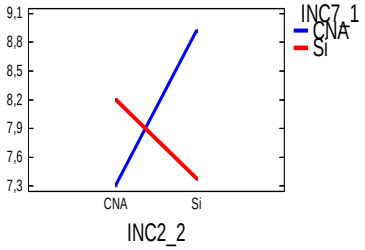
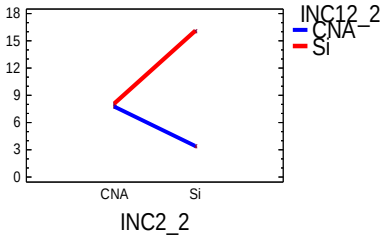
		a	d	LR
INC12.2	**INC1.3**	-2,38	3,94	7,4
	INC12.2	1,14	-3,29	13,4
	Significación: 0,02			

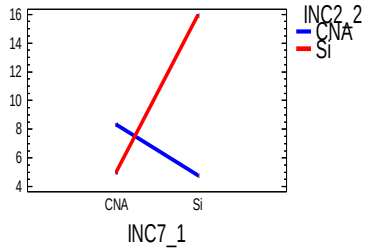
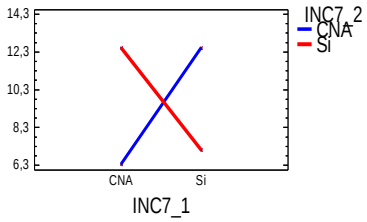
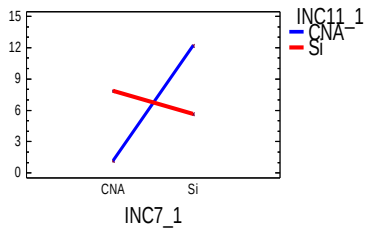


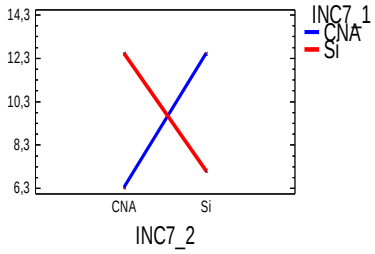
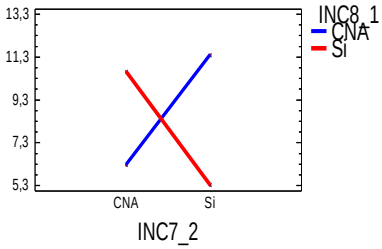
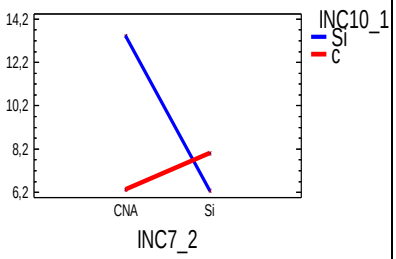
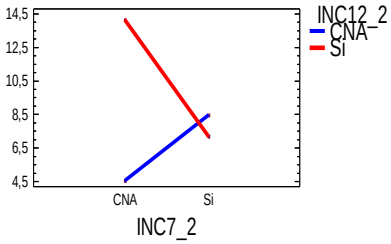
Is.11 INC2.1

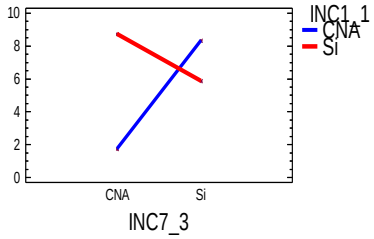
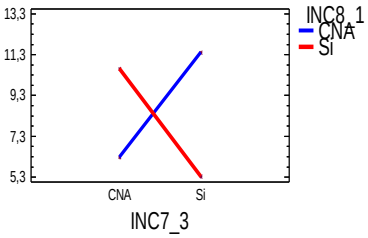
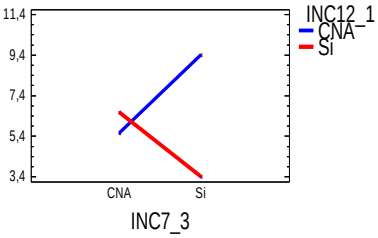
		a	d	LR
INC2.2	**INC2.1**	1,30	-1,62	7,9
	INC2.2	4,12	-4,18	7,9
	Significación: 0,05			



Is.12	INC2.2				
INC2.1		**a**	**d**	**LR**	
	INC2.2	4,12	-4,18	7,9	
	INC2.1	1,30	-1,62	7,9	
	Significación: 0,05				
INC7.1		**a**	**d**	**LR**	
	INC2.2	4,12	-4,18	7,9	
	INC7.1	1,17	-1,70	6,4	
	Significación: 0,01				
INC12.2		**a**	**d**	**LR**	
	INC2.2	4,12	-4,18	7,9	
	INC12.2	1,14	-3,29	13,4	
	Significación: 0,05				

Is.13	INC7.1				
INC2.2		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.1	1,17	-1,70	6,4	
	INC2.2	4,12	-4,18	7,9	
	Significación: 0,01				
INC7.2		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.1	1,17	-1,70	6,4	
	INC7.2	-1,96	-1,71	8,5	
	Significación: 0,05				
INC11.1		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.1	1,17	-1,70	6,4	
	INC11.1	1,30	3,55	9,2	
	Significación: 0,03				

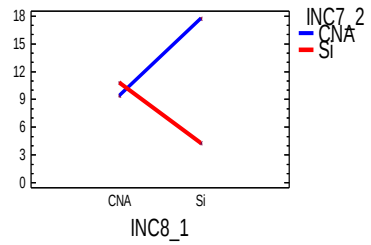
Is14	INC7.2				
INC7.1		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.2	-1,96	-1,71	8,5	
	INC7.1	1,17	-1,70	6,4	
	Significación: 0,05				
INC8.1		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.2	-1,96	-1,71	8,5	
	INC8.1	0,13	-2,75	9,5	
	Significación: 0,04				
INC10.1		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.2	-1,96	-1,71	8,5	
	INC10.1	2,62	-0,61	8,0	
	Significación: 0,05				
INC12.2		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.2	-1,96	-1,71	8,5	
	INC12.2	1,14	-3,29	13,4	
	Significación: 0,04				

Is.15	INC7.3				
INC1.1		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.3	-0,21	3,16	8,4	
	INC1.1	-1,29	4,03	11,9	
	Significación: 0,03				
INC8.1		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.3	-0,21	3,16	8,4	
	INC8.1	0,13	-2,75	9,5	
	Significación: 0,05				
INC12.1		**a**	**d**	**LR**	
	INC7.3	-0,21	3,16	8,4	
	INC12.1	-1,98	-3,27	9,9	
	Significación: 0,05				

Is.16 INC8.1

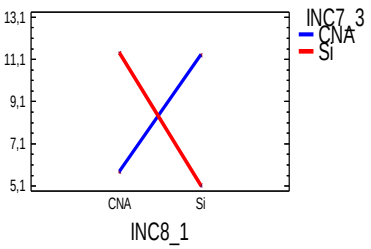
INC7.2

	a	d	LR
INC8.1	0,13	-2,75	9,5
INC7.2	-1,96	-1,71	8,5
Significación: 0,004			



INC7.3

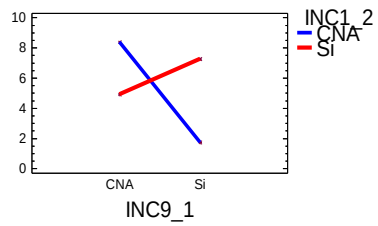
	a	d	LR
INC8.1	0,13	-2,75	9,5
INC7.3	-0,21	3,16	8,4
Significación: 0,05			



Is.17 INC9.1

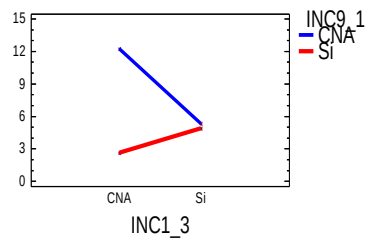
INC1.2

	a	d	LR
INC9.1	-0,89	5,13	9,4
INC1.2	-3,02	1,28	8,6
Significación: 0,004			

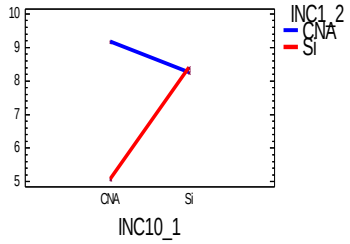


INC1.3

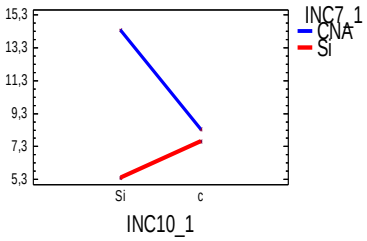
	a	d	LR
INC9.1	-0,89	5,13	9,4
INC1.3	4,12	-4,18	7,9
Significación: 0,04			



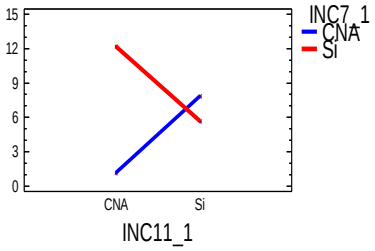
Is.18	INC10.1			
INC1.2		a	d	LR
	INC10.1	2,62	-0,61	8,0
	INC1.2	-3,02	1,28	8,6
	Significación: 0,04			

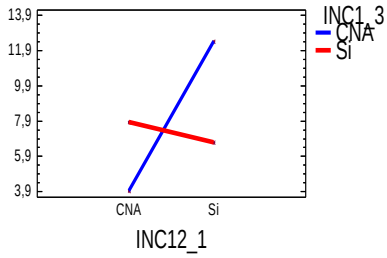
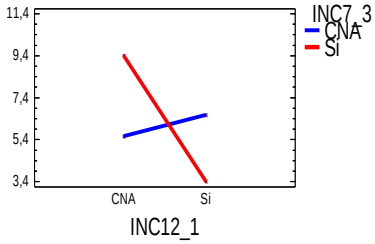


INC7.2		a	d	LR
	INC10.1	2,62	-0,61	8,0
	INC7.2	-1,96	-1,71	8,5
	Significación: 0,04			



Is.19	INC11.1			
INC7.1		a	d	LR
	INC11.1	1,30	3,55	9,2
	INC7.1	1,17	-1,70	6,4
	Significación: 0,03			

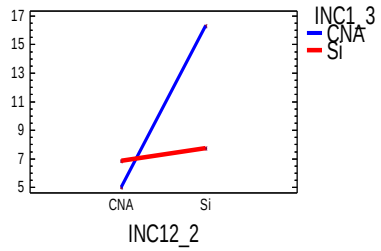


Is.20	INC12.1				
INC1.3		**a**	**d**	**LR**	
	INC12.1	-1,98	-3,27	9,9	
	INC1.3	-2,38	3,94	7,4	
	Significación: 0,05				
INC7.3		**a**	**d**	**LR**	
	INC12.1	-1,98	-3,27	9,9	
	INC7.3	-0,21	3,16	8,4	
	Significación: 0,05				

Is.21 INC12.2

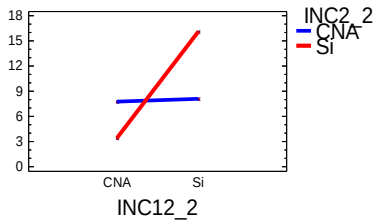
INC1.3

	a	d	LR
INC12.2	1,14	-3,29	13,4
INC1.3	4,12	-4,18	7,9
Significación: 0,01			



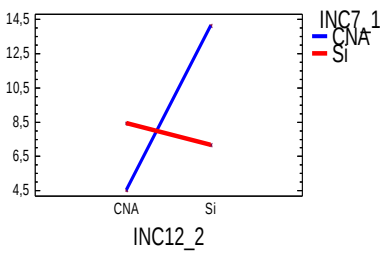
INC2.2

	a	d	LR
INC12.2	1,14	-3,29	13,4
INC2.2	4,12	-4,18	7,9
Significación: 0,05			



INC7.2

	a	d	LR
INC12.2	1,14	-3,29	13,4
INC7.2	-1,96	-1,71	8,5
Significación: 0,04			



Anexo III: Interacciones aditivas significativas entre QTLs de severidad (SH) y de incidencia en panícula (PAN) en JSxGV

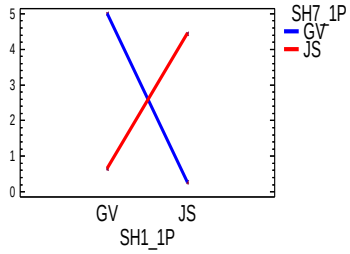
a = valor aditivo (a > 0: el alelo de JS aumenta el carácter, es decir, la susceptibilidad; a < 0: JS disminuye el carácter, es decir, aumenta la resistencia). d = valor dominante. LR: significación del QTL. Significación: Nivel de significación de la interacción.

Ij.1 SH1.1P

SH7.1P

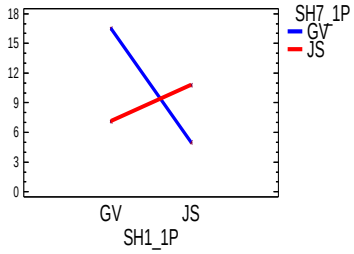
El Palmar

	a	d	NS
SH1.1P	(+)		*
SH7.1P	(-)		*
Significación: 0,07			



Sueca

	a	d	NS
SH1.1P	(+)		*
SH7.1P	(-)		*
Significación: 0,07			

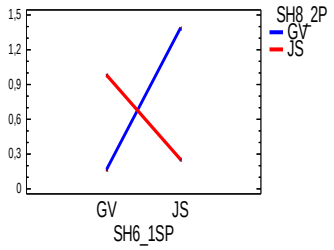


Ij.2 SH6.1S+P

SH8.2P

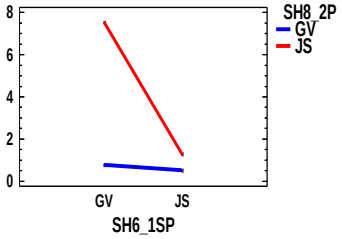
Delta

	a	d	NS
SH6.1S+P	(-)		**
SH8.2P	(+)	-	**
Significación: 0,01			



El Palmar

	a	d	NS
SH6.1S+P	(-)		**
SH8.2P	(+)	-	**
Significación: 0,07			

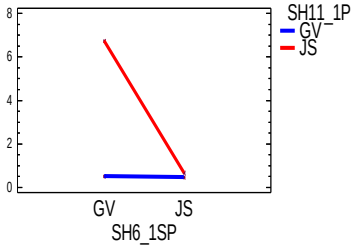


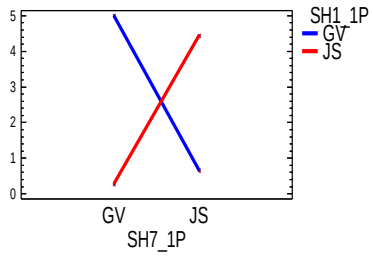
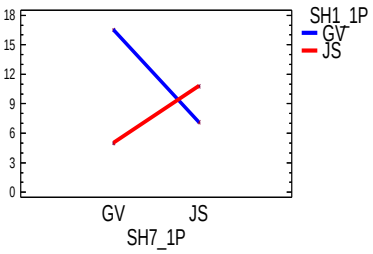
Ij.3 SH6.1S+P

SH11.1P

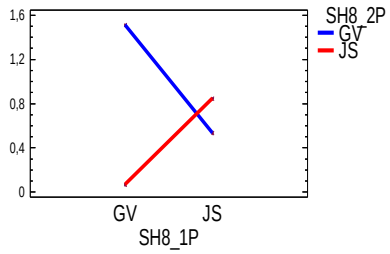
El Palmar

	a	d	NS
SH6.1S+P	(-)		**
SH11.1P	(+)		**
Significación: 0,06			

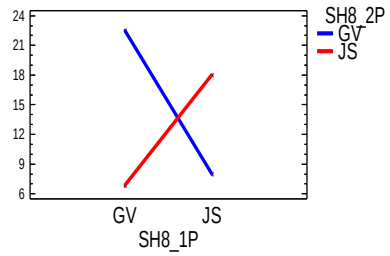


Ij.4	SH7.1P				
SH1.1P	**El Palmar**				
		a	**d**	**NS**	
		SH7.1P	(-)		*
		SH1.1P	(+)		*
		Significación: 0,07			
	Sueca				
		a	**d**	**NS**	
		SH7.1P	(-)		*
		SH1.1P	(+)		*
		Significación: 0,07			

Ij.5	SH8.1P			
SH8.2P	**Delta**			
		a	**d**	**NS**
	SH8.1P	(-)		*
	SH8.2P	(+)		**
	Significación: 0,04			



	Sueca			
		a	**d**	**NS**
	SH8.1P	(-)		*
	SH8.2P	(+)		**
	Significación: 0,001			



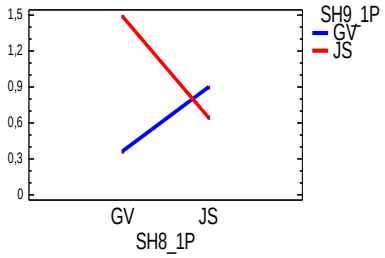
Ij.6 SH8.1P

SH9.1P

Delta

	a	d	NS
SH8.1P	(-)		*
SH9.1P	(-)	(-)	*

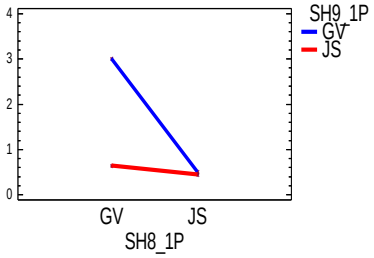
Significación: 0,08

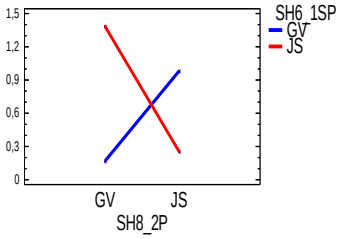
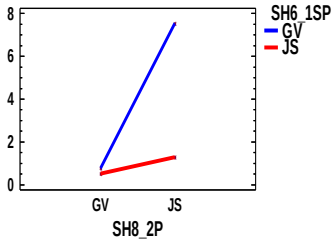


El Palmar

	a	d	NS
SH8.1P	(-)		*
SH9.1P	(-)	(-)	*

Significación: 0,000



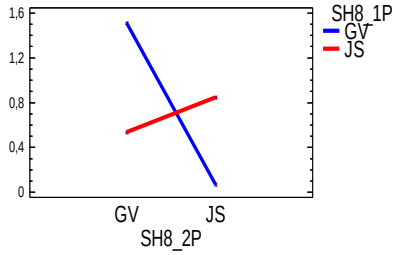
Ij.7	SH8.2P				
SH6.1S+P	**Delta**				
		a	**d**	**NS**	
	SH8.2P	(+)	-	**	
	SH6.1S+P	(-)		**	
	Significación: 0,01				
	El Palmar				
		a	**d**	**NS**	
	SH8.2P	(+)	-	**	
	SH6.1S+P	(-)		**	
	Significación: 0,07				

Ij.8 SH8.2P

SH8.1P

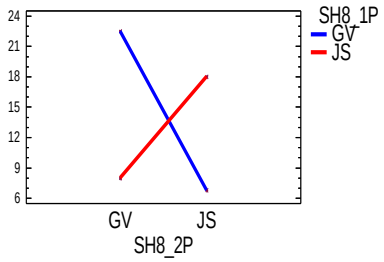
Delta

	a	d	NS
SH8.2P	(+)		**
SH8.1P	(-)		*
Significación: 0,04			



Sueca

	a	d	NS
SH8.2P	(+)		**
SH8.1P	(-)		*
Significación: 0,001			

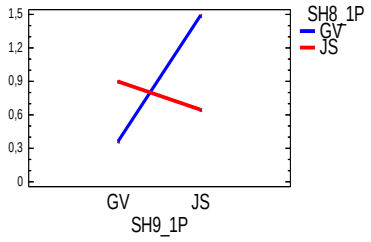


Ij.9 SH9.1P

SH8.1P

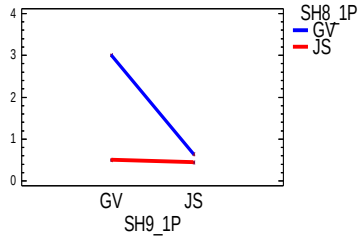
Delta

	a	d	NS
SH9.1P	(-)	(-)	*
SH8.1P	(-)		*
Significación: 0,08			



El Palmar

	a	d	NS
SH9.1P	(-)	(-)	*
SH8.1P	(-)		*
Significación: 0,00			

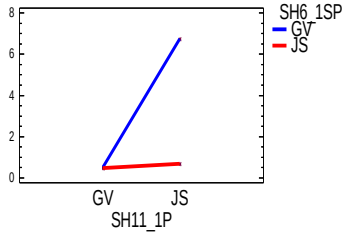


Ij.10 SH11.1P

SH6.1S+P

El Palmar

	a	d	NS
SH11.1P	(+)		**
SH6.1S+P	(-)		**
Significación: 0,06			

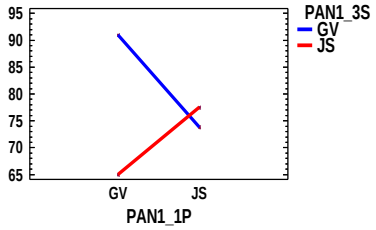


Ij.11 PAN1.1P

PAN1.3S

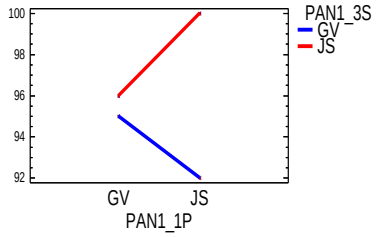
El Palmar

	a	d	NS
INC1.1P	(-)		*
INC1.3S	(+)		*
Significación: 0,06			



Sueca

	a	d	NS
INC1.1P	(-)		*
INC1.3S	(+)		*
Significación: 0,03			

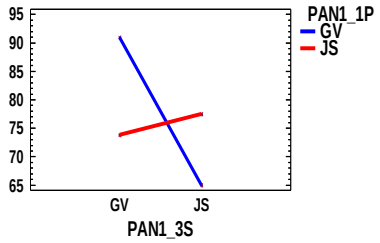


Ij.12 PAN1.3S

PAN1.1P

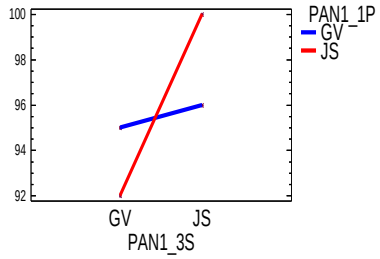
El Palmar

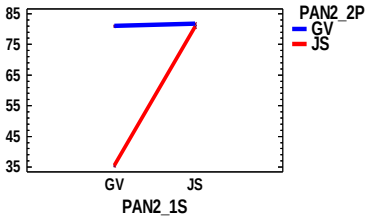
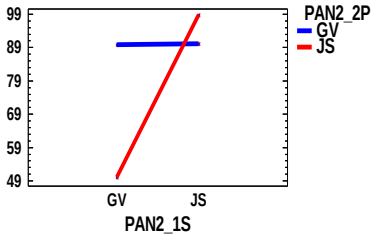
	a	d	NS
INC1.3S	(+)		*
INC1.1P	(-)		*
Significación: 0,06			

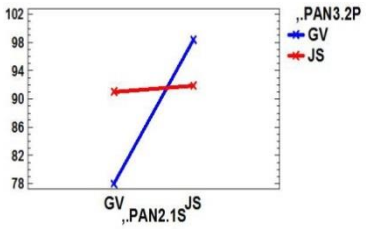


Sueca

	a	d	NS
INC1.3S	(+)		*
INC1.1P	(-)		*
Significación: 0,03			



Ij.13	PAN2.1S				
PAN2.2P	El Palmar				
		a	d	NS	
	PAN2.1S	(+)		*	
	PAN2.2P	(-)		*	
	Significación: 0,02				
	Sueca				
		a	d	NS	
	PAN2.1S	(+)		*	
	PAN2.2P	(-)		*	
	Significación: 0,01				

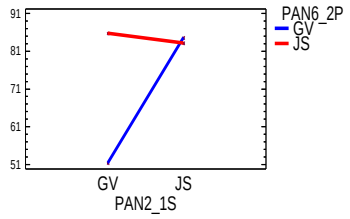
Ij.14	PAN2.1S				
PAN3.2P	Sueca				
		a	d	NS	
	PAN2.1S	(+)		*	
	PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7	
	Significación: 0,09				

Ij.15 PAN2.1S

PAN6.2P

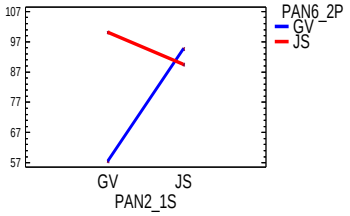
El Palmar

	a	d	NS
PAN2.1S	(+)		*
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
Significación: 0,03			



Sueca

	a	d	NS
PAN2.1S	(+)		*
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
Significación: 0,005			

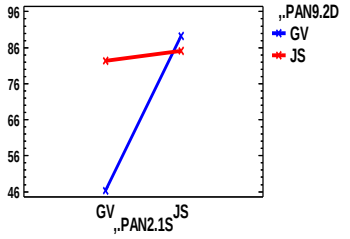


Ij.16 PAN2.1S

PAN9.2P+D

El Palmar

	a	d	NS
PAN2.1S	(+)		*
PAN9.2P+D	(-)	(-)	*
Significación: 0,003			

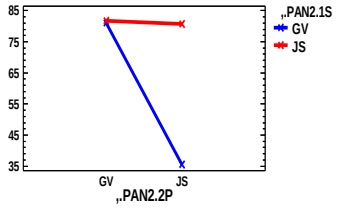


Ij.17 PAN2.2P

PAN2.1S

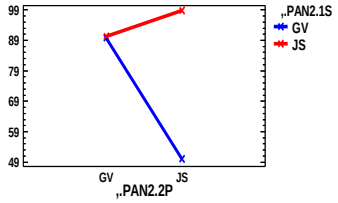
El Palmar

	a	d	NS
PAN2.2P	(-)		*
PAN2.1S	(+)		*
Significación: 0,02			



Sueca

	a	d	NS
PAN2.2P	(-)		*
PAN2.1S	(+)		*
Significación: 0,01			

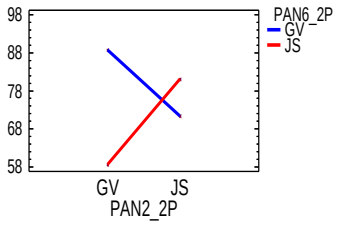


Ij.18 PAN2.2P

PAN6.2P

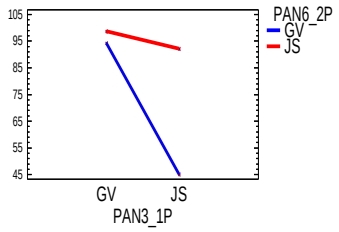
El Palmar

	a	d	NS
PAN2.2P	(-)		*
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
Significación: 0,06			



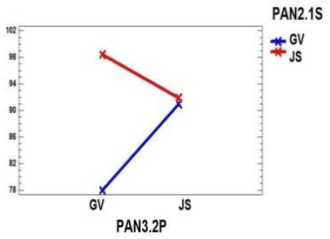
Ij.19 PAN3.1P

	Sueca			
		a	d	NS
PAN6.2P	PAN3.1P	(-)		**
	PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
	Significación: 0,005			



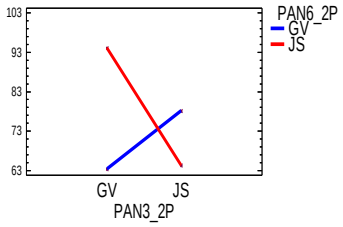
Ij.20 PAN3.2P

	Sueca			
		a	d	NS
PAN2.1S	PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7
	PAN2.1S	(+)		*
	Significación: 0,09			



Ij.21 PAN3.2P

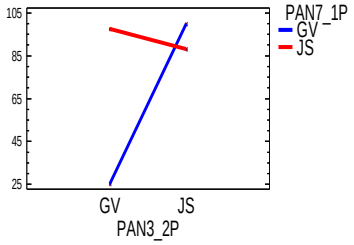
	El Palmar			
		a	d	NS
PAN6.2P	PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7
	PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
	Significación: 0,05			



Ij.22 PAN3.2P

Sueca

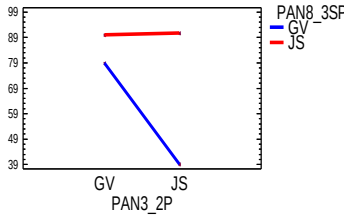
PAN7.1P	a	d	NS
PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7
PAN7.1P	(-)		**
Significación: 0,0002			



Ij.23 PAN3.2P

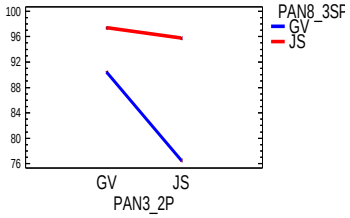
El Palmar

PAN8.3S+P	a	d	NS
PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7
PAN8.3S+P	3,89	8,07	26,2
Significación: 0,02			



Sueca

PAN8.3S+P	a	d	NS
PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7
PAN8.3S+P	(+)	(+)	**
Significación: 0,09			

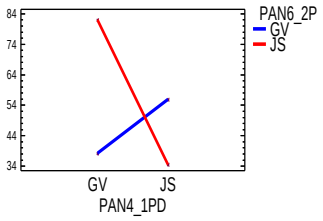


Ij.24 PAN4.1P+D

PAN6.2P

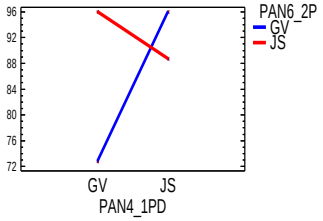
Delta

	a	d	NS
PAN4.1P+D	1,51	0,54	8,0
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
Significación: 0,01			



Sueca

	a	d	NS
PAN4.1P+D	-1,84	6,59	11,0
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
Significación: 0,04			

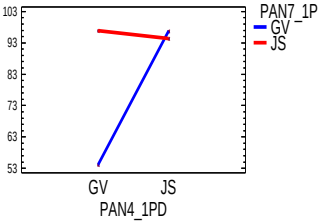


Ij.25 PAN4.1P+D

PAN7.1P

Sueca

	a	d	NS
PAN4.1P+D	-1,84	6,59	11,0
PAN7.1P	(-)		**
Significación: 0,00			



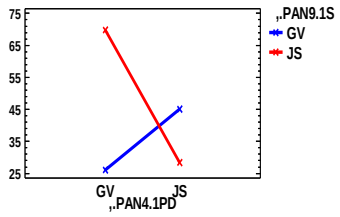
Ij.26 PAN4.1P+D

PAN9.1S

Delta

	a	d	NS
PAN4.1P+D	1,51	0,54	8,0
PAN9.1S	(+)	(+)	*

Significación: 0,01



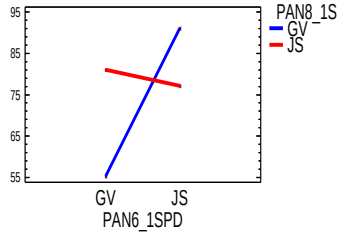
Ij.27 PAN6.1S+P+D

PAN8.1S

El Palmar

	a	d	NS
PAN6.1S+P+D	(+)	(+)	**
PAN8.1S	(+)		*

Significación: 0,004



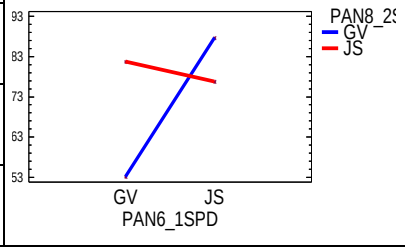
Ij.28 PAN6.1S+P+D

PAN8.2S+P+D

El Palmar

	a	d	NS
PAN6.1S+P+D	(+)	(+)	**
PAN8.2S+P+D	(-)		*

Significación: 0,005

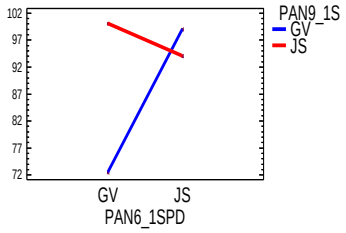


Ij.29 PAN6.1S+P+D

PAN9.1S

Sueca

	a	d	NS
PAN6.1S+P+D	(+)	(+)	**
PAN9.1S	(+)	(+)	*
Significación: 0,07			

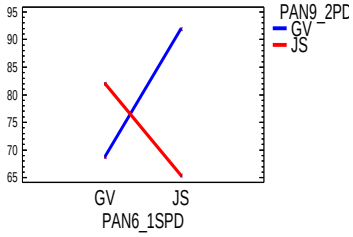


Ij.30 PAN6.1S+P+D

PAN9.2P+D

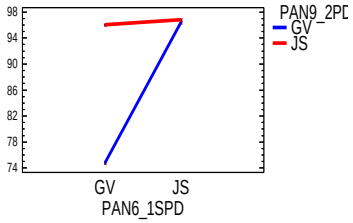
El Palmar

	a	d	NS
PAN6.1S+P+D	(+)	(+)	**
PAN9.2P+D	(-)	(-)	*
Significación: 0,05			



Sueca

	a	d	NS
PAN6.1S+P+D	(+)	(+)	**
PAN9.2P+D	(-)	(-)	*
Significación: 0,11			

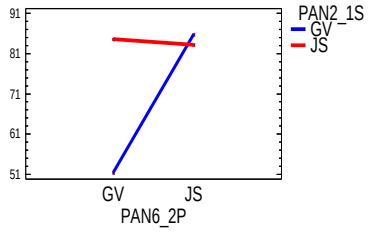


Ij.31 PAN6.2P

PAN2.1S

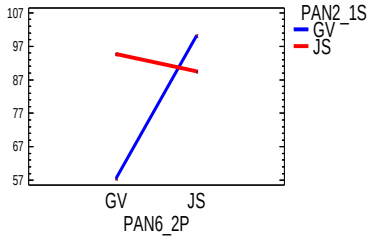
El Palmar

	a	d	NS
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
PAN2.1S	(+)		*
Significación: 0,03			



Sueca

	a	d	NS
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
PAN2.1S	(+)		*
Significación: 0,005			

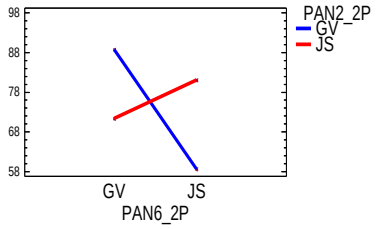


Ij.32 PAN6.2P

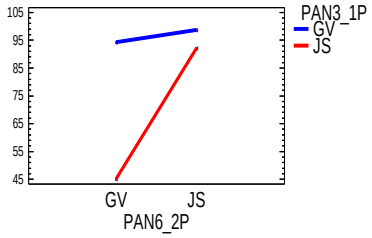
PAN2.2P

El Palmar

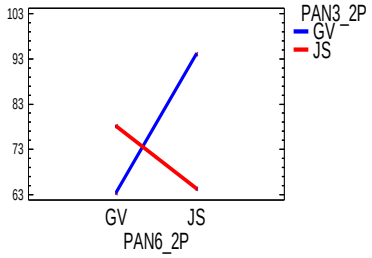
	a	d	NS
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
PAN2.2P	(-)		*
Significación: 0,06			



Ij.33	PAN6.2P				
	Sueca				
		a	d	NS	
PAN3.1P	PAN6.2P	1,88	4,38	10,8	
	PAN3.1P	(-)		**	
	Significación: 0,005				



Ij.34	PAN6.2P				
	El Palmar				
		a	d	NS	
PAN3.2P	PAN6.2P	1,88	4,38	10,8	
	PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7	
	Significación: 0,05				

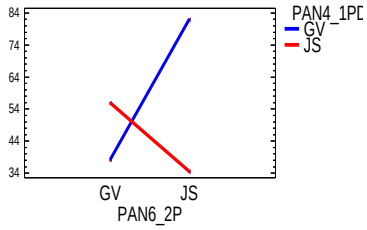


Ij.35 PAN6.2P

PAN4.1P+D

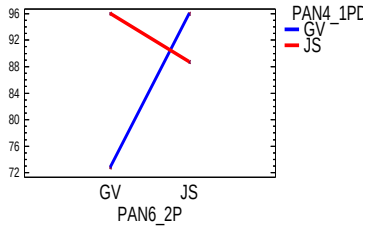
Delta

	a	d	NS
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
PAN4.1P+D	1,51	0,54	8,0
Significación: 0,01			



Sueca

	a	d	NS
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
PAN4.1P+D	-1,84	6,59	11,0
Significación: 0,04			

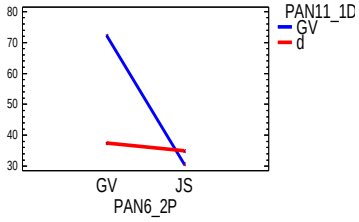


Ij.36 PAN6.2P

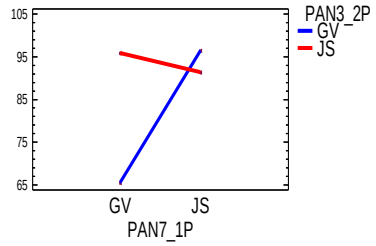
PAN11.1D

Delta

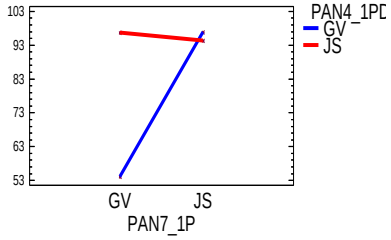
	a	d	NS
PAN6.2P	1,88	4,38	10,8
PAN11.1D	-6,84	-7,06	13,6
Significación: 0,03			



Ij.37	PAN7.1P				
	Sueca				
		a	d	NS	
PAN3.2P	PAN7.1P	(-)		**	
	PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7	
	Significación: 0,00				



Ij.38	PAN7.1P				
	Sueca				
		a	d	NS	
PAN4.1P+D	PAN7.1P	(-)		**	
	PAN4.1P+D	-1,84	6,59	11,0	
	Significación: 0,00				

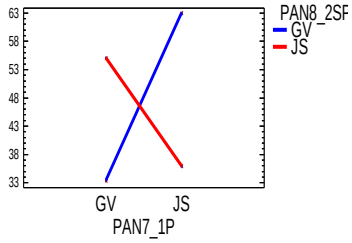


Ij.39 PAN7.1P

PAN8.2S+P+D

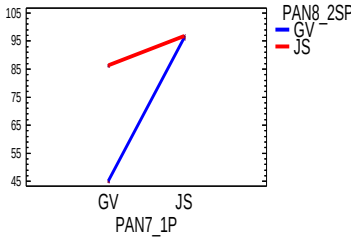
Delta

	a	d	NS
PAN7.1P	(-)		**
PAN8.2S+P+D	-1,36	-5,47	9,2
Significación: 0,06			



Sueca

	a	d	NS
PAN7.1P	(-)		**
PAN8.2S+P+D		(-)	*
Significación: 0,06			

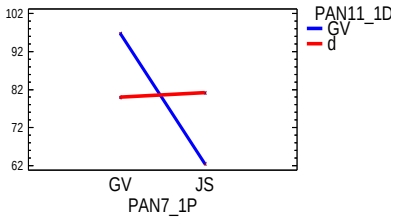


Ij.40 PAN7.1P

PAN11.1D

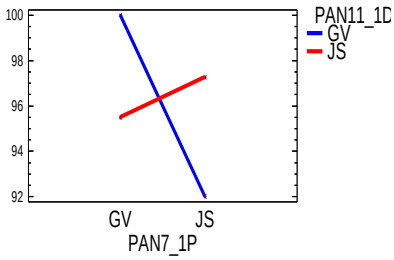
El Palmar

	a	d	NS
PAN7.1P	(-)		**
PAN11.1D	-6,84	-7,06	13,6
Significación: 0,05			



Sueca

	a	d	NS
PAN7.1P	(-)		**
PAN11.1D	-6,84	-7,06	13,6
Significación: 0,09			

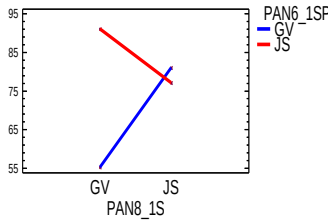


Ij.41 PAN8.1S

PAN6.1S+P+D

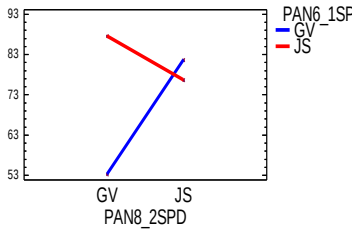
El Palmar

	a	d	NS
PAN8.1S	(+)		*
PAN6.1S+P+D	(+)	(+)	**
Significación: 0,004			



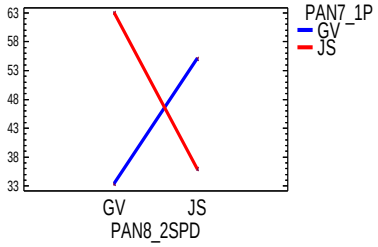
Ij.42 PAN8.2S+P+D

	El Palmar			
		a	d	NS
PAN6.1S+P+D	PAN8.2S+P+D	(-)		*
	PAN6.1S+P+D	(+)	(+)	**
	Significación: 0,005			

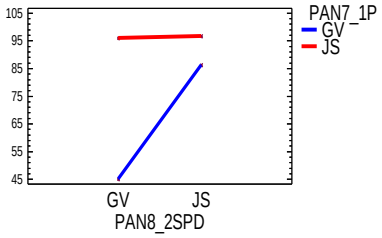


Ij.43 PAN8.2S+P+D

	Delta			
		a	d	NS
PAN7.1P	PAN8.2S+P+D	-1,36	-5,47	9,2
	PAN7.1P	(-)		**
	Significación: 0,06			



	Sueca			
		a	d	NS
	PAN8.2S+P+D		(-)	*
	PAN7.1P	(-)		**
	Significación: 0,06			

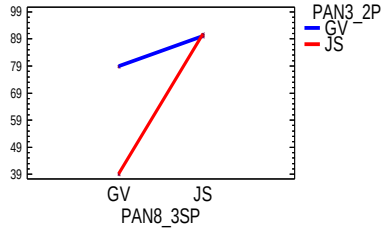


Ij.44 PAN8.3S+P

PAN3.2P

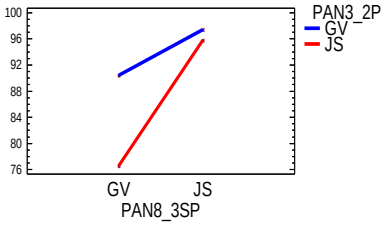
El Palmar

	a	d	NS
PAN8.3S+P	3,89	8,07	26,2
PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7
Significación: 0,02			

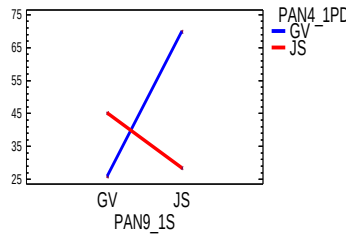


Sueca

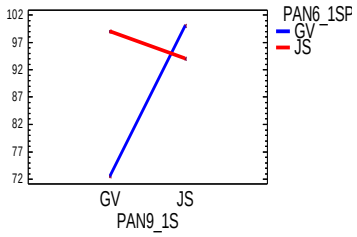
	a	d	NS
PAN8.3S+P	(+)	(+)	**
PAN3.2P	-1,89	-2,32	8,7
Significación: 0,09			



Ij.45	PAN9.1S				
	Delta				
		a	d	NS	
PAN4.1P+D	PAN9.1S	(+)	(+)	*	
	PAN4.1P+D	1,51	0,54	8,0	
	Significación: 0,01				



Ij.46	PAN9.1S				
	Sueca				
		a	d	NS	
PAN6.1S+P+D	PAN9.1S	(+)	(+)	*	
	PAN6.1S+P+D	(+)		*	
	Significación: 0,07				



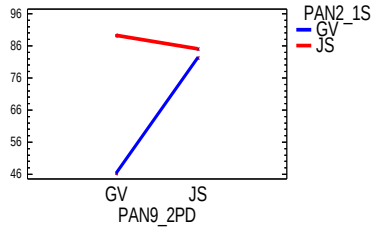
Ij.47 PAN9.2P+D

PAN2.1S

El Palmar

	a	d	NS
PAN9.2P+D	(-)	(-)	*
PAN2.1S	(+)		*

Significación: 0,003



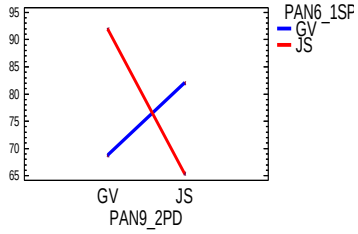
Ij.48 PAN9.2P+D

PAN6.1S+P+D

El Palmar

	a	d	NS
PAN9.2P+D	(-)	(-)	*
PAN6.1S+P+D	(+)	(+)	**

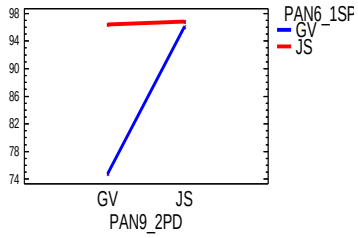
Significación: 0,06

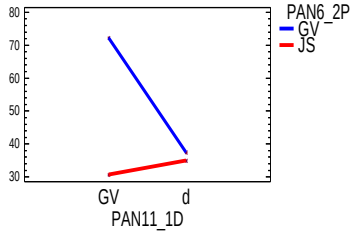


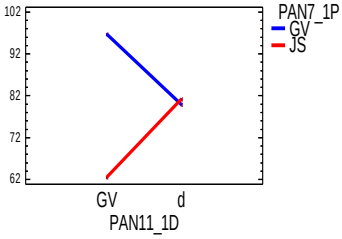
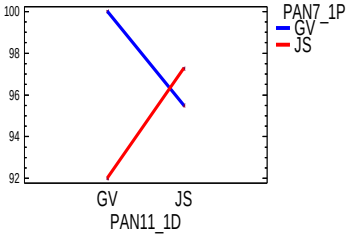
Sueca

	a	d	NS
PAN9.2P+D	(-)	(-)	*
PAN6.1S+P+D	(+)		*

Significación: 0,12



Ij.49	PAN11.1D				
PAN6.2P	Delta				
		a	d	NS	
	PAN11.1D	-6,84	-7,06	13,6	
	PAN6.2P	1,88	4,38	10,8	
	Significación: 0,03				

Ij.50	PAN11.1D				
PAN7.1P	El Palmar				
		a	d	NS	
	PAN11.1D	-6,84	-7,06	13,6	
	PAN7.1P	1,88	4,38	10,8	
	Significación: 0,05				
	Sueca				
		a	d	NS	
	PAN11.1D	-6,84	-7,06	13,6	
	PAN7.1P	1,88	4,38	10,8	
	Significación: 0,09				

Anexo IV: Resultados del ensayo de inoculación en la población F3 del cruzamiento JSxGV y en los parentales

Medidas de AFA (porcentaje de área foliar afectada) por 6 aislados de *M. oryzae*, y valores promedio de todos los aislados. Med: porcentaje medio de cada aislado; Max: porcentaje máximo de cada aislado; AFAmed: Promedio de los porcentajes medios de AFA; AFAmax: Promedio de los porcentajes máximos.

	Aislado												Promedio	
	TH12		FR128		CD49		FR13		FR94		FR95			
	Med	Max	Med	Max	Med	Max	Med	Max	Med	Max	Med	Max	AFAmed	AFAmax
JS	7,5	15	25,0	50	0	0	5,0	5	5,0	5	5,0	5	7,9	13,3
GV	0	0	0	0	0	0	0	0	4,9	50	2,5	5	1,3	9,2
Media F3	4,3	9,7	4,6	9,6	1,9	4,0	2,3	12,9	10,9	31,4	6,0	17,7	5,0	14,2
Rango F3	0-23	0-50	0-40	0-60	0-22	0-40	0-30	0-80	0-60	0-80	0-55	0-80	0-22	0-47

Anexo V: QTLs del área foliar afectada en la población JSxGV: desglose por aislado, y promedios

Medidas de AFA (porcentaje de área foliar afectada) por 6 aislados de *M. oryzae*, y valores promedio de todos los aislados; valores sin transformar. Med: porcentaje medio de cada aislado; Max: porcentaje máximo de cada aislado; AFAmed: Promedio de los porcentajes medios de AFA; AFAmax: Promedio de los porcentajes máximos. Cr.: Cromosoma; a = valor aditivo (a > 0 ó (+): el alelo de JS aumenta el carácter, es decir, la susceptibilidad; a < 0 ó (-): JS disminuye el carácter, es decir, aumenta la resistencia). d = valor dominante. R^2 = variación fenotípica explicada; Sign. = Nivel de significación: se refiere al LR.

QTL	Cr	Intervalo		TH12				FR128				CD49				FR13				FR94				FR95				AFA			
				a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.
AFA1.1	1	RM 3148 - RM 259	Med									-0,12	0,03	0,07	10,3	-0,03	0,18	0,07	7,9												
			Max									-0,08	0,21	0,09	7,8	-0,03	0,38	0,09	9,7												
AFA1.2		RM 488 - RM 473B	Med																	-0,09	-0,2	0,04	4					0,09	-0,1	0,1	6,2
			Max																	-0,05	-0,51	0,19	9,2								
AFA1.3		RM 246 – RM 473B	Med									-0,2	0,34	0,06	11,9																
			Max					0,12	0,17	0,06	6,9	-0,26	0,45	0,09	10,2																
AFA1.4		RM 315 - RM 476	Med	0,25	0,07	0,22	28,4	0,17	-0,05	0,08	8,3	0,18	0,11	0,18	27	0,08	0,07	0,04	4,9									0,15	0,08	0,13	17,8
			Max	0,28	0,07	0,19	22,8					0,2	0,11	0,14	19,1													0,1	0,04	0,05	7,7
AFA2.1	2	RM 109 – RM 476	Med									0	0,14	0,06	7,5																
			Max									-0,02	0,19	0,06	7,5	0,04	0,29	0,05	5,7												
AFA2.2		RM 341– RM 263	Med																												
			Max													0,22	-0,3	0,11	7,9					-0,14	0,41	0,12	9				
AFA2.3		RM 475 – RM 530	Med																									0,09	-0,14	0,09	8,2
			Max																									0,09	-0,12	0,08	8,3
AFA2.4		RM 530 - RM 250	Med																	0,14	-0,1	0,05	5,6								
			Max																	0,13	0,22	0,07	9,1								
AFA3.1	3	RM 569 - RM 231	Med																	0,07	-0,2	0,06	8,1	0,09	-0,2	0,06	7,8	0,04	-0,14	0,03	9,2
			Max																												
AFA3.2		RM 251- RM 473C	Med	0,02	-0,23	0,11	9,8	-0,1	-0,26	0,12	9,6	-0,12	-0,14	0,11	9					-0,1	-0,25	0,09	5,3	-0,12	-0,4	0,2	11,9	-0,05	-0,12	0,05	7,6
			Max	-0,1	-0,34	0,15	12,7	-0,14	-0,29	0,12	11,3	-0,13	-0,21	0,11	6,3					-0,15	-0,12	0,04	5,8	0,01	-0,3	0,07	4,4	-0,06	-0,1	0,04	6,5
AFA3.3		RM 135 - RM 422	Med													-0,03	0,2	0,08	6,3												
			Max													0,03	0,39	0,09	8,1												
AFA4.1	4	RM 335 - RM 16460	Med									0,09	0,01	0,05	7,3					0,12	0,14	0,07	7,3					0,13	0,17	0,18	18,5
			Max	0,1	0,15	0,06	7,7					0,13	0,04	0,07	8,3					0,24	0,22	0,15	16,4					0,15	0,17	0,2	23
AFA5.1	5	RM 122 – RM 574	Med									0,03	-0,12	0,05	6,4																
			Max									0,07	-0,21	0,09	6,9																
AFA5.2		RM 430 - RM 161	Med																												
			Max																	0,07	-0,53	0,23	10,7								

QTL	Cr	Intervalo		TH12				FR128				CD49				FR13				FR94				FR95				AFA			
				a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.	a	d	R^2	Sig.
AFA6.1	6	RM 539 – RM 564	Med	-0,1	0,1	0,04	5					-0,08	0,09	0,06	6,9	0	0,2	0,08	7,3	-0,16	0,16	0,06	4	-0,13	0,24	0,01	9,2				
			Max	-0,1	0,21	0,06	7,3	-0,05	0,26	0,07	5,2	-0,11	0,2	0,09	8,5									-0,2	0,35	0,11	9,7				
AFA6.2		RM 527 – RM 295	Med																												
			Max																	-0,08	-0,3	0,07	10	0,25	0,13	0,06	7,9				
AFA7.1	7	RM 336 - RM 505	Med									-0,03	0,14	0,06	8,5																
			Max									-0,07	0,18	0,06	7,2																
AFA7.2		RM 505 – RM 342D	Med	-0,1	0,1	0,04	4,7					0,02	0,17	0,08	10,7	-0,01	0,18	0,07	8,5	0,27	-0,1	0,11	13	0,14	-0	0,04	4,3	0,11	-0,01	0,05	6
			Max									0,07	0,27	0,14	9,3	-0,06	0,34	0,07	8,5	0,22	-0,25	0,1	13,4								
AFA8.1	8	RM 152 - RM 38	Med																												
			Max																	-0,03	-0,27	0,05	8,2								
AFA8.2		RM 14748 – RM 342A	Med									-0,06	-0,1	0,05	5,2	-0,11	0	0,04	5,7	-0,1	0,15	0,06	6,3								
			Max	-0,1	0,08	0,04	6,2	0,14	0,29	0,09	10,4													-0,19	-0,1	0,04	5	-0,16	0,03	0,1	13,5
AFA9.1	9	RM 444 – RM 23973	Med	-0,1	0,07	0,07	7,9																								
			Max	-0	0,44	0,26	7,1									0,59	-0,7	0,64	17,6												
AFA9.2		RM 23973 - RM 24006	Med																					0,46	-0,2	0,51	27,6				
			Max													0,42	-0,3	0,25	8,3					0,5	0,06	0,35	23,5				
AFA9.3		RM 409	Med																												
			Max																												
AFA9.4		RM 242 - RM 215	Med													0,01	0,14	0,04	5,6												
			Max													-0,04	0,33	0,06	8,2												
AFA11.1	11	RM 286 - RM 441	Med	0,15	-0,2	0,23	12,7					0,18	-0,23	0,29	23,5	0,22	-0,4	0,43	30,5					0,07	-0,3	0,15	11,3	0,11	-0,26	0,23	15,5
			Max									0,23	-0,36	0,34	21,7	0,36	-0,5	0,32	10,4												
AFA12.1	12	RM 101– RM 501	Med													-0,02	-0,1	0,04	4,2												
			Max													-0,07	-0,3	0,05	5,9												
AFA12.2		RM 501– RM 309	Med									-0,04	0,12	0,05	6,4	-0,05	-0,2	0,06	5,3												
			Max									-0,05	-0,16	0,06	5,3																