



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Obtención de líneas de arroz de secano con introgresión de los genes de resistencia a *Pyricularia* *Pi40* y *Pi9*

Paola Andrea Mosquera Vergara

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agrícolas
Palmira, Colombia

2016

Obtención de líneas de arroz de secano con introgresión de los genes de resistencia a *Pyricularia* *Pi40* y *Pi9*

Paola Andrea Mosquera Vergara

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para
optar al título de:

Magister en Ciencias Agropecuarias

Directora:

Cécile Grenier, Ph.D.

Codirector:

Franco Alirio Vallejo, Ph.D.

Línea de Investigación:

Fitomejoramiento

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agrícolas

Palmira, Colombia

2016

1. Resumen

Magnaporthe oryzae es el agente causal de la enfermedad conocida como Pyricularia la cual es la más destructiva en campos de arroz a nivel mundial, siendo la utilización de variedades resistentes una de las medidas más efectivas en el control de la enfermedad. Las líneas de secano L3 y L23 son materiales elite con altos niveles de resistencia a la enfermedad ya que han sido seleccionados en un sitio con alta presión del patógeno. Estudios recientes han mostrado que genes resistencia provenientes de especies silvestres *Pi9* y *Pi40* (*Oryza minuta* y *O. australiencis*) proporcionan resistencia a la población de Pyricularia encontrada en Colombia. En la presente investigación se introgresaron estos genes utilizando los genotipos 75-1-127 e IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1 por medio de Retrocruces y utilizando selección asistida por marcadores moleculares tipo SNP. Para ello se utilizó 96 marcadores SNP para *Pi9*, y 48 para *Pi40*, marcadores para el genoma del parental recurrente. Esta estrategia permitió obtener individuos con recuperación del 100% de los alelos del parental recurrente en BC₂F₂ para L23_*Pi9*, BC₃F₁ para L3_*Pi40*, BC₃F₁ para L23_*Pi40* y en un 95% para L3_*Pi9* en BC₃F₁. Se espera que la introgresión de nuevos genes de resistencia de especies silvestres en las líneas de secano aumente la durabilidad de la resistencia a lo largo del tiempo.

Palabras clave: Pyricularia, Selección asistida Marcadores moleculares, Retrocruce, genes R, Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

2. Abstract

Magnaporthe oryzae is the causal agent of the disease known as Pyricularia which is the most destructive in rice fields at the global level, being the use of resistant varieties one of the most effective measures to control the disease. The rainfed lines L3 and L23 are elite materials with high levels of resistance to the disease because they have been selected in a zone with high pathogen pressure. Recent studies have shown that resistance genes from wild species *Pi9* and *Pi40* (*Oryza minuta* and *O. australiensis*) provide resistance to the population of Pyricularia found in Colombia. In the present investigation was introgressed these genes using the genotypes 75-1-127 and IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1 through Retrocruces and using molecular marker assisted selection SNP type. For this purpose we used 96 SNP markers for *Pi9*, and 48 for *Pi40*, markers for the genome of the parental recurring. This strategy allowed to obtain individuals with recovery of 100% of recurrent parental alleles in BC₂F₂ to L23_*Pi9*, BC₃F₁ for L3_*Pi40*, BC₃F₁ to L23_*Pi40* and a 95% for L3_*Pi9* in BC₃F₁. It is expected that the introgression of new resistance genes in wild species in the rainfed lines increase the durability of the resistance over time.

Keywords: Pyricularia, Marker assisted selection, Backcross, R genes, SNP, Single nucleotide polymorphism (SNP).

Contenido

1. Resumen	IV
2. Abstract	V
3. Introducción	12
Objetivos.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
4. Marco Teórico	18
4.1. Arroz	18
4.2. <i>Magnaporthe oryzae</i>	20
4.3. Genes de Resistencia e interacción con <i>M. oryzae</i>	24
4.4. Selección asistida por marcadores moleculares y resistencia a <i>M. oryzae</i>	25
4.5. Método de retrocruces asistido por marcadores moleculares ...	27
5. Materiales y Métodos	30
5.1. Ubicación	30
5.2. Material vegetal.....	30
5.3. Germinación de semillas	30
5.3.1. Desinfección	31
5.3.2. Germinación y paso a suelo.....	31
5.4. Extracción de ADN y pruebas moleculares	32
5.4.1. Identificación y selección de marcadores tipo SNP para el rastreo del alelo <i>Pi9</i> y el alelo <i>Pi40</i> en poblaciones de retrocruce.....	32
5.4.2. Selección de marcadores tipo SNP para el rastreo de alelos de parentales recurrentes L3 y 23 en poblaciones de retrocruce.....	33

5.4.3. Desarrollo de marcadores tetra-primer para genotipado de SNP en gel de agarosa	34
5.5. Cruzamientos	34
5.6. Retrocruces y selección con marcadores SNP	36
6. Resultados	38
6.1. Homogeneidad de semilla para iniciación de cruzamientos	38
6.2. Identificación y selección de marcadores tipo SNP para el rastreo de alelos <i>Pi9</i> y <i>Pi40</i> en poblaciones de retrocruce.....	39
6.3. Generación F ₁	43
6.4. Generación BC ₁ F ₁	44
6.5. Generación BC ₂ F ₁	53
6.6. Generaciones BC ₂ F ₂ y BC ₂ F ₃	55
6.7. Generaciones BC ₃ F ₁ y BC ₃ F ₂	59
7. Discusión	61
7.1. Homogeneidad de semilla para iniciación de cruzamientos	61
7.2. Identificación y selección de marcadores tipo SNP	61
7.3. Identificación y selección de marcadores tipo SNP para el rastreo de alelos de parentales recurrentes L3 y L23 en poblaciones de retrocruce	63
7.4. Retrocruces con selección asistida por marcadores moleculares tipo SNP.....	65
7.4.1. Líneas de arroz de secano L3 y L23	65
7.4.2. Retrocruces y selección con MAS.....	66
Conclusiones	70
8. Perspectivas.....	71
9. Bibliografía.....	72
ANEXOS	80

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo de infección de <i>Magnaporthe oryzae</i> (Modificado de Skamnioti & Gurr, 2009). pv)	22
Figura 2. Síntomas de <i>M. oryzae</i> sobre la hoja de arroz..	23
Figura 3. Proceso de emasculación y polinización en flores de arroz.....	35
Figura 4. Esquema de mejoramiento en el proceso de retrocruces.	37
Figura 5. Perfiles genéticos de parentales con 23 de 96 marcadores SNP evaluados.....	39
Figura 6. Ubicación física de los marcadores SNP diseñados para selección de Pi9.	41
Figura 7. Ubicación física de los marcadores SNP diseñados para selección de Pi40.	42
Figura 8. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25128. Cromosoma 1-5. L3_Pi9 BC1F1.	45
Figura 9. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25128. Cromosomas 6-12. L3_Pi9 BC1F1.	46
Figura 10. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25138. Cromosomas 1-5. L23_Pi9 BC1F1.	47
Figura 11. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25138. Cromosomas 6-12. L23_Pi9 BC1F1.	48
Figura 12. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25174. Cromosomas 1-5. L3_Pi40 BC1F1..	49
Figura 13. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25174. Cromosomas 6-10. L3_Pi40 BC1F1..	50
Figura 14. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25175. Cromosomas 1-5. L23_Pi40 BC1F1.....	51
Figura 15. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25175. Cromosomas 6-11. L23_Pi40 BC1F1.....	52
Figura 16. Genotipo de 12 plantas de la población L23_Pi40 y los controles (IR83260, L23 y NTC para Non Target Control) con el marcador Pi40-27A.	54
Figura 17. Genotipado de 11 plantas de la población L3_Pi40 BC2F1 con el marcador Pi40-27A.	55
Figura 18. Genotipado de 11 plantas de la población L23_Pi9 BC2F2 con marcador Pi9-34B..	56
Figura 19. Distribución de marcadores SNP en el genoma de J32. Cromosoma 1-5. L23_Pi9 BC2F2.....	57
Figura 20. Distribución de marcadores SNP en el genoma de J32. Cromosoma 8-12. L23_Pi9 BC2F2.	58
Figura 21. Genotipado de 10 plantas de la población L3_Pi9 BC3F1 con marcador Pi9-34B, En recuadro rojo, perfil de planta K1 seleccionada para producción de L3_Pi9 BC3F2.	59
Figura 22. Genotipado de ocho plantas de la población L3_Pi40 BC3F1 análisis con marcador 9871.T7E2b.	60
Figura 23. Distribución teórica de marcadores tipo SNP para recuperación de genoma recurrente en cromosomas no portadores del gen de interés.....	67
Figura 24. Distribución teórica de marcadores tipo SNP para recuperación de genoma recurrente en cromosomas no portadores del gen de interés.....	68
Figura 25. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25737. Cromosomas 1-5. BC2F1 L23_Pi9.	84
Figura 26. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25737. Cromosomas 1-12. BC2F1 L23_Pi9.	85
Figura 27. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25130. Cromosomas 1-5. BC2F1 L3_Pi9.	86
Figura 28. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25130. Cromosomas 6-12. BC2F1 L3_Pi9.	87
Figura 29. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 176. Cromosomas 1-5. BC2F1 L23_Pi40.	88
Figura 30. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 176. Cromosomas 6-11. BC2F1 L23_Pi40.	89
Figura 31. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 23. Cromosomas 1-5. BC2F1 L3_Pi40.....	90
Figura 32. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 23. Cromosomas 6-11. BC2F1 L3_Pi40.....	91
Figura 33. Distribución de marcadores SNP en el genoma de K1. Cromosomas 1-5. BC3F1 L3_Pi9.....	92

Figura 34. Distribución de marcadores SNP en el genoma de K1. Cromosomas 6-12. BC3F1 L3_Pi9.....	93
Figura 35. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L10. Cromosomas 1-5. BC3F1 L3_Pi40.	94
Figura 36. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L10. Cromosomas 6-10. BC3F1 L3_Pi40.....	95
Figura 37. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L140. Cromosomas 1-5. BC3F1 L23_Pi40.....	96
Figura 38. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L140. Cromosomas 6-11. BC3F1 L23_Pi40.....	97

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Recuperación esperada del genoma del parental recurrente comparando retrocruces convencionales y asistidos por marcadores moleculares (Modificado de Hospital, 2003).	29
Tabla 2. Semilla obtenida en la generación F_1 y BC_1F_1 de las cuatro poblaciones en proceso de mejoramiento. ..	43
Tabla 3. Porcentaje de recuperación de alelos del parental recurrente, en las cuatro poblaciones en proceso de mejoramiento.....	53
Tabla 4. Ejemplos de metodologías de genotipado de SNP de alto rendimiento. (Modificado de Thomson, 2014).	63

3. Introducción

El arroz (*Oryza sativa*) es uno de los cultivos básicos que alimenta a más de la mitad de la población mundial (USDA, 2015), y provee alrededor del 70% de la ingesta calórica para más de 2 billones de humanos (Yousefi, et al. 2015). El arroz es cultivado en todos los continentes, en un área aproximada de 162.6 millones de hectáreas, con una producción mundial de 750 millones de toneladas (FAO, 2015). China es el mayor productor de arroz con el 18% de la producción mundial, seguido por India e Indonesia con el 14 y 6.3%, respectivamente.

En el continente americano el mayor productor de arroz es Brasil con el 1.1% de la producción mundial (FAO, 2015). En el caso de Colombia, para el año 2012 se produjo 2.3 millones de toneladas, dando a esta producción el tercer lugar después de la caña de azúcar y el plátano. Durante ese año, el cultivo de arroz ocupó el mismo puesto en cuanto al área total cosechada después del café y el maíz (FAOSTAT, 2013; Areisa, 2012). Para el año 2014, el consumo per cápita de arroz en Colombia, llegó a los 39.62 kilos (Fedearroz, 2016, siendo cereal más consumido.

En el país se emplean dos sistemas de producción de arroz: riego y seco. En el arroz de riego se utiliza un recurso hídrico, provisto por bombeo o gravedad, mantenido durante el desarrollo del cultivo con una lámina de agua de 10-15 centímetros, mantenida gracias a la adecuación del lote, la nivelación del suelo y a la construcción de taipas. Al final del ciclo del cultivo, el agua se retira para la fase de maduración del grano. Por otra parte, en el arroz de seco, la fuente hídrica utilizada depende de las aguas de lluvia, por ende es plantado en campos no inundados que frecuentemente no fueron sometidos a un trabajo de nivelación (Xia, et al. 2015). Alrededor del 30% de la producción de arroz en Colombia se da bajo el sistema de seco. Según los datos del anuario agropecuario de Colombia del 2013 los departamentos que más contribuyeron a esta producción bajo sistema de seco fueron Meta con el 38.1%, seguido de Casanare y Sucre con un 34.5% y 11.6% respectivamente (DANE, 2013). En conjunto en los llanos Orientales se produce el 77.4% del arroz de seco

cultivado en Colombia (teniendo en cuenta la producción del departamento de Arauca).

Esta región también conocida como la Orinoquía colombiana está conformada por los departamentos de Meta, Arauca, Casanare y Vichada, los cuales constituyen el 22% de la superficie del país (Rippstein et al., 2001). El clima de los llanos está definido por el ritmo de los vientos y su régimen térmico es elevado (Rippstein, et al. 2001). Según las predicciones 2011- 2100 hechas por el IDEAM (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales) en los Llanos Orientales persistirán climas semi-húmedos excepto en su parte sur donde paulatinamente existe un cambio de semi-húmedo a húmedo (Murcia, 2010). La temperatura promedio anual es alrededor de los 26 °C, su amplitud diaria (diferencia entre temperatura diurna y nocturna) puede ser de 5 a 6 °C en la época seca, pero es atenuada en la época lluviosa. La humedad relativa mínima es de 80% en la época lluviosa y 60-65% en la época seca (Rippstein, et al. 2001). Las condiciones edafológicas de los suelos llaneros se caracterizan por la exigua presencia de los principales nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio). También se caracterizan por la presencia de acidez, que intensifica la dificultad de las plantas para absorber los pocos nutrientes del suelo (Fedearroz 2011).

Las condiciones climáticas y edáficas de los llanos orientales cumplen con las condiciones óptimas para que se dé una alta presión de enfermedades del arroz, principalmente *Pyricularia*. Consecuentemente, el programa de investigación de arroz del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) inició su programa de mejoramiento en la estación experimental en Santa Rosa (Meta) desde mediados de los años 80, con el fin de exponer los materiales en desarrollo a una alta presión de selección para poder desarrollar líneas resistentes a la enfermedad (Correa, 2000).

Teniendo en cuenta el potencial de los llanos orientales para la producción y el mejoramiento del arroz de secano, el Cirad (centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo, por sus siglas en francés) conjuntamente con el CIAT, han venido trabajando en el desarrollo de nuevos materiales de arroz para la zona de las sabanas colombianas. El programa de mejoramiento de arroz de secano se estableció en los años noventa a partir de un programa de mejoramiento poblacional, dirigido a producir líneas aptas para estos suelos ácidos (Châtel et al., 2005) predominantes en la región, con el objetivo el desarrollo y la selección de materiales resistentes a *Pyricularia*. Se han conformado poblaciones sintéticas, mejoradas a través de la selección recurrente para ser adaptadas a la región, y notablemente para lograr a

incrementar la frecuencia de plantas resistentes a *Pyricularia* (Ospina et al., 2005). Luego del mejoramiento poblacional, líneas fueron desarrolladas por selección genealógica para ser liberadas en la región (Châtel et al., 2008). Un convenio reciente entre CIAT, Cirad y CORPOICA logró probar la adaptación y la ventaja sobre testigo comercial local de líneas promisorias para la región. Resultado de este convenio se han obtenido las líneas L3 y L23 (6.5 ton/ha y 6.6 ton/ha), las cuales superan hasta en un 15% el rendimiento de la variedad comercial Llanura 11 (Grenier et al., en preparación). A demás del rendimiento, estas líneas mejoradas contienen características deseables para el consumo y como materia prima para la industria.

El hongo ascomiceto *Magnaporthe oryzae* Cav., cuyo anamorfo es *Pyricularia oryzae* (Couch and Kohn 2002), es el agente causal de la enfermedad denominada *Pyricularia* o añublo del arroz (Talbot, 2003). *Pyricularia* es la enfermedad más destructiva en campos de arroz a nivel mundial (Namai, 2011). En el 2009 se estima que las pérdidas ascendieron al orden de 157 millones de toneladas de arroz al año (Lin et al., 2009), la producción mundial de arroz para ese año fue de solo 680 millones de toneladas (FAO, 2010).

El manejo de la enfermedad a través de la siembra de variedades resistentes es el medio más eficiente de control (Fukuoka et al., 2015), especialmente en países en desarrollo (Ashkani et al., 2015). Además de ser una opción más respetable para el ambiente, manejar cultivos con genes de resistencia, según el modo de diseminación de estos genes (distribución espacial y/o temporal) permite de limitar agresividad de enfermedades debido a pérdida de sensibilidad a las moléculas activas de los fungicidas utilizados. Cultivares de arroz con un amplio espectro de resistencia han sido identificados y desarrollados para varios sistemas de producción, este tipo de cultivares resistentes son preferidos por agricultores y consumidores, debido a que es su producción se utilizan menos fungicidas y productos químicos, reduciendo costos, polución por agroquímicos en los campos de arroz (Ashkani et al., 2015), y finalmente siendo menos perjudiciales para la salud humana.

M. oryzae es un patógeno que tiene una alta inestabilidad en su genoma, y es común que quiebre la resistencia de las variedades, especialmente cuando la resistencia se sustenta en un solo gen (Dai et al., 2010). Una forma de solventar este problema es mediante la piramidación de múltiples genes de resistencia, cada uno de los cuales reconoce un set único de aislamientos del hongo (Ashkani et al., 2015) controlada por múltiples genes con efectos de resistencia completa (controlada por genes mayores o genes R),

complementarios o aditivos, así como resultado de interacciones ambientales (Bonman 1992, Wang et al., 1994, Rahman, et al., 2011). Se ha demostrado que la interacción entre *Pyricularia* y el arroz pertenece al sistema gen por gen y que la mutación en los genes de avirulencia puede ser decisiva para esta interacción (Jia et al. 2000). Algunos de los genes *Avr* se localizan en regiones teloméricas y subtéloméricas y que deleciones en estas regiones pueden dar como resultado la pérdida de los genes *Avr* resultando en la ganancia de virulencia lo anterior demostrado por Orbach et al (2000).

Alrededor de 22 genes R han sido exitosamente clonados y molecularmente clasificados hasta el momento. En la práctica, el uso de un gen R que tenga un amplio espectro de resistencia es un método efectivo de control de la enfermedad (Ashkani et al., 2015). Muchos reportes describen la introgresión de genes de resistencia a *Pyricularia* (genes *Pi*) en variedades comerciales y elite (Miah et al., 20013). Por ejemplo, el gen *Pi9*, situado en el brazo corto del cromosoma 6 fue introgresado a *O. sativa* desde *Oryza minuta* (Amante-Bordeos et al., 1992). En la actualidad se encuentra disponible en la línea de arroz indica 75-1-127. Dicha línea fue probada con 43 aislamientos de *Pyricularia* provenientes de 13 países y fue caracterizada con resistencia a todos los aislamientos probados (Liu et al., 2002).

Otro gen de resistencia que proviene de un origen silvestre es *Pi40*, que al igual que *Pi9* se encuentra en la misma región del brazo corto del cromosoma 6. *Pi40* fue introgresado desde *Oryza australiensis* en *Oryza sativa* específicamente en la línea IR65482-4-136-2-2 (Ju et al., 2007). Mediante análisis de asociación los autores pudieron comprobar que el marcador 9871.T7E2b, ligado a la presencia de *Pi40* estaba en la línea monogénica que presentó resistencia a 29 cepas virulentas de *Pyricularia* provenientes de Corea y Filipinas.

En estudios realizados para verificar que genes de resistencia se encontraban presentes en variedades de arroz de Latinoamérica y el Caribe, Correa et al (2009) reportaron que el gen *Pi9* era el que se encontraba con mejor frecuencia en dicho germoplasma. Hasta esa fecha el gen *Pi40* no había sido utilizado como fuente de resistencia a *Pyricularia* en ninguno de los programas de mejoramiento de esta zona del continente. Sumado a esto, estudios hechos en el programa de mejoramiento de arroz del CIAT y realizados con 205 aislamientos de *M. oryzae* provenientes de la altillanura y otras regiones arroceras del Colombia e inoculados en 26 líneas monogénicas para genes *Pi*, dieron como resultado que los donantes de *Pi9* y *Pi40* constituían los genotipos más resistentes al patógeno (Mosquera et al., en preparación). En este mismo

estudio se obtuvo que 75-1-127 el parental donante de *Pi9* fue resistente a 204 cepas del hongo.

El mejoramiento por medio de retrocruces y asistido por marcadores moleculares (MABC por sus siglas en inglés), es un método con el cual se puede incorporar un gen mayor desde un parental donante, en un cultivar elite o línea en proceso de mejoramiento que ni tiene dicho gen y que será el parental recurrente. El producto final en un proceso de MABC es una línea que contenga el gen de interés del padre donante, con el genotipo del padre recurrente en el resto del genoma (Hospital, 2003). Esta metodología ha sido utilizada anteriormente en la introgresión de genes de resistencia a *Pyricularia* (Fukuoka et al., 2015; Ashkani et al., 2015). Con la ayuda de los marcadores moleculares se puede saber el genotipo de cada individuo en la progenie, ósea el número de alelos favorables de cada individuo, lo que hace que la selección sea dirigida a la forma genotípica presente y por ende eficiente (Hasan et al., 2015). Teóricamente se espera con MABC una recuperación del 98% de los alelos recurrentes pasado tres ciclos de retrocruces, eso teniendo en cuenta que los individuos se seleccionan con base al genotipo, lo cual se hace antes de la floración, disminuyendo considerablemente el tiempo de selección. Mientras que en un retrocruce convencional en los mismos ciclos solo se espera la recuperación del 93.7% del genoma del padre recurrente (Hospital, 2003).

En la siguiente investigación se realizó la introgresión asistida por marcadores moleculares de los genes de resistencia a *Pyricularia Pi9* y *Pi40*, provenientes de especies silvestres pero disponibles en fondos genéticos de materiales elite 75-1-127 para el caso de *Pi9* (Liu et al. 2002) y de IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1 para el caso de *Pi40* (Ju et al. 2007). Esta introgresión se hace con el fin de conferir resistencia durable en dos líneas avanzadas de arroz de secano, L3 y L23 que se encuentran finalizando su proceso de validación antes de ser liberadas como variedades en los próximos años.

Objetivos

Objetivo general

Introgresar los genes *Pi9* y *Pi40* de resistencia a *Magnaporthe oryzae* en las líneas de arroz de secano L3 y L23, por medio de retrocruces y selección asistida por marcadores moleculares.

Objetivos específicos

Seleccionar un grupo de marcadores tipo SNP polimórficos que permitan distinguir entre el genoma de los parentales donantes de los genes de resistencia *Pi9* y *Pi40* (75-1-127 e IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1) y los parentales recurrentes L3 y L23.

Diseñar y validar marcadores tipo SNP para los genes de resistencia *Pi9* y *Pi40*, que permitan discriminar individuos en la progenie que contengan los alelos de resistencia favorables.

Implementar la utilización de marcadores tetra-primer ARMS-PCR, como alternativa inicial al genotipado de marcadores tipo SNP en la selección de los alelos de *Pi9* y *Pi40*.

Introgresar *Pi9* y *Pi40* en el genoma de L3 y L23 recuperando el mayor porcentaje de los alelos del padre recurrente en plantas.

4. Marco Teórico

4.1. Arroz

El arroz cultivado *Oryza sativa* L. pertenece a la tribu Oryzaceae, a la subfamilia Oryzoideae incluida en la familia Poaceae (Gramineae). Esta tribu contiene 11 géneros, de los cuales el género *Oryza* se originó por lo menos hace 130 millones de años y es el único con especies cultivadas (Brar & Singh, 2011). El arroz ha sido encontrado en sitios arqueológicos que datan de 8000 años AC, pero aun la fecha de su domesticación es fruto de continuo debate (Callaway, 2014; Sweeney & McCouch, 2007). Hoy, *O. sativa* es cultivado en todos los continentes, excepto en la Antártida (Reaño, et al. 2008).

Esta gramínea anual varía en altura, desde 40 cm para las variedades enanas, hasta 7 m encontrado en las variedades flotantes. Los tallos del arroz son redondos y huecos, compuestos por nudos y entrenudos, las hojas de lámina plana son unidas al tallo por la vaina. La inflorescencia en panícula, ubicada en el ápice del tallo, es protegida por una hoja terminal más ancha y corta que las anteriores, llamada hoja bandera (Degiovanni et al., 2010).

El crecimiento y desarrollo del arroz es un proceso fisiológico continuo, que puede variar ligeramente dependiendo de características genéticas de la planta o de la influencia del ambiente. Se lleva a cabo en tres fases. La primera fase es la fase vegetativa que se da desde la germinación de la semilla hasta la iniciación de la panícula. Sigue la fase reproductiva en la que se define el tamaño de los “depósitos de rendimiento” es decir el número potencial de granos. Esta fase incluye desde la iniciación de la panícula hasta la floración. Por último, la fase de maduración que también se conoce como ‘fase de llenado del grano’ porque es el proceso que la caracteriza comprendiendo desde la anthesis hasta la maduración del grano. Estas fases son afectadas principalmente por la temperatura y la duración del día (Riveros & Rodríguez, 2010; Fernández & Arregocés, 1980).

El arroz es predominantemente autógamo, con un bajo porcentaje de polinización cruzada natural. La tasa de polinización cruzada es generalmente

inferior al 1%, pero puede ser mayor, por ejemplo cuando hay contacto físico entre panículas adyacentes (Reaño, et al., 2008). El grado de alogamia depende también de la temperatura del aire y de la humedad relativa. El arroz es una especie diploide $2n=24$ que presenta una constitución genómica AA (Watanabe 1997) y fue la primer planta cultivada en tener su genoma secuenciado, por cuatro grupos de investigación independientes: Beijing Institute of Genomics (Yu et al., 2002), Syngenta (Goff et al., 2002) International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP) (Sasaki et al., 2002), y Monsanto.

En términos de variabilidad genética, la revolución verde favoreció la diseminación de cultivares de alto rendimiento, e hizo que un relativo pequeño número de variedades de arroz reemplazara literalmente a cientos de variedades tradicionales, reduciendo así la diversidad o base genética del cultivo (Khush, 1977; Khoury et al., 2014). Es así como entre los mejoradores surgió la necesidad de ampliar la base genética de los materiales de arroz, esto mediante la utilización de métodos alternativos de mejoramiento, como lo es el mejoramiento poblacional.

El mejoramiento poblacional se condujo durante dos décadas en el programa de arroz del CIAT. Dos poblaciones fueron constituidas al final de los años ochenta usando el gen de esterilidad macho (*ms*) proveniente de un mutante de la variedad IR36. Una de estas poblaciones, CNA-IRAT5 fue desarrollada con la introgresión del gen recesivo *ms* en líneas elites de arroz de secano adaptadas a sistemas aeróbicos y presentando una variabilidad de origen y tipo de plantas (Taillebois & Guimarães, 1988). Esta población orientada a los suelos de sabana fue enriquecida con líneas de arroz de secano donantes de resistencia a *Pyricularia* generando la población PCT4 la cual, sucesivamente, fue enriquecida con materiales de alto potencial de rendimiento así conformando la población PCT11 (Ospina et al., 2005). Estas poblaciones, PCT4 y PCT11 fueron sometidas a varios ciclos de mejoramiento, los cuales consisten en evaluación de líneas extraídas de la población y recombinación de las líneas seleccionadas con el mejor desempeño (Châtel & Guimarães, 1995). Mientras se evalúan líneas para seleccionar aquellas contribuyen al mejoramiento poblacional, estas mismas líneas seleccionadas pueden entrar en el desarrollo de líneas y así alimentar el programa de selección genealógica (o selección pedigrí). Para el arroz de secano, varias líneas promisorias fueron desarrolladas a partir de poblaciones de selección recurrente (Châtel et al., 2008).

El programa de mejoramiento de arroz del CIAT-Cirad ha enfocado en desarrollo de arroces de secanos con adaptación a las condiciones de sabanas. En el año 2011 se registró la variedad CORPOICA Llanura 11, derivada del

programa de selección pedigrí, con adaptación al sistema de secano y particularmente a la Altillanura plana y terrazas altas de piedemonte del Meta. Llanura 11 se caracteriza con un ciclo corto (85 días a maduración) y características deseables para la industria, notablemente para la realización de desayunos a base de arroz. En 2011, CIAT empezó un proyecto con CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria) para la identificación de nuevos materiales promisorios para el lanzamiento de una(s) nueva(s) variedad(es) para la Altillanura Colombiana y Piedemonte Llanero. Un set de 54 líneas avanzadas del programa de mejoramiento poblacional y selección pedigrí de arroz de secano se evaluó en múltiple sitios en la Altillanura para estudiar la interacción genotipo por ambiente. De esta evaluación se seleccionaron ocho materiales de ciclo corto, con rendimientos estables, buen nivel de resistencia a Pyricularia y características de tipo de planta y tipo de grano diferentes. Esta amplitud de características de calidad de grano permite orientar estos materiales hacia fines diferentes, tanto para consumo directo como para usos industriales. Las ocho líneas se compararon con el testigo comercial local, la variedad Llanura 11, y fueron evaluadas por varias características de interés, tales como la estabilidad de rendimiento, la tolerancia a sequía, el uso agronómico del nitrógeno, y la resistencia a las cepas de Pyricularia presentes en la región. De esta investigación, se destacaron dos líneas, más promisorias considerando su productividad bajo las varias condiciones consideradas. Estas líneas, PCT-4\SA\1\1, Bo\3\1>42-1-6-1-M (L3) y PCT-11\0\0\2, Bo\2\1>133-M-5-1-4-3-M (L23) presentan las características de adaptación a suelos de sabanas y buena productividad bajo condiciones de suelos mejorados (hasta 116% del rendimiento del testigo). Ambas líneas tienen un ciclo corto (66 días a floración) y resistencia a Pyricularia. Las dos líneas se diferencian en que una tiene un tipo de grano mediano, mientras la otra es con grano de tipo largo, así ofreciendo materiales con adaptación y que pueden ser utilizados para diversos fines de consumo.

4.2. *Magnaporthe oryzae*

En general, el resultado de la interacción entre planta y patógeno depende de la reacción a nivel molecular entre los dos organismos, con el patógeno intentando controlar las células de la planta para el establecimiento de una relación de compatibilidad (Schulze-Lefert & Panstruga, 2003). Para tener

acceso a nutrientes, los patógenos de plantas han desarrollado diferentes estilos de vida (Marcel et al., 2010). Los biótrosos como el mildew polvoso o las royas derivan sus necesidades nutricionales de células vivas, y, para poder traspasar la pared celular hacia el interior de la célula, han desarrollado estructuras de infección altamente especializadas (Horbach et al., 2011). Al contrario, los necrótrofos destruyen los tejidos de la planta hospedera para su propia alimentación (Glazebrook, 2005).

M. oryzae pertenece a una clase intermedia a la de los patógenos hemibiotrosos, que combinan características de biótrosos y necrótrofos (Marcel et al., 2010). Por lo general, los hemibiotrosos inician su ciclo de infección como biótrosos y una vez dentro de la planta cambian a un estado necrótrofo, matando el tejido infectado (Munch et al., 2008). En el caso de *M. oryzae*, este patógeno invade el tejido foliar manteniendo ambos estilos de vida en simultaneo (Kankanala et al., 2007).

Esta enfermedad es considerada la enfermedad más importante del cultivo. Puede afectar todos los órganos de la planta, desde la etapa de plántula y durante todo el desarrollo del cultivo (Marcel et al., 2010). Anteriormente los aislamientos del hongo que infectaban arroz eran formalmente nombrados como *oryzae* y los que afectaban otras especies como *grisea*, pero no habían diferencias morfológicas que pudieran ser usadas para diferenciar los aislamientos obtenidos de arroz y los de otras especies, entonces se decidió que todos los miembros de grupo se designarían *Magnaporthe oryzae* (Scheuermann et al. 2012)

El inicio del ciclo de infección (Figura 1) se da con la unión de una conidiospora a la superficie de la hoja. En seguida es la germinación, en la que la conidiospora desarrolla un tubo germinal y un apresorio (Tucker & Talbot, 2001) desde el cual se desprende una estructura de penetración que atraviesa la célula epidérmica por medio de la perforación mecánica de la superficie a través de la cutícula y de la pared celular de la célula (Wilson and Talbot, 2009). Esta penetración es posible gracias a que el apresorio es capaz de producir una alta presión de turgencia de más o menos 8MPa (Ribot et al. 2008).

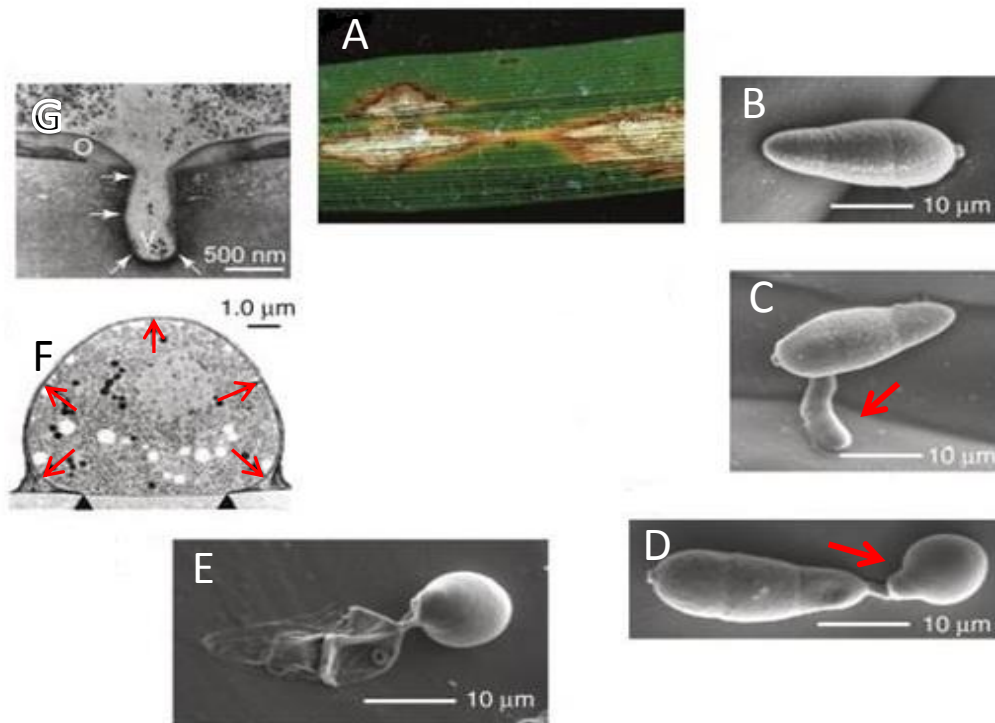


Figura 1: Ciclo de infección de *Magnaporthe oryzae* (Modificado de Skamnioti & Gurr, 2009). **A.** Lesión causada por *M. oryzae* sobre hoja de arroz. **B.** Vista en microscopio electrónico (scanning electron microscope SEM, por siglas en inglés) de una conidiospora adherida a la hoja de arroz. **C.** Germinación de una conidiospora, se observa el tubo germinal (flecha) y el inicio de la formación del apresorio (imagen SEM). **D.** Apresorio formado (flecha) (imagen en SEM). **E.** Apresorio teniendo dentro el contenido de la espora y el tubo germinal. **F.** Imagen de transmisión (EM, por sus siglas en inglés), presión de turgencia generada por el apresorio (flechas) que empuja la estructura de penetración que traspasa la cutícula y la pared celular (entre los triángulos), observada en G, con vesículas (v).

Una vez dentro de la célula, el hongo desarrolla una estructura globular denominada hifa invasiva, morfológicamente diferente al tubo germinal, que se diferencia del micelio vegetativo al superar en más de dos veces su diámetro (Xu et al., 2007). Al ser un patógeno hemibiotrofo, la hifa invasiva crece intra y extracelularmente, sin causar daño a las células de la planta, durante la primera etapa de la infección que es biótropa (Kankanala et al., 2007). Cuando la infección esparce a las células vecinas, las células previamente infectadas pierden viabilidad, así poniendo evidente la fase necrótropa del hongo, caracterizada por las lesiones en la superficie de la hoja ocurriendo aproximadamente a los seis días de que el patógeno hace contacto con la planta (Ribot et al. 2008).

Cuando los síntomas aparecen en la hoja, son por lo general de blanco a gris verdoso con bordes verde oscuros, naranja o café (Figura 2A). Las lesiones varían en apariencia, pero comúnmente adoptan una forma de diamante o forma lineal con esquinas en punta (Figura 2B). La forma, color y tamaño de la lesión puede variar debido a factores como la edad de la planta, la agresividad de la cepa del hongo o incluso la variedad de arroz. En el caso de ataques muy fuertes, las lesiones se pueden traslapar, haciendo que toda la hoja se vea afectada (Figura 2C).

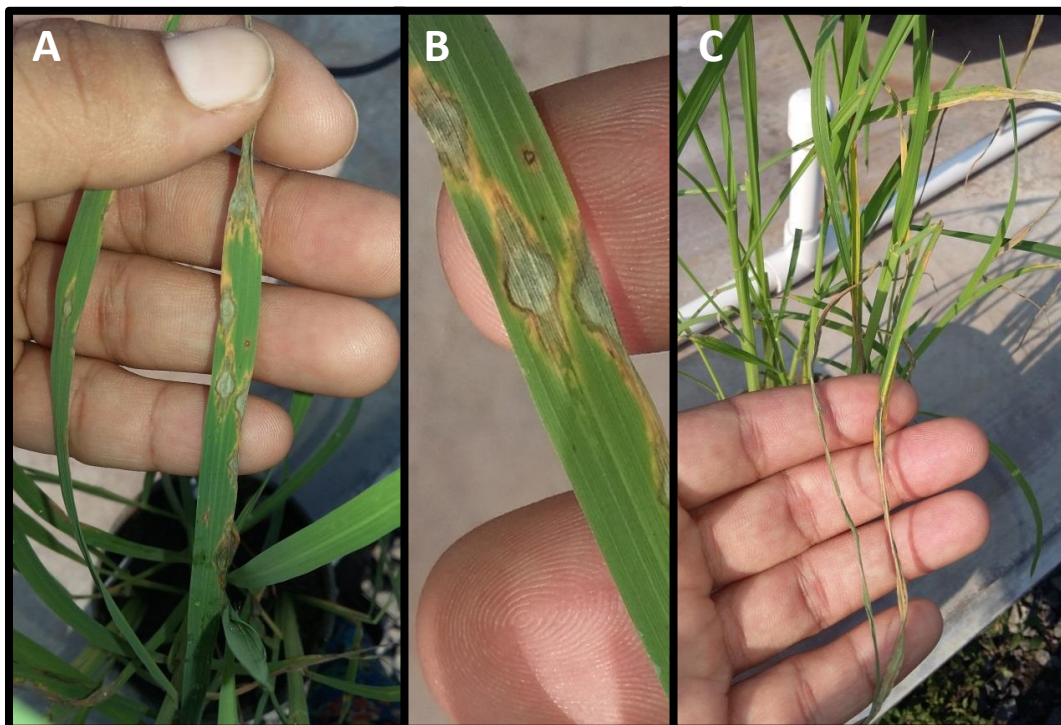


Figura 2. Síntomas de *M. oryzae* sobre la hoja de arroz. A. Lesión característica de la enfermedad. **B.** Acercamiento de la lesión, donde se observa la característica forma de diamante y las esquinas en punta. **C.** Lesiones traslapadas que afectan la totalidad de la hoja.

Las condiciones ambientales apropiadas para que se lleve a cabo la infección incluyen periodos de humedad sobre la superficie de la planta, y temperaturas nocturnas de 17 a 27 °C con poco viento y alta humedad relativa. La temperatura diaria óptima para la germinación, la formación de la lesión y esporulación esta entre los 25 y 28 °C (Bonman, 1992).

El ataque por *M. oryzae*, puede causar desde una simple reducción de calidad en el producto final, hasta una pérdida de más del 80% en rendimiento y calidad. Muchas metodologías para el control de la enfermedad han sido desarrolladas (Miah et al., 2013). Para controlar la dispersión del patógeno en

el cultivo se han empleados métodos químicos y biológicos. El control químico con funguicidas preventivos es una alternativa costosa, como lo menciona Rivas (2004), reportando costos anuales del control químico en plantaciones de arroz en los llanos orientales de Colombia de aproximadamente 16 millones de dólares. Estas cifras pueden ser disminuidas si se plantan variedades de arroz resistentes.

La utilización de variedades de arroz resistentes es la forma más económica y amigable con el medio ambiente para el control de la enfermedad (Miah et al., 2013). Entre las estrategias de control utilizando variación en los cultivares de arroz sembrados sobresalen, la siembra de variedades multilínea (Abe, 2004), la mezcla de variedades o líneas (Zhu et al., 2000) y la piramidación de genes de resistencia en una sola línea o variedad (Bonman et al., 1992).

4.3. Genes de Resistencia e interacción con *M. oryzae*

Debido a la disponibilidad pública de las secuencias de los genomas del arroz y de *M. oryzae*, este patógeno se ha convertido en un organismo modelo para entender las interacciones y coevolución hospedero-patógeno en cereales (Ashkani et al., 2014). La virulencia y agresividad de un patógeno es esencialmente el resultado de interacciones de co-evolución entre los patógenos y sus plantas hospederas (Burdon et al., 2014).

Interacciones planta patógeno, particularmente las que se dan con patógenos que tienen ciclo de vida biótrofos, están reguladas por interacciones específicas entre genes de resistencia presentes en la planta (o genes R) y genes de avirulencia del patógeno (o *Avr*). Cuando los correspondientes genes R y *Avr* están presentes en el hospedero y en el patógeno, el resultado es de resistencia por parte de la planta (Flor, 1971; Burdon et al., 2014). Mientras que los patógenos que son capaces de generar una reacción de total susceptibilidad son considerados infectivos, las plantas involucradas en esta reacción son clasificadas como susceptibles.

La base genética detrás de estas respuestas fenotípicas es variable. Las interacciones que involucran la denominada raza-específica con líneas de hospedero típicamente involucran interacciones gen por gen controladas por genes R denominados genes mayores. Existe otra clase de interacción denominada resistencia parcial, en este caso puede ser generada por: A) genes

R medianamente expresados, B) resistencia de planta adulta, o C) genes de resistencia menores. Para el caso la resistencia de planta adulta, la resistencia no es específica y puede ser expresada contra todos los aislamientos patógenos con los que entre en contacto (Burdon et al., 2014). Desde el punto de vista del patógeno, una vez que la infección ocurre, la agresividad del ataque es un componente cuantitativo del desarrollo del patógeno dentro del hospedero.

Genes mayores R han sido ampliamente manipulados en programas de mejoramiento, siendo comprobando sus fenotipos a través de inoculaciones con cepas individuales, mix de cepas o exponiendo las plantas a la infección natural en campo. Aunque, generalmente la naturaleza de la expresión de estos genes R impone una limitación en cuanto a que la expresión de un gen R puede enmascarar la expresión de otro que se encuentre en la misma planta. Esto hace que el fenotipado de plantas con dos o más genes de resistencia solo sea posible mediante el uso de aislamientos del patógeno que sean capaces de discriminar entre tipos individuales de cada gen de resistencia (McIntosh et al., 1995).

Debido a la necesidad de identificar la interacción que está ocurriendo entre el patógeno y los diferentes genes de resistencia disponibles, se desarrolló un set de 24 líneas monogénicas que contienen 24 genes mayores (*Pia*, *Pib*, *Pii*, *Pik*, *Pik-h*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pik-s*, *Pish*, *Pit*, *Pita*, *Pita-2*, *Piz*, *Piz-t*, *Pi1*, *Piz-5*, *Pi3*, *Pi5(t)*, *Pi7(t)*, *Pi9*, *Pil2(t)*, *Pi11(t)*, *Pi19*, y *Pi20*) en el genoma de la variedad susceptible LTH (Ling et al. 2000) , esta variedad es altamente susceptible a aislamientos del hongo (Wang et al., 2013).

4.4. Selección asistida por marcadores moleculares y resistencia a *M. oryzae*

Los marcadores moleculares como su nombre lo indica son marcas de referencia en los cromosomas que sirven como puntos de localización de regiones de interés cuando se construye un mapa genético. Los mejoradores están interesados en saber la asociación (ligamiento) entre los marcadores moleculares y los genes que controlan características que ellos están tratando de manipular. La selección para la característica de interés se hace indirectamente sobre el marcador, cuando el marcador está en desequilibrio de ligamiento estrecho con el gen, y/o dentro del gen (marcador funcional). Así, la observación o detección de un marcador señala la presencia del carácter de interés (Acquaah, 2007).

Un SNP o polimorfismo en un sólo nucleótido (por sus siglas en inglés) es una variación de un sólo nucleótido entre genomas de individuos de la misma especie. Pueden ser utilizados para descubrir la diferencia entre individuos de una población, estudiar la filiación entre individuos, cuantificar la diversidad genética dentro de un grupo de germoplasma, o reconstruir la historia evolutiva de las poblaciones. En genética, se busca SNP asociados a caracteres de interés para poder, con los datos de anotación del genoma, identificar el(los) gen(es)/QTL(s) controlando estos caracteres. En mejoramiento se busca encontrar SNP ligados a genes de interés, tal como los genes de resistencia a patógenos, para facilitar la introgresión de estos genes en variedades elite (Acquaah, 2007).

El mejoramiento convencional para resistencia a enfermedades es un proceso laborioso, también es altamente dependiente de condiciones ambientales ya que se necesita hacer selección sobre el fenotipo (Ruane & Sonnino, 2007). El limitante de los programas de mejoramiento para conferir resistencia a enfermedad es debido a que con su demora, el mejoramiento convencional puede llevar a la creación de una variedad por la cual la resistencia sería superada por las nuevas variantes del patógeno. Típicamente se requiere de 10 a 15 años para desarrollar una variedad y llevarla al mercado (Miah et al., 2013). El factor tiempo es muy importante cuando se trabaja con mejoramiento en pro de obtener variedades resistentes, ya que por ejemplo con *M. oryzae* se ha demostrado que la resistencia en campo puede ser ineficiente después de tres a cuatro años de ser liberada la variedad o incluso antes que la misma salga al mercado (Khan et al. 2014).

El mejoramiento asistido por marcadores moleculares es una alternativa adecuada para el desarrollo de variedades resistentes a *M. oryzae* ya que como se mencionó anteriormente los fenotipos resistentes están comúnmente siendo la expresión de un solo gen o pocos genes R (Young, 1996; Collard & Mackill, 2008). Utilizando marcadores moleculares se tiene una gran oportunidad de mejorar la eficiencia del mejoramiento, porque la selección se dirige no a la característica de interés en si misma sino en marcadores moleculares ligados al gen controlando esa característica en particular, los cuales no son afectados por el ambiente (Miah et al., 2013). Además, la MAS permite de seleccionar temprano en el ciclo del cultivo, y a una etapa precoz del desarrollo de la planta, lo que permite una ganancia significativa de tiempo. La disponibilidad de marcadores adecuados es esencial para poder desarrollar una resistencia durable y eficaz a *M. oryzae*, y el éxito de esta selección está influenciado en la relación entre los marcadores y los genes de interés (Akhtar et al., 2010).

La caracterización y análisis de genes R ha permitido la obtención de marcadores estrechamente ligados a características de interés, que han sido utilizados en los procesos de selección de diversos programas de mejoramiento de arroz (Miah et al., 2013). En años recientes MAS ha sido utilizada en la producción de nuevas variedades con los diversos genes de resistencia a *M. Oryzae* (Hasan et al., 2015).

El descubrimiento continuo y la facilidad de uso de marcadores moleculares para que los mejoradores puedan utilizarlos en el proceso de mejoramiento tiene gran potencial para acelerar de manera significativa el desarrollo de cultivares resistentes (Miah et al., 2013).

4.5. Método de retrocruces asistido por marcadores moleculares

El método de retrocruces ha sido una técnica ampliamente utilizada en mejoramiento de plantas (Stoskopf et al., 1993; Allard, 1999; Hospital, 2005). El proceso de retrocruzar se hace con el fin de incorporar uno o pocos genes en una variedad elite o adaptada (Hasan et al., 2015). Este método propuesto por Harlan y Pope en 1922 fue usado intensivamente entre la década de los 30 y los 60 (Akhtar et al., 2010), y ha sido una técnica ampliamente utilizada en mejoramiento de plantas (Stoskopf et al., 1993; Allard, 1999; Hospital, 2005).

En muchos casos la variedad elite usada para el retrocruce tiene un amplio rango de atributos deseables pero es deficiente en solo unas pocas características (Allard, 1960). Este parental se denomina el parental recurrente. El otro parental, denominado el parental donante, posee uno o más genes que controlan una característica de interés, ausente en la variedad elite. El objetivo de realizar retrocruces es de transferir uno o unos genes de interés desde el padre donante hasta el genoma de la variedad elite y recuperar el genoma del padre recurrente, eliminando los genes indeseables del padre donante ligados a este gene, tan rápido como sea posible (Hasan et al., 2015). Dependiendo del ligamiento entre el gene de interés y las regiones no deseables del padre donante presentes alrededor del gen, el tamaño de las regiones flanqueantes al gene puede reducirse por medio de retrocruces adicionales (Young, et al., 1988).

Hospital en el 2003 expone que en esquemas de mejoramiento convencional, la presencia del gen de interés es evaluada fenotípicamente (este gen debe tener un efecto visible en la progenie) y la recuperación del genoma del material a mejorar (o parental recurrente) es asegurada por la realización de retrocruces

sucesivos con los individuos de la progenie que tiene el fenotipo del padre donante. El genoma del padre donante presente en la progenie (para cromosomas que no llevan el gen) se espera que se reduzca en cada ciclo de retro-cruzamiento, y se necesitan entre seis y siete ciclos de retro-cruzamiento para asegurar una similitud aceptable entre la línea obtenida por retrocruces y el padre recurrente. En la práctica, el número de retrocruces realizados es aún mucho mayor.

Para el caso de retrocruces asistidos por marcadores moleculares, la recuperación de la totalidad de los alelos del padre recurrente se puede obtener incluso a partir del segundo retrocruce y comúnmente en el cuarto ciclo (Akhtar et al., 2010). Por ende el uso de marcadores moleculares en los retrocruces incrementa la eficiencia de la selección. La utilización de la información genética de los parentales ayuda en el control de la presencia del gen de interés, ya que se puede seguir su aparición en la progenie de cada ciclo, así mismo, el control del genoma recurrente recuperado (Hospital, 2003).

La utilización de MAS en las primeras generaciones es de gran importancia, ya que se pueden descartar plantas con combinaciones genéticas no deseables. Esto permite enfocarse en menos líneas que darán paso a las nuevas generaciones (Akhtar et al., 2010). La eficacia de los retrocruces asistidos depende de varios factores, incluyendo el tamaño de población producto de cada ciclo de retrocruces, la distancia entre los marcadores y el gen de interés, y el número de marcadores para recuperación del genoma recurrente utilizados.

Hospital en su estudio sobre mejoramiento asistido por marcadores moleculares (Hospital, 2003), considera que el tamaño óptimo de población para recuperar el 99% de los alelos del padre donante en el cuarto ciclo de retrocruce, utilizando tres marcadores moleculares por cromosoma es de 300 individuos. Ahí mismo Hospital compara retrocruces sin la utilización de marcadores moleculares, en la que después de cuatro ciclos solo se ha obtenido la recuperación del 96.9% del genoma del padre recurrente (tabla 1).

Tabla 1. Recuperación esperada del genoma del parental recurrente comparando retrocruces convencionales y asistidos por marcadores moleculares (Modificado de Hospital, 2003).

Generación de retrocruce	Número de individuos	Porcentaje del genoma parental recurrente	
		Retrocruce asistido por marcadores moleculares	Retrocruces convencionales
BC ₁ F ₁	70	79.0	75.0
BC ₂ F ₁	100	92.2	87.5
BC ₃ F ₁	150	98.0	93.7
BC ₄ F ₁	300	99.0	96.9

5. Materiales y Métodos

5.1. Ubicación

Los procedimientos descritos a continuación se realizaron en las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ubicado en el municipio de Palmira, departamento del Valle del Cauca - Colombia, situado a 3°30'7"N 76°21'22"W y altitud de 965 msnm, específicamente en el área de Biotecnología y en los invernaderos del Programa de Arroz.

5.2. Material vegetal

Como donante del gen *Pi9* se utilizó el cultivar 75-1-127, y como donante del gen *Pi40* se utilizó el cultivar IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1, estos dos materiales fueron desarrollados por el IRRI y utilizados como padres donantes de polen en la generación F₁ del proceso de introgresión. Bajo las condiciones de la casa de malla en el CIAT Palmira, 75-1-1727 floreció a los 75 días después de trasplante, mientras que IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1 floreció a los 45 días.

Como receptores de los genes de resistencia se utilizaron las líneas de arroz de secano L3 y L23, las cuales bajo las condiciones de casa de malla en el CIAT Palmira florecieron a los 50 y 55 días después del trasplante.

5.3. Germinación de semillas

La semilla pura y desnuda de cada uno de los parentales se pre-germinó en el laboratorio para garantizar la óptima desinfección y homogeneidad del material utilizado como parental en el proceso de mejoramiento. Las semillas destinadas a germinación se llevaron a un horno a 50 grados por 5 días.

5.3.1. Desinfección

- a. En un tubo Falcon de 50 ml estéril se preparó una solución al 8 % de TEGO 51® y se sumergieron las semillas a ser desinfectadas.
- b. Se dejaron las semillas en la solución de TEGO 51® por 10 minutos en constante agitación.
- c. Se descartó la solución de TEGO 51® y se enjuagó dos veces las semillas con agua destilada estéril.
- d. Al eliminar los restos del desinfectante, las semillas se pasaron a germinar.

5.3.2. Germinación y paso a suelo

- a. En el fondo de un frasco Peldar de 500 ml se puso 3 toallas de papel absorbente (lo que formó una capa de 5 milímetros aproximadamente (encargada de retener humedad), se esterilizó una hora a 120 °C.
- b. Con agua destilada estéril se humedeció el montaje anterior y se puso las semillas sobre las toallas húmedas, se tapó el frasco, se cubrió con papel aluminio y se dejó en una cámara de crecimiento Hoffman a 28 °C.
- c. Pasados 3 días se observó que la semilla germinó, por lo que se descubrieron los frascos y se dejaron bajo la luz con un fotoperiodo 12/12 para garantizar que las plantas iniciaran el proceso de fotosíntesis.
- d. Una vez las plantas crecieron, con su raíz principal desarrollada y que hubiesen aparecido las raíces secundarias, se trasladaron a suelo estéril previamente humedecido. Esto fue aproximadamente a 7 días de iniciado el proceso de germinación.
- e. Los primeros 25 días de crecimiento de las plantas se establecieron en materos de cuatro pulgadas. Las plantas seleccionadas para cruzamientos se pasaron a materos más grandes de ocho pulgadas los cuales contenían suelo fangueado no estéril.
- f. La fertilización de las plantas cuando estuvieron en suelo fue de un gramo de urea cada ocho días, a partir del décimo día de trasplante. Las plantas seleccionadas para cruzamientos fueron fertilizadas el día de paso a fango con una mezcla de elementos mayores y menores, continuando con la fertilización nitrogenada.

5.4. Extracción de ADN y pruebas moleculares

Se extrajo ADN de plantas de 15 días de edad, siguiendo el protocolo de Risterucci et al., 2002 modificado por Lorieux en el 2002. La calidad de ADN se confirmó en gel de agarosa al 1%, se cuantificó en el Synergy™ HT (Held & Buehrer, 2004) y se normalizó a 60 ng/μl.

La evaluación de marcadores PI9-34B y Pi40-27A se llevó a cabo siguiendo el protocolo desarrollado por Silva en el 2015 en el laboratorio de Biotecnología del CIAT (Anexo 1).

La detección de los SNP en las progenies fue llevada a cabo utilizando la plataforma de genotipado Fluidigm Dynamic Arrays™ según el protocolo establecido por Thomson (2014), en la que se utilizó chips de 48 SNP.

La representación gráfica de la posición de cada uno de los marcadores y genes en el genoma de arroz, se realizó con el programa MapChart (Voorrips, 2002), teniendo como unidad de medida mega pares de bases (10⁶ pb).

5.4.1. Identificación y selección de marcadores tipo SNP para el rastreo del alelo *Pi9* y el alelo *Pi40* en poblaciones de retrocruce

Para identificar SNP que diferenciaron a las variedades donantes del alelo funcional de *Pi9* (75-1-127) y del alelo funcional de *Pi40* (IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1) de los parentales recurrentes (L3 y L23), se realizó la secuenciación de genoma completo (WGS) para los cuatro genotipos, se utilizaron los resultados del análisis realizados por Silva en el 2015, del laboratorio de biotecnología del CIAT (dichos análisis fueron realizados de la siguiente manera).

Las lecturas fueron analizadas usando la aplicación NGSEP (Next Generation Sequencing Eclipse Plugin) (Duitama et al. 2014) usando los parámetros recomendados para análisis de datos de WGS (calidad mínima del genotipo 40%, máximo número de alineamientos permitido para iniciar en el mismo sitio de referencia). Como referencia se utilizó el genoma de la variedad japonesa Nipponbare version 7 (IRGSP-1.0), el cual

esta secuenciado completamente y se encuentra disponible en la página del Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>).

NGSEP también fue utilizado para la anotación funcional de las variantes detectadas (SNP), para filtrar y hacer conversión a partir de archivos VCF (archivos de llamados de variantes) a otros formatos para subsecuentes análisis de datos.

Los parámetros utilizados para seleccionar los SNP fueron: i) mínima distancia de 30 pb entre un SNP de referencia y otro polimorfismo, ii) mínimo y máximo contenido de nucleótidos guanina-citosina de 20% y 65% respectivamente dentro de los 100 pb cuesta arriba y cuesta abajo de cada SNP blanco, y iii) mínimo de dos muestras genotipadas. Sobre estos marcadores pre-seleccionados se hizo una nueva selección manual para cubrir toda la región de búsqueda.

Para identificar la posición física del locus *Pi9* en el genoma de referencia se hizo alineamientos locales de nucleótidos usando Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia del gen *Pi9* reportada en el GenBank (accession DQ285630) contra el genoma de referencia.

Dado que el gen *Pi40* aún no ha sido clonado y caracterizado, las secuencias de los primers del marcador 9871.T7E2b que se encuentra ligado a *Pi40* (Suh et al. 2009) se alinearon al genoma de referencia para tratar de identificar la región más probable donde se localiza el gen. La secuencia de los primers se alinearon dentro de la región en la que se había localizado el gen *Pi9* [primer F: 10'389639-10'389659 pb, Primer R: 10'390280-10'390260 pb].

5.4.2. Selección de marcadores tipo SNP para el rastreo de alelos de parentales recurrentes L3 y 23 en poblaciones de retrocruce

Para identificar marcadores SNP que permitieran diferenciar a la variedad donante 75-1-127 o IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1 de los parentales recurrentes L3 y L23, se realizó una comparación del genotipo de cada parental contra la base de datos de 424 SNP disponibles en nuestro laboratorio, aprovechando así los marcadores ya existentes y normalmente utilizados en el grupo de investigación de arroz. La

disponibilidad de SNP varió de acuerdo a la similitud o divergencia entre los genomas comparados.

5.4.3. Desarrollo de marcadores tetra-primer para genotipado de SNP en gel de agarosa

Como una alternativa al genotipado en la plataforma Fluidigm Dynamic Arrays™ para hacer el seguimiento de los alelos funcionales de *Pi9* y *Pi40* en las poblaciones de retrocruce se diseñaron primers para marcadores tetra-primer ARMS-PCR (Vieira y de Oliveira, 2014) como una estrategia de pre-selección de las plantas con el gen de resistencia antes del genotipado de marcadores tipo SNP. Se seleccionó el SNP ubicado en la posición 10'385269pb [T/G] del cromosoma 6 polimórfico entre el donante de *Pi40* y las líneas recurrentes, y el SNP ubicado en la posición 10'384890 [C/T] polimórfico entre el donante de *Pi9* y las líneas recurrentes. Para estos dos SNP se desarrollaron marcadores tetra-primers utilizando la aplicación Primer1 (Ye et al., 2001) los cuales fueron designados *Pi40-27A* y *Pi9-34B* respectivamente. Adicionalmente se utilizó el marcador CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) 9871.T7E2b específico para *Pi40* (Ju et al., 2007).

5.5. Cruzamientos

Como las plantas implicadas en el proceso de retrocruce tenían todas fechas de floración diferentes, se hicieron cinco siembras escalonadas de los progenitores masculinos cada ocho días, iniciando 15 días antes de la siembra de los progenitores femeninos para *Pi40* y 25 días antes para *Pi9*. Así se logró la coincidencia de la floración de ambos padres.

Las paniculas receptoras de polen, se seleccionaron cuando la inflorescencia había emergido de 5 a 10 centímetros de la hoja bandera (Figura 3A). Esta selección se hizo en horas de la mañana, cuando la actividad de las florecillas era poca y no estaban llevando a cabo la antesis, posteriormente en horas de la tarde se inició la emasculación.

El proceso de emasculación consistió en, la remoción de anteras de las florecillas de los progenitores femeninos, antes de la maduración y liberación del polen. Esta remoción se programó teniendo en cuenta la hora de ocurrencia de la antesis o liberación natural del polen, que bajo las condiciones del invernadero inició dos horas antes del mediodía y duró más o menos dos horas.

El proceso de emasculación se llevó a cabo siguiendo el protocolo usado por el área de mejoramiento de arroz del CIAT:

- a. Con unas tijeras se eliminaron las espiguillas de la parte superior de la panícula y también las espiguillas muy jóvenes de la parte inferior.
- b. Con unas tijeras pequeñas se cortó la parte apical de cada florecilla (Figura 3B), justamente por encima de las anteras, las cuales se ubicaron mirando la florecilla al trasluz (Figura 3A), evitando lastimar el estigma.
- c. Por medio de una pipeta Pasteur conectada a una fuente de vacío se removieron las 6 anteras de cada florecilla (Figura 3C).
- d. Inmediatamente después de emasculadas todas las florecillas, la panícula se cubrió con un glasin o bolsa de papel, y se escribió en una etiqueta la fecha de emasculación y los parentales involucrados en el cruce.



Figura 3. Proceso de emasculación y polinización en flores de arroz. **A.** Flores de arroz antes de antesis. **B.** Corte de la lemma y la palea para dejar expuestas las anteras. **C.** Retiro de las anteras por medio de vacío. **D.** Polinización.

Una vez se tuvo las panículas madre emasculadas se realizó el proceso de polinización (Figura 4D).

- a. Las panículas madre se revisaron con suficiente anterioridad para asegurar que no habían espiguillas sin emasculadas.
- b. La hora adecuada para hacer la polinización fue entre las 10 y 12 del mediodía, dependiendo de la temperatura y la luminosidad emergieron más o menos temprano las anteras de las florecillas de los progenitores masculinos.
- c. Las panículas de las plantas padre con las anteras emergidas se movieron sobre las emasculadas, vigilando que el polen callera sobre las florecillas emasculadas. Inmediatamente después éstas se volvieron a cubrir con los glases para evitar la introducción de polen foráneo.
- d. A las panículas polinizadas se les repitió la polinización al día siguiente, para garantizar la máxima cantidad de semilla recuperada de cada cruce.
- e. Contando desde el último día de polinización se dejaron un mes las panículas englasadas, dándole tiempo a los granos de arroz a que maduraran y se secaran para después cosecharlos.

5.6. Retrocruces y selección con marcadores SNP

Una vez realizado el primer cruce (figura 2), se obtuvo una F_1 que al ser resultado de la hibridación de un par de líneas puras fue toda heterocigota. De la población de plantas F_1 se escogió una planta que se cruzó nuevamente con el padre recurrente, resultando en una BC_1F_1 que significa retrocruce 1.

En cada generación se seleccionó plantas a favor del genoma recurrente, en este caso con los SNP para la línea L3 y L23, y a favor del gen de resistencia con los SNP para *Pi9* y *Pi40*. Las plantas escogidas para continuar con el proceso de introgresión se seleccionaron por tener el gen de resistencia y a su vez que presentaran la mayor cantidad de alelos del padre recurrente. El proceso se repitió hasta alcanzar la recuperación de por lo menos el 97 % de los alelos recurrentes. Para algunas poblaciones esto ocurrió en BC_2F_1 y en otras en BC_3F_1 . Sea cual fuere la generación

seleccionada (si BC₂F₁ o BC₃F₁), se permitió la autopolinización de las plantas seleccionadas, con el fin de obtener el gen de resistencia en estado homocigoto (figura 4).

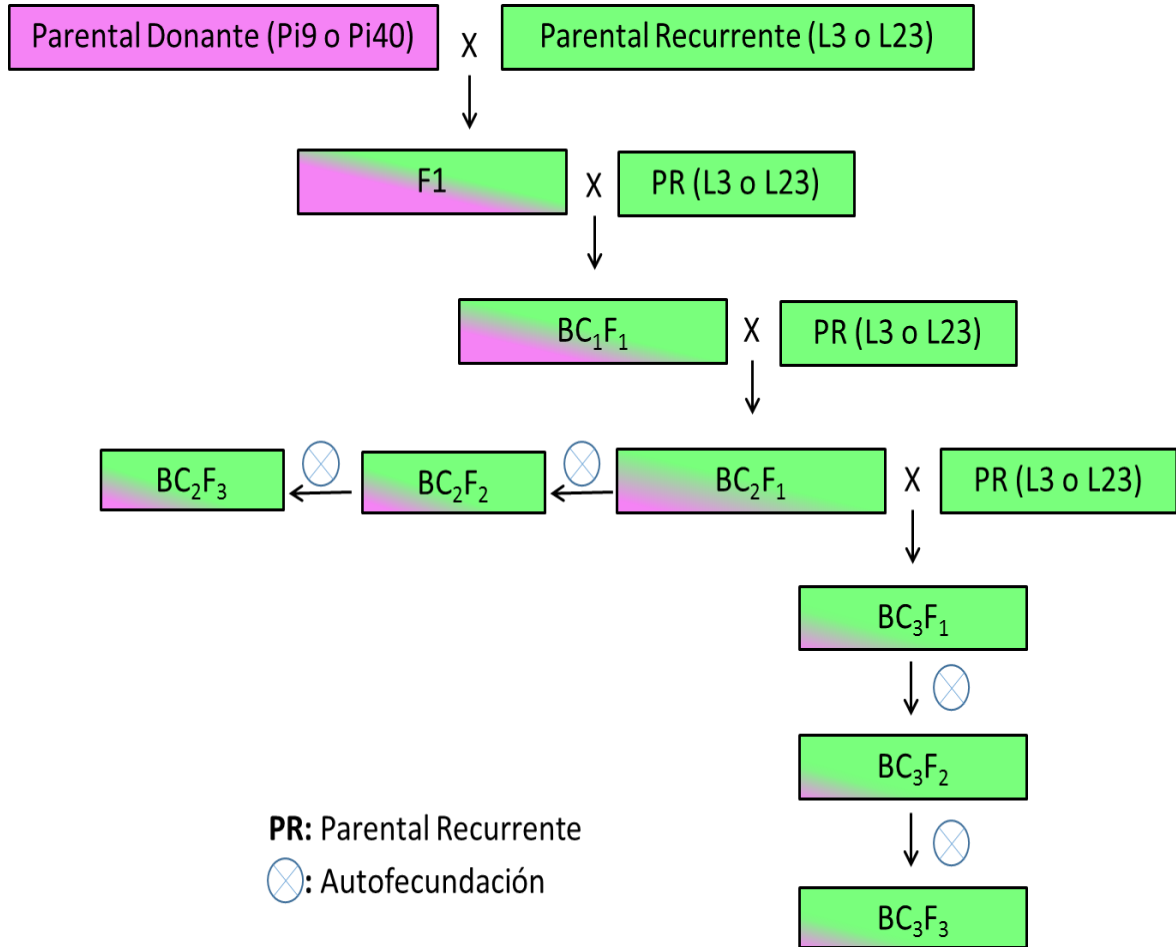


Figura 4. Esquema de mejoramiento en el proceso de retrocruces.

6. Resultados

6.1. Homogeneidad de semilla para iniciación de cruzamientos

Mediante la utilización del chip de SNP de diversidad se confirmó la homogeneidad de la semilla de los parentales involucrados en el proceso de introgresión. Un ejemplo de la composición alélica de 75-1-127, L23, L3 y de IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1, se observa en la figura 5 en la que se muestra el genotipo de cada planta con 23 de los 96 marcadores SNP evaluados. Se descartaron las plantas que presentaron loci en estado heterocigoto (planta 6 y 21) lo mismo que las plantas que presentaban alelos diferentes a los característicos de cada variedad o línea (planta 37).

Las plantas que cumplieron con el perfil genético de la variedad o línea se incorporaron en el proceso de introgresión.

Consec	Designation /SNPT name	fn9	id10000174	id10003885	id10006161	id1004817	id1007776	id1012784	id1015541	id1023892	id1028304	id11000858	id11002933	id11003281	id11004215	id11005646	id11008929	id12002490	id12006327	id12007742	id2005263	id2006621	id2009319	id2010969
1	75-1-127	A:A	G:G	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	G:G	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	C:C
2	75-1-127	A:A	G:G	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	G:G	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	C:C
3	75-1-127	A:A	G:G	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	G:G	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	C:C
4	75-1-127	A:A	G:G	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	G:G	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	C:C
5	75-1-127	A:A	G:G	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	G:G	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	C:C
6	75-1-127	A:A	A:G	G:G	A:C	A:A	A:G	G:G	C:C	A:G	A:A	A:G	A:C	A:A	A:G	C:G	A:C	A:G	A:A	C:C	A:G	G:G	A:A	A:C
7	75-1-127	A:A	G:G	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	G:G	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	C:C
8	75-1-127	A:A	G:G	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	G:G	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	C:C
9	75-1-127	A:A	G:G	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	G:G	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	C:C
10	75-1-127	A:A	G:G	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	G:G	C:C	G:G	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	C:C
11	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
12	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
13	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
14	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
15	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
16	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
17	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
18	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
19	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
20	Linea23	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
21	Linea3	G:G	A:A	A:A	A:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:C	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:G	A:G	A:A	C:C
22	Linea3	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
23	Linea3	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
24	Linea3	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
25	Linea3	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
26	Linea3	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
27	Linea3	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
28	Linea3	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
29	Linea3	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
30	Linea3	G:G	A:A	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C
31	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A
32	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A
33	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A
34	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A
35	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A
36	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A
37	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A
38	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A
39	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A
40	IR34	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	G:G	A:A	A:A	A:A	C:C	A:A	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A

Figura 5. Perfiles genéticos de parentales con 23 de 96 marcadores SNP evaluados.

6.2. Identificación y selección de marcadores tipo SNP para el rastreo de alelos *Pi9* y *Pi40* en poblaciones de retrocruce

El segmento genómico con la mayor identidad a la secuencia de *Pi9* se encontró en el cromosoma 6 en la región comprendida entre 10'382004 y 10'390596 pb (en el genoma de 75-1-127). Otros cuatro segmentos ubicados cerca al anterior fueron identificados en las posiciones [10'408268 – 10'410991] pb, [10'424604 – 10'427692] pb, [10'447169 – 10'449979] pb y [10'377173 -10'379993] pb. Esto se debe a que el gen *Pi9* se encuentra ubicado en un clúster de genes NBS-LRR que ha

evolucionado por duplicación génica. Por lo anterior se decidió identificar SNP que diferencien al genotipo donante 75-1-127 de las líneas recurrentes en toda la región del clúster de genes NBS-LRR incluyendo 250.000 pb cuesta arriba y cuesta abajo de la región blanco. Esto permitió hacer el seguimiento de la recombinación tanto del gen *Pi9* como de la región flanqueante en las poblaciones de retrocruce. De esta manera se seleccionaron los marcadores distribuidos en la región entre [10'124132 - 10'701549] pb del cromosoma seis (figura 4). Para *Pi40* se llevó a cabo la búsqueda de los marcadores en la misma región del cromosoma 6 pero sobre el genoma del padre donante IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1 (figura 7).

En cuanto a *Pi9*, se identificaron 22 marcadores SNP (figura 6). El marcador *Pi9*-12 se encontró sobre la región reportada para el gen, y otros seis marcadores en la región reportada para el clúster de *Pi9*, los 15 marcadores restantes se localizaron en las inmediaciones del gen (10 cuesta arriba y 5 cuesta abajo del gen).

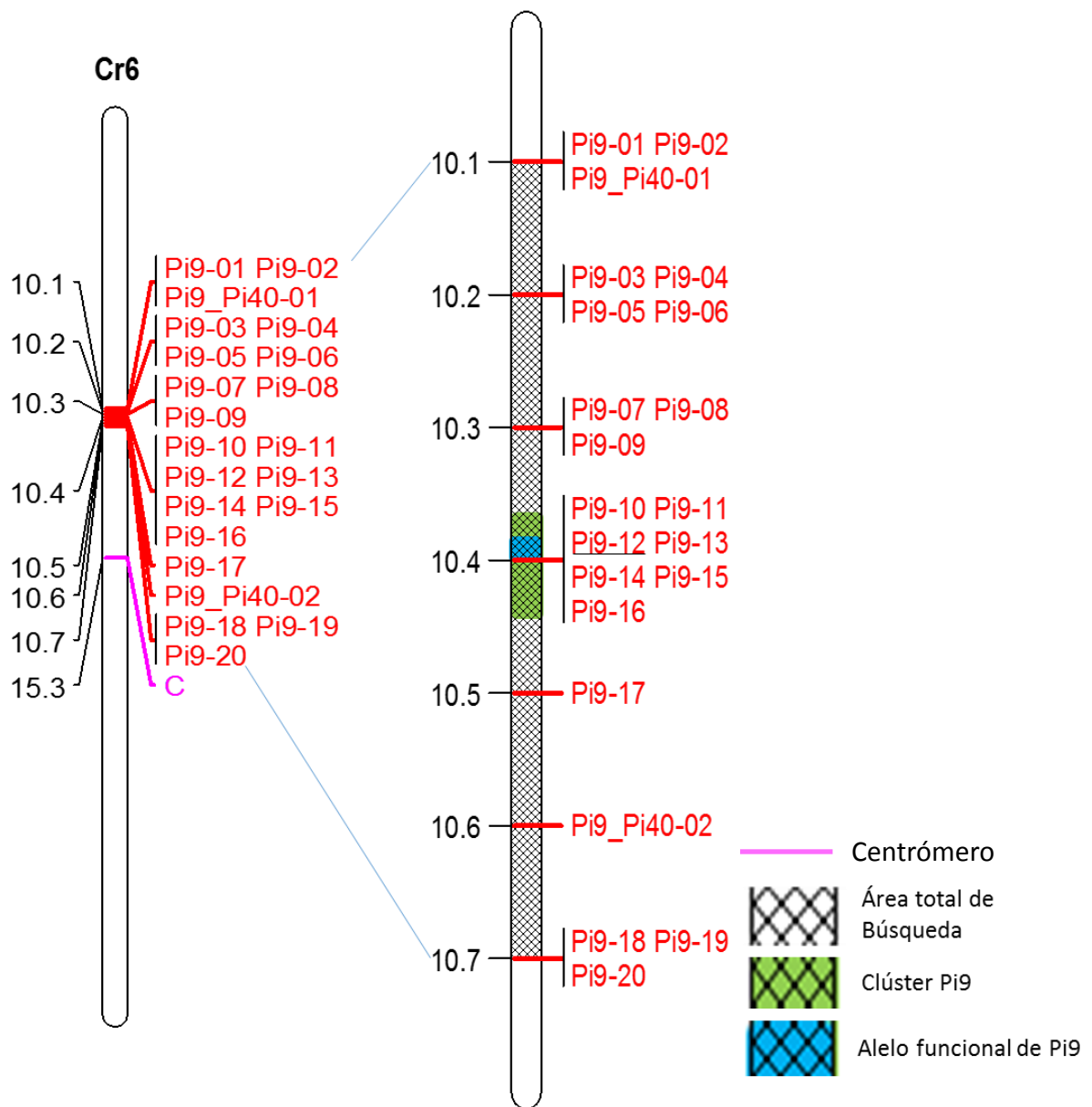


Figura 6. Ubicación física de los marcadores SNP diseñados para selección de Pi9. Distancias genéticas en Megabases Mb en negro al lado izquierdo del cromosoma, nombre del marcador (en rojo) al lado derecho del cromosoma.

Para *Pi40*, se obtuvo la identificación de 18 marcadores SNP (Figura 5), distribuidos a lo largo de la región [10'124132 - 10'701549] pb del cromosoma seis. Dos de los marcadores encontrados para *Pi40* coincidieron con el alelo encontrado en *Pi9*, que son *Pi9_Pi40-01* ubicado corriente arriba de la posición reportada para el gen, y el *Pi9_Pi40-02* ubicado corriente debajo de la posición reportada para el gen.

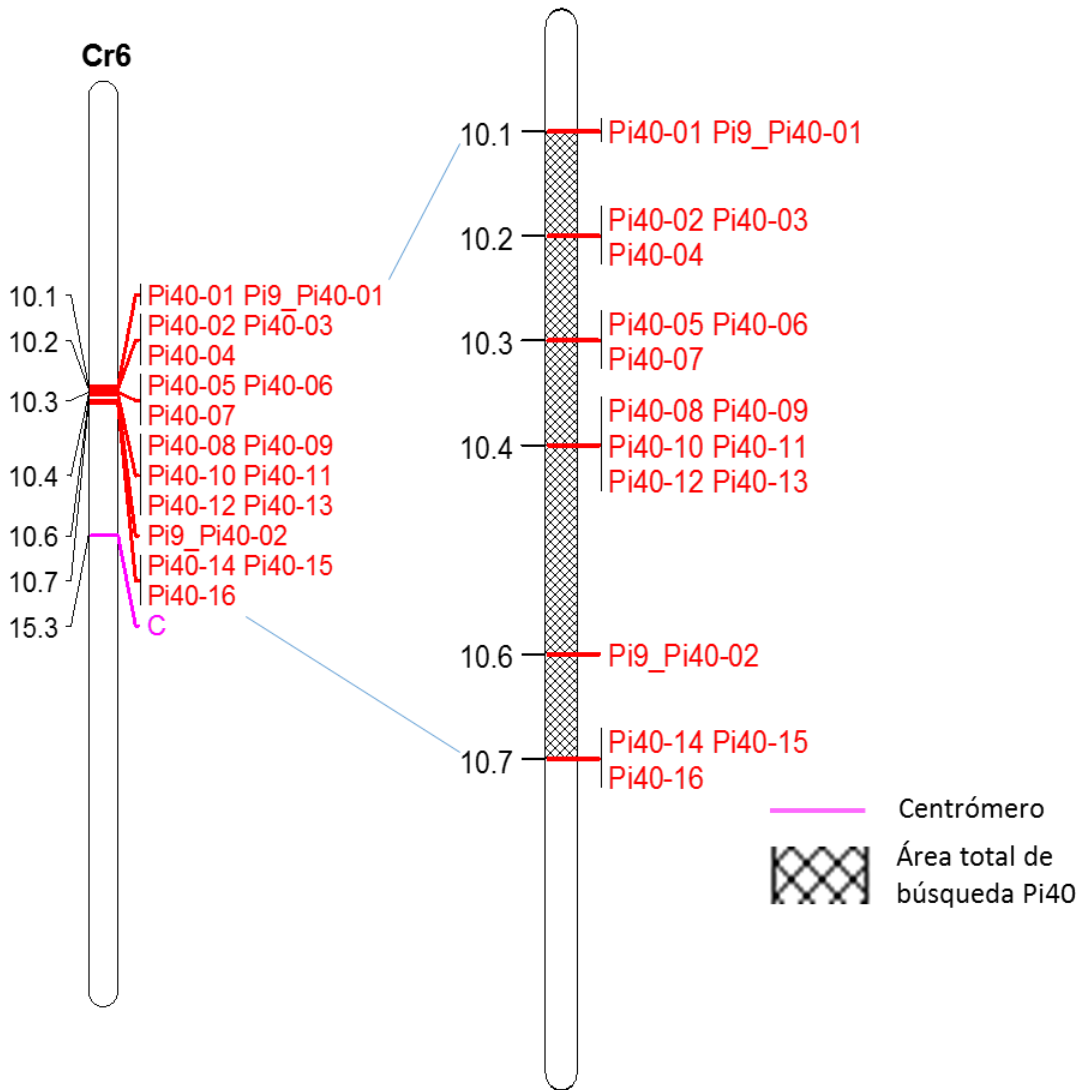


Figura 7. Ubicación física de los marcadores SNP diseñados para selección de *Pi40*. (Distancias genéticas en Megabases Mb en negro al lado izquierdo del cromosoma, nombre del marcador (en rojo) al lado derecho del cromosoma). Selección de marcadores tipo SNP para el rastreo de alelos de parentales recurrentes L3 y L23 en poblaciones de retrocruce.

Para las poblaciones resultando de cruzamientos entre 75-1-127 y las líneas de secano se seleccionaron 74 marcadores SNP para la selección del fondo genético más los 22 SNP de selección del gen *Pi9* se completó un arreglo de 96 marcadores que se usaron con la plataforma Fluidigm Dynamic Arrays™. Por su parte para las poblaciones resultado de cruzamientos entre IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1 y las líneas de secano se seleccionaron 30 marcadores SNP además de los 18 SNP de selección de *Pi40* completando un set de 48 marcadores, utilizados en la misma plataforma de genotipado.

6.3. Generación F₁

Cuatro poblaciones se generaron a partir de cruzamientos simples entre el padre donante de resistencia y las líneas de secano, estas poblaciones se nombraron con el nombre del parental recurrente seguido del gen que se introgresión como se muestra a continuación: L23_*Pi9*, L3_*Pi9*, L23_*Pi40* y L3_*Pi40*. A partir de semilla F₁ se analizó el perfil genético de cuatro plantas de cada cruce, para corroborar la presencia del gen de resistencia respectivo (*Pi9* o *Pi40*). En todas las poblaciones se confirmó la presencia del gen de resistencia. En la Tabla 2 se muestra la cantidad de semilla obtenida en cada generación F₁.

Tabla 2. Semilla obtenida en la generación F₁ y BC₁F₁ de las cuatro poblaciones en proceso de mejoramiento.

Población	Semilla obtenida	
	F ₁	BC ₁ F ₁
L3_ <i>Pi9</i>	135	450
L23_ <i>Pi9</i>	21	142
L3_ <i>Pi40</i>	113	200
L23_ <i>Pi40</i>	74	239

6.4. Generación BC₁F₁

Una vez confirmada la presencia del gen de resistencia en plantas F₁ de las cuatro poblaciones se realizó el primer ciclo de retrocruces con el padre recurrente, de esta manera se obtuvo la BC₁F₁. En esta generación se esperaba que el gen de resistencia estuviera en la mitad de la progenie y la otra mitad tuviera el genotipo del padre recurrente.

En las figuras 7 y 8 se muestra una representación de la posición física de los marcadores empleados en el genotipado de la planta CT25128 perteneciente a la población BC₁F₁ de L3_*Pi9*, en dicha población se realizó la selección con 86 marcadores SNP de los 96 evaluados, para la planta CT25128 se obtuvo una recuperación del 69% de los alelos recurrentes y la recuperación de la totalidad de los alelos de *Pi9* en estado heterocigoto.

De la población L3_Pi9, se seleccionó la planta CT25128 que tuvo una recuperación del 69% de los alelos recurrentes. Para esta BC₁F₁, la selección se basó en 86 marcadores SNP (figuras 8 y 9).

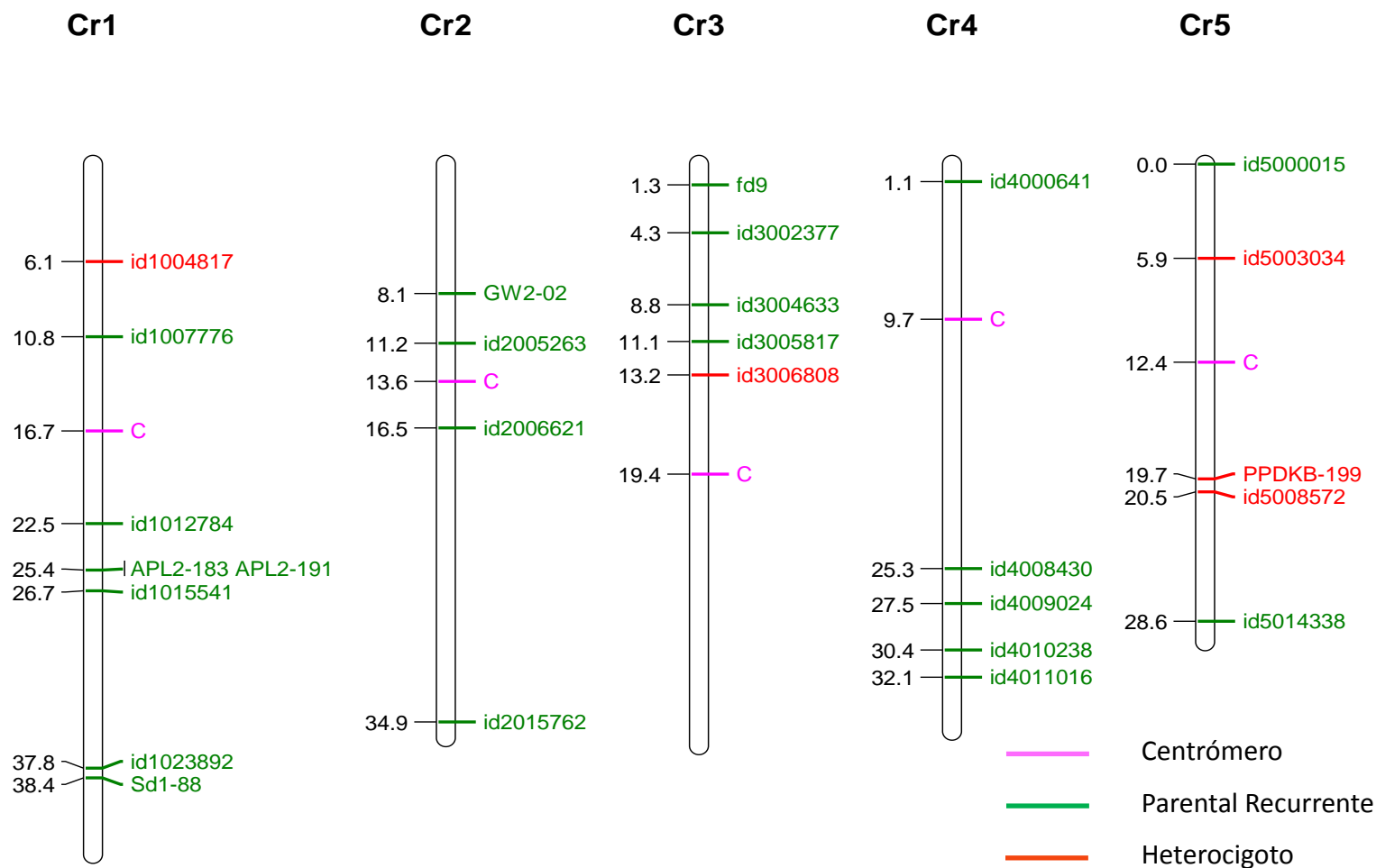


Figura 8. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25128. Cromosoma 1-5. L3_Pi9 BC₁F₁. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

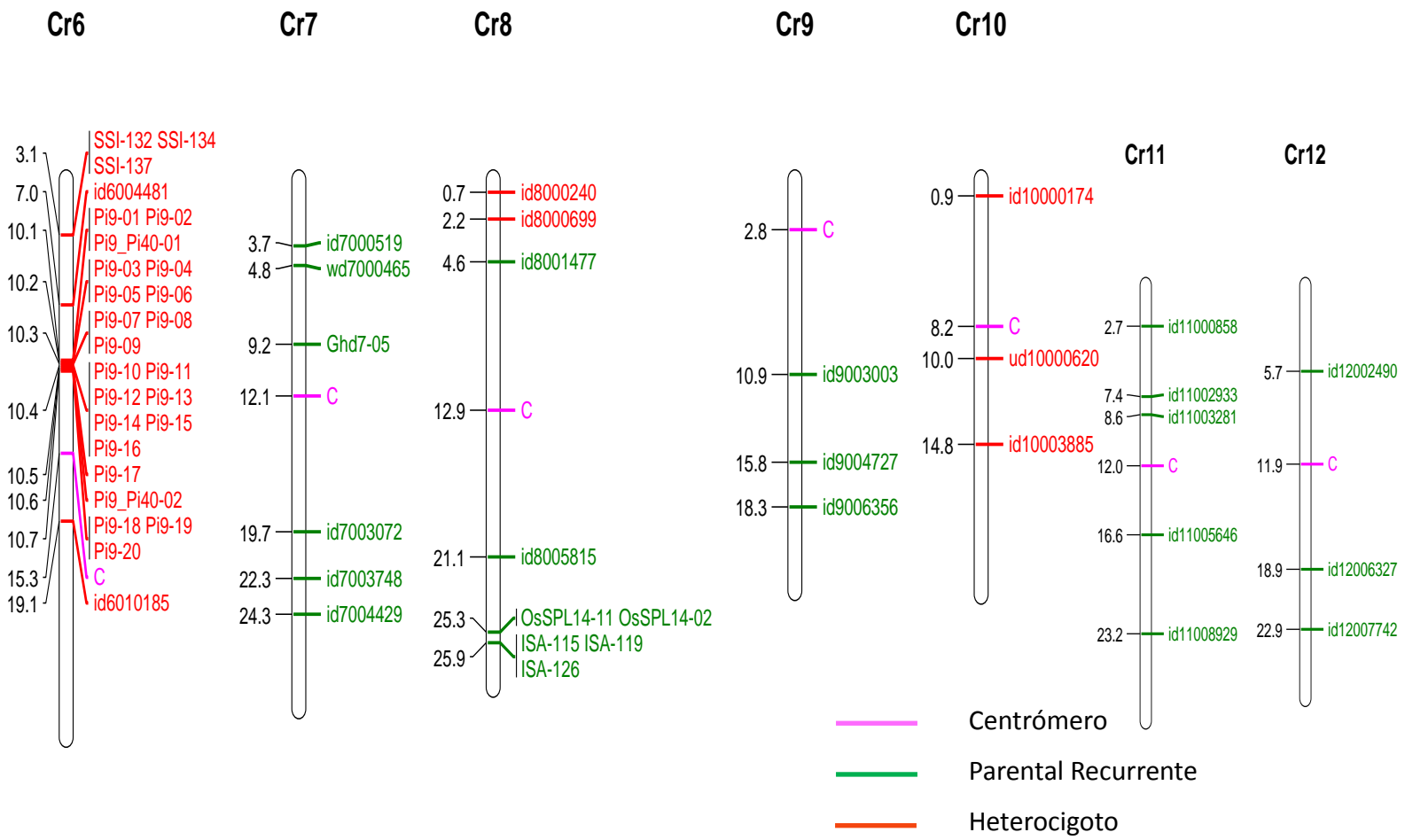


Figura 9. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25128. Cromosomas 6-12. L3_Pi9 BC1F1. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

De la población L23_Pi9 escogió la planta CT25138 que tenían una recuperación del 74% de los alelos recurrentes. Para esta BC₁F₁, la selección se basó en 84 marcadores SNP (figuras 10 y 11).

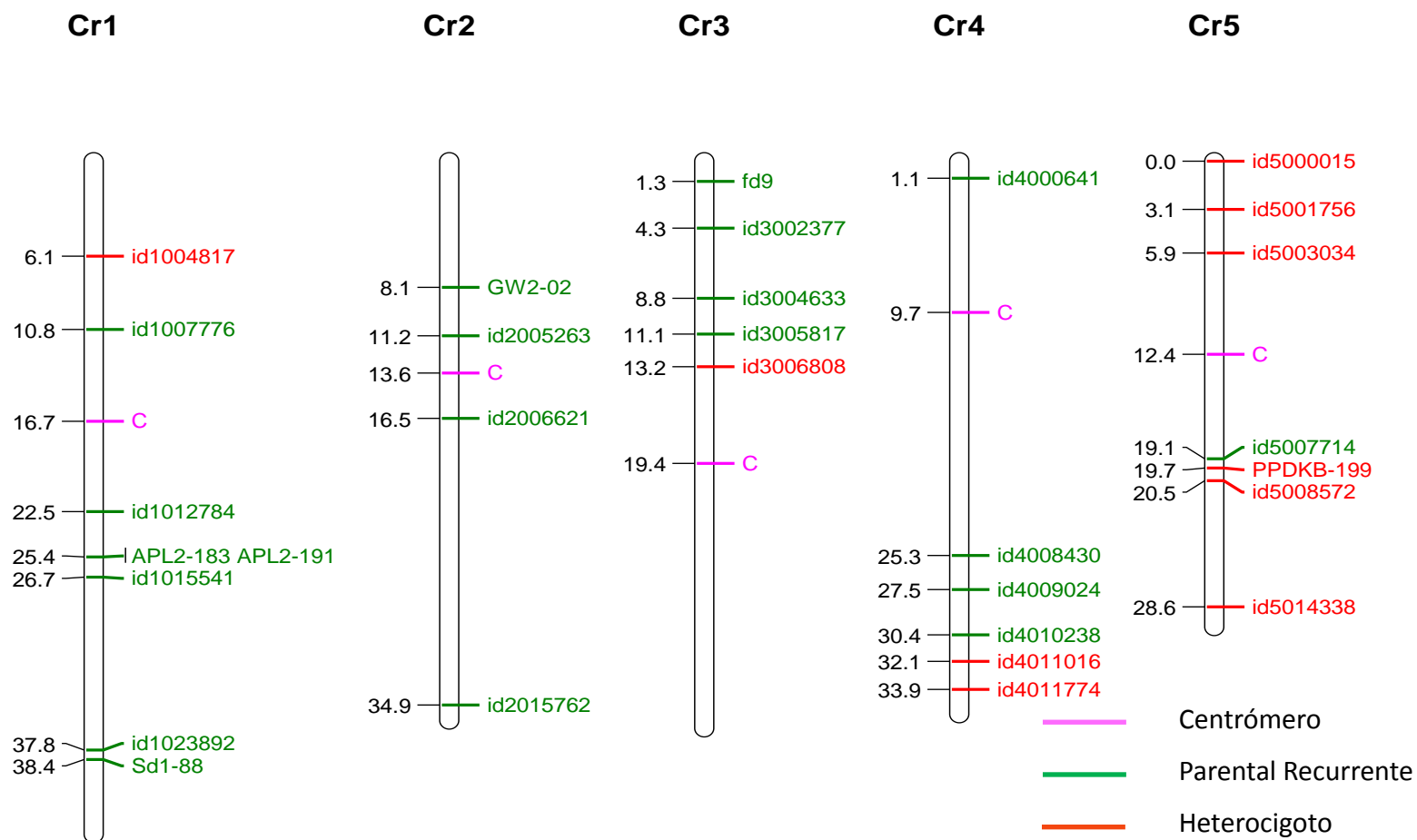


Figura 10. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25138. Cromosomas 1-5. L23_Pi9 BC₁F₁. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

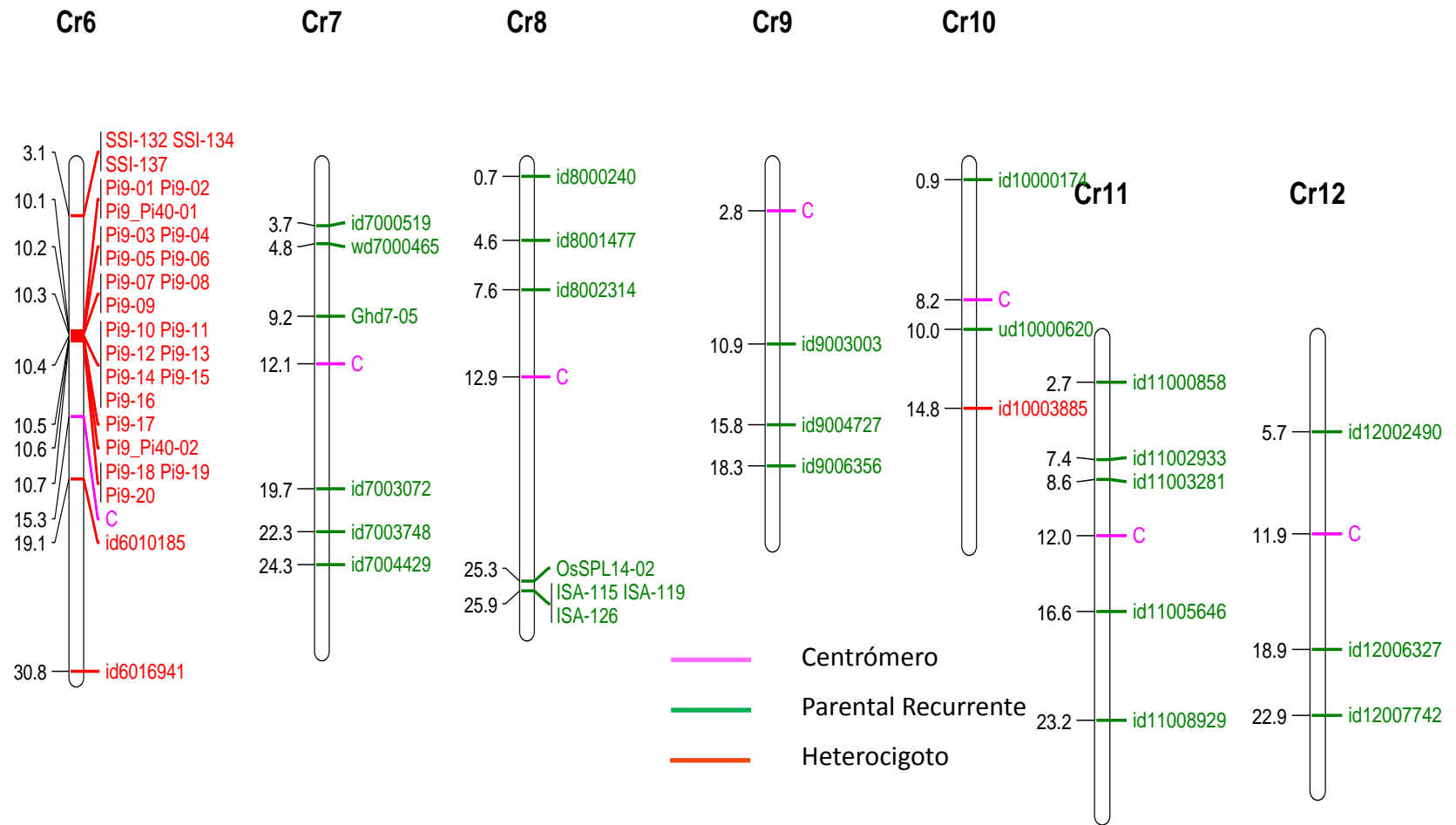


Figura 11. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25138. Cromosomas 6-12. L23_Pi9 BC1F1. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

De la población L3_Pi40 escogió la planta CT25174 que tenían una recuperación del 67% de los alelos recurrentes. Para esta BC₁F₁, la selección se basó en 38 marcadores SNP distribuidos en 9 de los 12 cromosomas (figuras 12 y 13).

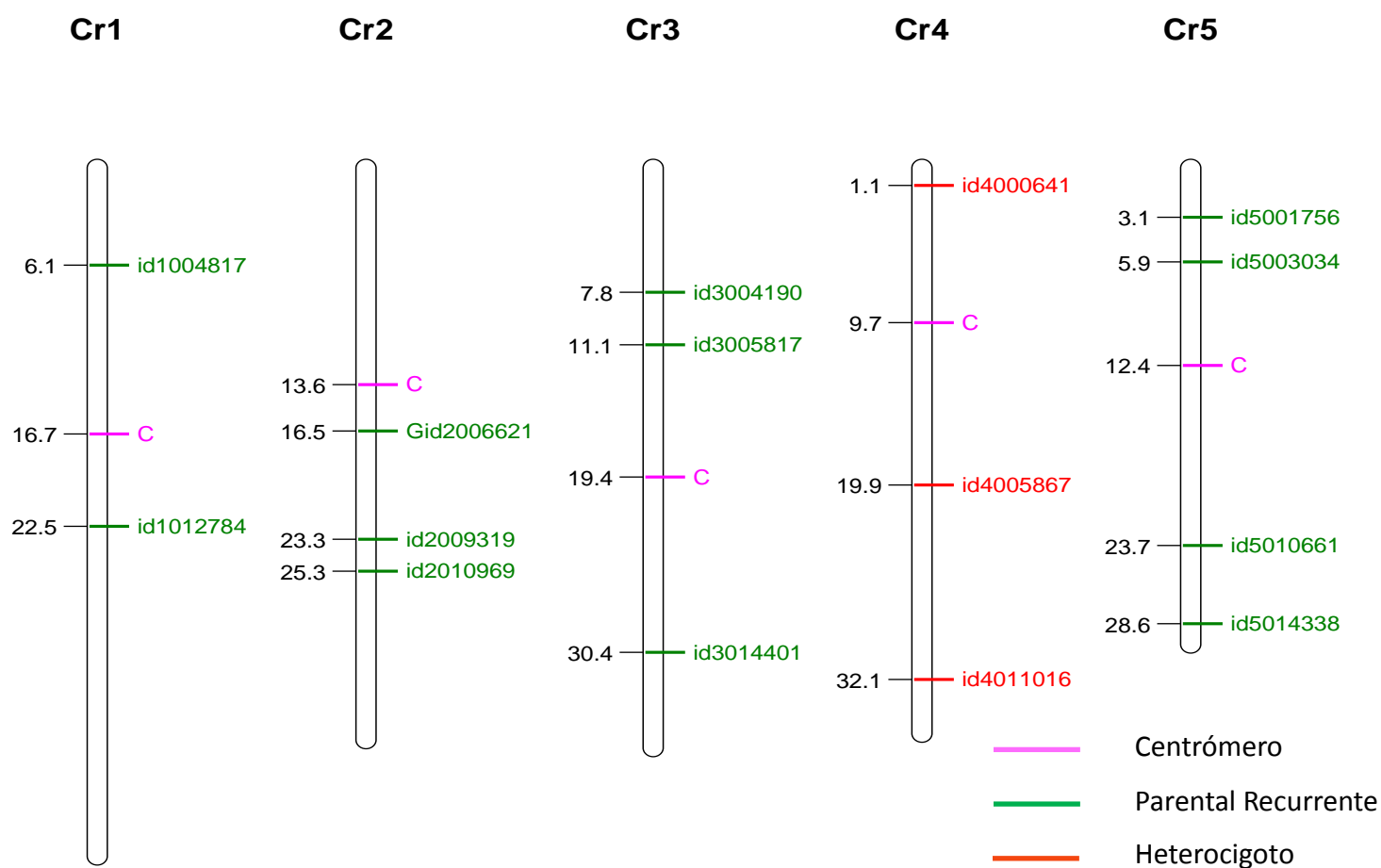


Figura 12. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25174. Cromosomas 1-5. L3_Pi40 BC₁F₁. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

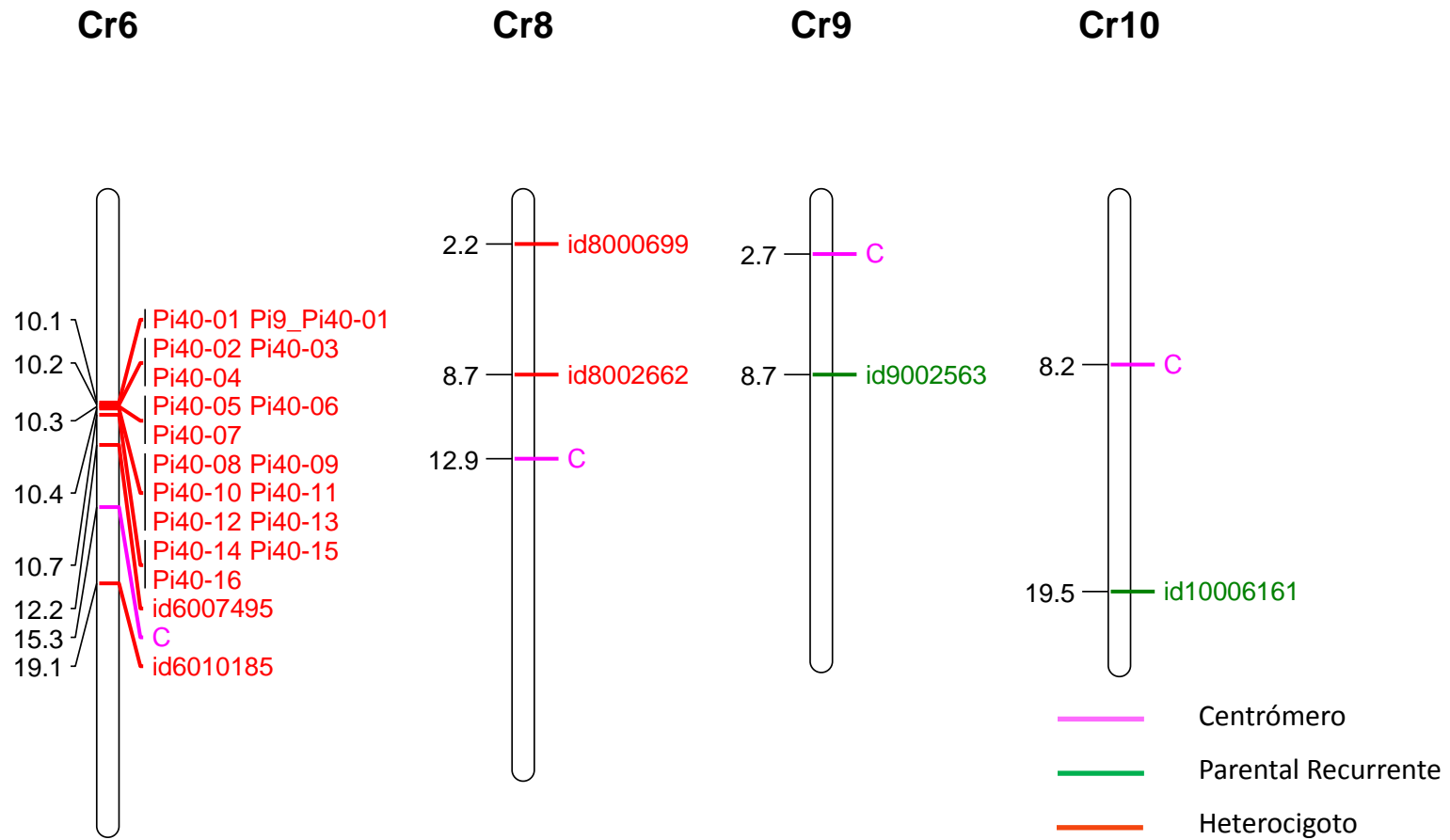


Figura 13. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25174. Cromosomas 6-10. L3_Pi40 BC1F1. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

De la población L23_Pi40 escogió la planta CT25175 que tenían una recuperación del 61% de los alelos recurrentes. Para esta BC₁F₁, la selección se basó en 41 marcadores SNP distribuidos en 10 de los 12 cromosomas (figuras 13 y 14).

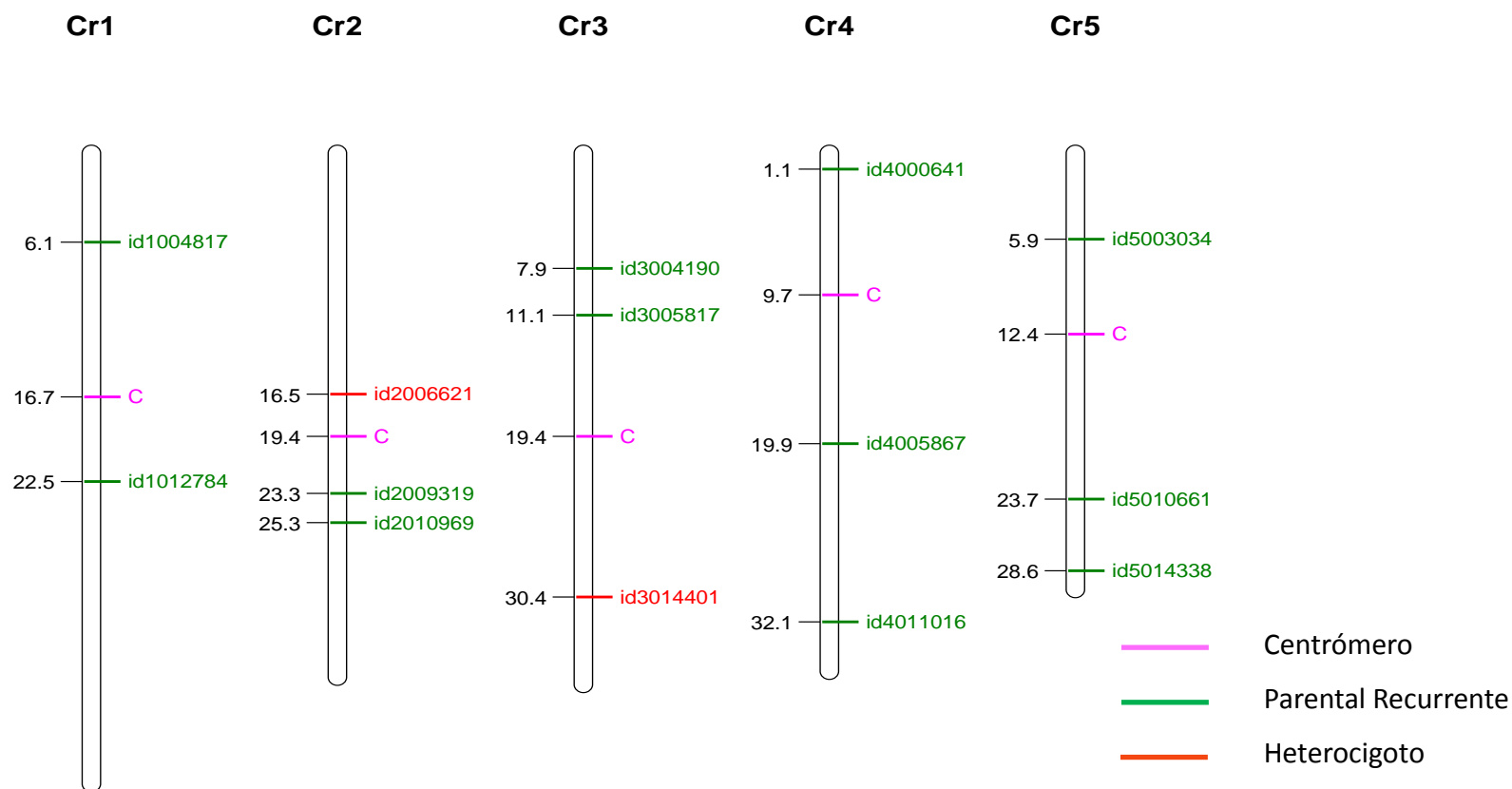


Figura 14. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25175. Cromosomas 1-5. L23_Pi40 BC₁F₁. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

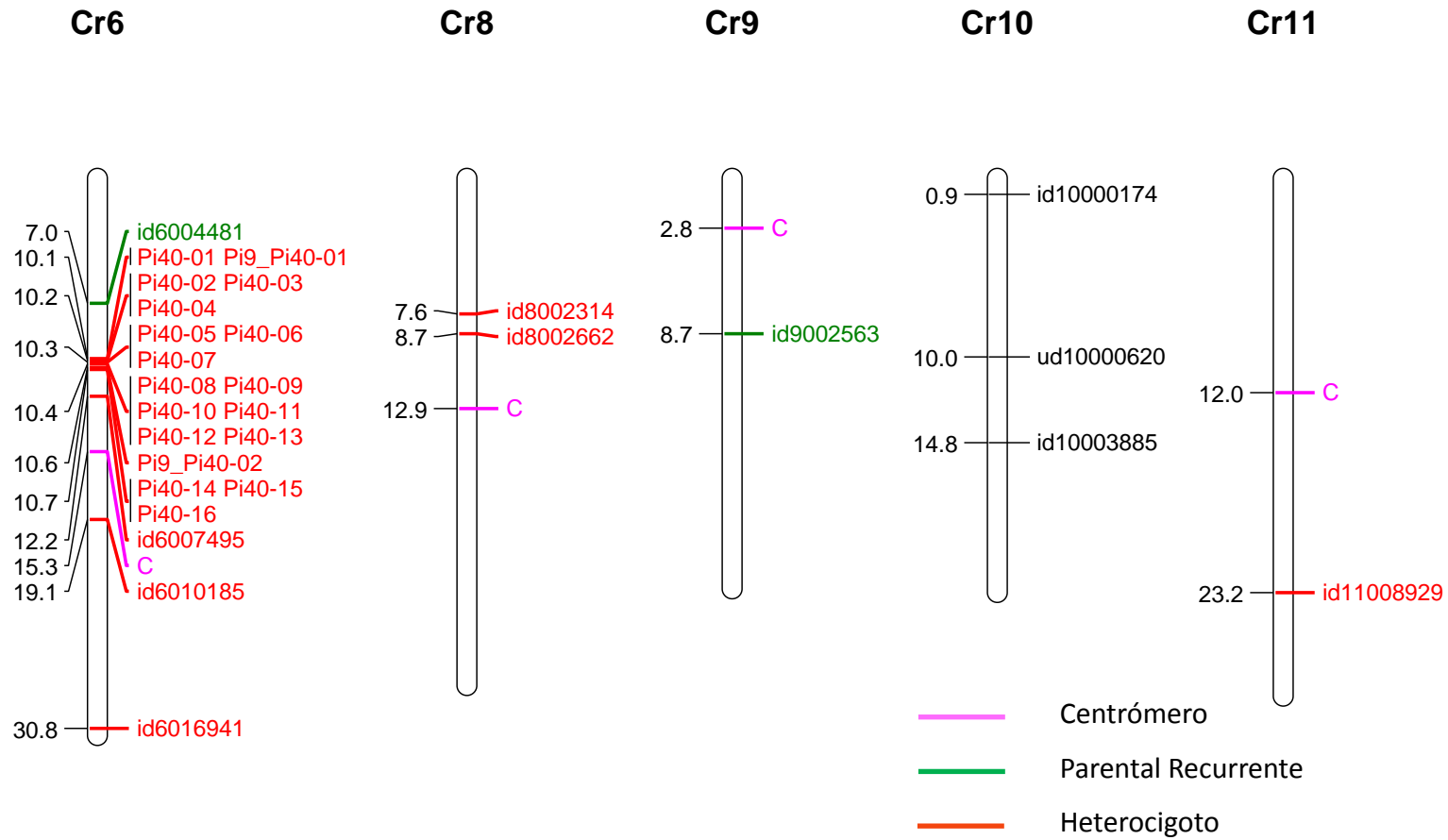


Figura 15. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25175. Cromosomas 6-11. L23_Pi40 BC₁F₁. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

Con cada planta seleccionada en BC₁F₁ se procedió a hacer el segundo ciclo de retrocruce. En la Tabla 3 se muestran el tamaño de población y la fracción de recuperación del genoma del padre recurrente obtenidos en cada ciclo de retrocruces y auto polinización de las cuatro poblaciones en proceso de mejoramiento.

Tabla 3. Porcentaje de recuperación de alelos del parental recurrente, en las cuatro poblaciones en proceso de mejoramiento.

Generación	Tamaño Población	ID Planta Seleccionada	Porcentaje de alelos del padre recurrente
Población	L3_Pi9		
BC1F1	120	CT25128	69
BC2F1	77	CT25130	92
BC3F1	100	K1	95
Población	L23_Pi9		
BC1F1	84	CT25138	74
BC2F1	117	CT25737	97
BC2F2	144	J32	100
Población	L3_Pi40		
BC1F1	118	CT25174	67
BC2F1	124	H273	91
BC3F1	140	L10	100
Población	L23_Pi40		
BC1F1	119	CT25175	67
BC2F1	122	H176	92
BC3F1	54	L140	100

6.5. Generación BC₂F₁

La generación BC₂F₁ se obtuvo para las cuatro poblaciones en mejoramiento, siendo la población de L23_Pi9 con la que se obtuvo una mayor recuperación de los alelos del parental recurrente con 97% en la planta CT25737 (tabla 3), selección realizada con 84 marcadores SNP distribuidos en los 12 cromosomas (Anexos 2 y 3). En las poblaciones L3_Pi9 y L23_Pi40 (Anexos 4 y 5), se obtuvo una recuperación de los alelos recurrentes del 92% para las dos poblaciones

(tabla 3). Para la población de L3_*Pi9* la selección que se llevó a cabo con 84 marcadores SNP, distribuidos en los 12 cromosomas (Anexos 2 y 3).

Para la población L23_*Pi40*, se realizó una selección previa con el marcador de PCR *Pi40-27A*. De las 122 plantas analizadas, 54 tenían *Pi40* y las 64 restantes no. Se seleccionaron y genotiparon 79 plantas BC₂F₁, teniendo en cuenta las 55 que dieron positivas para la presencia de *Pi40* más 25 que no lo tenían (figura 15), con el fin de validar la selección hecha por medio de PCR. En la Figura 15 se observa el resultado de PCR con el marcador *Pi40-27A* para 32 de las 122 muestras analizadas. Utilizando 48 marcadores SNP se llevó a cabo el genotipado de la progenie de esta población y se obtuvo 54 plantas con la presencia de *Pi40* en estado heterocigoto (se escogió la planta H176 Anexos 5 y 6) y 25 en estado homocigoto (como el del padre recurrente). Se validó la relación entre el marcador *Pi40-27A* y los SNP utilizados para la identificación de la presencia de *Pi40*.

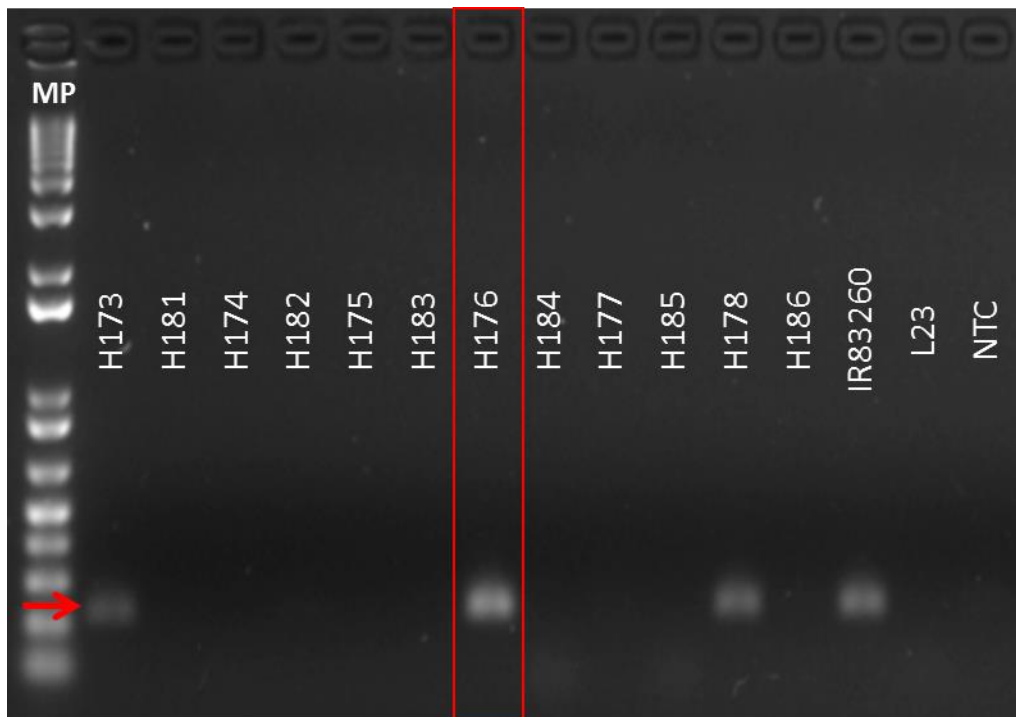


Figura 16. Genotipo de 12 plantas de la población L23_*Pi40* y los controles (IR83260, L23 y NTC para Non Target Control) con el marcador *Pi40-27A*. En recuadro rojo perfil de planta H176 seleccionada para producción de BC₃F₁ en L23_*Pi40*. Flecha roja señalando banda diagnóstica (224 pb). (**MP**): Marcador de peso 1 Kb Plus.

Para la población BC₂F₁ de L3_*Pi40*, la selección que se llevó a cabo inicialmente con el marcador de PCR *Pi40-27A* en 124 plantas de las cuales, 63

tenían *Pi40* y las 61 restantes no, en la Figura 16 se observa el resultado de PCR con el marcador *Pi40-27A* para 32 de las 124 muestras analizadas. Se seleccionaron y genotiparon 79 plantas BC_2F_1 con 48 marcadores SNP, teniendo en cuenta las 63 que dieron positivas para la presencia de *Pi40* y 7 más que no lo tenían. La selección se efectuó con 39 marcadores y se obtuvo una recuperación de los alelos recurrentes del 91% en la planta H273 (Anexos 6 y 7).

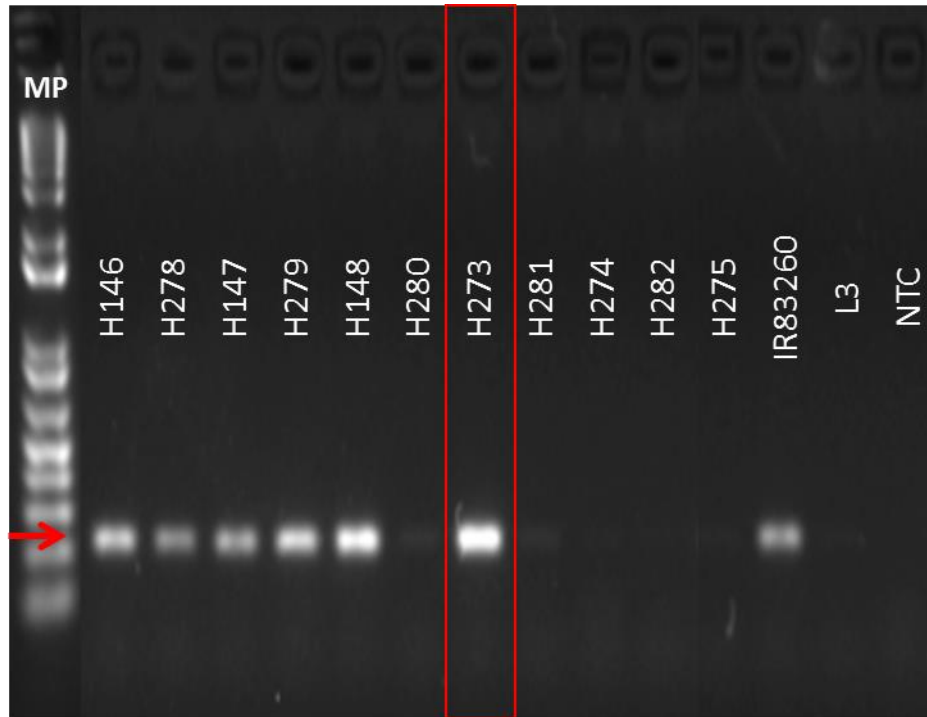


Figura 17. Genotipado de 11 plantas de la población $L3_{Pi40} BC_2F_1$ con el marcador *Pi40-27A*. En recuadro rojo perfil de planta H273 seleccionada para producción de $L3_{Pi40} BC_3F_1$. Flecha roja señalando banda diagnóstica (224 pb). (MP): Marcador de peso 1 Kb Plus.

6.6. Generaciones BC_2F_2 y BC_2F_3

Como en la población de $L23_{Pi9}$ en la generación BC_2F_1 ya se había recuperado el 97% de los alelos recurrentes, se permitió la autofecundación de la planta CT25737. Las plantas BC_2F_2 se analizaron con el marcador *Pi9-34B*, de 144 plantas analizadas 48 tenían *Pi9* en estado homocigoto, 62 en estado heterocigoto y 34 en estado homocigoto recesivo. En la Figura 17 se muestra el genotipo de la planta J32 en la que se observa el perfil homocigoto para *Pi9* con el marcador *Pi9-34B*.

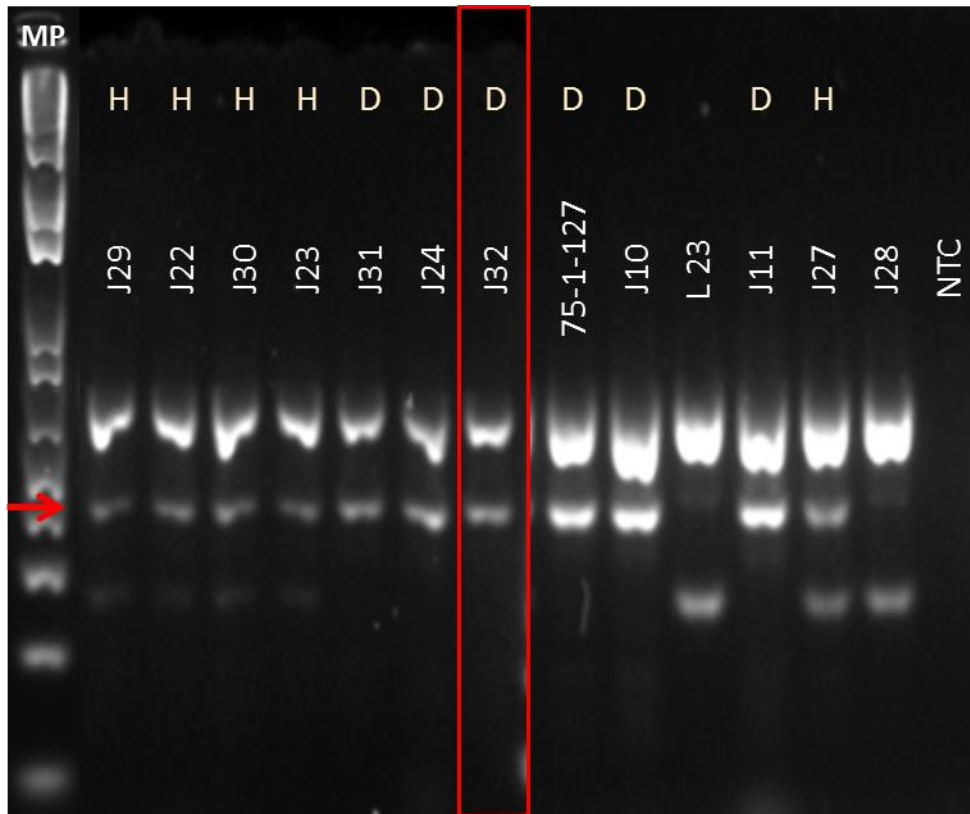


Figura 18. Genotipado de 11 plantas de la población L23_*Pi9* BC₂F₂ con marcador *Pi9*-34B, En recuadro rojo, perfil de planta J32 seleccionada para producción de L23_*Pi9* BC₂F₃. **(H)**: *Pi9* Heterocigoto. **(D)**: *Pi9* en estado homocigoto igual a padre donante 75-1-127. Flecha roja señalando banda diagnóstica (411pb). **(MP)**: Marcador de peso 1 Kb Plus.

De las 48 plantas con el gen *Pi9* homocigoto se realizó un genotipado con 48 marcadores SNP. Se escogió 14 plantas para avanzar a una generación BC₂F₃ (permitiendo autofecundación), de las cuales 8 tenían el gen en estado homocigoto igual al padre donante, 3 en estado heterocigoto y 3 en estado homocigoto igual al padre recurrente. Las plantas con presencia de *Pi9* en estado homocigoto tenían una recuperación del 100% de los alelos recurrentes (ganancia en id1004817-Chr1 y id10003885-Chr10) como se observa en las Figuras 18 y 19.

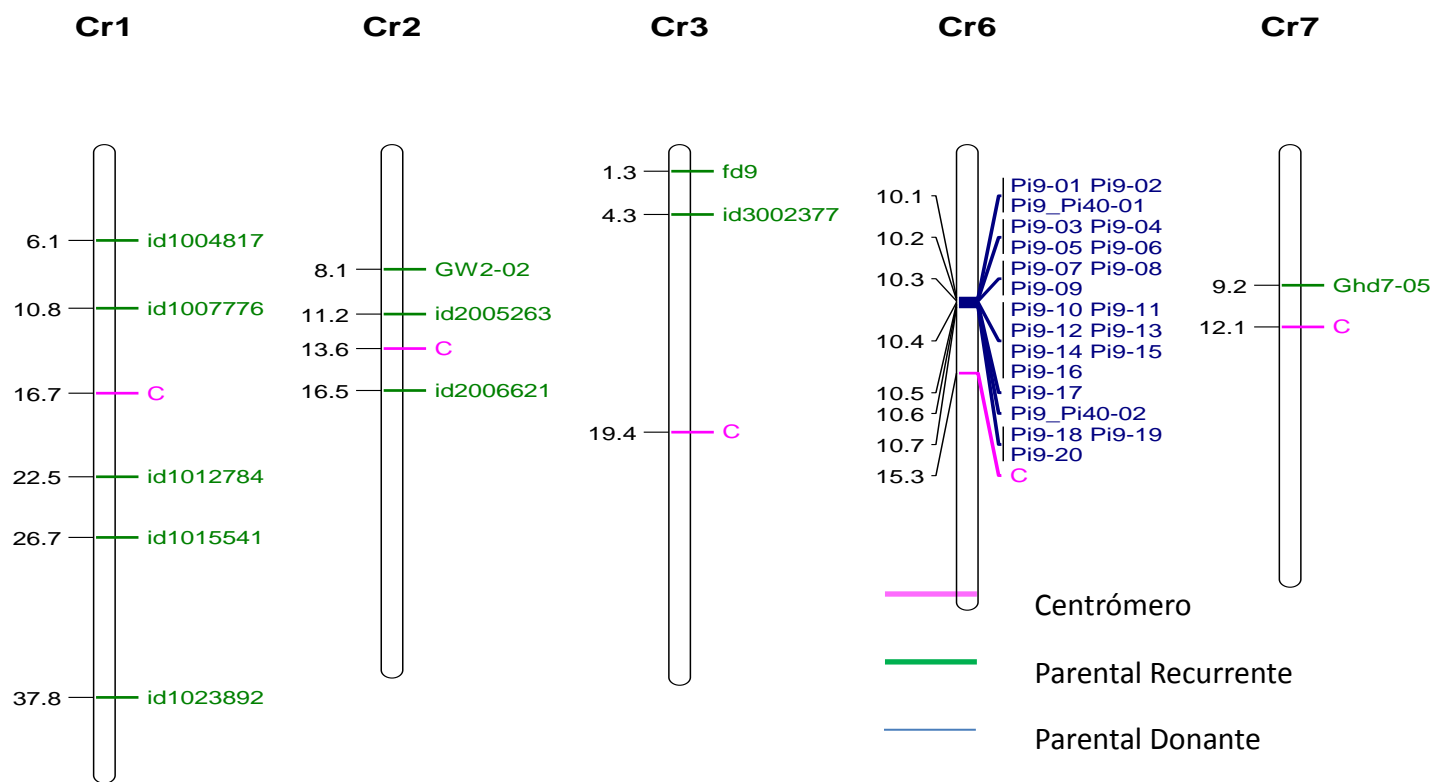


Figura 19. Distribución de marcadores SNP en el genoma de J32. Cromosoma 1-5. L23_*Pi9* BC₂F₂. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

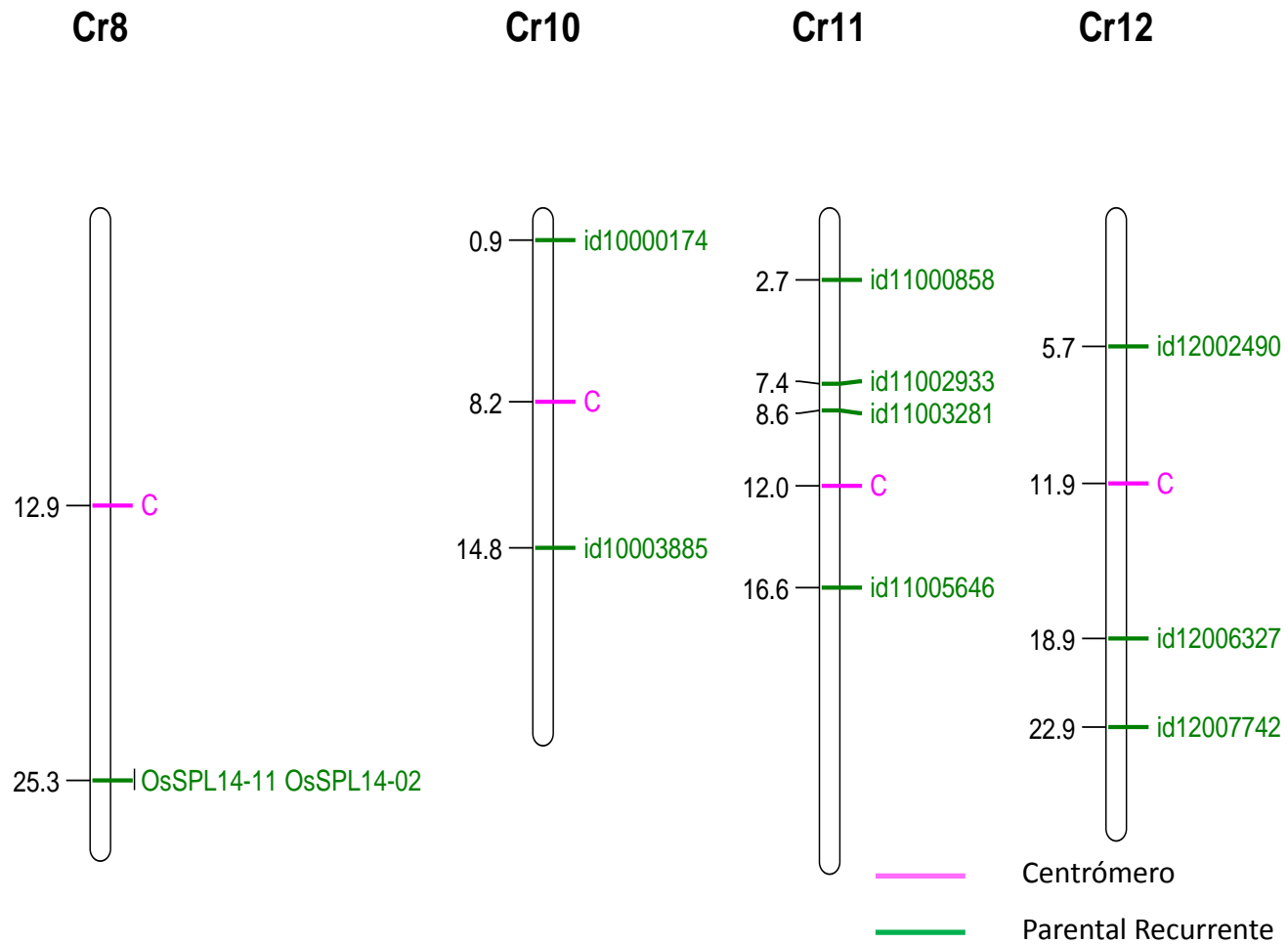


Figura 20. Distribución de marcadores SNP en el genoma de J32. Cromosoma 8-12. L23_Pi9 BC₂F₂. (Distancias genéticas en Megabases Mb).

6.7. Generaciones BC₃F₁ y BC₃F₂

Se produjo la generación BC₃F₁ de L3_*Pi9* primero mediante el cruce de las plantas CT25130 y la L3. Posteriormente se analizaron 100 plantas BC₃F₁ con el marcador *Pi9*-34B, 51 tenían *Pi9* en estado heterocigoto, las restantes 49 lo tenían en estado homocigoto como el padre recurrente, en la figura 20 se observa el perfil la planta K1 seleccionada por tener la recuperación del 95% de los alelos recurrentes (Anexos 9 y 10) a parte de tener el gen *Pi9* en estado heterocigoto, esta planta se englasinó, dejando que se autofecundara, así se obtuvo la generación BC₃F₂.

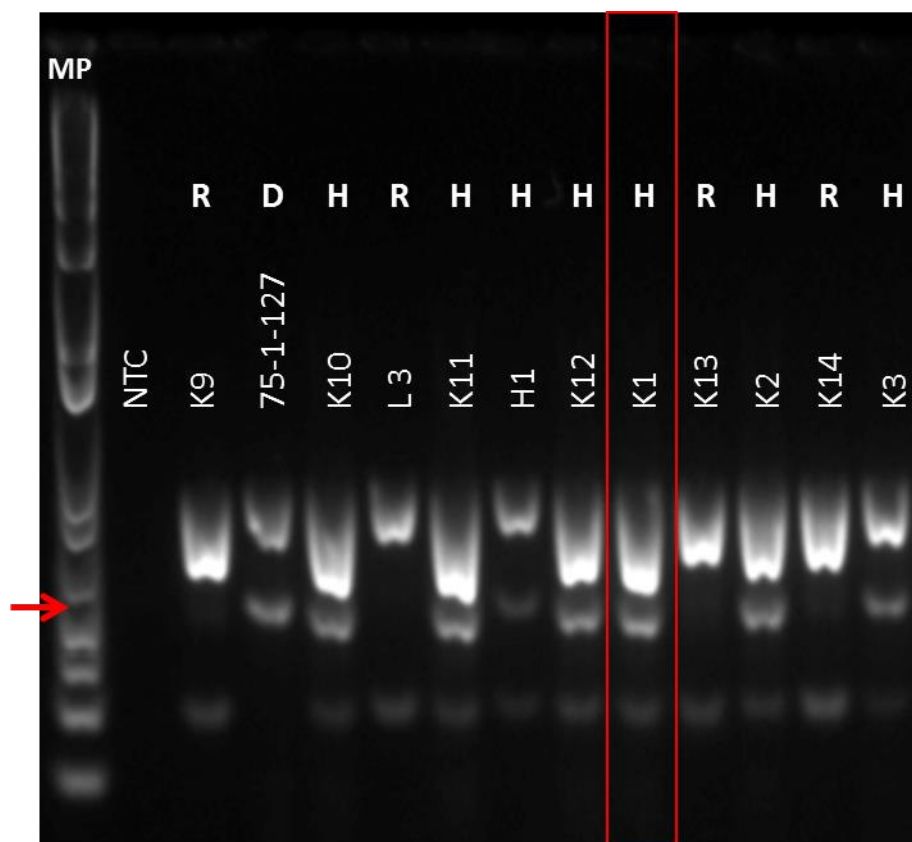


Figura 21. Genotipado de 10 plantas de la población L3_*Pi9* BC₃F₁. con marcador *Pi9*-34B, En recuadro rojo, perfil de planta K1 seleccionada para producción de L3_*Pi9* BC₃F₂. (**H**): *Pi9* Heterocigoto. (**D**): *Pi9* en estado homocigoto igual a padre donante 75-1-127. (**R**): Perfil del padre recurrente. Flecha roja señalando banda diagnóstica (411 pb). (**MP**): Marcador de peso 1 Kb Plus.

Para la Población L3_*Pi40* se retrocruzaron la planta H273 con la L3 y se obtuvo la generación BC₃F₁, de 140 plantas BC₂F₁ evaluadas con el marcador de PCR 9871.T7E2b, solo 73 plantas presentaban el alelo de *Pi40* las cuales se genotiparon con 41 marcadores SNP. Se seleccionó la planta L10 con un 100% de los alelos del padre recurrente recuperados (Anexos 11 y 12).

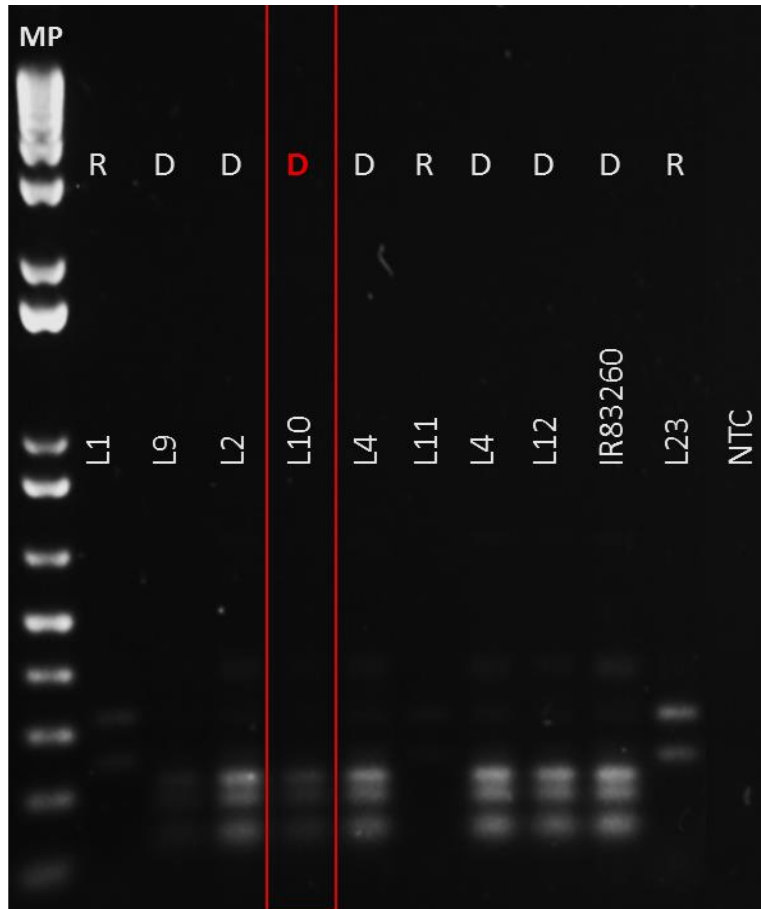


Figura 22. Genotipado de ocho plantas de la población L3_*Pi40* BC₃F₁ análisis con marcador 9871.T7E2b. En recuadro rojo, perfil de planta L10 seleccionada para producción de L3_*Pi40* BC₃F₂. (**D**): *Pi9* en estado homocigoto igual a padre donante 75-1-127. (**R**): Perfil del padre recurrente. Flecha roja señalando (**MP**): Marcador de peso 1 Kb Plus.

Para la Población L23_*Pi40* se retrocruzo la planta H176 con la L23, de 54 plantas BC₂F₁ evaluadas con el marcador de PCR 9871.T7E2b, solo 25 plantas presentaban el alelo de *Pi40* y se genotiparon con 42 marcadores SNP. Seleccionando la planta L140 con un 100% de los alelos del padre recurrente recuperados (Anexos 13 y 14).

7. Discusión

7.1. Homogeneidad de semilla para iniciación de cruzamientos

Cabe resaltar que los SNP utilizados permitieron diferenciar eficientemente entre los alelos de los parentales involucrados en los cruzamientos. Una primera distinción se hizo al observar el perfil genético de cada parental mediante el uso del chip de diversidad. A tal grado se podía identificar si la semilla utilizada como base para el inicio de los cruzamientos pertenecía a la variedad o línea, si se encontraba contaminada o segregando. En segundo lugar al evaluar los individuos de las progenies se pudo establecer claramente a cuál de los dos parentales pertenecía el alelo encontrado.

7.2. Identificación y selección de marcadores tipo SNP

El mejoramiento genético en cereales, basado en evaluación de fenotipos y selección de materiales superiores para llevar a fijación y creación de variedad es un proceso que consume tiempo y está altamente ligado a condiciones ambientales. El desarrollo de una nueva variedad puede tomar entre ocho y doce años e incluso su liberación no está garantizada (Akhtar et al. 2014). Es por esta razón que los mejoradores están muy interesados en nuevas tecnologías que puedan hacer este proceso más rápido e eficiente. En contraste con décadas pasadas, en las que no había una gran disponibilidad de marcadores moleculares y el mejoramiento era basado solamente en la selección fenotípica, los avances en genética molecular han permitido determinar el genotipo de individuos mediante el análisis de su ADN (de Vienne, 2002; Hospital, 2003). La información al nivel molecular puede ser usada de diferentes formas para hacer el proceso de mejoramiento más eficaz,

principalmente con los esquemas de mejoramiento que utilizan la selección asistida por marcadores moleculares (Dekkers & Hospital, 2002).

El esquema de mejoramiento utilizado en este trabajo fue la realización de retrocruces con la selección asistida por marcadores moleculares tipo SNP. Akhtar y colaboradores en el 2010 hacen una revisión de la selección asistida usada por mejoradores moleculares en arroz. Ellos definen cinco factores que se deben tener en cuenta a la hora de utilizar esta metodología de selección en un programa de mejoramiento; i) los marcadores deben ser confiables en el sentido que deben estar altamente ligado al gen de interés que se pretende rastrear, ii) el genotipado debe usar cantidades razonables de ADN lo que implica que no deben ser necesarias grandes extracciones o procesos de purificación complicados, iii) el tiempo requerido para el análisis tiene que ser mínimo y la simplicidad de la técnica alta, iv) los marcadores deben ser adecuados, o sea altamente polimórficos y permitir discriminar entre diferentes genotipos y por último, v) el costo beneficio debe ser a favor de la utilización de MABC.

En la presente investigación se utilizaron marcadores tipo SNP, y, en primer lugar se destaca la confiabilidad de los SNP seleccionados para rastrear a *Pi9* y *Pi40* en las progenies evaluadas. En teoría un marcador confiable debería estar ligado al gen de interés, preferiblemente a menos de 5 cM. En el caso de *Pyricularia*, los 22 marcadores para *Pi9* y los 18 para *Pi40*, se distribuyeron a lo largo de una región de 322.806 pb. Específicamente para el gen *Pi9* el marcador *Pi9-12* se encontraba dentro del área reportada en el GenBank (accesión DQ285630).

Por otra parte, en cuanto a la cantidad de ADN requerida para el genotipado de las plantas de cada progenie, solo se necesitó diluciones con una concentración de 60 ng/ μ l, obtenidas con la utilización método sencillo de extracción de ADN con base en MATAB (Risterucci et al., 2002).

Una de las bondades más relevantes de la utilización de genotipado utilizando plataforma de genotipado Fluidigm Dynamic Arrays TM, es que en estas matrices se pueden llevar a cabo una gran cantidad de reacciones de PCR y detección de polimorfismos al mismo tiempo. Según Thomson (2014), la inversión que se debe hacer para la implementación de la metodología (consecución de equipos y reactivos) es moderada, y el costo por muestra es catalogado como bajo cuando lo compara con otras cinco metodologías de genotipado de alto rendimiento, como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Ejemplos de metodologías de genotipado de SNP de alto rendimiento. (Modificado de Thomson, 2014).

Plataforma de genotipado	Tecnología	Combinaciones SNP por muestra	Capital invertido	Costo por muestra
Illumina Infinium iSelect HD	Arreglo fijo	3,072 – 700K SNP × 24 muestras	Alto (iScan)	Moderado a alto
Affymetrix Axiom	Arreglo fijo	50K SNP × 384 muestras; 650K SNPs × 96 muestras	Alto (GeneTitan)	Moderado a alto
Douglas Array Tape	Arreglo flexible, basado en PCR	1 SNP/muestra × 76,800 reacciones/reel	Muy alto (Nexar, SoelleX, Araya)	Muy bajo
Fluidigm Dynamic Arrays	Arreglo flexible, basado en PCR	96 SNP × 96 muestras; 24 SNP × 192 muestras	Moderado (IFC Controller, FC1, EP1)	Bajo
RE-based GBS	Genotipado por secuenciación	~10K-100K SNP × 96 o 384 muestras	Bajo a moderado (NGS outsourced or in-house)	Bajo a moderado
Amplicon sequencing	Genotipado por secuenciación	Variable (e.g. 20–500 SNP × 48–384 muestras)	Bajo a moderado (NGS outsourced or in-house)	Bajo a moderado

Los SNP se encuentran en la forma más simple de polimorfismo (a nivel de un solo nucleótido), debido a esto se han convertido en una alternativa para ser utilizados en estudios genéticos y en mejoramiento (Jiang, 2013).

7.3. Identificación y selección de marcadores tipo SNP para el rastreo de alelos de parentales recurrentes L3 y L23 en poblaciones de retrocruce

Una vez hallados los marcadores que permitieron rastrear el gen en la progenie se procedió a realizar la búsqueda de marcadores polimórficos entre los 424 SNP disponibles en el laboratorio de biotecnología del CIAT. Como ya se había mencionado no se mandaron a sintetizar nuevos primers, sino que se escogió de los que habían, haciendo la comparación del perfil genético de cada parental. Al realizar las comparaciones entre el padre donante de *Pi9* y las líneas de secano, se obtuvo un total de 74 marcadores polimórficos que permitían diferenciar el padre donante de los recurrentes, en el caso de *Pi40* se obtuvo un total de 30 marcadores polimórficos para el mismo fin. Hay que tener en cuenta que el número de marcadores para el rastreo del genoma recurrente es uno de los factores que más influyen en la eficiencia de MABC, junto con el tamaño de las poblaciones genotipadas (Hasan et al., 2015).

Si se compara el número de marcadores utilizados con los teóricos recomendados, se tiene que idealmente una cobertura densa de marcadores en los cromosomas que no portan el gen del donante no es obligatoria para

incrementar el contenido general del genoma recurrente. Para cromosomas de 100 cM (200 Kb/cM) de dos a cuatro marcadores son suficientes (Hospital, 2003). Para el caso de la presente investigación y las poblaciones generadas con 75-1-127 este postulado se cumplió, por ejemplo en el cromosoma uno que es el más grande del genoma y que tiene un tamaño de 43'270.923 pb debería tener entre 4 y 8 marcadores aproximadamente, y efectivamente se utilizaron 8 marcadores para seleccionarlo.

Mientras que para las poblaciones generadas con IR83260-1-1-12-1-1-3-1-1 no se obtuvo una cantidad muy grande de marcadores polimórficos para diferenciar entre el padre donante y las líneas recurrentes de secano (debido a que los perfiles de los parentales eran muy similar en los 424 marcadores comparados). En la mayoría de los cromosomas la cantidad de marcadores es inferior a la recomendada e incluso no se cuenta con marcadores en el cromosoma 7. Es de alta importancia llevar las plantas seleccionadas en la etapa final del proceso de retrocruce (que contengan los genes de resistencia introgresados a su genoma) al campo, para poder realizar una selección fenotípica a favor de las características de los padres recurrentes. Como en generación BC_nF_2 los genes de resistencia se encontraran en estado homocigoto, solo se seleccionaran las plantas más parecidas a los recurrentes. Esto debe hacerse ya que al no tener una cobertura del genoma ideal, puede haber regiones importantes del genoma que no se estén seleccionando y que puedan afectar directamente el fenotipo de las plantas seleccionadas al final del proceso.

En efecto, es muy importante tener como mínimo dos a tres marcadores por cromosoma, y no tener cromosomas sin marcadores. Si se dan estas condiciones y la selección de los marcadores es muy eficiente, tres a cuatro generaciones de MABC son suficientes para incrementar la recuperación de los alelos del padre recurrente en un 99.9% (Hospital, 2003). Por lo tanto la ganancia debida a la selección es de alrededor de dos generaciones de retrocruces, la ganancia en BC_4 con selección es aproximadamente la misma que la obtenida en BC_6 sin selección con marcadores (Akhtar et al., 2010).

7.4. Retrocruces con selección asistida por marcadores moleculares tipo SNP

7.4.1. Líneas de arroz de secano L3 y L23

Las líneas de secano empleadas en este estudio provienen de un programa de mejoramiento poblacional, esto implica que la diversidad genética entre líneas extraídas de una misma población es alta, si se compara con materiales provenientes de cruces entre pocas líneas parentales elites y producto de sucesivos procesos de selección (Guimaraes & Chatel, 2005).

McDonald en el 2014 resalta la importancia de mantener la resistencia a enfermedades en agroecosistemas y la dificultad de dicho paso debido a que los patógenos evolucionan. Esta dinámica evolutiva resulta de la diversidad genética del patógeno la cual se ve afectada por mutación, tamaño de población del patógeno, flujo de genes, recombinación y selección, los mismos factores que afectan un individuo desde el punto de vista de la genética de poblaciones.

Históricamente, cultivación restringida a monocultivo o cultivos con fondos genéticos similares han sido susceptibles a epidemias en muchas regiones del planeta (Fahad et al. 2014). Es por esta razón que al promover la diversidad genética de los cultivares es uno de los factores que puede ayudar a que las enfermedades que atacan a las plantas se reduzcan (Strange, 2005).

Evolutivamente hablando, los genes involucrados en la defensa contra patógenos y plagas evolucionaron rápidamente y exhiben una alta diversidad alélica (Tiffin et al. 2004). Una vez que los genes responsables de la resistencia son identificados y mapeados, llegará a ser más sencillo el desarrollo de híbridos y variedades resistentes en el mínimo tiempo posible (Fahad et al. 2014). Al provenir los genes *Pi9* y *Pi40* de variedades silvestres se pueden liberar al mercado cultivares diversos, con fondo genético diferente, que hagan frente a las demandas de materiales y que sustituyan anteriores variedades, que al poseer una estrecha base genética están relacionadas con la susceptibilidad al ataque de enfermedades (Yang & Clung, 2010), como el caso de *Pyricularia*.

A pesar que las líneas L3 y L23 actualmente presentan resistencia en campo, es de alta importancia de proveer a los agricultores nuevas variedades con resistencia durable en el tiempo. No se conoce que tipo de genes de resistencia están presentes en estas líneas de secano, pero es posible que la resistencia no

solo está conferida por la acción de genes mayores, pueda ser una mezcla de genes de herencia cuantitativa.

7.4.2. Retrocruces y selección con MAS

Hospital en el 2003, muestra que la mayor recuperación del genoma del parental recurrente mediante MAS comparada con retrocruces convencionales se da cuando se lleva a cabo la selección del gen de interés y el genoma del parental recurrente al mismo tiempo. Además comenta que la recuperación del genoma del parental recurrente se da más lenta en el cromosoma que lleva el gen de interés que en los otros cromosomas, debido a la dificultad de ruptura del ligamiento con el genoma del parental donante.

En la presente investigación se obtuvo la recuperación satisfactoria de la totalidad de los alelos recurrentes entre las cuatro poblaciones generadas (L23_Pi9, L3_Pi40 y L23_Pi40) y del 95% en la cuarta población (L3_Pi9). Aunque los datos de las poblaciones con Pi9 son más cercanas de los esperados, debido que en estas se cumplen la cantidad de marcadores recomendados para su óptima selección mas no la distribución deseada (figuras 22 y 23). El caso de las poblaciones con Pi40 es un caso intermedio ya que aunque se cuentan con marcadores para seleccionar parte del genoma recurrente no se tiene la suficiente cobertura para afirmar que se recuperó tal cantidad del genoma recurrente. Lo que cabe destacar es que aunque no se realice selección para el genoma recurrente, el porcentaje de alelos inherentes al padre recurrente se espera que incremente en las progenies resultado de retrocruce, debido a los retrocruces sucesivos (Hasan et al., 2015). Sumado a esto, la selección de los alelos del parental recurrente es más eficiente en generaciones avanzadas de retrocruces, como lo plantea Hospital et al (1992), los cuales mencionan que en un esquema de mejoramiento en el que se plantean tres ciclos de retrocruces y solo se puede hacer la selección del padre recurrente una sola vez es preferible hacerla en la generación BC₃F₁, con lo que podremos realizar una futura investigación.

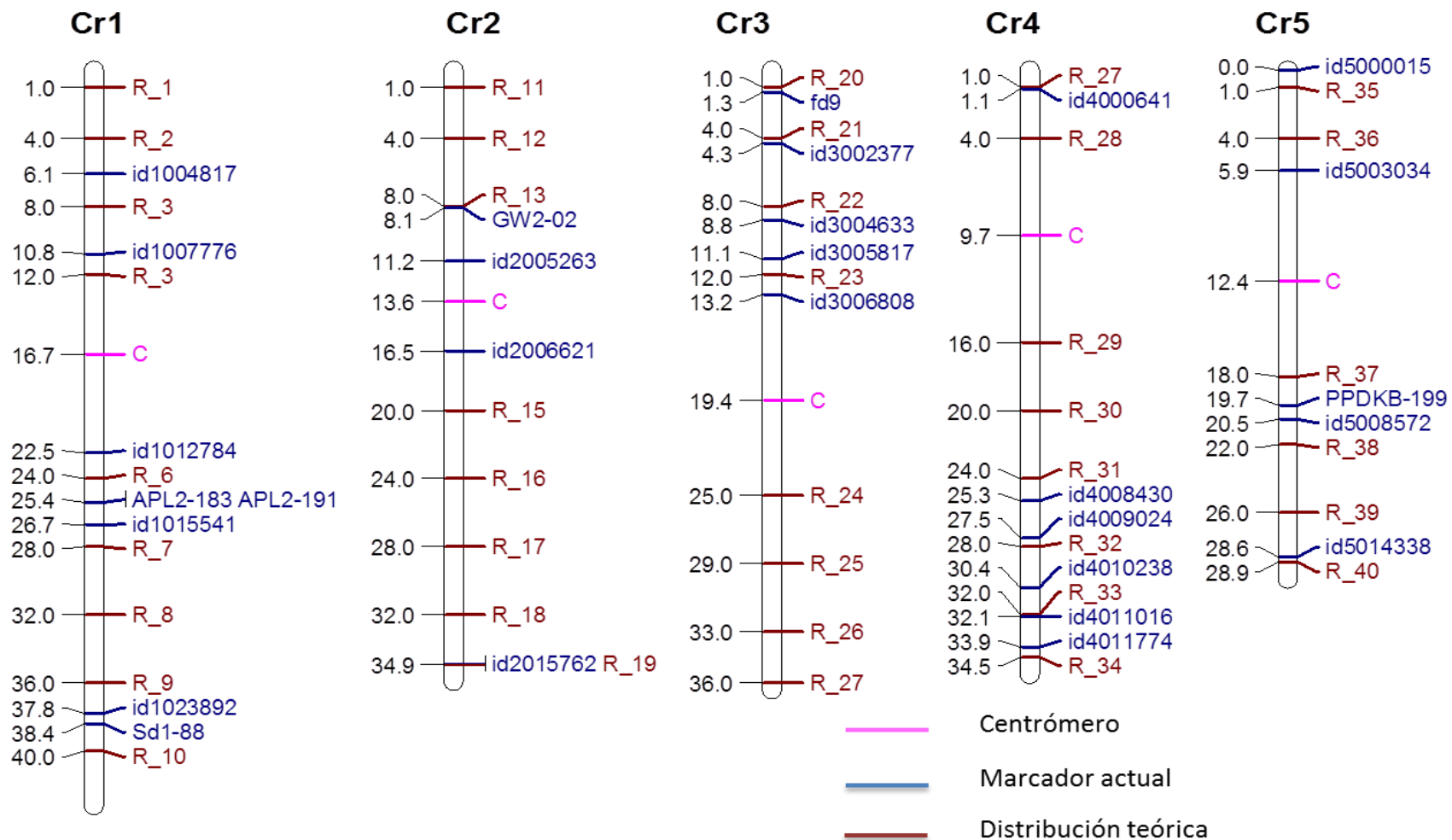


Figura 23. Distribución teórica de marcadores tipo SNP para recuperación de genoma recurrente en cromosomas no portadores del gen de interés. Comparación con los marcadores utilizados para la selección de las poblaciones resultado de cruce con el donante de *Pi9*. Cromosomas 1-5. En negro a la izquierda distancia en Megabases. Distribución teórica calculada basada en Hospital (1992).

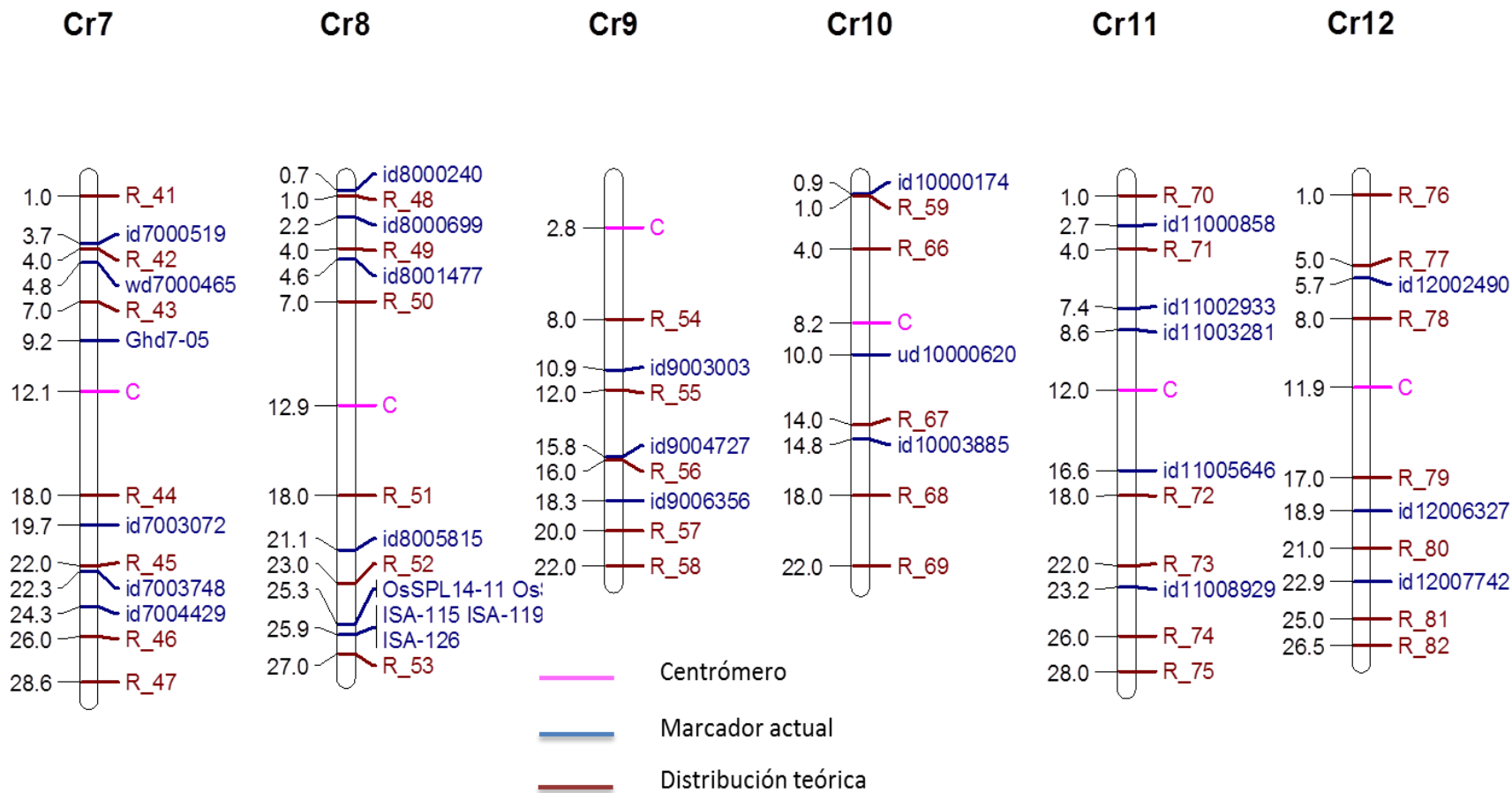


Figura 24. Distribución teórica de marcadores tipo SNP para recuperación de genoma recurrente en cromosomas no portadores del gen de interés. Comparación con los marcadores utilizados para la selección de las poblaciones resultado de cruce con el donante de *Pi9*. Cromosomas 7-12. En negro a la izquierda distancia en Megabases. Distribución teórica calculada basada en Hospital (1992).

La población más avanzada en el proceso de retrocruces fue la L23_*Pi9* por la cual logremos desarrollar la generación BC₂F₃ (Figura 17, 18 y 19). Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Akhtar y colaboradores (2010), los cuales argumentan que la recuperación de la totalidad de los alelos recurrentes en retrocruces se puede dar a partir del segundo ciclo de retrocruces. Un ejemplo de la utilización de MABC en el mejoramiento de arroz, es el realizado para la introgresión del QTL saltol por Hoque y colaboradores (2015). En este estudio produjeron plantas BC₂F₂ con una recuperación del 80.7% al 89.15% utilizando como marcadores de selección 56 microsatélites distribuidos a lo largo del genoma de la variedad Dhan-49, un número similar de marcadores a los empleados en el presente estudio.

Conclusiones

Se obtuvo líneas de secano L3 y L23 con la introgresión independiente de los genes *Pi9* y *P40* de resistencia a *Pyricularia*. Considerando el origen silvestre de este par de genes y la amplia diversidad genética de las líneas de secano, se espera que las líneas que porten *Pi9* y *Pi40* tengan una resistencia durable frente al patógeno. Estos genes disponibles en el fondo genético de líneas elite de secano, pueden ser utilizadas como parentales en procesos de mejoramiento de nuevo material japónica tropical

Se pudo corroborar la relación entre marcadores tetra-primer ARMS-PCR y la selección de SNP en la plataforma Fluidigm, permitiendo hacer un primer filtro en el proceso de selección, para genotipar sólo materiales que contengan el gen de interés (ya sea *Pi9* o *Pi40*).

Se desarrolló un protocolo para la introgresión de los genes *Pi9* y *Pi40*, con base en retrocruces y selección asistida por marcadores moleculares en líneas de secano, que puede ser empleado como hoja de ruta en futuras introgresiones.

8. Perspectivas

Es importante realizar una selección fenotípica en campo del material producto de las introgresiones, con el fin de comprobar la cercanía fenotípica de las líneas mejoradas introgresadas con las líneas parentales de secano. Como también exponer al material mejorado a razas del patógeno para comprobar la efectividad y durabilidad de la resistencia.

Como medida de manejo para el control de *Pyricularia* en campos de arroz de secano, se puede proponer la siembra de un gen por ciclo de cultivo (por ejemplo primero *L3_Pi9* y al siguiente ciclo de siembra utilizar *L3_Pi40*), para rotar artificialmente los genes en el campo. Otra medida que se puede emplear es la siembra de una mezcla de semilla de la misma línea pero con diferente gen de resistencia (*L3_Pi9* y *Pi40*). Estas medidas de distribución espacial y/o temporal de genes de resistencia han sido sugeridas en otros cultivos como un medio eficiente para evitar la caída de la resistencia en campo y la aparición de forma más virulenta del patógeno (McDonald, 2014).

Para hacer más robusto el proceso de selección genotípica, se deben diseñar marcadores que permitan hacer una selección más fina de los genotipos en el proceso de retrocruces y selección, teniendo en cuenta el tamaño de cada cromosoma y la distribución apropiada de los marcadores. Aun en el estudio actual no se pudo optimizar la cantidad y distribución de los marcadores (por razón ajenas al proyecto científico), se espera que en el futuro se pudiera hacer un ciclo de selección en las generaciones obtenidas poder selección aquellas familias tienen mayor similitud genética con los padres recurrente de estas poblaciones.

9. Bibliografía

Abe, S. 2004. Breeding of a rice blast multiline variety of rice, *Sasanishiki* BL. Japan Agric Research. 38:149-154.

Acquaah, G. 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell Publishing. USA. 249 p.

Akhtar, S., Bhat, M., Wani, S., Bhat, K., Chalkoo, S., Mir, R. & Wani, S. 2010. Marker assisted selection in rice. *Phytology* 2:66-81.

Allard, R. 1960. Principles of plant breeding. John Wiley & Sons Inc. New York.

Allard, R. 1999. Principles of Plant Breeding. 2nd Edition, Wiley and Sons: New York.

Amante-Bordeos, A., Sitch, L., Nelson, R., Damacio, R., Oliva, N., Aswidinnoor, H, & Leung, H. 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

Ashkani, S., Yusop, M., Shabanimofrad, M., Harun, A., Sahebi, M. & Latif, M. 2014. Genetic Analysis of Resistance to Rice Blast: A Study on the Inheritance of Resistance to the Blast Disease Pathogen in an F3 Population of Rice. *Journal Phytopathology*. doi: 10.1111

Ahtar, S., Bhat, M., Shafiq, A., Wani, K., Bhat, S., Chalkoo, M. & Shabir, A. 2010. Marker Assisted Selection in rice. *Journal of Phytology*. 2(10): 66-81.

Areiza, A. 2012. Estudios de Mercado. Diagnóstico Del Mercado Del Arroz En Colombia (2000-2012). Superintendencia de Industria y Comercio. Colombia. 48 p.

Ashkani, S., Rafii1, Y., Shabanimofrad, M., Miah, G., Sahebi, M., Azizi, P., Tanweer, F., Akhtar, M. & Nasehi, A. 2015. Molecular breeding strategy and

challenges towards improvement of blast resistance in rice crop. *Frontiers in Plant Science*. 6: 886.

Bonman, M. 1992. Rice Blast. En: Webster, R & Gunnell, P. (Eds) *Compendium of Rice Diseases*. American Phytopathological Society Press. Minnesota. USA.

Bonman, J., Khush, G. & Nelson, R. 1992. Breeding rice for resistance to pest. *Ann Rev Phytopathol*. 30: 507-528.

Brar, D. & Kuldeep, S. 2011. *Oryza*. En: Kole, C. (Ed). *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Cereals*. Springer. Berlin. 497p.

Burdon, J., Barrett, L., Rebetzke, G. & Thrall, P. 2014. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evolutionary Applications*. 7:609–624.

Callaway, E. 2014. Domestication: The birth of rice. *Nature*. 514: 58–59.

Chatel, M., Ospina, Y., Rodríguez, F., Lozano, V. & Delgado, H. 2008. Upland rice composite population breeding and selection of promising lines for Colombian Savannah ecosystem. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*. 38:1-5.

Collard, Y. & Mackill, D. 2008. Marker assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 363:557–572.

Correa, F., Escobar, F., Prado, G. & Aricapa, G. 2000. Population dynamics of the rice blast pathogen in a screening site in Colombia and characterization of resistance. En. Tharreau, D., Lebrun, M., Talbot, N. & Nottoghem, J. (Eds). *Advances in rice blast research*. Kluwer Academic Publishers. London. 354 p.

Couch, B. & Kohn, L. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*. 94(4):683-693.

Dai, Y., Jia, Y., Correll, J., Wang, X. & Wang, Y. 2010. Diversification and evolution of the avirulence gene ARV-Pita1 in field isolates of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 47:973-980.

Dargl, J. & Jones, J. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*. 411:826-833.

- Duitama, J., Quintero, J., Hubmann, J., Foulquie´ -Moreno, M., Quintero, C., Cruz, D., Thevelein, J. & Tohme, J. An integrated framework for discovery and genotyping of genomic variants from high-throughput sequencing experiments. *Nucleic Acids Research*. 42(6): 1–13.
- Fahad,S., Nie, L., Khan, A., Chen, Y., Hussain, S., Wu, C., Xiong, D., Jing, W., Saud, W., *et al.* 2014. Disease resistance in rice and the role of molecular breeding in protecting rice crops against diseases. *Biotechnol Lett*. 36(7): 1407–1420.
- FAO. 2015a. Food Outlook. Biannual Report On Global Food Markets. Food and Agriculture Organization. ISSN 1560-8182.
- FAO. 2015b. Seguimiento del Mercado del Arroz de la FAO (SMA). <http://www.fao.org/economic/est/publications/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>. Consultado Marzo 2016.
- FAOSTAT. 2013. FAO's Statistical Yearbook. Food and Agriculture Organization. <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>. Consultado Marzo 2016.
- FEDEARROZ. 2011. Dinámica Del Sector Arrocerero De Los Llanos Orientales De Colombia 1999-2011. Federación Nacional de Arroceros. Colombia. 160 p.
- Fernández, F. & Arregocés, C. 1980. Crecimiento Y Etapas de Desarrollo de la Planta de Arroz. Guía de estudio. CAT. Cali-Colombia. 28p.
- Fukuoka, S., Saka, N., Mizukami, Y., Koga, I., Yamanouchi, U., Yoshioka, Y., Hayashi, N., Ebana, K., Mizobuchi, R. & Yano, M. 2015. Gene pyramiding enhances durable blast disease resistance in rice. *Scientific Reports* 5: 7773.
- Flor, H. 1971. Current status of the gene for gene concept. *Annual Rev. Phytopathol*. 9:275-296.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*. 43: 205–227.
- Guimaraes, E. & Chatel, M. 2005. Exploiting rice genetic resources through population improvement. En. Guimaraes, E. (Ed.). Population improvement: A way of exploiting the rice genetic resources of Latin America. FAO. Roma. 350 p.

- Goff, A., Ricke, D., Lan, H., Presting, G., Wang, R., et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*. 296: 92–100.
- Harlan, H. & Pope, M. 1922. The use and value of back-crosses in small-grain breeding. *Journal of Hered.* 13:319-322.
- Hasan, M., Rafii, Y., Ismail, R., Mahmood, M., Rahim, A., Alam, A., Latif, A. 2015. Marker-assisted backcrossing: a useful method for rice improvement. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29(2):237–254.
- Held, P. & Buehrer, L. 2004. The Synergy™ HT: A Unique Multi-Detection Microplate Reader for HTS and Drug Discovery. *Journal of Laboratory Automation*. 8(2)44-49.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A., Knogge, W. & Deising, H. 2011. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*. 168:51–62
- Hospital, F. 2003. Marker-assisted breeding. En: Newbury, H. (Ed). *Plant molecular breeding*. Oxford and Boca Raton: Blackwell Publishing and CRC Press. 39-59.
- Hospital, F. 2005. Selection In backcross programmes. *Philosophical Trans Royal Soc*. 360:1503-1511.
- Kankanala, P., Czymmek, K. & Valent B. 2007. Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell* 19: 706–724.
- Khan, M., Sen, P., Bhuiyan, R., Kabir, E., Chowdhury, A., Fukuta, Y., Ali, A. & Latif, M. 2014. Phenotypic screening and molecular analysis of blast resistance in fragrant rice for marker assisted selection. *Comptes Rendus Biologies*. 337(5) 318–324.
- Khoury, C., Bjorkman, A., Dempewolf, H., Ramirez-Villegas, J., Guarino, L., Jarvis, A., Rieseberg, L. & Struik, P. 2014. Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. *PNAS*. 111:4001-4006.
- Ju, J., Kim, B., Cho, Y., Han, S., Moon, H., Lee, Y. & Jena, K. 2007. A novel gene, *Pi40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice. *Theor Appl Genet* 115:1163–1677

Jiang, Guo-Liang. 2013. Plant marker-assisted breeding and conventional breeding: challenges and perspectives. *Advances in Crop Science and Technology*. 1:e106.

Ling, Z., Mew, T., Wang, J., Lei, C. & Huang, L., 2000. Development of Chinese near-isogenic lines of rice and their differentiating ability to pathogenic races of *Pyricularia grisea*. *Sci. Agric.* 3: 1-8.

Liu, G., Lu, G., Zeng, L. & Wang, L. 2002. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. *Mol Genet Genomics*. 267: 472–480.

Marcel, S., Sawers, R., Oakeley, E., Angliker, H. & Paszkowski, U. 2010. Tissueadapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 22: 3177–3187.

McDonald, B. 2014. Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. *Tropical Plant Pathology*. 39(3):191-196.

McIntosh, R., Wellings, C. & Park, R. 1995. *Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes*. CSIRO Publications, Melbourne.

Miah, G., Raffi, Y., Ismail, M., Pute, A., Rahim, A., Asfaliza, R. & Latif, M. 2013. Blast resistance in rice: A review of conventional breeding to molecular approaches. *Mol Biol Report*. 40: 2369-2388.

Munch, S., Lingner, U., Floss, S., Liudwig, N., Sauer, N. & Deising, B. 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal Plant Physiol*. 165: 41–51.

Murcia, F. 2010. Cambio climático en temperatura, precipitación y humedad relativa para Colombia usando modelos meteorológicos de alta resolución. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM. Bogotá, Colombia. 91 p.

Namai, T. 2011. Race differentiation of the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, and environmentally friendly control of rice blast disease. *Journal of General Plant Pathology*. 77:350.

Rahman, L., Khanam, S., Roh, J. & Koh, H. 2011. Mapping of QTLs Involved in Resistance to Rice Blast (*Magnaporthe grisea*) Using *Oryza minuta* Introgression Lines. *Czech Journal Genet Plant Breed*. 47(3): 85–94

- Reaño R., Hamilton S. and Romero G. 2008. Guías para la regeneración de germoplasma: arroz. En: Dulloo M., Thormann I., Jorge M. & Hanson J. (eds). Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP). Roma. 13 pp.
- Rippstein, G., Escobar, G. & Motta, F. 2001. Agroecología y biodiversidad de las sabanas en los llanos orientales de Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. 302 p.
- Risterucci, M., Grivet, L., N’Goran, J., Pieretti, I., Flament, M. & Lanaud, C. 2000. A high density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor Appl Genet.* 101:948-955.
- Rivas, L. 2004. Resultados, adopción e impacto en los Llanos Orientales de Colombia. Centro internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Documento de trabajo. Cali. Colombia. 281 P.
- Riveros, G. & Rodríguez, N. 2010. La fisiología de la planta y la productividad del cultivo. En: Degiovanni, V., Martínez, C. & Motta, F. *Producción Eco-Eficiente del arroz en América Latina*. Tomo 1. CIAT. Cali-Colombia. 487p.
- Ruane, J. & Sonnino, A. 2007. Marker assisted selection as a tool for genetic improvement of crops, livestock, forestry and fish in developing countries: an overview of the issues. En: Guimaraes, E., Ruanae, J., Scherf, B., Sonnino, A. & Dargie, J. (Eds). *Marker Assisted selection: Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish*. FAO. Roma. 471 p.
- Sasaki, T., Matsumoto, T., Yamamoto, K., Sakata, K., Baba, T., et al. 2002. The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature.* 420: 312–316.
- Scheuermann, K., Vieira, J., Marschalek, R, Andrade, A. & Wickert, A. 2012. *Magnaporthe oryzae* Genetic Diversity and Its Outcomes on the Search for Durable Resistance. *Intech*. Brazil. 333-356p
- Schulze-Lefert, P., & Panstruga, R. 2003. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 641–667.
- Skamnioti, P. & Gurr. S. 2009. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. *Trends Biotechnology.* 27(3): 141–150.
- Stoskopf, N., Tomes, D. & Christie, B. 1993. *Plant Breeding: Theory and practice*. Oxford: Westview press Inc. San Francisco, California.

- Strange, R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Annual rev Phytopatol.* 43: 83-116
- Suh, P., Roh, H., Cho, C., Han, S., Kim, G., and Jena, K. 2009. The *Pi40* gene for durable resistance to rice blast and molecular analysis of *Pi40*-advanced backcross breeding lines. *Phytopathology* 99:243-250.
- Sweeney, M. & McCouch, S. 2007. The Complex History of the Domestication of Rice. *Annals of Botany.* 100: 951–957.
- Tacconi, G., Baldassarre, V., L Lanzanova, C., Faivre-Rampant, O., Cavigiolo, S., Urso, S., Lupotto, E. & Vale, E. 2010. Polymorphism analysis of genomic regions associated with broad-spectrum effective blast resistance genes for marker development in rice. *Molecular Breeding.* 26:595–617.
- Talbot, N. 2003. On the Trail of a Cereal Killer: Exploring the Biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology,* 57(1):177–202.
- Thomson, M. 2014. High-Throughput SNP Genotyping to Accelerate Crop Improvement. *Plant Breeding and Biotechnology.* 2(3): 195-212.
- Tucker, L., & Talbot, N. 2001. Surface attachment and prepenetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39(1): 385-417.
- Voorrips, R. 2002. MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs. *Journal Hered.* 93 (1): 77-78.
- Wang G., Mackill D., Bonman M., Mccouch S., Champoux M., Nelson R. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics,* 136: 1421–1434.
- Wang, J., Jia, Y., Wen, J. Liu, W., Liu, K., Li, L., Jiang, Z., Zhang, J., Guo, X., & Ren, R. 2013. Identification of rice blast resistance genes using international monogenic differentials. *Crop Protection.* 109-116.
- Watanabe, Y. 1997. Genomic constitution of genus *Oryza*. In: Matsuo, T., Futsuhara, Y., Kikuchi, F. & Yamaguchi, H. (eds). *Science of the rice plant: genetics.* Food and Agriculture Policy Research Center. Tokio. 1008p.
- Wilson, A. & Talbot, J. 2009. Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 185–195.

- Xia, H., Xiong, J., Tao, T., Zheng, Z., Huang, W., Li, J., Chen, L. & Luo, L. 2015. Distinguishing upland and lowland rice ecotypes by selective SSRs and their applications in molecular-assisted selection of rice drought resistance. *Euphytica* (2015) 206:11–20
- Xu, J., Zhao, X. & Dean, R. 2007. From genes to genomes: A new paradigm for studying fungal pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*. En: Jay, C. (ed). *Fungal Genomics: Advances in Genetics*. Elsevier. 301 P.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. & Day, I. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acid Research*. 29(17):88
- Young, N., Ganai, S. & Tanksley SD. 1988. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the Tm-2a gene in tomato. *Genetics*. 120:579-585.
- Young, N. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review Phytopath*. 34:470-501.
- Yousefi, M., Khoshnevisan, B., Shamsirband, S., Motamedi, S., Nizam, M., Arif, M., Ahmad, R. 2015. Support vector regression methodology for prediction of output energy in rice production. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*. 29(8) 2115-2126.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, K., Li, S. et al. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science*. 296: 79–92.
- Zhu, Y., Chen, H., Fan, J., Wang, Y., Li, Y., Chen, J., Fan, J., Mundt, C. 2000. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature*. 406:718-722.

ANEXOS

Anexo 1. Detección del alelo *Pi9* de la variedad 175-1-127 y del alelo *Pi40* de la línea isogénica IR83260 -1-1-12-1-1-3-1-1

Materiales:

- Agua ultra pura libre de nucleasas
- 2X GoTaq Master Mix
- Primers específicos para cada marcador
- Placas de PCR
- Tubos de 1.5mL o 2.0 mL
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Termociclador
- 1 Kb plus DNA Ladder
- Agarosa
- Cámara de electroforesis
- Buffer Tris-Borato EDTA (0.5X)
- Solución de Tinción (SYBR® Safe o SYBR® Gold)
- Buffer de carga (BlueJuice™)
- Documentador de geles

Protocolo para evaluación del marcador Pi9-34B

Posición en el genoma de referencia: Chr6: 10384890

Nombre del juego de Primers	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Tamaño esperado
Pi9-34B (FI-RO)	AGATACAGTCAAGCCCTC ATTACT	CAACGAAACTTTGGTCTCTC A	411
Pi9-34B (FO-RI)	CACCCTGATCATTGTTGTT G	ATGGATGGATATGGGATAC G	259

FI: Forward inner primer
 FO: Forward outer primer
 RI: Reverse inner primer
 RO: Reverse outer primer

Tamaño del amplicón con los dos primers externos (FO-RO): 626 pb

Tamaño del amplicón para el alelo G (FI-RO): 224 pb

Tamaño del amplicón para el alelo T (FO-RI): 436 pb

Componentes del Mix y Condiciones de PCR para el marcador Pi9-34B

DNA = 25ng				
PCR Pi9-34B marker		concentración inicial	concentración final	1Rx
DNA		10 ng/uL		2.5 uL
2X Gotaq Master Mix		2X	1X	5uL
Primer outer	Forward	10uM	0.3uM	0.3 uL
Primer outer	Reverse	10uM	0.3uM	0.3 uL
Primer inner	Forward	10uM	0.5uM	0.5 uL
Primer inner	Reverse	10uM	0.5uM	0.5 uL
H2O				0.9 uL

Programa: Pi9-34B		
Paso	Temp (°C)	Duración
1	94	4 min
2	94	30 seg
3	58	30 seg
4	72	1 min
5	Go to 2, 29 veces	
6	72	5 min
7	12	30 min

Protocolo para evaluación del marcador Pi40-27A

Posición en el genoma de referencia: Chr6: 10385269 pb

Nombre del juego de Primers	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Tamaño esperado
Pi40-27A (FI-RO)	TTTTCTTTTTGAGAGACCAACGG	CAAGACCTTAATTCTAGATGATGCC	224
Pi40-27A (FO-RI)	CAACCACCAGATACAGTCAAGC	GCTTTATCACTTAACATACAACGGAA	436

FI: Forward inner primer
 FO: Forward outer primer
 RI: Reverse inner primer
 RO: Reverse outer primer

Tamaño del amplicón con los dos primers externos (FO-RO): 611 pb

Tamaño del amplicón para el alelo G (FI-RO): 224 pb

Tamaño del amplicón para el alelo T (FO-RI): 436 pb

Componentes del Mix y Condiciones de PCR para el juego de primers Pi40-27A (FI-RO)

PCR Pi40-27A marker (FI-RO)		concentración inicial	concentración final	1Rx
DNA		10 ng/uL		2.5 uL
2X Gotaq Master Mix		2X	1X	5uL
Primer inner	Forward	10uM	0.3uM	0.3 uL
Primer outer	Reverse	10uM	0.3uM	0.3 uL
H2O				1.9 uL

<u>Programa: Pi40-27A (FI-RO)</u>		
Paso	Temp (°C)	Duración
1	94	4 min
2	94	30 seg
3	58	30 seg
4	72	1 min
5	Go to 2, 34 veces	

6	72	5 min
7	12	30 min

Componentes del Mix y Perfil de PCR para el juego de primers Pi40-27A (FO-RI)

DNA = 25ng				
PCR Pi40-27A marker (FO-RI)		concentración inicial	concentración final	1Rx
DNA		10 ng/uL		2.5 uL
2X Gotaq Master Mix		2X	1X	5uL
Primer outer	Forward	10uM	0.3uM	0.3 uL
Primer inner	Reverse	10uM	0.3uM	0.3 uL
H2O				1.9 uL

Programa: Pi40-27A (FO-RI)		
Paso	Temp (°C)	Duración
1	94	4 min
2	94	30 seg
3	60	30 seg
4	72	1 min
5	Go to 2, 34 veces	
6	72	5 min
7	12	30 min

Anexo 2. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25737. Cromosomas 1-5. BC2F1 L23_Pi9.

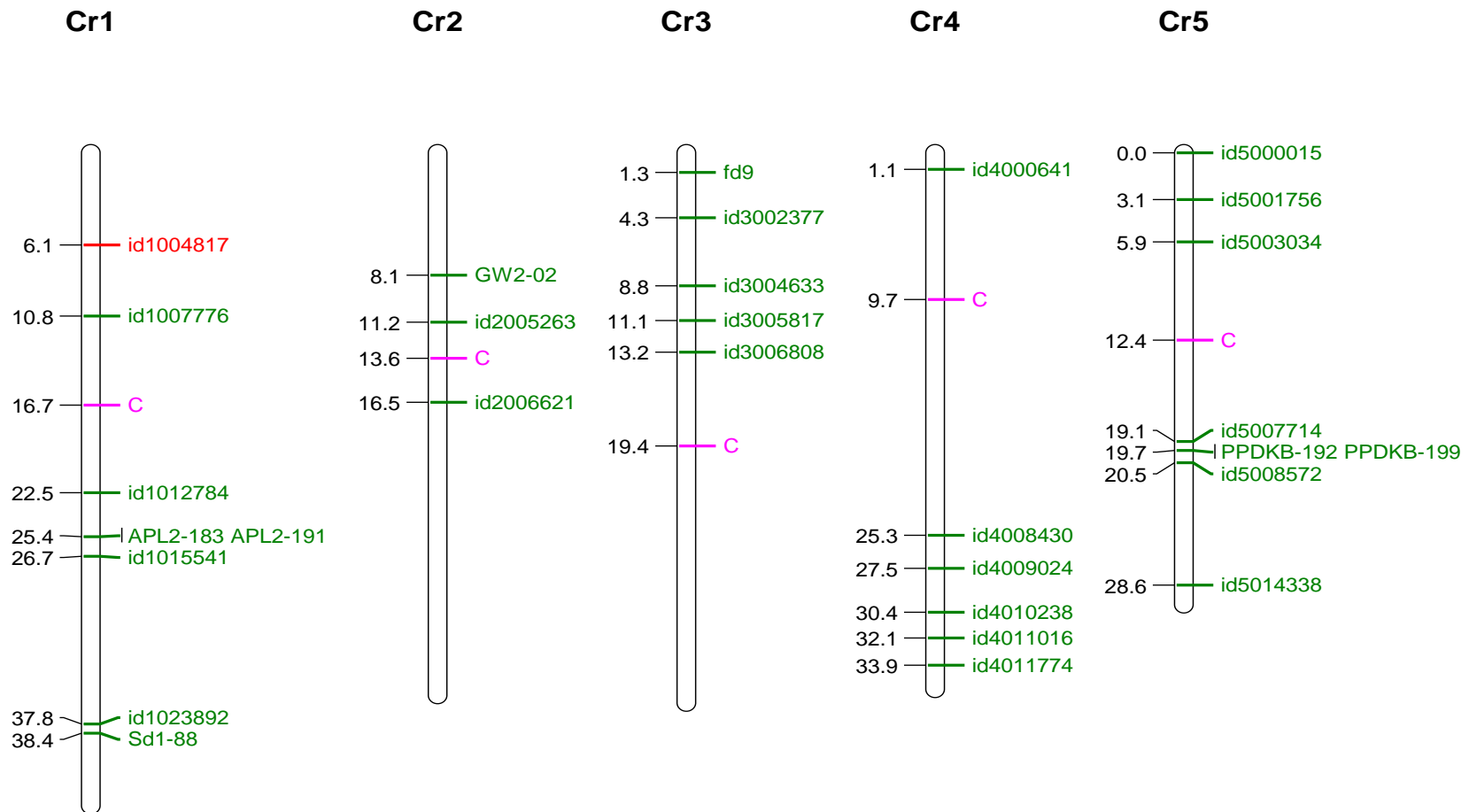


Figura 25. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25737. Cromosomas 1-5. BC2F1 L23_Pi9.

Anexo 3. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25737. Cromosomas 1-12. BC2F1 L23_Pi9.

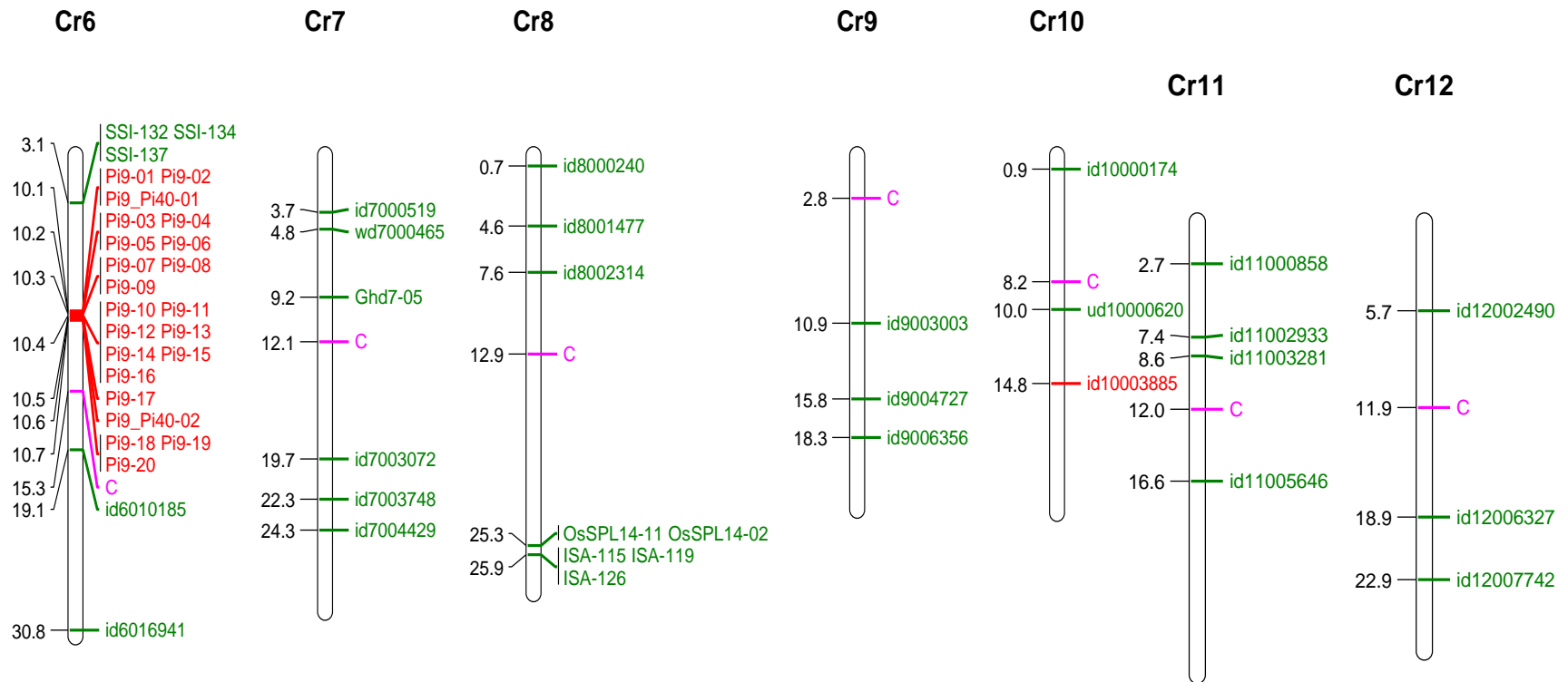


Figura 26. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25737. Cromosomas 1-12. BC2F1 L23_Pi9.

Anexo 4. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25130. Cromosomas 1-5. BC2F1 L3_Pi9.

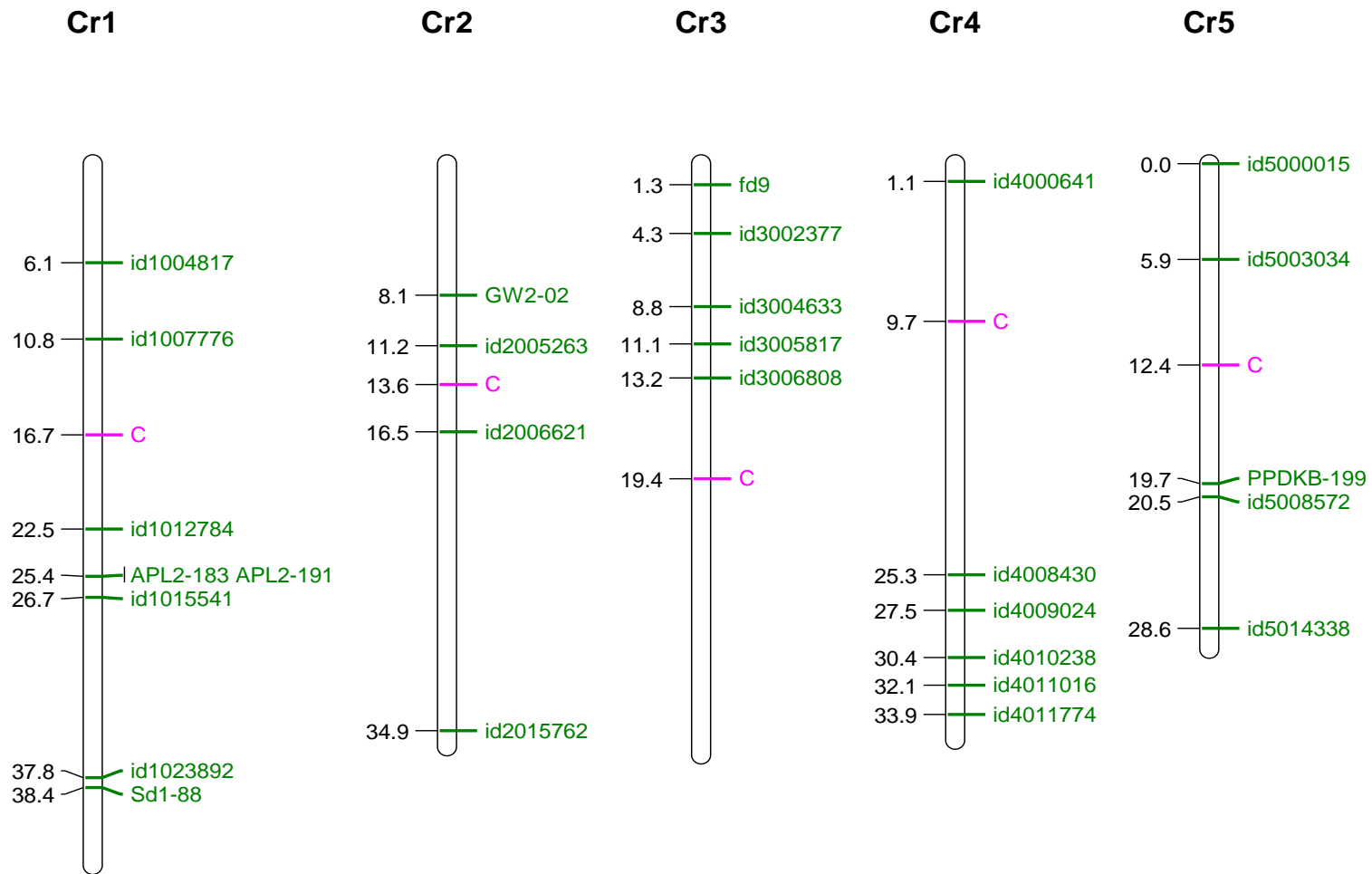


Figura 27. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25130. Cromosomas 1-5. BC2F1 L3_Pi9.

Anexo 5. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25130. Cromosomas 6-12. BC2F1 L3_Pi9.

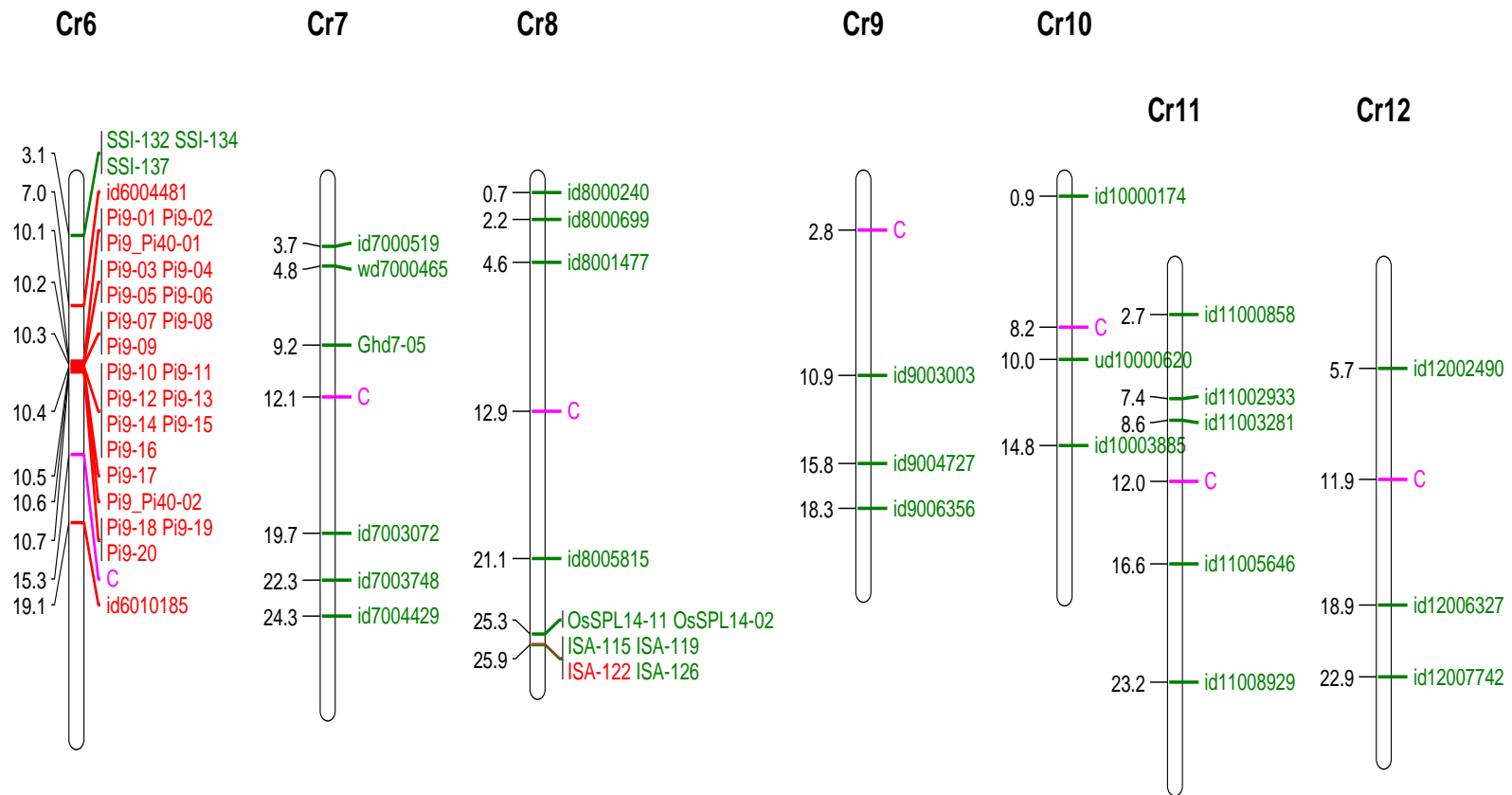


Figura 28. Distribución de marcadores SNP en el genoma de CT25130. Cromosomas 6-12. BC2F1 L3_Pi9.

Anexo 6. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 176. Cromosomas 1-5. BC2F1 L23_Pi40.

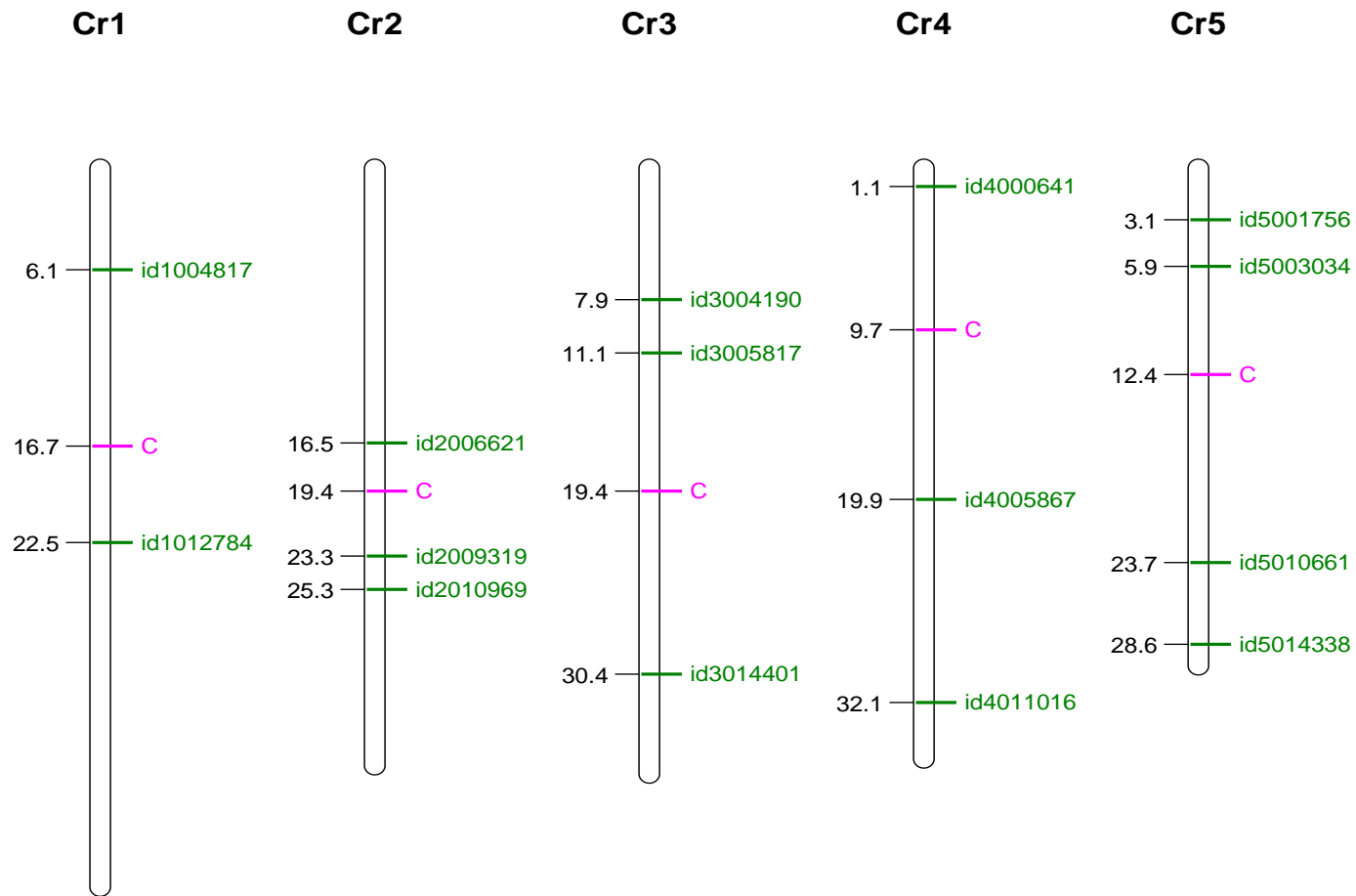


Figura 29. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 176. Cromosomas 1-5. BC2F1 L23_Pi40.

Anexo 7. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 176. Cromosomas 6-11. BC2F1 L23_Pi40.

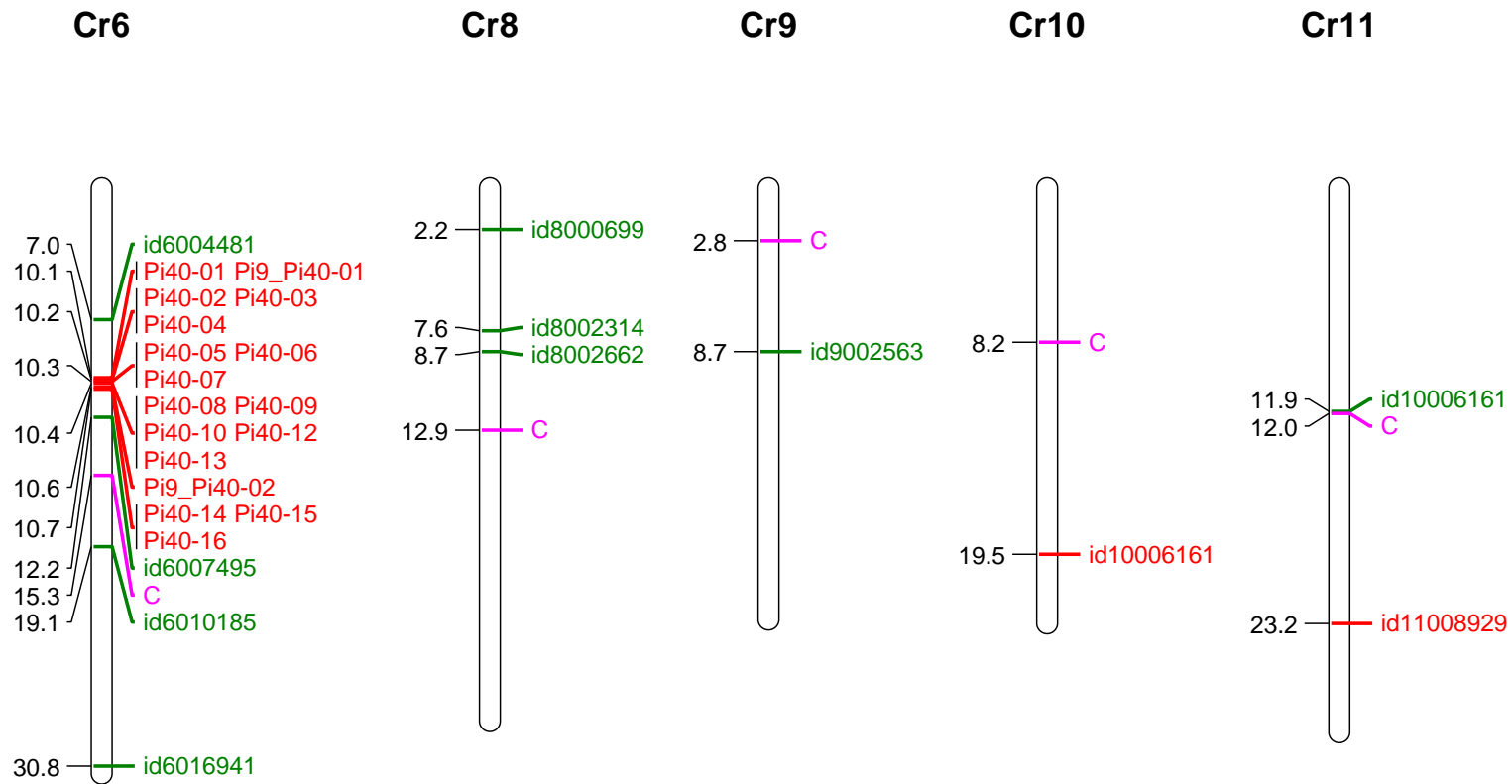


Figura 30. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 176. Cromosomas 6-11. BC2F1 L23_Pi40.

Anexo 8. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 23. Cromosomas 1-5. BC2F1 L3_Pi40.

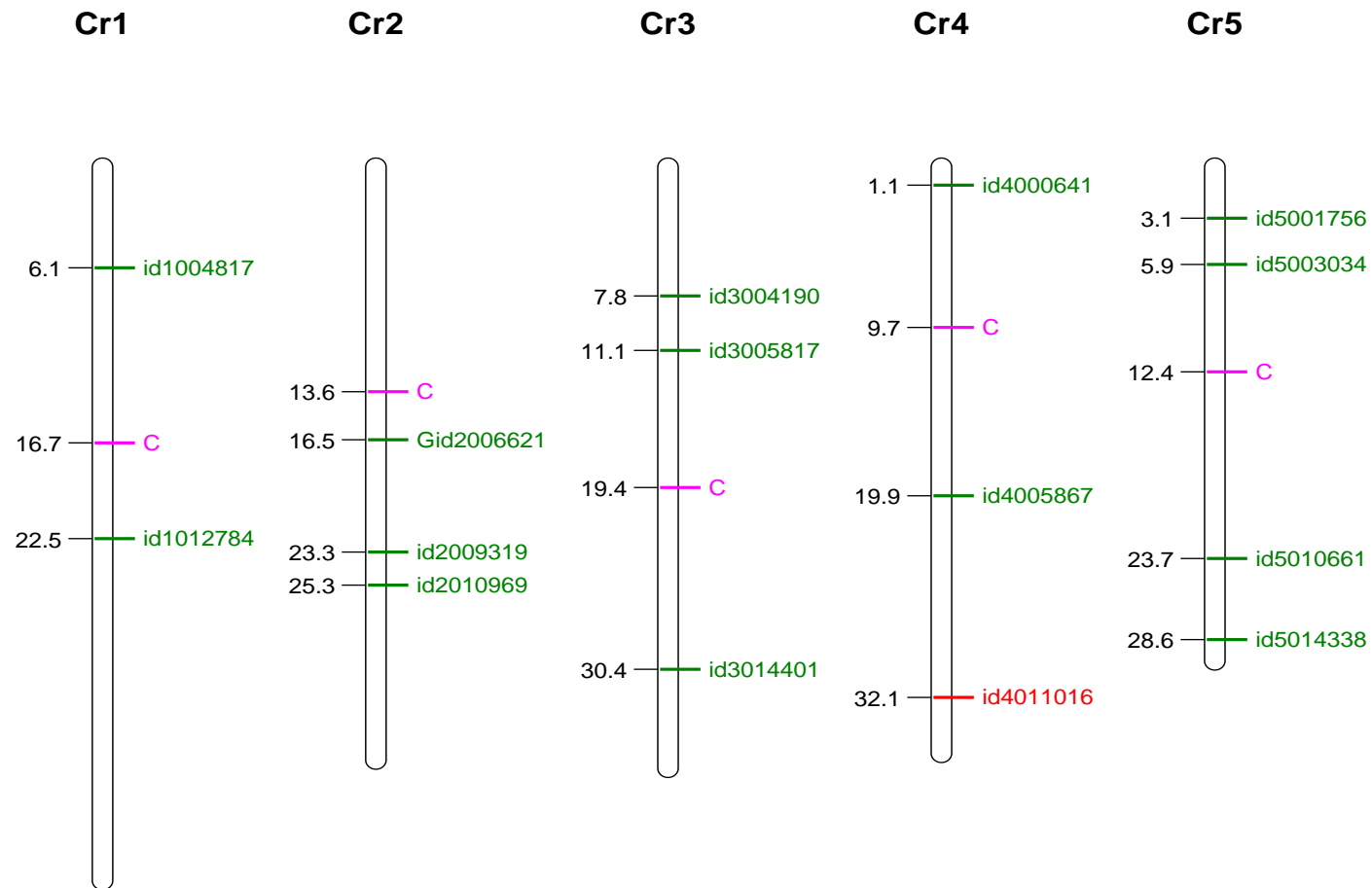


Figura 31. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 23. Cromosomas 1-5. BC2F1 L3_Pi40.

Anexo 9. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 23. Cromosomas 6-11. BC2F1 L3_Pi40.

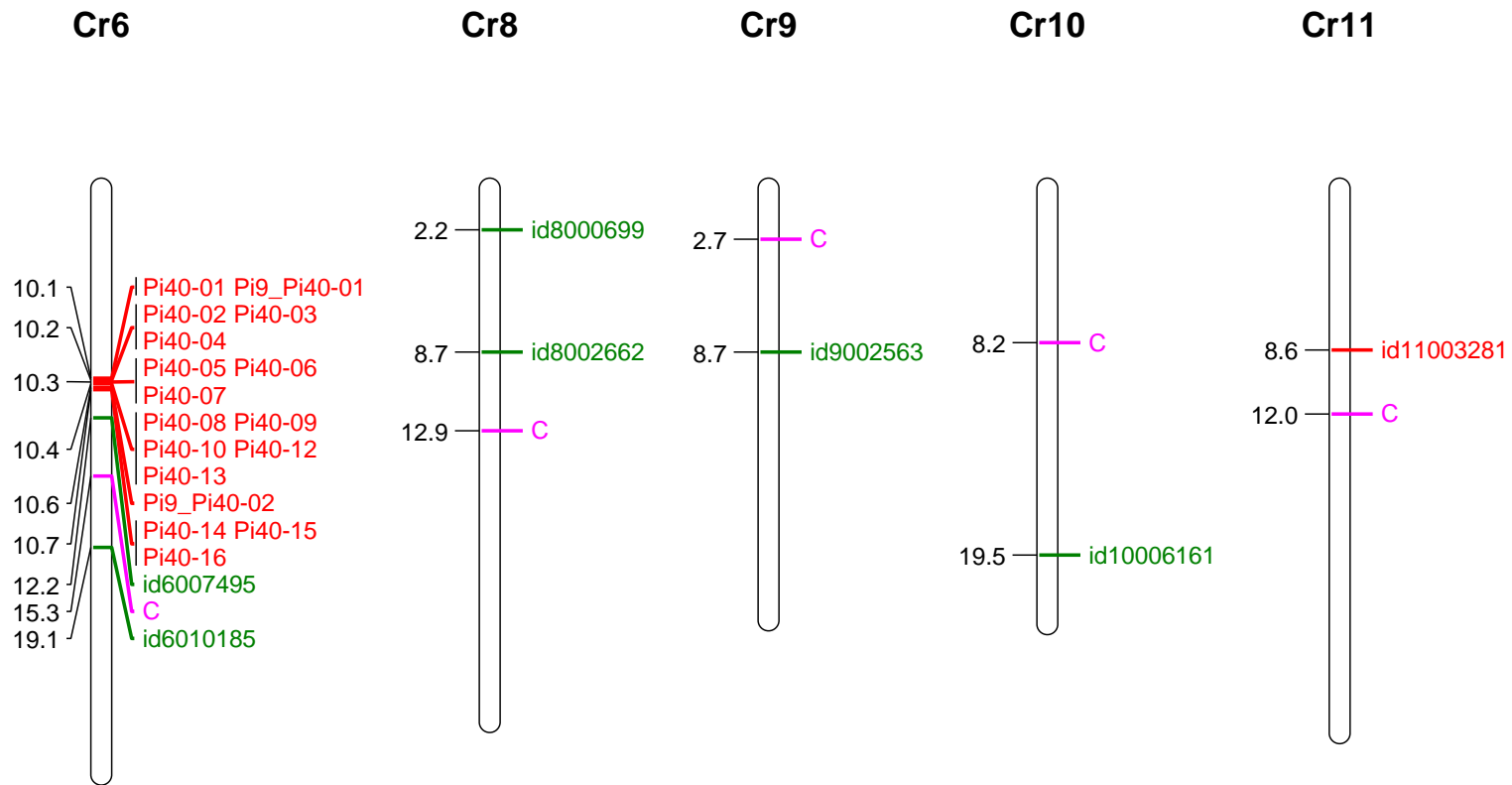


Figura 32. Distribución de marcadores SNP en el genoma de H 23. Cromosomas 6-11. BC2F1 L3_Pi40.

Anexo 10. Distribución de marcadores SNP en el genoma de K1. Cromosomas 1-5. BC3F1 L3_Pi9.

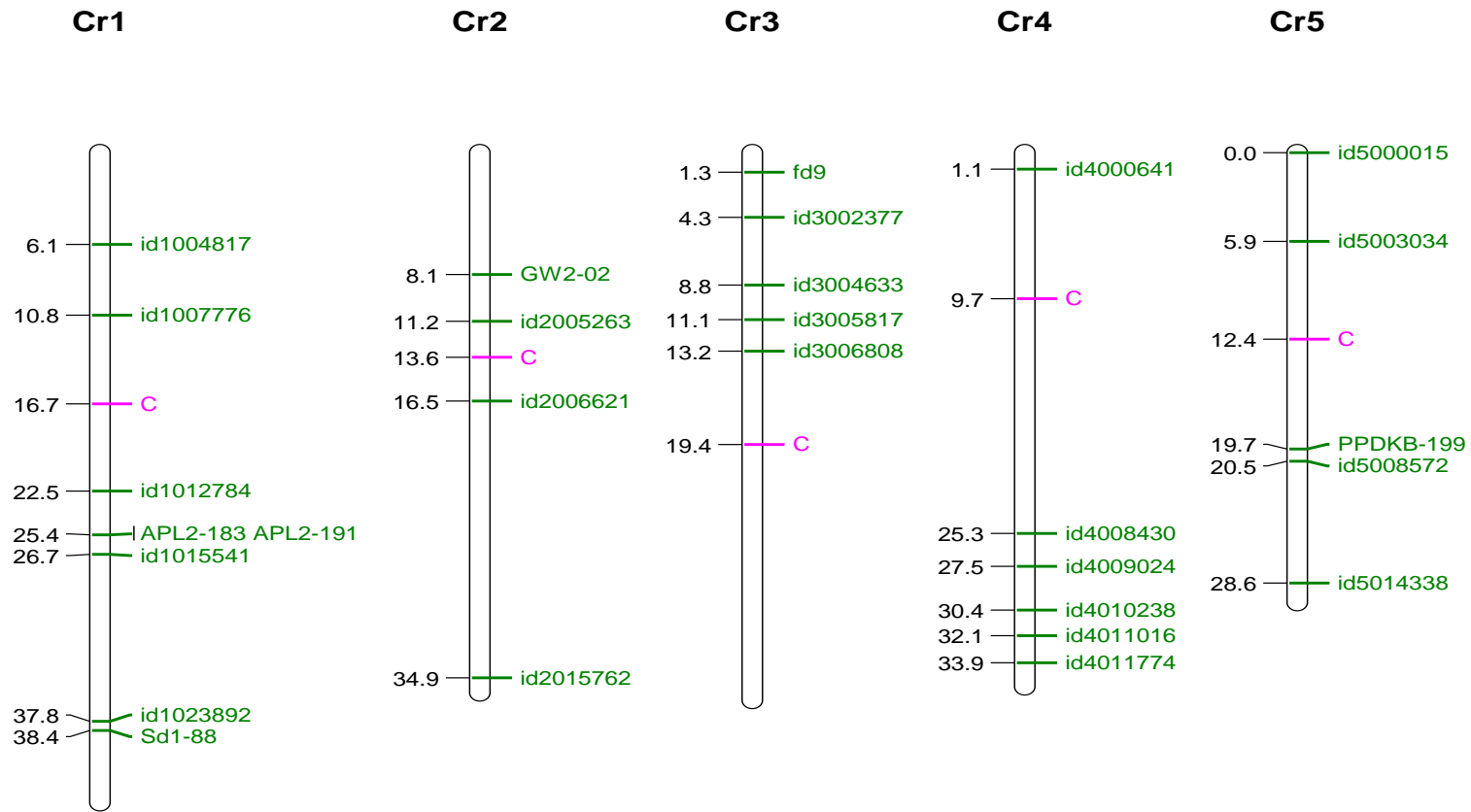


Figura 33. Distribución de marcadores SNP en el genoma de K1. Cromosomas 1-5. BC3F1 L3_Pi9.

Anexo 11. Distribución de marcadores SNP en el genoma de K1. Cromosomas 6-12. BC3F1 L3_Pi9.

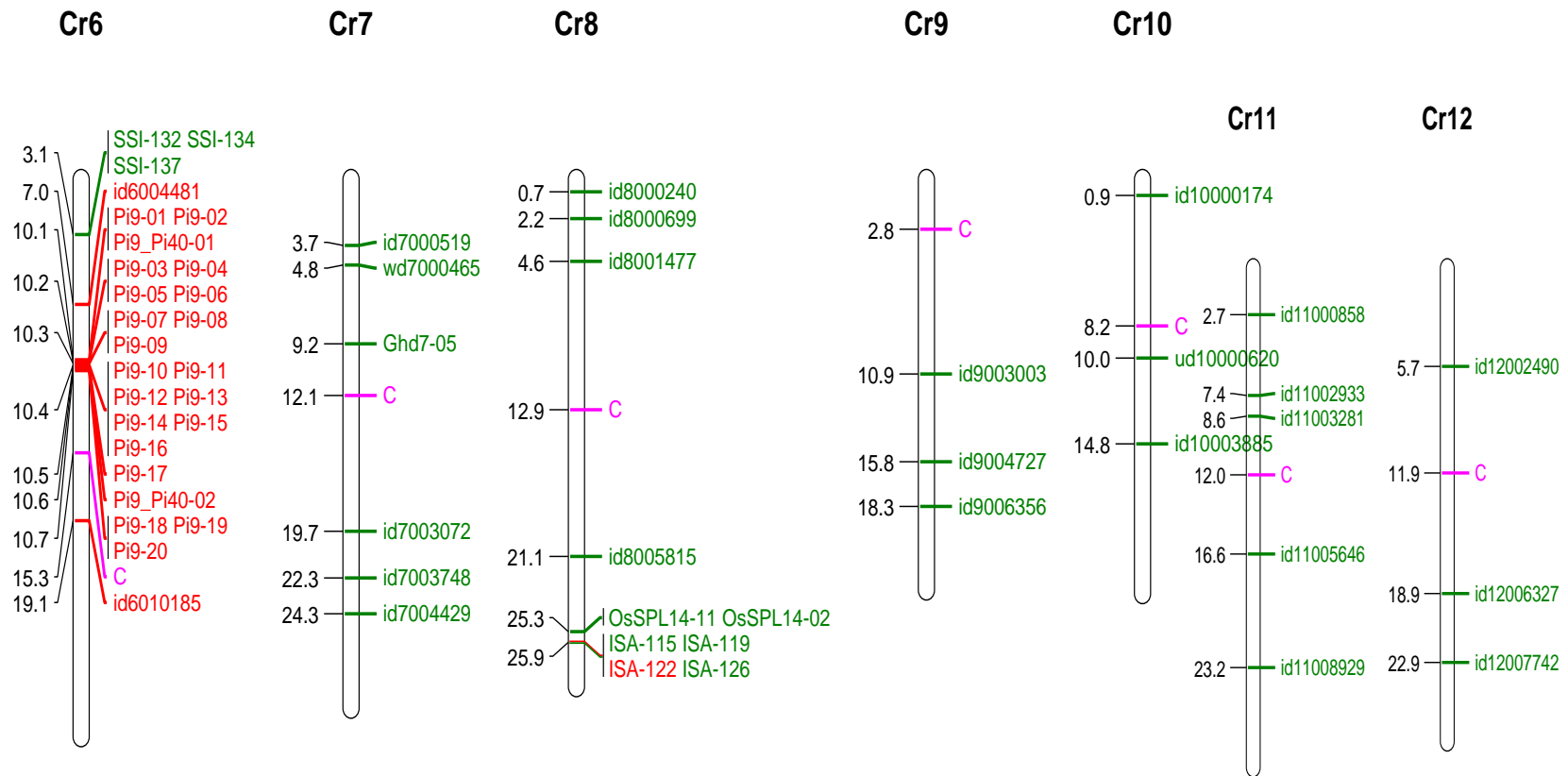


Figura 34. Distribución de marcadores SNP en el genoma de K1. Cromosomas 6-12. BC3F1 L3_Pi9.

Anexo 12. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L10. Cromosomas 1-5. BC3F1 L3_Pi40.

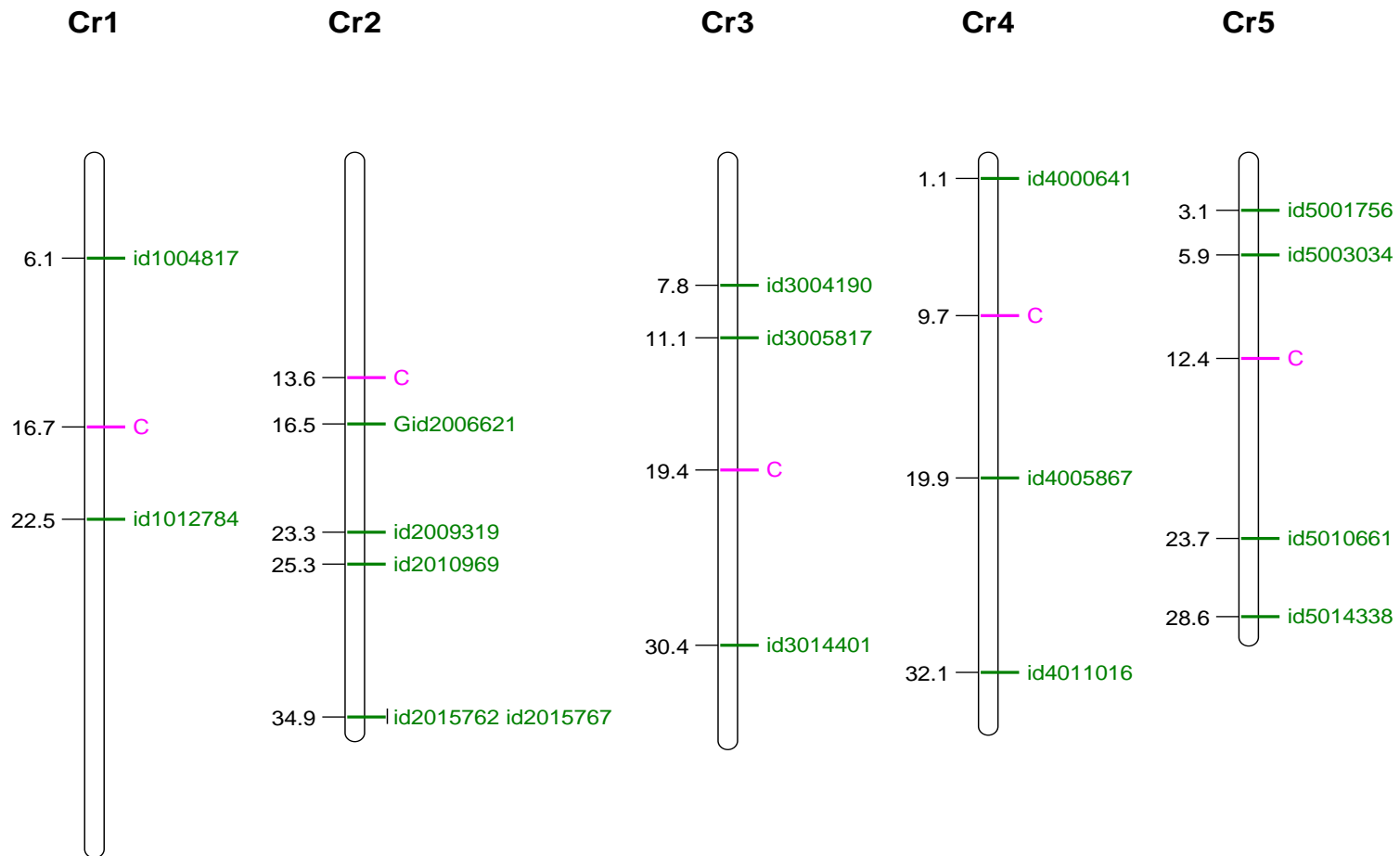


Figura 35. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L10. Cromosomas 1-5. BC3F1 L3_Pi40.

Anexo 13. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L10. Cromosomas 6-10. BC3F1 L3_Pi40.

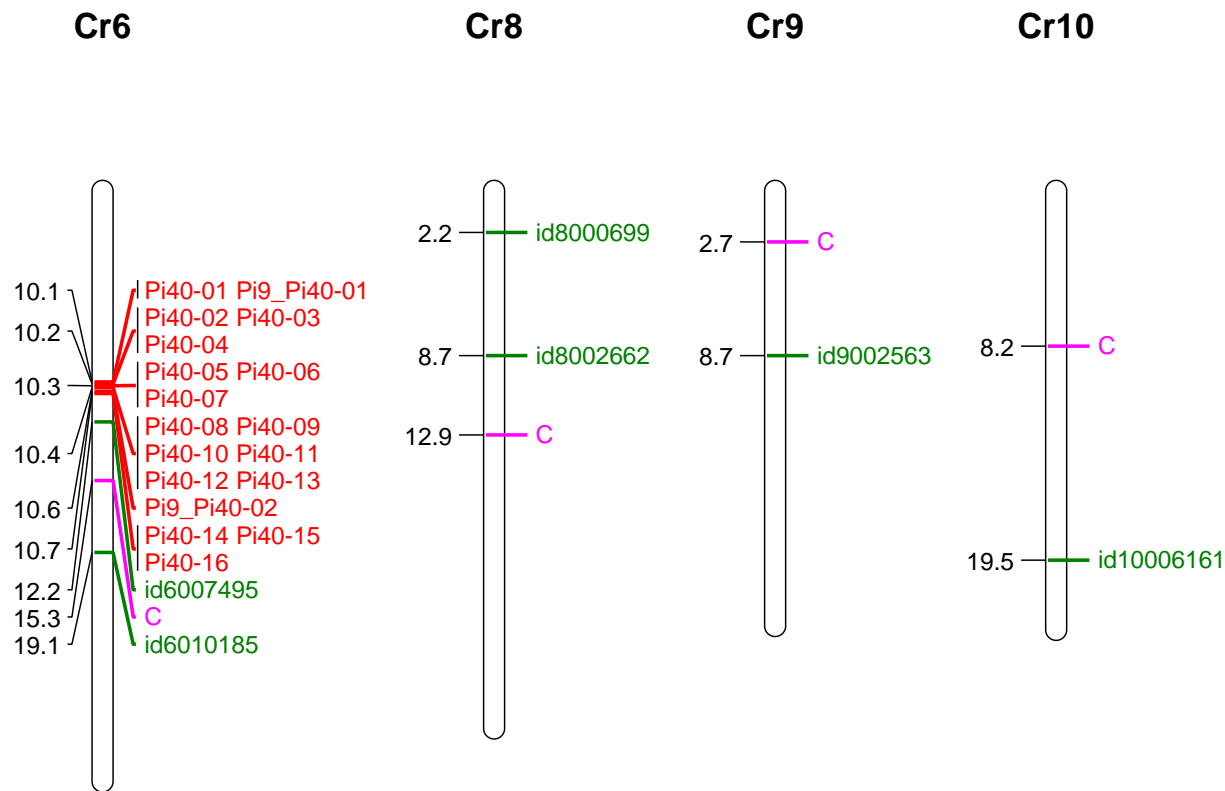


Figura 36. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L10. Cromosomas 6-10. BC3F1 L3_Pi40.

Anexo 14. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L140. Cromosomas 1-5. BC3F1 L23_Pi40.

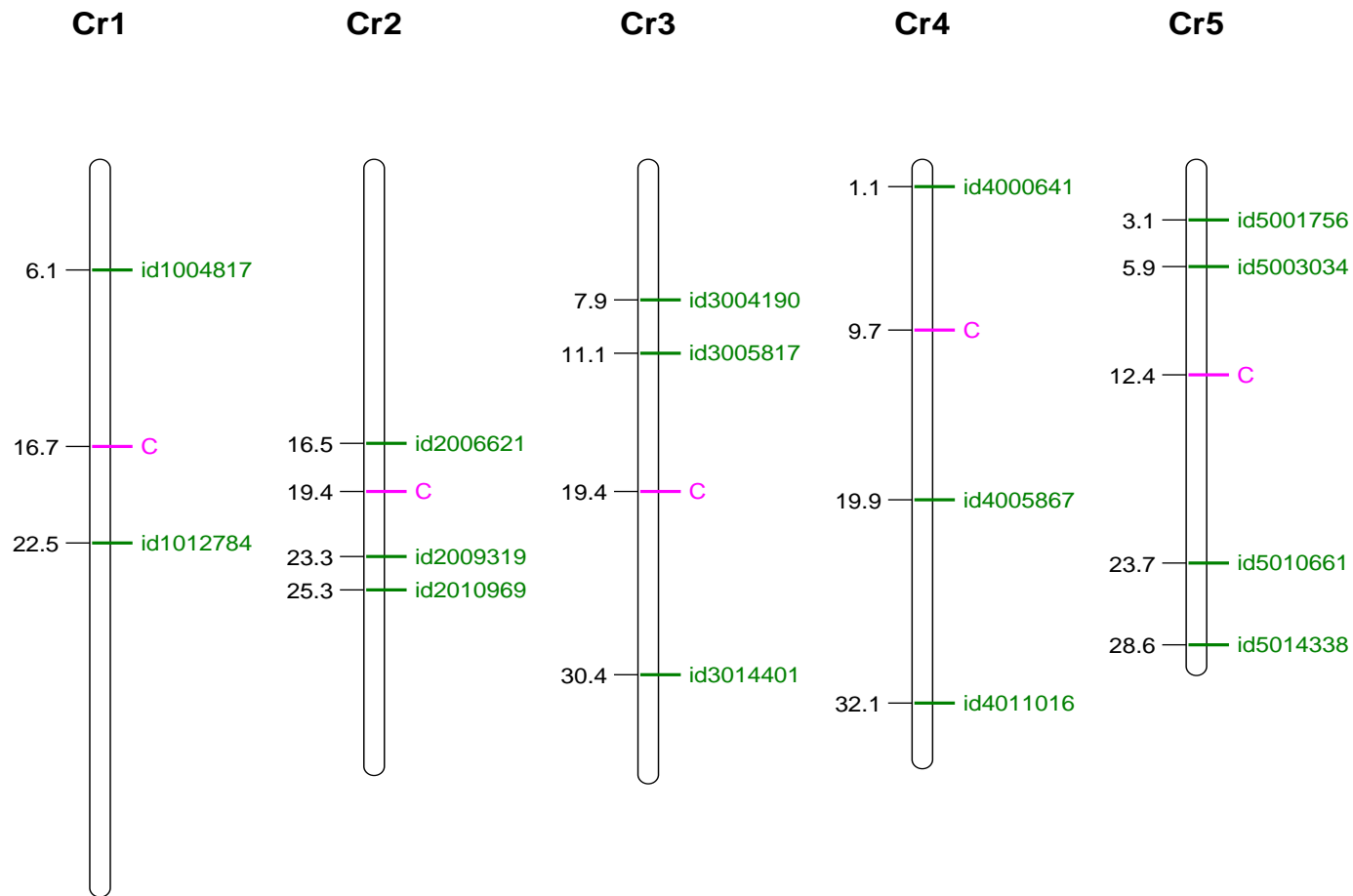


Figura 37. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L140. Cromosomas 1-5. BC3F1 L23_Pi40.

Anexo 15. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L140. Cromosomas 6-11. BC3F1 L23_Pi40.

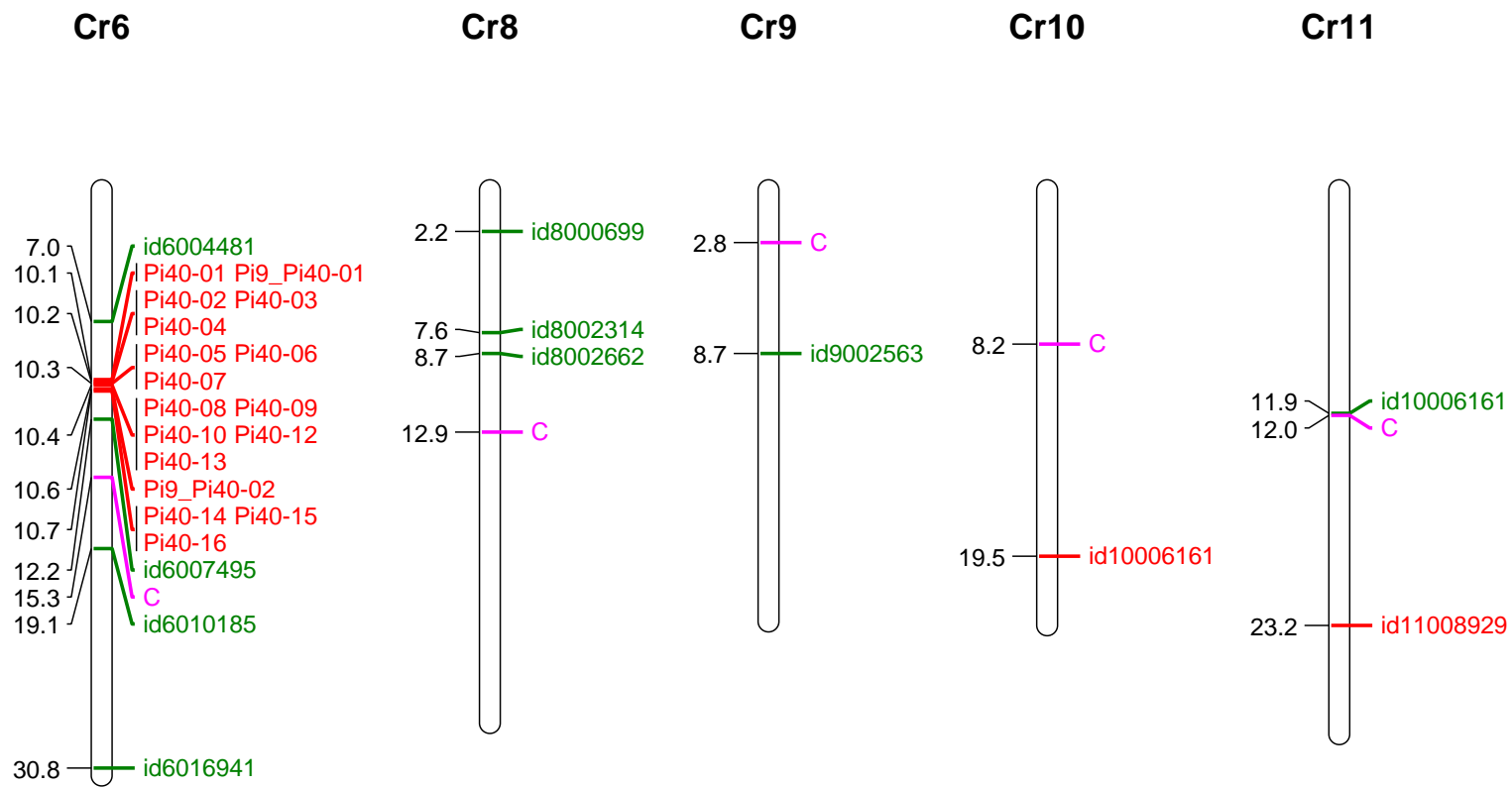


Figura 38. Distribución de marcadores SNP en el genoma de L140. Cromosomas 6-11. BC3F1 L23_Pi40.