

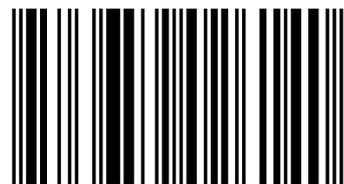
Métodos y reacción de cultivares de arroz y maíz a *Rhizoctonia solani*

Técnico Superior Universitario en Agronomía, IUT Región Los Andes (1984). Magíster Scientarum en Agronomía mención Protección Vegetal, Universidad Central de Venezuela (2000). Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Venezuela (2010). Investigador Nivel I (PPI-05436) desde el 2002-2009. Investigador B (PEI-2011) Ha tenido participación activa como investigador en seis proyectos de carácter inter institucional desarrollados en diferentes años. En los últimos años se ha especializado en la identificación molecular y convencional de patógenos, genética de poblaciones de patógenos, vigilancia de enfermedades del arroz, maíz y soya; caracterización de virulencia, desarrollo y aplicación de técnicas de evaluación de resistencia a diferentes enfermedades del arroz y maíz en condiciones controladas y de campo. El presente manuscrito fue parte de la tesis de doctorado.



Alex David Gonzalez Vera

Agrónomo (1984). Magíster en Agronomía(2000). Doctor en Ciencias Agrícolas (2010). Investigador Nivel I (2002-2009). Investigador B (2011). Especializado en la identificación molecular y convencional de patógenos, genética de poblaciones de patógenos, vigilancia de enfermedades del arroz, maíz y soya. El texto es parte de la Tesis Doctoral.



978-3-659-02614-0

editorial académica española

Resistencia de arroz y maíz a *R. solani*



Alex David Gonzalez Vera

Métodos y reacción de cultivares de arroz y maíz a *Rhizoctonia solani*

Una contribución al mejoramiento genético para resistencia a las principales enfermedades de los cereales en Venezuela

Gonzalez Vera

Alex David Gonzalez Vera

Métodos y reacción de cultivares de arroz y maíz a *Rhizoctonia solani*

Alex David Gonzalez Vera

**Métodos y reacción de cultivares de
arroz y maíz a *Rhizoctonia solani***

**Una contribución al mejoramiento genético para
resistencia a las principales enfermedades de los
cereales en Venezuela**

Editorial Académica Española

Impresión

Información bibliográfica publicada por Deutsche Nationalbibliothek: La Deutsche Nationalbibliothek enumera esa publicación en Deutsche Nationalbibliografie; datos bibliográficos detallados están disponibles en internet en <http://dnb.d-nb.de>.

Los demás nombres de marcas y nombres de productos mencionados en este libro están sujetos a la marca registrada o la protección de patentes y son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de sus respectivos propietarios. El uso de nombres de marcas, nombre de producto, nombres comunes, nombre comerciales, descripciones de productos, etc. incluso sin una marca particular en estas publicaciones, de ninguna manera debe interpretarse en el sentido de que estos nombres pueden ser considerados ilimitados en materias de marcas y legislación de protección de marcas y, por lo tanto, ser utilizadas por cualquier persona.

Imagen de portada: www.ingimage.com

Editor: Editorial Académica Española es una marca de
LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG
Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Alemania
Teléfono +49 681 3720-310, Fax +49 681 3720-3109
Correo Electronico: info@eae-publishing.com

Aprobado por: Maracay, Universidad Central de Venezuela, Tesis Doctoral en Ciencias Agrícolas, 2010

Publicado en Alemania
Schaltungsdienst Lange o.H.G., Berlin, Books on Demand GmbH, Norderstedt,
Reha GmbH, Saarbrücken, Amazon Distribution GmbH, Leipzig
ISBN: 978-3-659-02614-0

Imprint (only for USA, GB)

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek: The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this works is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

Publisher: Editorial Académica Española is an imprint of the publishing house
LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG
Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Germany
Phone +49 681 3720-310, Fax +49 681 3720-3109
Email: info@eae-publishing.com

Printed in the U.S.A.
Printed in the U.K. by (see last page)
ISBN: 978-3-659-02614-0

Copyright © 2012 by the author and LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG and licensors
All rights reserved. Saarbrücken 2012

TABLA DE CONTENIDO	Páginas
ÍNDICE	5-11
LISTA DE CUADROS	12-16
LISTA DE FIGURAS	17-20
RESUMEN	21
INTRODUCCIÓN	22-25
CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA	
I. GENÉTICA POBLACIONAL DEL PATOSISTEMA <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA - ARROZ - MAÍZ.	27-30
A. Generalidades sobre el hongo <i>Rhizoctonia solani</i> .	
1. Antecedentes. 2. Identificación. 3. Clasificación. 4. Grupos de anastomosis de <i>Rhizoctonia solani</i> . 5. Ecología y ciclo de vida.	
B. Potencial evolutivo y estructura genética de poblaciones de <i>Rhizoctonia solani</i> .	30-34
1. Conceptos sobre genética de poblaciones.	
a. Potencial evolutivo del patógeno. b. Estructura genética de poblaciones.	
1) Mutación. 2) Flujo génico. 3) Deriva genética. 4) Sistema de reproducción. 5) Selección.	
2. Potencial evolutivo de <i>Rhizoctonia solani</i> .	34-36
3. Herramientas y técnicas útiles para caracterizar poblaciones de <i>Rhizoctonia solani</i> .	36-41
a. Marcadores genéticos.	
1) Marcadores RAPD. 2) Marcadores RFLP. 3) Marcadores AFLP.	
4) Marcadores Microsatélites.	

C. Métodos de muestreo.	41
D. Métodos de análisis de datos.	42-46
1. Frecuencia de genes y Equilibrio de Hardy-Weinberg.	
a. Alelos codominantes. b. Alelos dominantes.	
2. Desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg-Equilibrium.	
a. Para un par de alelos. b. Alelos múltiples. c. Índices de Estabilidad.	
d. Asociación de genes no al azar.	
3. Variación genética dentro de especies.	46-48
a. Medidas de la variación genética. b. Proporción de loci polimórficos. c. Diversidad génica (heterocigosis). d. Distancia genética entre poblaciones.	
4. Filogenética molecular.	48-49
a. Métodos de distancia versus Parsimonia. b. <i>Bootstrapping</i> y confianza estadística en árboles filogenéticos.	
II. VIRULENCIA Y ESPECIFICIDAD DE AISLADOS DE <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA DERIVADOS DE ARROZ Y MAÍZ.	50-53
A. Conceptos generales de la enfermedad y del patógeno.	
1. Enfermedad. 2. Clasificación de los patógenos. 3. Sintomatología causada por el hongo necrotrofo <i>Rhizoctonia solani</i> . 4. Gama de hospedantes y distribución. 5. Aislamiento de <i>R. solani</i> de plantas infectadas y de suelo.	
B. Generalidades sobre el mejoramiento para resistencia a <i>R. solani</i> .	53-57
1. Conceptos generales sobre resistencia.	

- a. Defensa natural contra patógenos y parásitos.
 - 1) Evasión. 2) Resistencia. 3) Tolerancia.
- b. Interacción planta-patógeno.
- c. Mecanismos de resistencia.
 - 1) Resistencia amplia. 2) Resistencia del hospedante. 2.1) Resistencia completa. 2.2) Resistencia parcial.
- 2. Virulencia de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. 58
 - a. Virulencia de *R. solani* AG-1 IA infectivas de arroz.
 - b. Virulencia de *R. solani* AG-1 IA infectivas de maíz.
- 3. Especificidad de aislados de *R. solani* AG-1 IA.
- C. Métodos de evaluación desarrollados para evaluación de germoplasma de arroz y maíz frente a *R. solani*. 59-62
 - 1. Métodos de invernaderos.
 - a. Métodos para la evaluación de arroz frente a *R. solani* bajo condiciones de invernadero.
 - b. Métodos para la evaluación de maíz frente a *R. solani* bajo condiciones de invernadero.
 - 2. Métodos de laboratorios. 62-63
 - a. Métodos para la evaluación de arroz frente a *R. solani* bajo condiciones de laboratorio.
 - b. Métodos para la evaluación de maíz frente a *R. solani* bajo condiciones de laboratorio.
 - 3. Métodos de campo. 63-64
 - a. Evaluación del añublo de la vaina del arroz bajo condiciones de campo.
 - b. Evaluación de la mancha bandeada del maíz bajo condiciones de campo.

IV. EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA DE ARROZ Y MAÍZ PARA RESISTENCIA A *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. 64-68

A. Loci de carácter cuantitativo (QTLs).

B. Durabilidad de la resistencia.

C. Fuentes de resistencia para el añublo de la vaina del arroz.

1. Genes mayores, herencia transgresiva y QTLs.

2. Fuentes de resistencia en *Oryza* spp o parientes silvestres.

3. Fuentes en resistencia de maíz evaluado para la mancha bandeada.

CAPÍTULO 2. GENÉTICA POBLACIONAL DEL PATOSISTEMA *Rhizoctonia solani* AG-1 IA - ARROZ - MAÍZ, EN EL ESTADO PORTUGUESA, VENEZUELA

I. MATERIALES Y MÉTODOS. 69-74

A. Muestreo de la población.

B. Aislamiento del hongo

C. Extracción de ADN y Amplificación por PCR para ITS 5.8S del ADN ribosomal.

D. Amplificación de ADN por PCR para microsatélites.

E. Registro de datos.

F. Análisis de datos 74-78

1. Contenido de información Microsatélite y riqueza alélica de la población.

2. Diversidad clonal.

3. Diversidad genética y diferenciación entre poblaciones de distintos hospedantes.

4. Pruebas del equilibrio gamético de Hardy-Weinberg.

5. Prueba para la detección de embotellamientos

evolutivos o de efectos del fundador.

6. Prueba para la migración histórica.

7. Prueba para la fluctuación del tamaño de la población y los parámetros demográficos.

II. RESULTADOS.

78-88

A. Colecta de muestras y obtención de cultivos puros de *Rhizoctonia* spp.

B. Secuenciación y análisis de la región ITS 5.8S ADNr de *Rhizoctonia* spp.

C. Contenido de información Microsatélite.

1. Diversidad clonal.

2. Distribución jerárquica de la diversidad genética y diferenciación entre poblaciones de hospedantes. 3.

Pruebas del equilibrio gamético de Hardy-Weinberg (HWE).

4. Prueba para los efectos del fundador o los embotellamientos (cuello de botella).

5. Pruebas para la migración histórica, parámetros demográficos y tamaño de fluctuación de la población.

III. DISCUSIÓN.

88-93

IV. CONCLUSIONES.

94

CAPÍTULO 3. VIRULENCIA Y ESPECIFICIDAD DE CEPAS DE *Rhizoctonia solani* AG-1 IA DERIVADAS DEL ARROZ Y MAÍZ , BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO Y UMBRÁCULO

I. MATERIALES Y MÉTODOS.

95-100

A. Reactivación de aislados y preparación de inóculo.

B. Selección y siembra de cultivares de arroz y líneas de maíz.

C. Inoculación de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de laboratorio.	
D. Inoculación de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de umbráculo.	
E. Inoculación cruzada de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de umbráculo.	
II. RESULTADOS	100-120
A. Inoculación de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de laboratorio.	
B. Inoculación de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de umbráculo.	
1. Método de microcámaras para el añublo de la vaina de arroz.	
2. Método de inoculación de plántulas de maíz en umbráculo.	
C. Inoculación cruzada de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de umbráculo.	
III. DISCUSIÓN.	121-129
IV. CONCLUSIONES.	127

CAPITULO 4. EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA DE ARROZ Y MAÍZ PARA RESISTENCIA A *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS Y DE CAMPO

I. MATERIALES Y MÉTODOS.	128-132
A. Ensayos de umbráculo para evaluar el añublo de la vaina de arroz.	
B. Ensayos de laboratorio para evaluar el añublo de la vaina de	

arroz.

C. Ensayos de campo para el añublo de la vaina del arroz y la mancha bandeada del maíz (Determinación de la cantidad de inóculo natural, previo al establecimiento de los ensayos).

II. RESULTADOS.

133-157

A. Ensayos de umbráculo para evaluar el añublo de la vaina de arroz.

B. Ensayos para la evaluación del añublo de la vaina de arroz bajo condiciones de campo.

C. Ensayos de campo para evaluar la mancha bandeada del maíz.

III. DISCUSIÓN.

158-163

IV. CONCLUSIONES.

164

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

165-177

CUADRO	LISTA DE CUADROS	Página
1	Medida de la diversidad clonal total de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA que infectan el arroz y el maíz en Portuguesa, Venezuela.	83
2	Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para distribución jerárquica de la diversidad genética y comparación en pares de poblaciones de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA que infectan el arroz y el maíz en Portuguesa, Venezuela.	85
3	Pruebas de Hardy-Weinberg y equilibrio genotípico para poblaciones de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA que infectan el arroz y el maíz en Portuguesa, Venezuela.	86
4	Prueba de Cornuet y Luikarts (1996) para los efectos de embotellamientos (desviación del equilibrio neutral) bajo el modelo de mutación gradual de evolución para microsatélites en poblaciones de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA que infectan el arroz y el maíz en Portuguesa, Venezuela.	87
5	Análisis de la Varianza (SC Tipo III) para virulencia de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivas de arroz bajo el método de Laboratorio modificado.	101
6	Índice del espectro de virulencia (Iev) de los aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz bajo condiciones de laboratorio.	103

7	Análisis de la Varianza (SC Tipo III) en inoculación de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivas de arroz, bajo el método de microcámaras.	105
8	Índice del espectro de virulencia (Iev) con los aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz bajo condiciones de microcámaras.	107
9	Análisis de la Varianza (SC Tipo I) del avance de la mancha del experimento de virulencia de 11 aislados de <i>R. solani</i> infectivos de maíz, a los ocho días de la inoculación.	110
10	Índice de virulencia de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz bajo condiciones de umbráculo, a los ocho días de inoculados.	112
11	Análisis de la Varianza (SC Tipo III) del avance de la mancha (%) medidos a los 15 días de inoculado, del experimento de virulencia de 10 aislados de <i>R. solani</i> infectivos de maíz.	114
12	Índice de virulencia con los aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de maíz bajo condiciones umbráculo, a los 15 días de inoculado.	116
13	Prueba de inoculación cruzada de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de maíz y arroz con distintos genotipos multilocus SSR (GTML)	119

14	Resumen de la serie de ensayos establecidos en umbráculo, laboratorio y campo para la evaluación de germoplasma de arroz y maíz ante el añublo de la vaina y la mancha bandeada, respectivamente.	132
15	Análisis de la Varianza (SC Tipo III) de 23 genotipos de arroz inoculado con la cepa de <i>R. solani</i> AG-1 IA haplotipo A5B4 (64), A3D5 (70) y A5F2 (115) bajo el método Microcámaras, Bola de micelio y Laboratorio, resp.	133
16	Comparación de medias de la severidad del añublo de la vaina del arroz en 23 genotipos de arroz inoculados con <i>R. solani</i> AG-1 haplotipos A5B4 (64), A3D5 (70) y A5F2 (115) bajo el método Microcámaras, Bola de micelio y Laboratorio, respectivamente.	135
17	Análisis de la Varianza (SC Tipo III) de 23 genotipos de arroz inoculado con el hongo <i>R. solani</i> AG-1 IA haplotipo A3D5 (70) y A5B4 (64), bajo condiciones de campo.	137
18	Comparación de medias de la severidad del añublo de la vaina del arroz en 23 genotipos de arroz infectados con <i>R. solani</i> AG-1 haplotipos A3D5 (70) y A5B4 (64), bajo condiciones de campo.	138

19	Coeficientes de correlación de los diferentes métodos usados en la evaluación del añublo de la vaina en 23 genotipos de arroz inoculados con haplotipos de <i>R. solani</i> AG-1 IA bajo condiciones de laboratorio, umbráculo y campo.	141
20	Análisis de los componentes principales (ACP): autovalores, autovectores y correlaciones entre los métodos y aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA usados para medir la reacción del añublo de la vaina en 23 genotipos de arroz.	142
21	Valores de los Cuadrados Mínimos de las regresión lineal de MicA5B4.	144
22	Análisis de varianza (SC III) de la evaluación a los 60 y 70 días de edad (dde) de siete líneas de maíz infestadas con el haplotipo M2D4 (147) y el testigo P2AB2 de <i>R. solani</i> , bajo condiciones de campo.	145
23	Comparación de medias de la evaluación a los 60 y 70 días de edad (dde) de siete líneas de maíz infestadas con el haplotipo M2D4 (147) y el testigo P2AB2 de <i>R. solani</i> , bajo condiciones de campo.	149
24	Coeficientes de correlación del método de invernadero y campo y de los aislados de <i>R. solani</i> derivados de maíz para la evaluación de la mancha bandeada en siete líneas de maíz.	151

- 25 Análisis de los componentes principales (ACP) y las correlaciones entre los métodos de umbráculo y campo usando los aislados M2D4 (147) y P2AB2 (testigo) de *R. solani* AG-1 IA usados para medir la reacción de la mancha bandeada en siete líneas de maíz. 152
- 26 Valores de los Cuadrados Mínimos de las regresión lineal de un método de umbráculo (UbM2D4b) con relación a los a los resultados de la evaluación a la mancha bandeada del maíz en campo (CpM2D4b). 155

FIGURA	LISTA DE FIGURAS	Página
1	Ubicación geográfica de la población de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA que infecta el arroz y el maíz en el estado Portuguesa, Venezuela.	70
2	A. Síntoma del añublo de la vaina del arroz, se colectaron lesiones típicas en la hoja bandera. B. Síntomas de la mancha bandeada de la hoja del maíz	72
3	Resultados del análisis de ITS`4/5 realizado mediante el programa SEQUENCHER 4.2.2.	80
4	Distribución de la frecuencia de alelos para los 10 loci microsatélites en los seis campos de arroz y maíz infectados por <i>R. solani</i> AG1 IA en Portuguesa, Venezuela.	82
5	Virulencia de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz inoculados bajo condiciones de laboratorio.	101
6	Severidad del añublo de la vaina producida por aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA inoculadas en cultivares de arroz bajo condiciones de laboratorio.	102
7	Agresividad de los aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz inoculados sobre seis cultivares de arroz bajo condiciones de laboratorio.	103

8	A. Desarrollo de la mancha o síntoma del añublo de la vaina del arroz a las 48 h de inoculado con un aislado de <i>R. solani</i> infectivo de arroz. B. Mancha obtenida. C. Escala digramática	104
9	Virulencia de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz inoculados bajo el método de microcámara.	106
10	Severidad del añublo de la vaina producida por aislados de <i>R. solani</i> inoculados en cultivares de arroz bajo el método de microcámaras.	107
11	Agresividad de los aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de arroz inoculados sobre seis cultivares de arroz bajo condiciones de microcámara.	108
12	Método de microcámara para evaluar la reacción del añublo de la vaina del arroz (Jia et al., 2007).	109
13	Virulencia de aislados de <i>R. solani</i> AG1-IA de inoculados sobre siete líneas de maíz bajo condiciones de umbráculo, ocho días después de la inoculación.	111
14	Avance (%) de la mancha bandeada en siete líneas de maíz inoculadas con 11 aislados de <i>R. solani</i> AG1-IA infectivos de maíz, a los ocho días de inoculados.	111
15	Virulencia de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA	113

infectivos de maíz inoculados sobre siete líneas de maíz bajo condiciones de umbráculo, a los ocho días de inoculados.

16	Virulencia de aislados de <i>R. solani</i> AG1-IA de inoculadas sobre siete líneas de maíz bajo condiciones de umbráculo, a los 15 días de la inoculación.	115
17	Avance (%) de la mancha bandeada en siete líneas de maíz inoculadas con 11 aislados de <i>R. solani</i> AG1-IA infectivos de maíz a los 15 (ddi).	115
18	Virulencia de aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de maíz sobre siete líneas de maíz bajo condiciones de umbráculo, a los 15 de inoculados.	117
19	Vista general del ensayo de virulencia de aislados de <i>R. solani</i> infectivos de maíz, en umbráculo.	118
20	Aspecto general del ensayo de inoculación cruzada, se observan plántulas de maíz con suelo infectado con granos colonizados con <i>R. solani</i> cubiertas por microcámaras, bajo condiciones de umbráculo.	120
21	Método de la bola de micelio (Park et al., 2008).	134
22	Manchas típicas del añublo de la vaina del arroz uniformemente distribuidas en todas las plantas	139

(hojas básales) de una hilera central.

23	Aspecto general de los ensayos de germoplasma de arroz ante el añublo del arroz causado por <i>R. solani</i> AG-1 IA.	140
24	Componentes principales de los métodos y aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA usados para medir la reacción del añublo en genotipos de arroz.	146
25	Representación de la distribución de los genotipos de arroz en el resultado de la regresión lineal MicA5B4 con respecto a CpoA5B4.	147
26	Componentes principales de los métodos y aislados de <i>R. solani</i> AG-1 IA infectivos de maíz usados para medir la reacción a la mancha bandeada del maíz.	156
27	Representación de la distribución de las líneas de maíz regresión lineal de un método de umbráculo (UbM2D4b) con relación a los resultados de la evaluación a la mancha bandeada del maíz en campo (CpM2D4B).	128
28	A. Ensayos de la mancha bandeada del maíz. B. Forma de infestación del ensayo. C. Evaluación de los 60 días.	157

RESUMEN

La mancha bandeada del maíz y el añublo de la vaina del arroz, causadas por *Rhizoctonia solani* Kühn, son la primera y segunda enfermedad más importante del maíz y el arroz en Venezuela, respectivamente. El objetivo general fue conocer la diversidad genética y virulencia de *R. solani* y sus implicaciones en el mejoramiento genético del maíz y arroz, con la finalidad de contribuir a la obtención de cultivares resistentes de maíz y de arroz, como la alternativa más duradera, económica y ambientalmente aceptable para el control de dichas enfermedades. Se aplicaron métodos moleculares y convencionales de laboratorio, una serie de ensayos de umbráculo y campo para caracterizar genéticamente y por virulencia aislados de *R. solani*, determinar su especificidad mediante inoculación cruzada y posteriormente evaluar métodos de caracterización de germoplasma de arroz y maíz para resistencia a *R. solani*. Los resultados demostraron la hipótesis de (i) existencia de estructura poblacional de *R. solani* AG-1 IA con alta diversidad genética y sistema de reproducción mixto, (ii) existencia de aislados con amplio espectro de virulencia y niveles de especialización y (iii) existencia de fuentes de resistencia y métodos confiables para la evaluación de germoplasma de arroz y maíz. Los productos tangibles fueron aislados de *R. solani* caracterizados, métodos de evaluación identificados como confiables para evaluación de resistencia y genotipos identificados para su uso en programas de mejoramiento para resistencia la mancha bandeada del maíz y al añublo de la vaina del arroz.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.) son los cultivos más importantes en Venezuela, en términos de hectáreas cosechadas por año. En el 2006, se cosecharon cerca de 700.871 ha de maíz que produjeron 2,3 millones de TM de grano, en arroz se cosecharon 226.829 ha y se produjeron 1,1 millones de TM de arroz en cáscara, con un rendimiento promedio de 3.334 Kg/ha y 4.950 Kg/ha, respectivamente (Fedeaagro, 2009).

La principal zona de producción de los rubros arroz y maíz se encuentra ubicada en los llanos occidentales, donde se presentan condiciones de trópico húmedas. Los suelos son de textura fina, con fracción de limo y arcilla predominantes, con registros de precipitaciones que van desde los 1.200 a 1.800 mm anuales. El maíz se siembra desde 0 a 400 m.s.n.m. en épocas de lluvias o seco y el arroz se siembra durante todo el año en las zonas más bajas (0 - 250 m.s.n.m), bajo condiciones de riego controlado o mojes. El grano seco de maíz cosechado se destina principalmente a la industria de harinas precocidas, aceites y alimentos balanceados para animales. El arroz paddy o en cáscara mayormente se procesa industrialmente para el consumo humano como arroz de mesa (Fontana y González, 2000).

A pesar de la gran adaptabilidad de estos cultivos a las condiciones agroecológicas presentes, los rendimientos son bajos, siendo afectados por factores bióticos y abióticos (Cabrera, 2001). Entre los factores bióticos se encuentran enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y micoplasmas y entre los abióticos se encuentran el estrés por suelos con aguachinamiento, sequía y acidez, dichos factores pueden provocar síntomas de enfermedad y desbalances fisiológicos de las plantas, afectando los rendimientos.

En Venezuela, el maíz y el arroz son afectados principalmente por diversas enfermedades de origen fungoso. En maíz se presenta la mancha bandeada de la hoja, que fue identificada en la década de mil novecientos noventa, con una alta incidencia en el estado Portuguesa (Cardona et al., 1999). El arroz es afectado por el añublo de

la vaina, identificada desde mediados del siglo veinte (Malaguti, 1951). Ambas enfermedades son causadas por el mismo agente, el estado asexual o anamorfo del hongo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk conocido como *Rhizoctonia solani* Kühn (Ogoshi, 1987). Las cepas que afectan el arroz y maíz encontrados en Venezuela, han sido caracterizadas dentro del grupo de anastomosis AG-1 IA, respectivamente (Cedeño et al., 1996; Perdomo et al., 2007).

En arroz se han hecho estudios de la viabilidad del hongo bajo condiciones de inundación (Ulacio et al., 1999) y se han propuesto medidas paliativas como el control químico (Rodríguez et al., 2001), manejo cultural (Nass y Rodríguez, 1994) y control biológico (Rodríguez et al., 1999). En maíz se ha sugerido el manejo integrado asociado a prácticas culturales (Cabrera, 2001) y al control biológico (Zambrano et al., 2002). Si bien estas alternativas pueden disminuir los daños ocasionados por el hongo, una alternativa más duradera, económica y ambientalmente aceptable es la obtención de cultivares de arroz y maíz resistentes a la enfermedad, los cuales no se encuentran disponibles en Venezuela (Bastidas, 2003; Graterol et al., 1996).

En otros países, en arroz se han liberado cultivares con buen nivel de resistencia a *R. solani* (Kloesterboer et al., 1999; Pan et al., 1999) y se ha confirmado la presencia de loci que determinan características cuantitativas (QTLs, siglas del inglés) de resistencia en líneas endocriadas (Pinson et al., 2005). Por el contrario, en maíz han sido menores los reportes de obtención de materiales resistentes (Ahuja y Payak, 1984), recientemente fueron identificados QTLs para resistencia en China (Zhao et al., 2006), sólo existe un estudio de herencia de la resistencia, cuyos resultados no fueron concluyentes (Kumar y Singh, 2002).

En vista que la resistencia completa (vertical) contra el añublo de la vaina en arroz y la mancha bandeada del maíz no es una alternativa disponible, es esencial tener una técnica que pueda detectar diferencias en incrementos cuantitativos de resistencia parcial (horizontal) entre cultivares. Se han usado diferentes fuentes de inóculo de *R. solani* y métodos para evaluar la reacción del añublo de la vaina, incluyendo palillos

mondadientes colonizados en culmos de arroz en invernadero (Eizenga et al., 2002), discos de agar colonizado en plántulas incubadas en microcámaras (Jia et al., 2007; Prasad and Eizenga, 2008), bolas de micelio en plántulas en cámaras de crecimiento (Park et al., 2008), mezcla de arroz paddy y afrecho colonizado en macollos (Ou, 1985), esclerocios de diferente edad colocados en vértices de hojas (Singh et al., 2002) e infiltración con toxinas en hojas de arroz incubadas en cámara de crecimiento (Brooks, 2007).

Por su parte, como fuentes de inóculo de aislados de *R. solani* infectivos de maíz se han usado: siembra con semillas inoculadas, siembra en suelo inoculado y plántulas de maíz inoculadas con hojas de maíz infectadas, esclerocios o granos de arroz colonizados, además de suspensión de micelio colocados en la plántula (Pineda et al., 2005), granos de cebada colonizados en trozos de hoja en platos Petri (Ahuja y Payak, 1981) y discos de agar colonizado en plántulas de 12 días de edad (Perdomo et al., 2007).

El hongo *R. solani* se puede diseminar principalmente a través de semillas, del agua de riego, restos de cosecha, hospedantes alternos y maquinarias. Por ser *R. solani* un hongo de suelo, con producción de estructuras de supervivencia o esclerocios (Ogoshi, 1987; Ou, 1985) y de reproducción mayormente mixta (Bernardes de Assis et al., 2008; Linde et al., 2005; Rosewich et al., 1999), ha sido clasificado como un patógeno de potencial evolutivo intermedio (McDonald y Linde, 2002). En estudios recientes sobre diversidad y evolución de este patógeno bajo el sistema de rotación soya - arroz, se ha encontrado una alta diversidad o haplotipos entre muestras colectadas en Louisiana, con niveles de especificidad y sistema de reproducción mixto (Bernardes de Assis et al., 2008). Los estudios de diversidad / evolución son importantes para el entendimiento de la patología y ecología de *R. solani* AG-1 IA y de otros patosistemas (McDonald y Linde, 2002).

Por otra parte, para entender los procesos que conducen a la quiebra o rompimiento de un gen de resistencia, es necesario primero entender los procesos que gobiernan la evolución del patógeno. Solo entonces se puede desarrollar una estrategia de

mejoramiento que pueda ser viable para romper el “ciclo de Despliegue – y – Rompimiento” (boom – and – bust cycle, denominado por McDonald y Linde) de un gen de resistencia del hospedante por parte de un gen virulento del patógeno y así obtener una resistencia más durable. En otras palabras, las estrategias de mejoramiento para la obtención de materiales resistentes en arroz y maíz deben ir acompañadas de un estudio minucioso de la genética poblacional del patógeno, para conocer su diversidad genética y así desarrollar estrategias acordes con la complejidad del hongo.

Con base a lo anterior, el objetivo general de esta investigación fue conocer la variabilidad genética y virulencia de *Rhizoctonia solani* Kühn y sus implicaciones en el mejoramiento genético del maíz y arroz. Como objetivos específicos:

- I. Determinar la variabilidad genética poblacional de *Rhizoctonia solani* Kühn en el patosistema *Rhizoctonia* – arroz – maíz de la zona productora del estado Portuguesa.
- II. Determinar la especificidad de las cepas virulentas en arroz y maíz, bajo condiciones controladas.
- III. Evaluar germoplasma de arroz y maíz con cepas virulentas de *R. solani*, bajo condiciones controladas y de campo

Capítulo 1

REVISIÓN DE LITERATURA

I. GENÉTICA POBLACIONAL DEL PATOSISTEMA *Rhizoctonia solani* AG-1 IA - ARROZ - MAÍZ.

A. Generalidades sobre el hongo *Rhizoctonia solani*.

1. Antecedentes.

La más ampliamente reconocida especie del hongo *Rhizoctonia* fue originalmente descrita en el cultivo de papa por Julios Kühn en el año 1858 (Sneh et al., 1996). *Rhizoctonia solani* es un hongo basidiomiceto que no produce esporas asexuales (conidia) y solo ocasionalmente produce esporas sexuales llamadas basidiosporas. En la naturaleza, *R. solani* se reproduce mayormente de manera asexual y existe primariamente como micelio vegetativo y/o esclerocio. Diferente a muchos hongos basidiomicetos, las basidiosporas no están contenidas en cuerpo de fructificación suave como los típicos hongos de sombrero. Las estructuras de fructificación sexual y basidiosporas (teleomorfo) fueron observadas por primera vez y descritas en detalle por Prilleux y Delacroiz en 1981 (Cubeta y Vilgalys, 2000). El estado sexual de *R. solani* ha cambiado en varias ocasiones de nombre desde 1981, pero ahora se conoce como *Thanatephorus cucumeris* (Ogoshi, 1987; Sneh et al, 1996).

2. Identificación.

El micelio vegetativo de *Rhizoctonia* spp., incluyendo a *R. solani* es decolorado en estado joven pero adquieren un color gris a marrón cuando maduran. El micelio consiste en células individuales divididas por un septo que contiene un poro en forma de rosca o de nuez. El poro permite el movimiento del citoplasma, mitocondria y núcleos de célula a célula. La hifa por lo general presenta ramas con ángulos de 90° y usualmente posee más de tres núcleos por célula hifal. La anatomía del poro septal y el número nuclear celular (del inglés celular nuclear number, CNN), han sido

extensivamente usado por los investigadores para diferenciar a *R. solani* de otras especies. *R. solani* está caracterizado por tener más de 2 CNN en hifas jóvenes con punta cerrada, la hifa principal generalmente presenta un ancho mayor a 7µm, el micelio adquiere un color marrón oscuro, los esclerocios (si están presentes) son de forma irregular, marrón claro a oscuro, no se diferencia la corteza de la medula y tiene como teleomorfo a *Thanatephorus cucumeris* (Sneh et al., 1996).

3. Clasificación.

La clasificación de *Rhizoctonia* spp ha sido muy difícil. Antes de la década de mil novecientos sesenta, los investigadores realizaron diferencias en morfología, mayormente observadas en el cultivo del hongo en medios nutritivos en laboratorio y en la patogenicidad sobre varias especies de plantas. Parmeter (1969) citado por Sneh et al. (1996) reintroduce el concepto de ‘anastomosis hifal’ para caracterizar e identificar *Rhizoctonia*. El concepto implica que los aislados que tienen la habilidad para reconocerse y fusionarse con otros (proceso conocido como anastomosis) se encuentran genéticamente relacionados, mientras que los aislados de *Rhizoctonia* que no tienen esta habilidad, no están relacionados.

Actualmente los autores se refieren al agente causal del añublo de la vaina del arroz y de la mancha bandeada del maíz como *Rhizoctonia solani* Kühn, anamorfo de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Sneh et al., 1996) y su clasificación taxonómica actual es:

Reino: Fungi

Phyllum: Basidiomycota

Orden: Ceratobasidiales

Familia: Ceratobasidiaceae

Género y especie: *Thanatephorus cucumeris* (teleomorfo)

Rhizoctonia solani (Anamorfo)

4. Grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani*.

El criterio de anastomosis hifal ha sido usado extensamente para colocar aislados de *R. solani* dentro de distintos grupos taxonómicos llamados grupos de anastomosis (del inglés anastomosis group, abreviado como AG). En la práctica, la anastomosis hifal se determina de varias maneras. La manera comúnmente empleada involucra el apareamiento de dos aislados de *Rhizoctonia* que se dejan crecer juntos sobre un cubre objeto, el área donde emerge la hifa es teñida y se examina microscópicamente para determinar la interacción hifal resultante (Sneh et al., 1996).

El apareamiento de aislados pertenecientes al mismo AG resulta en una fusión hifal (anastomosis), conduciendo a la aceptación (auto-apareamiento) o rechazo (incompatibilidad somática). El apareamiento entre AG que no resulta en una fusión de hifas, sugiere una mayor diferencia genética entre aislados, lo cual se considera que son especies diferentes. Se conocen cuatro tipos de interacción hifal (C0 a C3), la interpretación de la reacción de anastomosis no siempre es íntegra para los cuatro fenotipos porque pueden ocurrir al mismo tiempo. La reacción C2 y C3 dentro del mismo AG son las más relevantes para el estudio de biología de poblaciones. La reacción C2 (reacción de muerte, del inglés killing reaction), representa la respuesta de incompatibilidad somática entre individuos genéticamente diferentes. La reacción C3 (fusión perfecta) entre dos aislados es indicativo de identidad genética igual o muy cercana (Carling, 1996; Cubeta y Vilgalys, 2000).

Se conoce muy poco acerca de los mecanismos genéticos que controlan este proceso de reconocimiento en *Rhizoctonia*. En otros hongos filamentosos, la incompatibilidad somática está controlada por varios genes con múltiples alelos. Para que dos aislados de un hongo sean compatibles, todos los loci de compatibilidad somática deben ser los mismos (Carling, 1996; Ogoshi, 1987).

Se han asignado hasta 13 AG para los aislados de *R. solani* (Carling et al., 2002). Recientemente los estudios basados en ADN y proteínas corroboran la separación de *R. solani* en varios grupos genéticamente distintos, pero además revelan una

considerable diversidad dentro de un mismo grupo de anastomosis. La anastomosis hifal y los métodos moleculares se están usando corrientemente para examinar la taxonomía, ecología y patología de *R. solani* (Bernardes de Assis, 2008; Carling et al., 2002).

5. Ecología y ciclo de vida.

El hongo *R. solani* puede sobrevivir por muchos años produciendo pequeñas estructuras (1-3 mm de diámetro) irregulares de color marrón-negro llamadas esclerocios, en el suelo o sobre el tejido de la planta (Ogoshi, 1987). Ciertos patógenos de *R. solani* del arroz, han evolucionado para producir un esclerocio con una delgada capa que le permiten flotar y sobrevivir en el agua (Carling, 1996; Cedeño et al., 1996). Además, *R. solani* sobrevive como micelio por colonización del suelo o materia orgánica como saprófito, particularmente como resultado de la actividad patogénica. Los esclerocios y/o micelios presentes en el suelo y/o sobre el tejido de la planta germinan para producir filamentos vegetativos (hifas) del hongo que pueden afectar una amplia gama de cultivos de fibra o alimento (Ogoshi, 1987).

B. Potencial evolutivo y estructura genética de poblaciones de *Rhizoctonia solani*.

1. Conceptos sobre genética de poblaciones.

a. Potencial evolutivo del patógeno.

Los agroecosistemas modernos son un magnífico escenario para estudiar la evolución de los microorganismos fitopatógenos, ya que en muchos casos la durabilidad de los programas de control de enfermedades, va estar condicionada por el potencial evolutivo de las poblaciones del patógeno que se pretende controlar. Así, por ejemplo, los patógenos que presenten un mayor potencial evolutivo tendrán una mayor probabilidad de escapar a programas de control basados en el empleo de productos fitosanitarios o en el uso de cultivares resistentes que aquellas poblaciones que presenten un potencial evolutivo menor (McDonald y Linde, 2002). Este mayor o

menor potencial evolutivo va a ser el reflejo de la estructura genética de las poblaciones del patógeno.

b. Estructura genética de poblaciones.

Se entiende por estructura genética de una especie a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de dicha especie. La estructura genética de una población concreta viene determinada por la historia evolutiva de esa población y va a ser consecuencia de las interacciones entre los cinco factores que condicionan la evolución de las poblaciones: mutación, deriva genética, flujo génico, sistema de reproducción y selección (Burdon y Silk, 1997; McDonald y Linde, 2002). La estructura genética de las poblaciones de un patógeno puede variar rápidamente en el tiempo y en el espacio mientras dichas poblaciones evolucionan o se adaptan en respuesta a cambios locales, pero la estructura genética global de una especie es poco probable que cambie en una escala de tiempo humana, salvo raras excepciones.

1) Mutación.

La mutación consiste en cualquier cambio detectable y heredable del material genético del hongo que no está causado por segregación genética, ni recombinación genética, que se transmite a las células hijas e incluso a las generaciones siguientes, dando lugar a células o individuos mutantes (Rieger et al., 1976). La mutación es la fuente fundamental de variación genética ya que conduce a cambios directos en la secuencia de ADN y a la creación de nuevos alelos en las poblaciones. Las poblaciones con más alelos tienen mayor diversidad génica, y por tanto, mayores posibilidades de crear nuevas cepas capaces de superar a genes de resistencia mediante mutaciones en los genes de no virulencia complementarios o de desarrollar resistencia a fungicidas mediante mutaciones en los genes que codifican las dianas o blancos de los mismos.

Las tasas de mutación son normalmente bajas, aunque éstas pueden diferir entre los diferentes loci y patógenos. A partir de este modelo, los patógenos con tasas de mutación más altas son los que presentan un mayor riesgo. No obstante, es difícil

imaginar un programa de control que pueda reducir las tasas de mutación de un patógeno (McDonald y Linde, 2002).

2) Flujo génico.

Es el proceso mediante el cual determinados alelos (genes) o individuos (genotipos) son intercambiados entre poblaciones separadas geográficamente. Según este planteamiento, el flujo génico puede incrementar sustancialmente el tamaño de una población mediante el incremento de tamaño del ‘vecindario genético’ a través del cual se intercambian genes y genotipos y facilitan el movimiento de alelos mutantes entre poblaciones individuales del patógeno. Por tanto, patógenos que presenten un alto grado de flujo génico presentarán una diversidad genética mayor porque presentan un tamaño de población efectivo mayor. Con este planteamiento, los patógenos con mayor riesgo suelen ser aquéllos que producen propágulos con capacidad de dispersión a larga distancia tales como royas y oídios que con frecuencia presentan vecindarios genéticos que comprenden continentes enteros, como por ejemplo la *Puccinia* o roya del trigo en Norteamérica (Burdon y Silk, 1997).

3) Deriva genética.

El tamaño de la población puede afectar a la frecuencia en la que un mutante esté presente e influir en la diversidad génica de una población a través de un proceso denominado deriva genética. Como las tasas de mutación son relativamente constantes y casi siempre bastante bajas, las poblaciones grandes tienen normalmente una mayor diversidad génica (más alelos, más mutantes) que las poblaciones pequeñas. La deriva genética ocurre cuando una población se ve sometida a un **cuello de botella** (acontecimiento catastrófico que causa una severa reducción en el tamaño poblacional) o a un **efecto fundador** (cuando una población pequeña del patógeno coloniza a una nueva población de hospedante), circunstancias en las que la frecuencia de los alelos mutantes en las poblaciones sobrevivientes o fundadoras

puede diferir significativamente de la frecuencia de la población original (McDonald y Linde, 2002).

Un cuello de botella severo puede ocurrir en la naturaleza cuando un pequeño grupo de emigrantes de una subpoblación establecida puede fundar una nueva subpoblación; la deriva genética al azar que acompaña este proceso se conoce como efecto del fundador (Hartl y Clark, 1997). Según esta idea, los patógenos que se presenten en poblaciones mayores tendrán un mayor potencial evolutivo y los que sufran de manera regular severas reducciones en sus tamaños poblacionales serán los que presenten una menor diversidad y por tanto una capacidad de adaptación más lenta (McDonald y Linde, 2002).

4) Sistema de reproducción.

Va a afectar a la manera en que la diversidad genética es distribuida dentro y entre poblaciones. La reproducción puede ser sexual, asexual o mixta, como ocurre con muchos hongos que presentan tanto reproducción sexual como asexual. Muchos de los patógenos más destructivos y peligrosos experimentan una combinación de ciclos sexuales y asexuales que permiten generar altos niveles de diversidad génica y genotípica. Durante el ciclo sexual se generan muchas nuevas combinaciones de alelos que pueden ser probados en diferentes ambientes, como puede ser la presencia de nuevos genes de resistencia o fungicidas (McDonald y Linde, 2002).

Durante la fase asexual los genotipos más aptos se mantienen a través de una reproducción clonal e incluso pueden aumentar su frecuencia. Ahora bien, la distribución espacial y temporal de clones o líneas clonales dentro o entre poblaciones dependerá principalmente de las capacidades de dispersión y supervivencia de los propágulos asexuales. Si el propágulo asexual es capaz de dispersarse a larga distancia, entonces el clon con mayor capacidad de sobrevivencia podrá ser distribuido ampliamente a través de un flujo genético relativamente rápido, provocando una epidemia. Según este modelo, los patógenos que experimentan

procesos de recombinación regulares serían los que presentan un mayor riesgo para los cultivos (Burdon y Silk, 1997; McDonald y Linde, 2002).

5) Selección.

Es la reproducción diferencial y no al azar de los diferentes genotipos, que representa el más importante de los factores que inducen los cambios evolutivos, por afectar las frecuencias génicas y genotípicas en las poblaciones. En ausencia de selección y mutación estas frecuencias permanecen constantes de generación en generación, en poblaciones grandes de reproducción al azar (principio de Hardy y Weinberg) (Rieger et al., 1976). Es la principal fuerza que conduce los cambios de frecuencias de alelos mutantes. Por ejemplo, se produce una fuerte selección direccional o presión de selección con el empleo intensivo de un nuevo gen de resistencia o un nuevo fungicida, lo que conduce a un incremento de la frecuencia de mutantes virulentos (que hayan perdido el elícitor complementario al gen de resistencia) o resistentes al fungicida.

Se conocen muchos ejemplos de ruptura de genes de resistencia y de fenómenos de resistencia a fungicidas que demuestran que la selección es un mecanismo evolutivo eficaz en la mayoría de los agroecosistemas modernos que están basados en la uniformidad genética de los monocultivos y en el uso intensivo de los productos fitosanitarios. Por lo tanto, los patógenos de mayor riesgo serían los sometidos a una mayor presión selectiva de los programas de control (McDonald y Linde, 2002).

2. Potencial evolutivo de *Rhizoctonia solani*.

Por lo expuesto anteriormente, queda claro que los patógenos de mayor riesgo para la agricultura son los que presentan un mayor potencial evolutivo. Una vez evaluado el potencial evolutivo de un patógeno determinado, deberían desarrollarse programas de control de la enfermedad que estén encaminados a disminuir la diversidad genética del patógeno en cuestión, mediante el mantenimiento de niveles reducidos de las poblaciones del patógeno, limitando el movimiento de genes y genotipos entre poblaciones, limitando la ocurrencia de reproducción sexual o la persistencia y

distribución de propágulos asexuales, utilizando cultivares portadores de varios genes de resistencia o mediante la alternancia de cultivares portadores de diferentes genes de resistencia, y sobre todo diversificando el uso de fungicidas (McDonald y Linde, 2002).

McDonald y Linde (2002) proponen la predicción del potencial evolutivo de los agentes fitopatógenos basada en el análisis de su estructura genética, como información esencial a tener en cuenta para el diseño de los programas de control de las enfermedades de plantas y presentan una tabla de valoraciones de riesgo para diferentes agentes fitopatógenos en función de sus respectivos potenciales evolutivos. De esta manera, lo que denominan ‘epidemiología molecular’ nos aporta información muy relevante para el control de una enfermedad desde la óptica de la genética de poblaciones del patógeno.

El potencial evolutivo de *R. solani* ha sido ubicado en categoría de riesgo intermedia (McDonald y Linde, 2002). *R. solani* posee un sistema mixto de reproducción y un bajo potencial para el flujo de genes/genotipo. Para este patógeno, los mejoradores deben centrarse en resistencia cuantitativa en vez de la resistencia del gen mayor.

Como resultado del sistema mixto de reproducción, la mutación para la virulencia se puede recombinar en muchas diversas bases genéticas, y es probable que una o más de las variantes resultantes del patógeno tendrán un alto nivel de adaptación en el cultivar resistente correspondiente. Es probable que un gen mayor de resistencia sea quebrado o superado rápidamente bajo estas circunstancias. En presencia de resistencia cuantitativa, el patógeno puede evolucionar aumentando la patogenicidad (la contraparte de la resistencia cuantitativa de la planta). Para desarrollar un alto nivel de patogenicidad, el patógeno debe recombinar un número de alelos de los loci independientes en un solo genotipo (un complejo coadaptado del gen). La reproducción sexual tenderá a romper estos complejos coadaptados del gen en los genotipos del patógeno que tienen un alto nivel de patogenicidad, así el aumento en patogenicidad en el patógeno de reproducción sexual puede ocurrir bastante lento o si

hay pocos ciclos asexuales de reproducción del patógeno por generaciones en la cosecha.

Si la resistencia cuantitativa no está disponible, la resistencia del gen mayor se puede desplegar después en rotaciones a través del tiempo o del espacio. Se espera que las rotaciones sobre una base regional sean eficaces contra un patógeno de flujo de genes bajos porque los mutantes virulentos que se presentan para superar un gen mayor de resistencia en una región probablemente no sean capaces de emigrar a otras regiones. Las rotaciones de los genes mayores de resistencia, con el tiempo producirán la selección que puede evitar que diversas mutaciones de la virulencia se acumulen en el mismo genotipo.

3. Herramientas y técnicas útiles para caracterizar poblaciones de *Rhizoctonia solani*.

a. Marcadores genéticos.

La elección del marcador genético puede tener un impacto substancial en el análisis y la interpretación de datos. Para conocer los efectos del tamaño de la población, los sistemas de apareamiento y el flujo de genes, se han preferido los marcadores genéticos selectivamente neutros. Los efectos de selección se han determinado mediante marcadores de selección. En general, para la genética de poblaciones se recomienda el uso de marcadores selectivamente neutros, altamente informativos, reproducibles, relativamente fáciles de probar y baratos. Los RFLP y los RAPD se han utilizado extensivamente en eucariotas (McDonald, 1997) y más recientemente los AFLP (Cubeta y Vilgalys, 2000) y SSR (Zala et al., 2007), entre otros. Con el uso de 6 a 12 marcadores no ligados distribuidos a través de muchos cromosomas se puede obtener un estimado de la estructura genética de la población (McDonald, 1997).

A continuación se destacan los marcadores genéticos que comúnmente se han usado en el estudio de poblaciones de *R. solani* haciendo énfasis en los utilizados en la caracterización de aislados derivados de arroz y maíz.

1) Marcadores RAPD.

Los marcadores RAPD (del inglés Randomly Amplified Polymorphic DNA) han llegado a ser populares porque la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es relativamente fácil de ejecutar. Son de gran importancia para los fitopatólogos, los RAPD se pueden probar usando muy pequeñas cantidades de biomasa del hongo, constituyéndose en una herramienta ideal para biotrofos obligados como la roya y los oidios. Una gran cantidad de amplicones se pueden probar relativamente en un corto período de tiempo; de esta forma, los RAPD son especialmente útiles en la diferenciación de linajes clonales de hongos que se reproducen asexualmente.

Los datos de RAPD son fáciles de interpretar porque se basan en la amplificación o la no amplificación de las secuencias específicas de ADN (amplicones), produciendo un conjunto de datos binarios que son fáciles de ingresar en una hoja de cálculo para el análisis. Desafortunadamente, los RAPD tienen muchas desventajas que se deben pesar contra su relativa facilidad de empleo. Hay varias limitaciones técnicas asociadas a los RAPD que las hacen de difícil reproducción entre los laboratorios y a veces dentro de laboratorios (McDonald, 1997).

En un estudio realizado sobre *R. solani* en dos campos de arroz en la India, se caracterizaron 46 aislados por análisis de RAPD para determinar la variabilidad intercampo y comparar la eficacia entre cinco métodos para detectar diferencias entre esos aislados. Se probaron 22 iniciadores (del inglés primers) de los cuales se seleccionaron ocho. Los iniciadores polimórficos específicos para los aislados se recomendaron para el análisis de RAPD en el estudio de poblaciones en el complejo añublo de la vaina del arroz y en la dinámica y sobrevivencia de *R. solani* en suelo (Singh y Singh, 2003).

En otra investigación, mediante RAPD se caracterizaron 52 aislados pertenecientes a *R. solani* causante de la mancha bandeada y tizón de la vaina en maíz que mostraron una variación considerable en virulencia; en dicho estudio, fueron incluidos aislados

de otros cultivos como café, sorgo, arroz, trigo, caña de azúcar, algodón, soya, frijol y algunas especies de malezas gramíneas. Se usaron tres iniciadores que dieron polimorfismos reproducibles por PCR, el agrupamiento UGMA-SAHN permitió resolver siete grupos de AG-1 IA a un nivel de 75%, asimismo, reunió a los AG-1 IA, IB y IC en un grupo principal (Pascual y Hyakumachi, 2000).

2) Marcadores RFLP.

Los RFLP (del inglés Restricción Fragment Length Polymorphism) se ha utilizado en genomas nucleares y mitocondriales (mt) en muchos estudios de hongos patógenicos de plantas. Los RFLP se basan en la hibridación ADN-ADN, son técnicamente más difíciles que los RAPD, pero ofrecen la ventaja de ser más reproducibles. Como los RAPD, los RFLP son fáciles de interpretar, son codominantes y exhiben un número potencialmente ilimitado de alelos por locus. Una desventaja de los RFLP es que requieren relativamente grandes cantidades (5 a 10 μg) de ADN de cada individuo, esto requiere el crecimiento del hongo en cultivos puros antes de la extracción del ADN.

La mayor preocupación para muchos fitopatólogos, al utilizar el análisis del RFLP, es la experticia técnica, incluyendo la clonación, adhesión y el marcaje de sondas. Una vez que han sido dominadas las técnicas obligatorias, los análisis pueden hacerse muy rápidamente. Las sondas de prueba para RFLP se pueden elegir por el alto nivel de especificidad con el hongo diana, pueden permitirse sin afectar los resultados, una cierta contaminación por ADN de plantas, de hongos o de bacterias. Las características de codominancia y de los alelos múltiples hacen de los marcadores RFLP más ventajosos comparado a los RAPD para la mayoría de los estudios en genética de población. Una ventaja adicional, es que otros laboratorios pueden reproducir resultados usando la misma batería de sondas y de enzimas de la restricción, permitiendo que el trabajo sea compartido y comparado entre varios laboratorios (McDonald, 1997).

En Japón, aislados de cinco especies de *Rhizoctonia* causantes de la enfermedad del añublo de la vaina del arroz fueron caracterizadas por análisis de RFLP del 28S ADNr amplificado por PCR. Los perfiles obtenidos después de la digestión del 28S ADNr con enzimas de restricción fueron diferentes dependiendo de las cuatro enzimas usadas HpaII, HhaI, SauAI y HaeIII. La enzima HpaII fue seleccionada por poseer mayor utilidad al discriminar especies de *Rhizoctonia* (Matsumoto et al., 1996).

Siete copias individuales (loci) RFLP nuclear fueron usados para examinar 182 aislados de *R. solani* AG-1 IA colectados en seis campos comerciales de arroz en Texas (USA). Treinta y seis genotipos multilocus RFLP fueron identificados y fueron de utilidad para los análisis poblacionales subsiguientes (Rosewich et al., 1999). Los siete loci RFLP anteriores fueron usados para caracterizar la población de *R. solani* AG-1 IA derivada de arroz de la India, con resultados similares a los encontrados en Texas (Linde et al., 2005).

3) Marcadores AFLP.

Los AFLP (del inglés Amplified Fragment Length Polymorphisms) potencialmente ofrecen una herramienta de gran alcance para detectar secuencias polimórficas del ADN en hongos. Los AFLP comparten muchas características con los RAPD, son dominantes y tienen generalmente solamente dos alelos por locus. Los AFLP tienen una ventaja sobre los RAPD porque más loci se prueban en cada reacción y el uso de iniciadores con más nucleótidos hace más probable que un AFLP sea reproducible. Es probable que los AFLP sean más útiles para determinar la huella dactilar genética, porque una gran cantidad de loci se pueden probar en una reacción. Entre las desventajas de los AFLP está el requerimiento de más experticia técnica en comparación con los RAPD, asimismo, sufren las mismas limitaciones analíticas que los RAPD (McDonald, 1997).

En arroz, esta metodología fue usada para determinar la relación genética en la población del patógeno *R. solani* colectado durante 2000-2003 en diferentes regiones

geográficas en la India. El análisis de conglomerados (del inglés cluster) basado en la data de AFLP separó a los aislados en tres grupos intraespecíficos diferentes de AG-1, asimismo permitió diferenciar a *R. solani* de la especie *R. oryzae-sativae* (Taheri et al., 2007).

En un trabajo cuyo objetivo fue estandarizar la técnica AFLP para la caracterización genética de diferentes géneros de hongos se probaron dos aislados de *R. solani* AG-1 IA derivado del maíz. La digestión de los ADN se realizó con las enzimas EcoRI y MseI usando ocho combinaciones de nucleótidos para la amplificación selectiva. Los patrones moleculares fueron evaluados en cuanto a la claridad de las bandas y el número de bandas polimórficas. Un total de 726 bandas fueron amplificadas con las ocho combinaciones de las cuales 337 (46,41 %) fueron polimórficas con un promedio de 42,12 bandas polimórficas por combinación. Las ocho combinaciones permitieron la diferenciación entre los aislados de *Rhizoctonia* derivados de maíz (Sanz et al., 2007).

4) Marcadores Microsatélites.

Los Microsatélites o SSR (del inglés Simple Sequence Repeats) son ubicuos en los genomas eucarióticos y procarióticos. En hongos, la abundancia de microsatélites se considera relativamente bajo. Sin embargo, debido a su típicamente alta cantidad de polimorfismos dentro de la especie y de poblaciones, el uso de los loci del microsatélite como marcadores genéticos ha llegado a ser cada vez más importante. Además, estos marcadores genéticos codominantes son relativamente fáciles de contabilizar, tienen alta reproducibilidad y especificidad (Zala et al., 2007).

En un trabajo reciente, se usaron 10 microsatélites para comparar poblaciones de *R. solani* AG-1 IA derivadas del arroz y de la soya en campos adyacentes en el estado de Louisiana y de campos cultivados de arroz en Texas. Ninguno de los 154 genotipos (multilocus SSR) encontrados fueron compartidos entre los 223 aislados de las tres poblaciones estudiadas. Asimismo, se encontró que las poblaciones derivadas

de la soya fueron más clónales que la derivadas del arroz (Bernardes de Assis et al, 2008).

C. Métodos de muestreo.

La mayor parte de los análisis conducidos por los genetistas de poblaciones están basados en las frecuencias de los alelos en los loci genéticos discretos. Debido a esto, es vital que los tamaños de muestra sean adecuados para hacer estimaciones confiables. Las estimaciones de las frecuencias de alelos con base a tamaños de muestra de 3 a 10 individuos por población, no tienen sentido, mientras que las estimaciones basadas en tamaños de muestra de 30 a 100 individuos pueden ser muy confiables. En general, la estrategia de muestreo y el tamaño de muestra se ajustan según la pregunta que es tratada en el experimento. Los tamaños de muestra deben ser grandes para permitir que las pruebas sean significativas estadísticamente. Las preguntas referentes a distancia genética entre las poblaciones se pueden tratar adecuadamente con un tamaño de muestra tan pequeño como 30 a 40 individuos por población (McDonald, 1997).

Aunque las herramientas genéticas descritas previamente y las herramientas analíticas resumidas más adelante, probablemente sean muy similares para cualquier patógeno, la metodología de muestreo puede variar entre hongos que principalmente existen en el suelo. A menos que un hongo del suelo produzca cuerpos fructíferos (por ejemplo: setas u hongos de sombrero), es imposible visualizar la distribución directa de los hongos en el suelo. Existe una excepción para los hongos que pueden ser visualizados por los hospedantes sintomáticos cuando se siembra una cosecha uniforme; como por ejemplo, *R. solani* causante del añublo de la vaina del arroz (McDonald, 1997).

En última instancia, la metodología de muestreo pondrá límites en la interpretación de datos. Si las colecciones se hacen solamente de las plantas enfermas, entonces la interpretación biológica puede ser extensiva solamente a esa fracción de la población fungosa que causa esa enfermedad sobre el cultivar del cual fue hecha la colección.

D. Métodos de análisis de datos.

En estudio de poblaciones es fundamental, en primer lugar, cuantificar la diversidad genética. Para los organismos como los hongos que experimentan la reproducción asexual y sexual, es necesario distinguir entre la diversidad de un loci individual, denominado '**diversidad génica**' y la diversidad basada en el número de individuos genéticamente distintos en una población, denominado '**diversidad del genotipo**'. En conjunto, la diversidad génica y del genotipo constituye la **diversidad genética**. Las medidas de diversidad génica y del genotipo están entre los parámetros más fáciles y más informativos de cuantificar. Las medidas de diversidad génica se basan en el número y ausencia de movimiento de gametos o de individuos entre las poblaciones, lo esperado es que la deriva genética conducirá a los cambios al azar en las frecuencias del alelo para los loci neutros en diferentes poblaciones. Si hay movimiento limitado de genes entre poblaciones, esperamos encontrar una correlación entre la distancia genética y la geográfica entre poblaciones (McDonald., 1997).

El flujo de genes se puede medir directa o indirectamente, las medidas indirectas se basan en la comparación de las frecuencias del alelo en diferentes poblaciones y la estimación del grado de la subdivisión de la población. Ambos métodos se pueden utilizar para definir los límites geográficos de poblaciones, según lo determinado por la ausencia de flujo de genes entre poblaciones. Si no se comparte ninguno de los genotipos entre las poblaciones y la estadística de flujo de genes es $N < 1$, éste sugiere que las poblaciones no intercambian genes o genotipos y que las medidas de la cuarentena han sido eficaces (McDonald, 1997).

1. Frecuencia de genes y Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE).

La frecuencia de un alelo particular en una población es llamada '**frecuencia del alelo o genes**'. Este es un parámetro fundamental en el estudio de evolución, hasta el cambio genético de la población es usualmente descrito por el cambio de la frecuencia de genes.

Considerando un locus con dos alelos A_1 y A_2 en un organismo diploide, existen tres posibles genotipos para este locus: A_1A_1 , A_1A_2 , y A_2A_2 . Si N_{11} , N_{12} , y N_{22} sea el número y A_1A_1 , A_1A_2 , y A_2A_2 los genotipos de una población, respectivamente, entonces $N_{11} + N_{12} + N_{22} = N$. las frecuencias de A_1A_1 , A_1A_2 , y A_2A_2 serán las dadas por la expresión: $X_{11} = N_{11}/N$, $X_{12} = N_{12}/N$, y $X_{22} = N_{22}/N$, respectivamente. En otras palabras, la frecuencia de alelo de A_1 estará dada por $x_1 = (2N_{11} + N_{12})/(2N)$ entonces $x_1 = X_{11} + X_{12}/2$. Obviamente, la frecuencia de A_2 será $x_2 = 1 - x_1$ (Nei, 1987).

En teoría, la ‘**frecuencia de genotipos**’ X_{11} , X_{12} y X_{22} puede tomar cualquier valor no negativo entre 0 y 1 con la restricción de $X_{11} + X_{12} + X_{22} = 1$. Sin embargo, en muchos organismos, el apareamiento ocurre al azar, y los genotipos se producen por la unión al azar de los gametos masculinos y femeninos. En este caso, la frecuencia de genotipos estará dado por la expansión de $(x_1 + x_2)^2$. Que es: $X_{11} = x_1^2$; $X_{12} = 2x_1x_2$; $X_{22} = x_2^2$.

Esta propiedad fue notada primeramente por Hardy (1908) y Weinberg (1908) independientemente, citado por Nei (1987, se le conoce como el principio de Hardy-Weinberg. La relación entre las frecuencia del alelo y genotipo cuando existen más de dos alelos por locus es esencialmente el mismo que para el caso de dos alelos.

a. Alelos codominantes.

Cuando todos los genotipos son identificables, la frecuencia de genes puede ser estimada contando el número de genes en la muestra. Supóngase que hay m alelos por locus y n individuos son muestreados de la población. Sea n_{ij} el número del genotipo A_iA_j , el número total de individuos será n , lo que equivale a $\sum n_{ij} = n$. La frecuencia del alelo A_i será estimada por: $x_i = (2n_{ij} + \sum_{j \neq i} n_{ij})/(2n)$. Puede demostrarse que ésta es la máxima probabilidad estimada de x_i . Si se supone que el muestreo es multinomial, la varianza $\{V(x_i)\}$ de x_i y las covarianzas $\{Cov(x_i, x_j)\}$ de x_i y x_j estarán dadas por: $V(x_i) = x_i(1 - x_i)/(2n)$; $Cov(x_i, x_j) = -x_i x_j/(2n)$ (Nei, 1987).

b. Alelos dominantes.

Si A y a son los alelos dominantes y recesivos por locus, respectivamente. En una población de apareamiento al azar, la frecuencia de alelos recesivos estará dado por x_2^2 , donde x_2 es la frecuencia del alelo a . No obstante, si n_R es el número de homocigotos recesivos en la muestra de n individuos, x_2 puede ser estimado por: $x_2 = \sqrt{n_R/n}$. La estimación de la frecuencia (x_1) de A es, por supuesto, dado por $x_1 = 1-x_2$. La varianza del muestreo de x_2 es: $V(x_2) = (1-x_2^2)/(4n)$. Cuando existen alelos múltiples, la relación de dominancia puede variar de caso a caso. El procedimiento ideal de estimación de la frecuencia para estos casos es el método de máxima probabilidad, la cual se conoce por ser estadísticamente más eficiente para al menos muestras grandes (Nei, 1987).

2. Desviaciones de las proporciones de Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE).

Se conoce el HWE completo para muchos organismos con loci polimórficos. Sin embargo, este puede ser disturbado por un número de factores tales como la endocría, apareamiento mixto y la selección natural.

a. Para un par de alelos.

Cuando hay dos alelos por locus, cualquier desviación de las proporciones de HWE puede ser medido por un solo parámetro (F) llamado índice de Estabilidad. Si se usa este índice, la frecuencia de genotipos estará dado por: $X_{11} = (1-F) x_1^2 + Fx_1$; $X_{12} = 2(1-F) Fx_1x_2$; $X_{22} = (1-F) x_2^2 + Fx_2$ (Nei, 1987).

El índice de estabilidad puede ser negativo o positivo, dependiendo del caso. Algunos factores de importancia que causan los valores de F diferentes de cero, son los siguientes: 1) Endocría: incrementa la frecuencia de homocigotos. 2) Apareamiento mixto: ocurre selectivamente entre individuos que tienen caracteres fenotípicos similares. 3) Subdivisión de la población: a veces es difícil conocer la estructura poblacional, y la población bajo estudio puede incluir varias unidades de apareamiento o subpoblación. 4) Selección: puede incrementar o disminuir el valor

de F , dependiendo del tipo de selección. Si el heterocigoto tiene una baja adaptabilidad como los homocigotos, entonces F se convierte en positivo. Caso contrario, si el heterocigoto tiene una alta adaptabilidad para ambos homocigotos, F se convierte en negativo (Nei, 1987).

b. Alelos múltiples.

Cuando existen m alelos por locus, generalmente se necesita el índice de estabilidad $m(m-1)/2$ para especificar toda la frecuencia de genotipos en términos de frecuencia de genes e índices de estabilidad. Sin embargo, si la desviación de HWE ocurre solamente por endocria o diferenciación al azar en la frecuencia de genes entre subpoblaciones, la desviación puede ser descrita por un solo índice de estabilidad. En este caso, la frecuencia (X_{ii}) del homocigoto A_iA_i ($i = 1, 2, \dots, m$) estará dada por: $X_{ii} = (1-F)x_i^2 + Fx_{ii}$. Mientras que la frecuencia (X_{ij}) del heterocigoto A_iA_j será $X_{ij} = 2(1-F)x_ix_j$ (Nei, 1987).

c. Índices de Estabilidad.

Como se mencionó anteriormente, las diferencias en la frecuencia de genes entre poblaciones subdivididas causa una deficiencia de heterocigosis comparada con el caso de una población apareada al azar. Wright (1943, 1951, 1965, 1969) citado por Nei (1987), propuso tres parámetros F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} para medir la desviación de la frecuencia de genotipos de en una población subdividida, los cuales a menudo se les llama **Índices de Estabilidad o F estadísticos**. F_{IS} y F_{IT} son las correlaciones entre la unificación de dos gametos relativos a la subpoblación y relativo al total de la población, respectivamente, mientras que F_{ST} es la correlación entre dos gametos unidos al azar de cada subpoblación y medidos por el grado de diferenciación de subpoblaciones. Ellos se encuentran relacionados por la siguiente fórmula: $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$ (Nei, 1987).

d. Asociación de genes no al azar.

Desequilibrio de ligamiento: cuando dos o más loci son considerados juntos, la frecuencia de genotipos en una población apareada al azar no necesariamente resulta del producto de la frecuencia de genes. Esto es porque los alelos de diferentes loci no siempre se encuentran combinados al azar en los cromosomas. Considerando dos loci con dos alelos A_1, A_2 y B_1, B_2 . Existen cuatro diferentes tipos de cromosomas posibles para este loci, por ejemplo: $A_1 B_1, A_1 B_2, A_2 B_1$ y $A_2 B_2$. Si X_1, X_2, X_3 y X_4 sean las frecuencias de estos cromosomas, respectivamente. La frecuencia de genes estará dado por $x_1 = X_1+X_2$; $x_2 = X_3+ X_4$; $y_1 = X_1+X_2$, $y_2 = X_3+ X_4$, respectivamente. La frecuencia de cromosomas no necesariamente da por producto la frecuencia de genes involucrados. Nominalmente: $X_1 = x_1y_1+D$; $X_2 = x_1 y_2-D$; $X_3 = x_2y_1 -D$; $X_4 = x_2 y_2+D$.

Donde $D = X_1X_4-X_2X_3$

Esta D es llamada desequilibrio de ligamiento. Cuando $D = 0$ en una población, se dice que esta población está en desequilibrio de ligamiento. Solo en estos casos la frecuencia de cromosomas puede ser expresado como el producto de la frecuencia de genes (Nei, 1987).

3. Variación genética dentro de especies.

a. Medidas de la variación genética.

Uno de los principales objetivos de la genética de poblaciones es describir la cantidad de variación genética en poblaciones y estudiar el mecanismo del mantenimiento de esa variación. La variación puede ser medida en varios niveles, pero en este capítulo se abordará particularmente la variación identificada por electroforesis. El genoma de un organismo superior contiene de 4.000 a 50.000 loci estructurales. No obstante, para determinar la cantidad exacta de variación genética se deben estudiar todos estos loci. En la práctica, esto es virtualmente imposible, solo una pequeña cantidad de loci son muestreados para estimar la cantidad total de variabilidad genética. Como el polimorfismo genético varía de locus a locus, se usa el muestreo al azar de loci. En

estudios electroforéticos, la selección de un locus generalmente depende del aprovechamiento o una técnica apropiada de tinción para el ADN amplificado (Nei, 1987).

b. Proporción de loci polimórficos.

Cuando un gran número de loci es examinado para el estudio de variación génica de una población, la cantidad de variación es a menudo medida por la proporción de loci polimórficos y el promedio de heterocigosis por locus. Usualmente, un locus es llamado **polimórfico** cuando la frecuencia de los alelos más comunes (x_c) es igual o menor que 0,99. Esta definición obviamente es arbitraria y no existe razón del por qué entre un locus polimórfico y un monomórfico no se haga con otro valor diferente, por ejemplo 0,95. Adicionalmente, cuando el tamaño de la muestra (n) es más pequeña que 50, el criterio de $x_c = 0,99$ no es razonable, porque en este caso un alelo en la cual la frecuencia de población es menor que $1/(2n)$ no puede ser representado en la muestra, aún si este alelo tiene una frecuencia de 0,01 o más (Nei, 1987).

c. Diversidad génica (heterocigosis).

La medida más apropiada de la variación génica es el **promedio de heterocigosis** o **diversidad génica**. Esta medida no depende de la definición arbitraria de polimorfismo. Considerando una población de apareamiento al azar, y dejamos que x_i sea la *frecuencia poblacional* de la *i*ésimo alelo por locus, la *heterocigosis* de este locus entonces será definida como:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

Dónde m es el número de alelos. El promedio de heterocigosis (H) es el promedio de toda esta cantidad sobre todo el loci. En una población apareada al azar, la varianza $V_s(h)$ puede ser determinada relativamente fácil. Se considera $V_s(h)$ para un locus particular denotado por $V_{s1}(h)$. Esta sería la varianza de h entre muestras para un conjunto determinado de frecuencia de genes de la población por locus. De la fórmula anterior se deriva:

$$V_{s1}(h) = \frac{(2n-1)}{2n-1} V(\sum x_i^2)$$

Para cualquier valor, los estimados de $V_{s1}(h)$ para r loci $V_s(h)$ puede ser estimado por:

$$V_s(h) = \sum_{J=1}^r V_{sj}(h)/r$$

Donde $V_{sj}(h)$ es el valor de $V_{s1}(h)$ para el j ésimo locus. La relación entre H y $V(h)$ se han usado para probar la hipótesis de mutación neutral (Nei, 1987).

d. Distancia genética entre poblaciones.

La distancia genética es el límite de las diferencias de genes (diferencia genómica) entre poblaciones o especies que son medidas por alguna cantidad numérica. A menudo, el número de nucleótido sustitución por nucleótido sitio o el número de gen sustitución por locus es una medida de distancia genética. Sin embargo, históricamente, es usual referirse a la diferencias de genes como una medida, por una función de frecuencia de genes. Nei (1987) señala que Cavalli-Sforza and Edwards (1967) intentaron relacionar sus medidas de distancia a los cambios evolutivos de la frecuencia de genes, también menciona que Latter (1972) propuso varias medidas que están estrechamente relacionadas al índice de estabilidad de Wright (1951). Nei (1971, 1972) citado por Nei (1987), propone una medida de distancia genética con la cual uno puede estimar el número de gen o codón sustitución por locus entre dos poblaciones.

4. Filogenética molecular.

El uso de técnicas de biología molecular, particularmente aquellas para determinar las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, han añadido una nueva dimensión a la inferencia de filogenética. Por ejemplo, el análisis de la secuencia 5S del ARN en una amplia variedad de microorganismos ha conducido a la reclasificación de los niveles filogenéticos más complejos, resultando en un nuevo reino, el Archeae (Woese, 1981) citado por Hartl y Clark (1997). Además, la aplicación de los análisis comparativos de la biología molecular para inferir robustas y seguras relaciones filogenéticas ha incrementado el interés de la aplicación de estos árboles filogenéticos

para probar las hipótesis sobre los mecanismos evolutivos. El problema para inferir la correcta topología de las ramas de los árboles que relaciona a un grupo de organismo en parte es un reto por el enorme número de posibilidades de bifurcación de los árboles. Si hay n especies para ser colocados, existen $(2n-3)!/2^{n-2}(n-2)!$ ramificaciones de árboles que describen la posible historia ancestral (Hartl y Clark, 1997).

a. Métodos de distancia versus Parsimonia.

No existe una teoría universal que provea una sola manera óptima para la construcción de árboles filogenéticos, y la matriz básica conocida no es requerida para todos los métodos. Otro método conocido como **Máxima Parsimonia**, usa pequeños números de eventos mutacionales necesarios para contabilizar la evolución de un grupo de secuencias de un ancestro común para construir los árboles. Existe un número de árboles para el método de Parsimonia con pequeños números de sustituciones, pero ninguna garantiza que el árbol de Parsimonia sea el árbol correcto (Hartl y Clark, 1997).

b. *Bootstrapping* y confianza estadística en árboles filogenéticos.

Debido a que existen muchas posibilidades en topologías de árboles, es importante fijar cuanta confianza estadística se puede colocar en un árbol particular. Un método ampliamente usado para designar confianza estadística en el nodo de un árbol es la prueba de tirilla o **Bootstrap** (Felsenstein, 1985) citado por Hartl y Clark (1997). La idea básica es bastante simple: un subgrupo de datos originales se dibuja con reemplazo o sustitución y de este nuevo grupo de datos, luego se dibuja un árbol. La operación completa de reemplazo de datos, dibujo de árboles, y la colocación de nodos que hay en el árbol original se repite tal vez unas 1000 veces, y al final el resultado es mostrado gráficamente como un número próximo a cada nodo indicando el porcentaje de veces que el conglomerado está presente entre los árboles reemplazados. Si el porcentaje es alto, se gana la confianza que el conglomerado actualizado da junto a los de su clase (Hartl y Clark, 1997).

II. VIRULENCIA Y ESPECIFICIDAD DE AISLADOS DE *Rhizoctonia solani* AG-1 IA DERIVADOS DE ARROZ Y MAÍZ.

A. Conceptos generales de la enfermedad y del patógeno.

1. Enfermedad.

La palabra ‘patógeno’ significa literalmente ‘generador de enfermedad’. Sin embargo, es cuestionable si realmente algunos patógenos causan enfermedad. En sentido estricto, la palabra ‘enfermedad’ indica disturbio fisiológico en toda la planta que conlleva a ‘síntomas’ tales como: amarillamiento (= clorosis), marchitez, enanismo y deformación. Dichos síntomas son típicos de infecciones por virus, fitoplasma, bacterias y alguna clase de hongos. Las reacciones locales del tejido de la planta a un intruso, como manchas necróticas causadas por la reacción de resistencia, o lesiones necróticas causadas por una infección local no son llamadas síntomas (Niks y Lindhout, 1999). La severidad de los síntomas no es una indicación confiable de la cantidad de patógeno presente en la planta; por ejemplo, en la virología para indicar que una infección por virus causa síntomas relativamente ligeros se usa el término ‘resistencia’. En sus extremos, el hospedante no muestra ningún síntoma a pesar de la presencia y reproducción del virus en el tejido; de esta manera se denomina a la planta ‘asintomática portadora’ (Niks y Lindhout, 1999).

Se prefiere evitar el término enfermedad y en su lugar usar el término ‘infección’, si la planta está siendo explotada por patógenos o parásitos (por ejemplo, una planta severamente infectada por un hongo causante de la roya).

2. Clasificación de los patógenos.

Los patógenos están subdivididos de acuerdo a sus características en el proceso de infección en: a. biotrofos (virus, oidio, royas, carbonos), que dependen del tejido vivo de la planta. Muchos hongos biotrofos forman ‘haustorios’ en las células de la planta y toman nutrientes de ella, las células de las plantas hospedantes permanecen vivas a pesar de la presencia de los haustorios. La mayoría de los patógenos biotrofos no se pueden cultivar en medios artificiales.

b. necrotrofos (hongos del género *Septoria*, *Helminthosporium* y hongos que causan manchas foliares), extraen los nutrientes que necesitan de los tejidos muertos de la planta que ellos mismos matan, generalmente mediante la producción de toxinas. Son fácilmente cultivables en medio artificial.

c. hemibiotrofos (*Phytophthora infestans* y los causantes de los mildiús), son intermedios entre los biotrofos y necrotrofos, mueren tan pronto ocurre el proceso de infección del tejido en la planta. Algunos pueden crecer en medio de cultivo. 4) parásitos oportunistas (algunos hongos como *Botrytis* y *Pythium*), que infectan plantas débiles o partes de plantas (frutos, flores, plántulas). 5) marchitez vascular (hongos del género *Fusarium*, *Verticillium* y *Ceratocystis*), estos hongos causan el bloqueo del xilema; y por tanto, las plantas se marchitan (Niks y Lindhout, 1999).

3. Sintomatología causada por el hongo necrotrofo *Rhizoctonia solani*.

R. solani afecta las partes de la planta que se encuentra debajo del suelo como lo son semillas, hipocotilos y raíces; pero además, puede infectar la parte aérea como tallos, hojas y frutos. El síntoma más común de la enfermedad producida por *R. solani* se refiere como ‘damping off’ o ‘sanchocho’, caracterizada por la no germinación de la semilla severamente infectada, mientras que la plántula puede morir antes o poco después de la emergencia del suelo. Las plantas que no mueren por el hongo a menudo tienen canchales, los cuales son lesiones de color rojizo-marrón en el tallo y las raíces. Adicionalmente, el hongo puede infectar tejido de hojas produciendo tizones y pudrición de frutos localizados cerca o sobre la superficie del suelo. Este tipo de infección ocurre porque el micelio y/o esclerocios del hongo están cerca o son salpicados en el tejido de la planta (Sneh et al., 1996).

Aparte de muchas enfermedades ocasionadas por *Rhizoctonia* que son iniciadas por micelio y/o esclerocios, varias enfermedades importantes del frijol, remolacha azucarera, tabaco y soya son el resultado de la infección por basidiosporas. Además, estas basidiosporas sirven como una fuente de dispersión del hongo a largas distancias. Las basidiosporas germinan y producen hifas que infectan las hojas

durante el periodo de alta humedad relativa y en periodos húmedos extensivos. Bajo estas condiciones, las basidiosporas se pueden observar sobre la base del tallo cerca de la superficie del suelo en el envés de las hojas en la copa de la planta (Sneh et al., 1996).

4. Gama de hospedantes y distribución.

El hongo *R. solani* es un patógeno común del suelo para una gran diversidad de plantas hospedantes. La relación de grupos de anastomosis particulares y sus hospedantes son muchas (sobrepasan los 500 hospedantes) y están bien documentadas (Sneh et al., 1996). En esta tesis, solo se considera el grupo de anastomosis AG-1 IA que produce la enfermedad del tizón de la vaina (del inglés sheath blight, SB) y mancha de la vaina (del inglés sheath spot, SS) en arroz (Ou, 1985) y la rizoctoniosis (del inglés sclerotial disease, SD), mancha bandeada (del inglés banded leaf, BL) y el tizón de la hoja (del inglés Sheath blight, SL) en maíz (De Sharma et al., 2000).

5. Aislamiento de *R. solani* de plantas infectadas y de suelo.

La determinación cualitativa de *R. solani* en plantas infectadas se hace por aislamiento de tejido de plantas infectadas. El tejido infectado es cortado en piezas de 5 cm, se lava con agua de chorro para eliminar restos orgánicos adheridos, y se dejan secar sobre servilletas. Pequeños segmentos de tejido (0,5 cm de longitud) se cortan de la lesión y son transferidos a medio de aislamiento, generalmente se puede usar cualquier medio o medio selectivo (Ko y Hora, 1971). El medio alcalino agar-agua (pH 8,5) suplementado con antibióticos provee una manera rápida de aislamiento que otro medio general, resultando exitoso en el aislamiento de *R. solani* después de las 24 h de la siembra (Gutierrez et al., 1997).

La determinación cuantitativa de *R. solani* en suelos para estimar la densidad de inoculo, está basado en la habilidad saprofítica y/o competitiva del hongo. Los métodos desarrollados bajo este principio incluyen el enterramiento y la subsiguiente recuperación de varios sustratos como cebos para *Rhizoctonia*. Los cebos incluyen

plantas hospedantes susceptibles, semillas autoclavadas, segmentos de tallos como lino, frijol, trigo sarraceno, algodón y paja de cereales. Otros métodos incluyen diferentes métodos de tamizado de suelos combinados con medios selectivos para el aislamiento de *R. solani* del suelo. También, se han desarrollado métodos para la estimación cuantitativa de la densidad de propágulos de *R. solani* basado en la colocación de una cantidad pesada de suelo o suelo peletizado sobre agar-agua suplementado con cloroanfenicol o medio selectivo (Castro et al., 1988; Hennis et al., 1978).

B. Generalidades sobre el mejoramiento para resistencia a *R. solani*.

1. Conceptos generales sobre resistencia.

a. Defensa natural contra patógenos y parásitos.

De acuerdo a Niks y Lindhout (1999) en la planta se pueden reconocer tres estrategias de defensa:

1) **Evasión**, reduce la probabilidad de contacto entre el hospedante o planta alimenticia y un enemigo natural potencial, generalmente como resultados de una morfología, fenología u olor particular de la planta hospedante. Los mecanismos de evasión actúan antes del establecimiento del contacto íntimo entre hospedante y parásito. Se ha demostrado que en cultivares con hojas erectas se depositan menos esporas que en plantas con hojas horizontales. La arquitectura de la planta también determina el microclima en ese cultivo, el cual es relevante para el éxito del proceso de infección de patógenos. Algunos hongos patogénicos necesitan encontrar los estomas para penetrar la hoja, los cuales utilizan la morfología de la hoja para dirigir su tubo germinativo hacia el estoma.

2) **Resistencia**, es la capacidad de la planta para reducir el crecimiento y/o desarrollo del parásito después de que se ha iniciado o establecido el contacto. La resistencia se mide comparando la cantidad de patógeno o parásito por planta o parte de una planta con la cantidad en una planta o parte de una planta 'susceptible' (=

menos resistente). La ‘**severidad**’ de cualquier síntoma no es relevante puesto que la severidad de los síntomas no está bien correlacionada con la cantidad de patógeno en o sobre la planta.

3) **Tolerancia**, el hospedante que muestra tolerancia restringe las consecuencias dañinas de la infección. No obstante, la tolerancia no restringe el contacto, ni el crecimiento y reproducción del parásito después de su establecimiento. Por lo tanto, la tolerancia no afecta la cantidad de infección. La tolerancia reduce la cantidad de daño o síntomas por unidad de parásito presente. La presencia de un parásito sobre una planta tolerante conduce a menos daño (expresado como menor reducción en rendimiento) o permite síntomas más ligeros que una planta ‘susceptible’. La susceptibilidad es lo opuesto a la tolerancia, es el daño relativamente alto o una expresión de síntoma relativamente alta por unidad de parásito. Tolerancia y susceptibilidad son caracteres cuantitativos relativos. Estos se miden mediante la determinación del daño por unidad de cantidad de parásito, mientras más baja es la proporción, la planta es más tolerante (= menos susceptible).

b. Interacción planta-patógeno.

Las plantas son organismos que, con la ayuda de la luz, transforman la materia inorgánica (bióxido de carbono, agua y minerales) en materia orgánica (carbohidratos, grasas y proteínas), por esta razón son una fuente atractiva de nutrientes para organismos que no son capaces de fotosintetizar. Si las plantas no evitaran ser consumidas por microorganismos y animales ellas desaparecerían rápidamente, de tal manera que todas han desarrollado mecanismos de defensa. Estos son de varias clases y difieren por especies de plantas.

La ‘**defensa general**’ consiste en la reparación de heridas de manera rápida, excluyendo a los microorganismos, o produciendo alcaloides contra las infecciones, esta estrategia general, probablemente apareció temprano en la evolución debido a la presión de selección originada por una amplia gama de plagas y patógenos potenciales. Una consecuencia de esto es que solo los organismos que son capaces de

anular la defensa general de una especie de plantas, pueden alimentarse sobre esa especie.

Cuando un organismo es capaz de explotar una especie de planta existe ‘**compatibilidad básica**’ entre la planta y el organismo parásito. El resultado es que cada especie de plantas puede sólo ser explotada como una fuente de nutrientes por un número limitado de especies enemigas naturales. Algunas de estas especies ejercerán una presión de selección substancial sobre la población de plantas. Las plantas con algunas resistencias efectivas a tales especies adaptadas tendrán una ventaja sobre las plantas que no la posean. La resistencia que aparece a esos patógenos y plagas especializadas habitualmente es específica de la especie. Esta ‘**resistencia específica**’ al patógeno está sobrepuesta a la compatibilidad básica (Niks y Lindhout, 1999).

c. Mecanismos de resistencia de acuerdo a Niks y Lindhout (1999).

En la caracterización de la resistencia es importante conocer los aspectos acerca de los mecanismos, genética y durabilidad y especificidad de la resistencia. Los tipos de resistencia más importantes en el mejoramiento de plantas son:

1) **Resistencia amplia**, resulta de un mecanismo identificable que es efectivo para varios tipos de enemigos naturales potenciales, los alcaloides tóxicos de la papa son ejemplo de ‘**resistencia pasiva**’; los compuestos tóxicos están presentes en la planta, sin importar la presencia o ausencia del patógeno. Para el caso de la ‘**resistencia activa**’, las reacciones de defensa son activadas tan pronto como el microorganismo trata de invadir el tejido de la planta; por ejemplo, la producción de **fitoalexinas**, las cuales son específicas del hospedante, pero no específicas del patógeno. Otro mecanismo de defensa activa es la producción de **proteínas relacionadas con la patogénesis (RP)**, la planta produce este tipo de proteínas en respuesta a la infección, daño, mordedura u otro tipo de estrés (metales pesados, senescencia), ocurriendo sistémicamente en toda la planta. Las que poseen este

mecanismo muestran un elevado nivel de resistencia a muchos enemigos naturales. Este efecto es llamado ‘**resistencia inducida**’ o ‘**resistencia sistémica adquirida**’.

2) **Resistencia del hospedante**, dentro de una especie de hospedantes no todos los genotipos son igualmente susceptibles a la misma especie de enemigos naturales. Cuando una colección de genotipos (líneas, familias, clones, cultivares) se expone a un enemigo natural a menudo se observa que algunas plantas son menos infectadas, otras un poco y otras severamente. Existen dos tipos de resistencia del hospedante.

2.1) **Resistencia de hipersensibilidad o completa**, es un mecanismo de resistencia que ocurre de forma universal, como reacción a infecciones de hongos biotrofos y hemibiotrofos, bacterias, virus e incluso insectos. La hipersensibilidad, es un mecanismo de resistencia activo; consiste en una necrosis de las células alrededor del sitio de penetración, mientras el crecimiento del patógeno es desviado, detenido o aniquilado. En la **especificidad de la raza**, los genotipos del patógeno a los cuales la resistencia no es efectiva se llaman ‘**virulentos**’ y los genotipos a los cuales la resistencia es efectiva se llaman ‘**avirulentos**’, este tipo de resistencia también fue llamado ‘**resistencia vertical**’ (Vanderplank, 1963; citado por Niks y Lindhout, 1999).

Los mejoradores exponen un gran número de entradas a una colección de aislados del patógeno. Un ‘**aislado**’ es una muestra del patógeno que es mantenida en forma pura en una planta o in vitro, o está almacenada a bajas temperaturas. Cuando varios genotipos del hospedante son ‘**inoculados**’ con varios aislados del patógeno, se puede encontrar un espectro diferente de virulencia para cada aislado. El ‘**espectro de virulencia**’ es la serie de genes para resistencia para los cuales un patógeno o parásito no posee o expresa los correspondientes alelos de avirulencia. Aislados con el mismo espectro de virulencia son llamados **raza** (fisiológica). Una ‘**raza compleja**’ es una raza con amplio espectro de virulencia.

En la **Relación de gen-gen**, la resistencia de hipersensibilidad se debe frecuentemente a un gen dominante. En el patógeno, la **avirulencia** o no virulencia es

dominante sobre la virulencia. La hipótesis del modelo gen-gen fue postulada por Flor (1956) citado por Niks y Lindhout (1999), con base a sus investigaciones sobre la genética del lino y la roya del lino, la cual explica: “para cada gen que condiciona resistencia en el hospedante, existe un gen específico que condiciona patogenicidad en el parásito”.

En la actualidad la hipótesis de Flor es definida con énfasis en la avirulencia: “un gen de resistencia es efectivo sólo si el patógeno que infecta posee el correspondiente gen de avirulencia” (Niks y Lindhout, 1999).

Con base a la combinación de genes en el hospedante y en el aislado del patógeno, la interacción resulta en **compatibilidad** (representado por +, una infección exitosa) o **incompatibilidad** (representado por -, debido a una reacción de resistencia de la planta). Si se enfatiza la reacción de la planta, se deben usar los términos resistencia y susceptibilidad, respectivamente. Desde el punto de vista del patógeno se deben utilizar los términos avirulencia y virulencia (Niks y Lindhout, 1999).

2.2) **Resistencia parcial**, con resistencia de hipersensibilidad incompleta ocurre alguna reproducción del patógeno, en este caso la resistencia se expresa cuantitativamente, pero aún es reconocible por la asociación con la necrosis y clorosis del tejido infectado. Sin embargo, observando en forma detallada, plantas hospedantes ‘**completamente susceptibles**’ al patógeno pueden mostrar diferencias cuantitativas en el grado de infección. Tales diferencias son aparentes, especialmente en ensayos de campo, cuando el patógeno ha completado algunos ciclos de reproducción y se han acumulado pequeñas diferencias en los factores de reproducción y tiempo de generación. Esto resulta en diferencias cuantitativas en el desarrollo de la epidemia en los genotipos hospedantes. La resistencia que resulta de una reducción del desarrollo de la epidemia a pesar de un tipo de infección susceptible, se denomina ‘**resistencia parcial**’, resistencia de campo u horizontal (Niks y Lindhout, 1999).

2. Virulencia de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

a. Virulencia de *R. solani* AG-1 IA infectivas de arroz.

Los aislados de *R. solani* que infectan al arroz pertenecen mayormente al grupo de anastomosis AG-1 IA (Rush y Lee, 1992). La mayoría de ellos usados para caracterizar germoplasma de arroz, son colectados en campos arroceros y son poco estudiados (Eizenga et al., 2002; Jia et al., 2007; Prabhu et al., 2002). Se han observado diferencias en la virulencia midiendo el tamaño de las lesiones, pero hasta la fecha no se ha aceptado este sistema para diferenciar aislados patogénicos de arroz (Carling, 1996; Eizenga et al., 2002).

b. Virulencia de *R. solani* AG-1 IA infectivas de maíz.

En maíz, los aislados de *R. solani* AG-1 IA causan síntomas típicos de mancha bandeada (Cardona et al., 1999) y tizón de la vaina (Li et al., 1998). Parecido a lo ocurrido en arroz, los aislados usados para las pruebas de resistencia en germoplasma de maíz, se han colectado en campos cultivados de maíz y han sido poco caracterizados (Ahuja and Payak, 1984; Kumar and Singh, 2002; Zhao et al., 2006), mayormente se ha usado la infección natural por *R. solani* en viveros de enfermedades (Vasal et al., 1999).

3. Especificidad de aislados de *R. solani* AG-1 IA.

Rhizoctonia solani puede provocar una respuesta diferencial en **agresividad**, la cual consiste en la capacidad de un aislado para infectar una especie o genotipo en mayor grado que otros aislados (Niks y Lindhout, 1999), lo cual es indicativo de una adaptación ecológica sobre el tipo de hospedante (Huyse et al., 2005; Kohn, 2005). El argumento de la diferenciación genética entre poblaciones de patógenos, probablemente depende del grado de relación de los hospedantes de origen. Por ejemplo, cuando se compararon dos poblaciones de *R. solani* AG-1 IA derivadas de Poaceas y Fabaceas infectivas de arroz y soya, respectivamente, se encontró que la agresividad de los aislados fue mayor en su hospedante de origen en la prueba de inoculación cruzada (Bernardes de Assis et al., 2008).

C. Métodos de evaluación desarrollados para evaluación de germoplasma de arroz y maíz frente a *R. solani*.

1. Métodos en invernaderos.

Se aplican en plántulas o también con plantas adultas, las inoculaciones se controlan mejor que en el campo, se puede proporcionar al enemigo natural condiciones ambientales óptimas para el proceso de infección, como humedad relativa del aire y temperatura. La posibilidad de escape es pequeña y la evaluación es relativamente simple. Generalmente, las pruebas son diseñadas como monocíclicas aunque el patógeno sea policíclico, es decir, se completa un solo ciclo de reproducción sexual o asexual del enemigo durante la prueba. Una desventaja de las evaluaciones es que no siempre son representativas de lo que se espera en campo, esto puede ser debido a que las condiciones para el enemigo son mejores en invernadero que campo, las cuales incluyen la dosis de inóculo, el ambiente y el estado de crecimiento de la planta (Niks y Lindhout, 1999).

a. Métodos para la evaluación de arroz frente a *R. solani* bajo condiciones de invernadero.

En la literatura se puede observar un aumento reciente en el desarrollo de metodologías para la evaluación de arroz frente a aislados de *R. solani*:

1) Singh et al. (2002) desarrollaron una técnica de inoculación sencilla y fácil de aplicar colocando esclerocios de diferente tamaño y madurez sobre plantas de cuatro semanas de edad (4 hojas expandidas) en dos cultivares de arroz susceptibles. El factor crítico para el desarrollo de manchas uniformes y discretas fue la cantidad de inóculo; los esclerocios de 0,2 mg colocados en inserción de la vaina con la hoja, más unas gotas de agua destilada fue el mejor, indiferentemente al grado de madurez. Sin embargo, se recomendó el uso de esclerocios inmaduros.

2) Eizenga et al. (2002) inocularon plantas de *Oryza* spp, con trozos de palillos mondadientes de madera colonizados con aislados de *R. solani* infectivos de arroz

provenientes de campo, los cuales fueron colocados en el cuello de la hoja basal de la vaina de los tallos de los macollos (estado de máximo macollamiento) sin causar heridas. Luego se incubaron en cámara de crecimiento y se evaluaron visualmente a los siete días, utilizando una escala de severidad de 10 grados que estimó en % la lesión en las hojas. Los tallos fueron cortados y los rebrotes fueron también inoculados y evaluados bajo condiciones de invernadero, utilizando la misma escala. Un método parecido al anterior fue usado por Prabhu et al. (2002), para evaluar 12 cultivares de arroz irrigado sembrados en Brasil, inoculados artificialmente bajo condiciones de invernadero. En ambos trabajos se identificaron fuentes de resistencia al añublo de la vaina.

3) Brooks (2007) empleó un método para aislar y utilizar una fitotóxina de *R. solani* infectiva en arroz y determinar la genética de la susceptibilidad al añublo de la vaina. Aplicó una solución 50× TOX fue en segmentos de hojas basales de 17 cultivares de arroz en estado de plántula con distintos grados de susceptibilidad a la enfermedad e incubó en cámara de crecimiento (30 °C y 48 h de luz continua). Después de tres días, las plántulas fueron transferidas a invernadero, rociadas ligeramente con agua y cubiertas con un plástico para mantener la humedad. Los fenotipos fueron evaluados visualmente como sensibles o insensibles (+ o -), por la presencia o ausencia de lesiones necróticas en la sección pintada con el filtrado. Se desarrollaron manchas típicas en cultivares de arroz, maíz y tomate, encontrándose una correlación ($r = 0,66$) entre la sensibilidad a la toxina y la susceptibilidad a la enfermedad

4) Una serie de ensayos con la metodología de inoculación de microcámaras fueron establecidos por Jia et al. (2007) en tres diferentes localidades (Arkansas, Texas y Colombia). Plántulas de arroz (3-4 hojas) fueron inoculadas con discos de PDA colonizados con micelio de *R. solani*, cubiertas con botellas plásticas transparentes (2-3 L) para mantener la humedad después de la inoculación. Como testigos fueron usados dos cultivares ‘Jasmine 85’ y ‘Lemont’ quienes mantuvieron consistentemente un alto y bajo nivel de resistencia, respectivamente. Experimentos

de campo en Arkansas y Texas fueron establecidos para comparar los registros de la enfermedad en invernadero con las observadas bajo condiciones de campo. Los siete ensayos desarrollados en las diferentes localidades fueron consistentes con los resultados de campo. Se concluyó que el método de microcámara fue un método efectivo para evaluar la resistencia al añublo de la vaina del arroz bajo condiciones de invernadero y fue útil para seleccionar germoplasma.

5) Para evaluar la eficiencia de la infección de *R. solani* en arroz, Park et al. (2008) probaron dos cultivares parcialmente resistentes (Tetep y Jasmine 85) y dos susceptibles (Chucheongbyeo, Junambyeo) usando tres tipos de inóculo (bola de micelio, suspensión de micelio y discos de agar colonizados), cubriendo la vaina inoculada con un trozo de papel aluminio para mantener la humedad. Los resultados indicaron un 100% de infección, la bola de micelio obtenido en medio líquido fue mejor que otros tipos de inóculo. En la investigación además, se desarrolló una nueva fórmula para calcular el índice de susceptibilidad

6) Prasad y Eizenga (2008) evaluaron 73 genotipos de *Oryza* para identificar fuentes de resistencia con tres diferentes métodos conducidos en cámara de crecimiento, invernadero y laboratorio. Se compararon el método de microcámara (Jia et al., 2007), el método de hoja separada inoculado con un disco de micelio y el método con trozos de palillos mondadientes colonizado (Eizenga et al., 2002). Se concluyó que el método de microcámaras dio resultados más uniformes y reproducibles y fue fácil de usar bajo condiciones de invernadero.

b. Métodos para la evaluación de maíz frente a *R. solani* bajo condiciones de invernadero.

En la literatura mundial se encuentran pocos ejemplos de evaluación de germoplasma de maíz a la enfermedad mancha bandeada o tizón de la vaina.

1) En Venezuela Pineda et al. (2005) evaluaron ocho técnicas de inoculación de genotipos de maíz bajo condiciones controladas: inoculación a la semilla, siembra en suelo inoculado con hojas de maíz infectadas, esclerocios o granos de arroz

colonizados y plántulas de maíz (15 días de edad) inoculadas con esclerocios, granos de arroz colonizados, trocitos de hojas de maíz infectadas y aspersión de suspensión de micelio. La técnica más adecuada resultó ser la aplicación de arroz colonizado al momento de la siembra (100 % de incidencia).

2) En otro trabajo llevado a cabo por Perdomo et al. (2007) evaluaron la virulencia de 25 aislados de *R. solani* infectivos de maíz inoculando las líneas CML-254 y L-82201-22-1-1. El experimento consistió en colocar un círculo de PDA colonizado de cada uno de los aislamientos en la primera hoja verdadera entre la vaina y el tallo de la planta a los 12 días de edad. La evaluación se realizó siete días después de la inoculación, utilizando para ello una escala de cinco grados, basada en la altura relativa o avance de la lesión, a saber 1: <5% de la altura de la planta, 2: 5-15%, 3: 16-35%, 4: 36-65% y 5: >66% de la altura de la planta y muerte de las mismas. Los aislados más virulentos fueron B1TOR1, P2TUR6 y B2SAB1. La línea CML-254 mostró el mayor nivel de resistencia a la enfermedad. Los resultados permitieron identificar y caracterizar aislados que fueron utilizados en programas de mejoramiento genético para la identificación de posibles fuentes de resistencia y en la evaluación del germoplasma mejorado.

2. Métodos de laboratorio.

a. Métodos para la evaluación de arroz frente a *R. solani* bajo condiciones de laboratorio.

El método de la hoja separada por Prasad y Eizenga (2008), fue descrito en párrafos anteriores. Otro método propuesto por Martínez et al. (2005), consistió en colocar segmentos de 4-6 cm de largo de la última hoja totalmente formada, fijadas a un portaobjetos por sus extremos con cinta adhesiva en platos Petri con soporte de papel filtro estéril humedecido. La hoja se perforó en el centro con aguja y se depositó una gota (10 µL) de suspensión de micelio e incubó a 28 °C durante cinco días. Se evaluó la presencia de necrosis en los segmentos inoculados y la severidad fue expresada en área foliar afectada (AFA) con base a tres parámetros (largo L, ancho A en mm y L x

A en mm²). Se observó una alta correlación entre el largo y el ancho de las lesiones (LxA) con un coeficiente de 0,80. El cultivar ‘Amistad 82’ se mostró menos afectado por los aislados probados. Los resultados indicaron diferencias de acuerdo a la severidad, los aislados más severos fueron: el 304-2-1 y el 304-9-3 y los menos: el 304-1 y el 304-6-2.

- b. Métodos para la evaluación de maíz frente a *R. solani* bajo condiciones de laboratorio.

Un método en platos Petri fue diseñado por Ahuja and Payak (1981) para evaluar la reacción de germoplasma a la mancha bandeada del maíz causado por *R. solani*. Trozos de hoja de tamaño adecuado de plantas de 30 días, fueron flotados en 8 ml de solución de Cinetina a 2 ppm. Granos de cebada enteros colonizados se colocaron cerca de la vena principal del trozo de hoja en la superficie adaxial e incubaron a 27 ± 1 °C por dos días. La intensidad de la enfermedad fue registrada en nueve categorías basadas en una escala diagramática. Seis líneas endocriadas CM 103, CM104, CM105, CM600 Y PI 21407 y el híbrido VL 43 fueron resistentes, el maíz dulce X 104 y Henius fueron susceptibles y el remanente de las entradas fueron intermedias. Estos resultados tuvieron alta correspondencia con las reacciones de campo. Una prueba de virulencia para 25 aislamientos de *R. solani* AG-1 IA fue desarrollada por Perdomo et al. (2007), utilizando el método anterior con ligeras modificaciones, que consistió en la multiplicación del inóculo sobre granos de arroz esterilizado, el resto del procedimiento fue parecido. Dentro del grupo de mayor virulencia se encontraron las cepas G1SOM1, P2TUR3, Y2SP1, P2TUR2 y P2TUR5.

3. Métodos de campo.

- a. Evaluación del añublo de la vaina del arroz bajo condiciones de campo.

En Portuguesa, Delgado et al. (2004) realizaron un ensayo de campo para evaluar métodos de inoculación de *R. solani* en arroz de la variedad Fundarroz PN-1. En la investigación se utilizó arroz descascarado colonizado por el micelio de *R. solani*, en diferentes dosis inóculo (25g y 100cc), forma de aplicación (hilera y al voleo) y época de aplicación o días después de la siembra (20 y 70 dds), comparado con

esclerocios colocados en la 2ª y 3ª vaina del tallo principal a los 70 dds, dejando un testigo sin inocular. El mejor tratamiento fue la dosis de 100 ml (medido en cilindro graduado de 500 ml), sobre las dos hileras centrales cuando el cultivo se encontraba en el estado de bota, embuchamiento o prefloración coincidiendo con los 70 días de edad. Las evaluaciones de las dos hileras centrales de cada parcela se hicieron a los 15 y 28 después de la infestación.

b. Evaluación de la mancha bandeada del maíz bajo condiciones de campo.

En China, Zhao et al. (2006) evaluaron la resistencia a la mancha bandeada del maíz en el cruce entre las líneas elites R15 (resistente) y 478 (susceptible); 299 familias de la F_{2:4} fueron infectadas mediante inoculación artificial de *R. solani* en dos localidades con condiciones agroecológicas diferentes, el diseño fue de bloques completos al azar con tres repeticiones, las parcelas tuvieron hileras de 3m por 0,8m entre hileras para un total de 14 plantas por parcela. En estado de 8-10 hojas se colocaron en el vértice de la tercera vaina dos granos de trigo colonizado, 20 días después de la inoculación, se midió la altura de la planta y el tamaño de la mancha en 10 plantas de la parcela. La severidad de la enfermedad fue medida por una escala de seis clases, calculándose un índice de acuerdo a la fórmula de Wang y Dai (2001) citado en el trabajo anterior. Los autores concluyeron que el método de inoculación artificial favoreció la expresión de la enfermedad.

IV. GERMOPLASMA DE ARROZ Y MAÍZ EVALUADO PARA RESISTENCIA A *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

A. Loci de carácter cuantitativo (del inglés Quantitative Trait Loci, QTLs).

En general, la resistencia parcial es un carácter cuantitativo, debido a genes con pequeños efectos. Los loci sobre los cuales estos genes están localizados son tratados como **loci de carácter cuantitativo** (QTLs). Cuando se evalúa la progenie de un cruzamiento de dos padres con diferentes niveles de resistencia parcial se observa una segregación continua de niveles de infección, esta distribución continua también se observa con otros caracteres cuantitativos como rendimiento. Cuando en la progenie

se observa **transgresión**, (por ejemplo algunos genotipos de la progenie tienen resistencia o susceptibilidad más extrema que los niveles de los padres), se concluye que los dos padres poseen genes para resistencia parcial en diferentes QTLs. La definición de resistencia parcial no implica que la herencia siempre sea poligénica. Ocurren resistencias heredadas monogénicamente que muestran una reducción en el desarrollo de la epidemia a pesar de que ocurra un tipo de infección compatible. A menudo se asume que la resistencia parcial se basa en una combinación de genes aditivos cada uno con efectos pequeños. Esta hipótesis excluye la posibilidad de interacciones diferenciales. La resistencia debería ser **no específica a la raza** completamente (Niks y Lindhout, 1999).

Las interacciones cultivar*aislado, pequeñas pero significativas, que se han encontrado frecuentemente indujeron a Parlevliet y Zadoks (1977) a proponer que los genes cuantitativos para resistencia parcial en la planta pueden actuar en una relación gen-a-gen con genes de agresividad en el patógeno, aunque es una relación gen-a-gen menor. Como se explicó anteriormente, una interacción diferencial es una de las consecuencias de la relación gen-a-gen (Niks y Lindhout, 1999).

B. Durabilidad de la resistencia.

En general, la resistencia parcial es efectiva durante mucho tiempo. Los ejemplos de ‘**rompimiento**’ de resistencia parcial son escasos. Es notable que en los patosistemas cebada-oidio y trigo-roya de la hoja, los genes para resistencia *ml-o* y *Lr34*, que no están asociados con hipersensibilidad han durado, a pesar de su uso extensivo en los cultivares modernos que se siembran en grandes áreas (Niks y Lindhout, 1999).

C. Fuentes de resistencia para el añublo de la vaina del arroz.

1. Genes mayores, herencia transgresiva y QTLs.

a. Genes mayores que le confieran una resistencia completa al añublo de la vaina han sido estudiados en los cultivares de arroz. Sin embargo, existe mucha variación en la resistencia cuantitativa la cual puede ser aprovechada para la resistencia a *R*.

solani y este tipo de resistencia puede ofrecer una protección adecuada contra el patógeno bajo condiciones de campo. En un ensayo se usaron 255 F4 de la población masal del cruce de la variedad susceptible ‘Lemont’ y la variedad resistente ‘Teqing’, con dos años de evaluación en campo y utilizando 113 marcadores RFLP distribuidos en el genoma, fueron identificados seis QTLs que contribuyeron a la resistencia de *R. solani*. Los QTLs fueron localizados en el cromosoma 6 y 12 del arroz y en conjunto explicaron aproximadamente el 60% de la variación genotípica del 47% de la variación fenotípica del cruce Teqing x Lemont (Li et al., 1995).

b. La resistencia parcial de los cultivares ‘Jasmine 85’ y ‘Teqing’ fue estudiada por la evaluación de la F1, F2, F3, F4 y la F1 de la retrocruza de los padres resistentes con los cultivares susceptibles ‘Maibelle’x ‘Cypress’, respectivamente. Las plantas de la F1 fueron resistentes. La segregación de la población F2 de ambos cruces mostró una proporción 3:1 de plantas resistentes/plantas susceptibles. La retrocruza F1 segregó en una proporción 1:1 cuando fue cruzada nuevamente con el padre susceptible y cuando fue cruzada con el padre resistente no hubo segregación. Estos resultados fueron consistentes con la resistencia parcial de dos cultivares resistentes que poseen un sólo gen dominante. Cuando los padres resistentes fueron cruzados, en la F2 se obtuvo una segregación 15:1 resistentes / susceptibles. Los resultados indicaron que los dos padres resistentes poseen cada uno un gen mayor de resistencia que segregan independientemente (Pan et al., 1999).

c. Zou et al. (2000) condujeron un estudio con la F2 de la población clonal de ‘Jasmine 85’ / ‘Lemont’, la cual fue inoculada con el aislado RH-9 por el método de palillos mondadientes colonizados. Con base a la evaluación de dos años usando 118 marcadores moleculares de alta resolución se identificaron seis QTLs que contribuyeron a la resistencia del añublo de la vaina

d. En otro trabajo, Pinson et al. (2005) confirmaron los hallazgos de seis QTLs anteriormente citados (Li et al., 1995) usando líneas puras recombinantes de arroz endocriadas (RILs) y se encontró un nuevo loci que condiciona la resistencia para el añublo de la vaina del arroz.

e. Graterol et al. (1996) lograron detectar herencia transgresiva en el cruce de los cultivares ‘Fonaiap 1’/’Palmar’ a pesar de la influencia del ambiente sobre el grado de severidad de los síntomas (GSS). Los resultados obtenidos en el cruce permitieron detectar variabilidad genética para la reacción a *Rhizoctonia* spp coincidiendo con los resultados de Marchetti y McClung (1994) obtenidos con el cruce RU8703196/’Rosemont’, quienes también identificaron segregantes transgresivos para resistencia a *R. solani* en generaciones tempranas de selección (F3).

2. Fuentes de resistencia en *Oryza* spp o parientes silvestres.

Muchas especies de arroz silvestre no pueden ser evaluadas en campo como el arroz cultivado (*O. sativa*), debido a que el follaje no favorece el desarrollo de la enfermedad y se acaman cuando la semilla comienza a madurar por su peso (Eizenga et al., 2002). En consecuencia, se han utilizados métodos en cámaras de crecimiento, en invernadero y microcámaras, los cuales fueron descritos anteriormente. Eizenga et al. (2002), evaluaron 21 accesiones de *Oryza* ssp y tallos de rebrotes de la F1 de cruces de la progenie y cultivares de arroz, encontrando que el método fue efectivo en escala limitada para evaluar especies de *Oryza* que no podrían evaluarse en campo. Además, *Oryza* spp podrían contener nuevos genes de resistencia al añublo de la vaina del arroz causado por *R. solani*. Prasad y Eizenga (2008) comprobaron que el método de microcámaras fue el más sensible y reproducible que el segmento de hoja y los brotes de plántulas inoculados en cámara de crecimiento. En este trabajo siete accesiones de *Oryza* spp fueron clasificadas como moderadamente resistentes, las cuales fueron derivadas de *O. nivara*, *O. barthii*, *O. meridionalis*, *O. nivara* / *O. sativa* y *O. officinalis*.

3. Fuentes en resistencia de maíz evaluado para la mancha bandeada.

a. Ahuja y Payak (1981) pudieron identificar seis líneas endocriadas CM-103, CM-104, CM-105, CM-300, CM-600, PI-217407 y al híbrido VL-43 como resistentes, mientras que el maíz dulce x 104 y Hunius fueron susceptibles mediante

un método de laboratorio diseñado para evaluar la mancha bandeada en germoplasma de maíz.

b. Ahuja and Payak (1984) evaluaron un grupo de 141 entradas de maíz para resistencia a la mancha bandeada y tizón de la vaina inoculando artificialmente con cuatro granos de cebada colonizado con *R. solani*, colocados en el 2^{do} y 3^{er} internudo desde la superficie del suelo. Los autores identificaron 35 genotipos resistentes, 85 intermedios y 19 susceptible. De estas, las líneas CM-104, CM-105, CM-300 y el compuesto 'Vikram' presentaron resistencia a otras enfermedades.

c. Kumar y Singh (2002) condujeron un estudio sobre herencia de la resistencia usando el método de cinetina e inoculación artificial en campo. Ocho cruces entre dos líneas resistentes (CM-104 y CM-1) y cuatro líneas susceptibles (Tarun x 36-1-1-1-2, D741 x 1-1-10-4-4, Pop31 x 21-1-2-4-1-1-5-1/13# y Tarun x 252-1-2-2-1-2-1) fueron considerados en el análisis. El patrón de segregación en la F2 fue de 15:1 en cruces involucrados con CM-104 como padre resistente, y de 13:3 en cruces involucrados con CM-1 como padre resistente. En la RC1P1 el patrón de segregación fue 3:1. Los cruces resistente x resistente y un cruce de susceptible por susceptible fue 0:0. El análisis de segregación de ocho cruces resistentes x susceptible reveló que la resistencia estuvo gobernada por dos genes. La reacción a la mancha bandeada en la F2 y las retrocruzas involucrando a CM-104 como padre resistente y una línea susceptible, sugieren que la resistencia de CM-104 estuvo controlada por dos genes dominantes por duplicado, mientras que el cruce involucrando a CM-1 mostraron dominancia e interacción recesiva.

Capítulo 2

GENÉTICA POBLACIONAL DEL PATOSISTEMA *Rhizoctonia solani* AG-1 IA - ARROZ -MAÍZ, EN EL ESTADO PORTUGUESA, VENEZUELA

I. MATERIALES Y MÉTODOS.

A. Muestreo de la población.

Para tratar las preguntas relevantes referentes al flujo de genes entre las distintas poblaciones de hospedantes y el modo reproductivo del hongo, muestras de poblaciones de *R. solani* AG-1 IA que infectan el arroz y el maíz en Venezuela fueron apareadas geográficamente (agrupación de los aislados de *R. solani* por campos de maíz y arroz próximos entre ellos). En áreas sembradas del estado Portuguesa, en el municipio Turén se muestrearon tres campos de arroz (identificados como A4, A5, A6) y tres de maíz (identificados como M2, M4, M5), ubicados entre las coordenadas geográficas de latitud 9.2485 N y longitud 69.1324 O. En el municipio Santa Rosalía se muestrearon dos campos de arroz (A2, A3) y uno de maíz (M1) el cual fue apareado por proximidad con uno de arroz (A1) del municipio Turén, ubicados entre las coordenadas 9.0333 N y 60.0167 O, en el municipio Esteller solo se muestreó un campo de maíz (M3) ubicado entre las coordenadas 9.3667 N y 69.2131 O (Figura 1).

En cada campo sembrado con arroz y maíz seleccionado, fueron ubicados cinco a seis focos de la enfermedad inducida por *Rhizoctonia* spp; tomándose al azar muestras infectadas a lo largo de transectas (por lo menos 10 m de separado), de un total de seis a ocho transectas en cada campo, totalizando de 30 a 48 focos por campo. Los campos próximos se encontraban a menos de cinco kilómetros separados uno de otros, mientras que las tres localidades estaban distantes de 10 a 35 kilómetros entre ellas (Figura 1).

Las muestras fueron colocadas en sobres de papel Manila e identificadas con un código compuesto por la combinación de una primera letra en mayúscula (indica el cultivo A = Arroz y M = Maíz) y un número (indicativo del campo), seguido por otra letra en mayúscula por orden alfabético (indicativo de la transecta) y un número (muestra) con el punto de georeferencia.

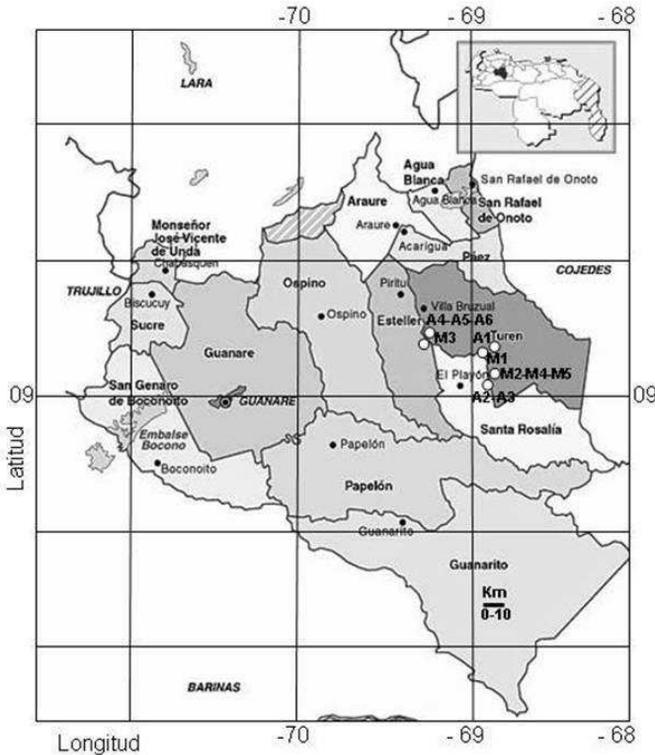


Figura 1. Ubicación geográfica de la población de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que infecta el arroz y el maíz en el estado Portuguesa, Venezuela. La latitud (N-S) y los valores de la longitud (E-O) se indican en el mapa. Las muestras fueron referenciadas por medio de GPS (Sistema de Geo-Posicionamiento Global), las cuales fueron agrupadas por la cercanía de los campos y número de individuos presentes como se indica en la figura.

B. Aislamiento del hongo.

Hojas superiores o bandera que presentaron los síntomas característicos del añublo del arroz (Figura 2A) y vainas de maíz con síntomas de mancha bandeada (Figura 2B), muestreadas por transectas, fueron ingresadas al Laboratorio de Protección Vegetal de Fundación Danac, Venezuela. Los aislados puros fueron obtenidos transfiriendo fragmentos de las hojas lesionadas a platos Petri (Figura 2C) que contenían un medio selectivo para aislar *Rhizoctonia* (Ko y Hora, 1971), incubándose a 25°C en oscuridad por 48 a 72 h, después las puntas hifales fueron transferidas al medio papa-dextrosa-agar (PDA). Los esclerocios producidos por cada aislado se colocaron en crio-tubos 1,8 ml (Nunc® CryoLine System, Dinamarca) o viales (1,5 ml) conteniendo silica gel esterilizada (Fluka Chemie GmbH, Alemania) para el almacenamiento de larga duración a 4 °C (Figura 2D).

En el laboratorio tipo C2 (cuarentena vegetal) del ETH (Politécnico de Zurich, Suiza), se procedió a realizar la multiplicación del micelio en caldo de papa + Kanamicina (0,050 mg/L), sembrando trozos de micelio puro y dejando el medio líquido en agitación orbital durante 8 días, luego se extrajo la masa de micelio de 1 g aproximadamente, se colocó en viales de crio-preservación de 2,5 ml, se precongeló y se liofilizó a 35 bar a -70 °C.

C. Extracción de ADN y Amplificación por PCR para ITS 5.8S del ADN ribosomal.

El micelio de 150 aislados de *R. solani* de arroz y 150 aislados de maíz se pulverizó en molino FASTPREP FP120 (BIO 101 SAVANT). El resto de la extracción se realizó con el estuche de extracción DNeasy Plant Kit (Cat. N°. 69106 QUIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Finalizada la extracción del ADN de todos los aislados, se tomó una alícuota de 10µl y se diluyó en 490µl de agua bidestilada estéril (ABDE), constituyendo las diluciones de trabajo. Para realizar la amplificación del ADN y la metodología del espaciador interno ribosomal (5.8S ITS - ADN_r), se preparó la mezcla de reacción base para una muestra de 16 µl (11 µl ABDE + 2 µl Buffer + 1 µl nucleótidos + 1 µl de primer ITS-

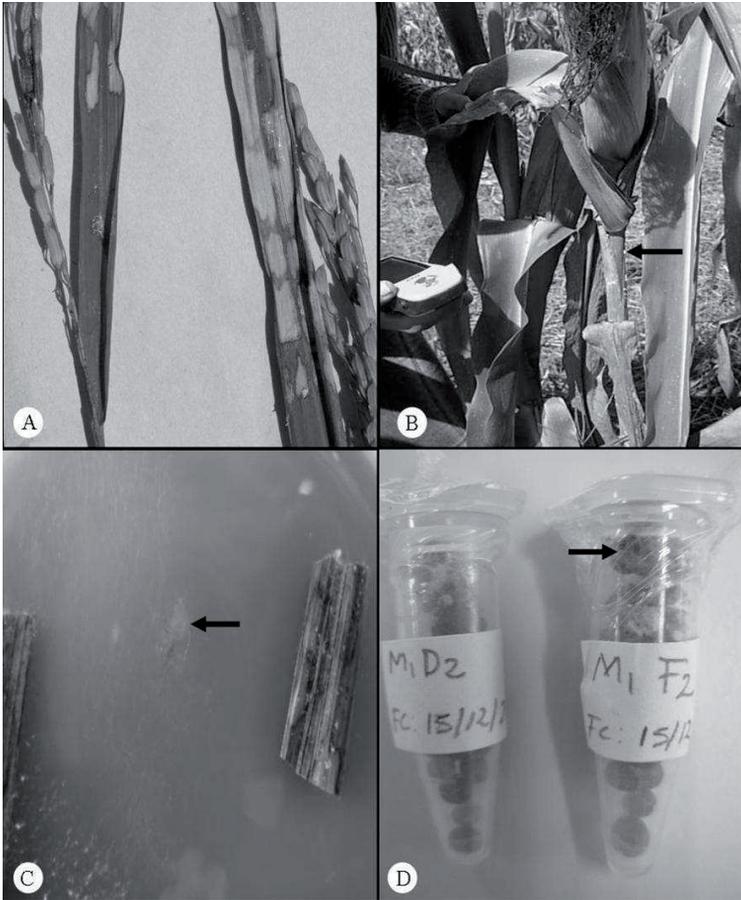


Figura 2. A. Síntoma del añublo de la vaina del arroz, se colectaron lesiones típicas en la hoja bandera. B. Síntomas de la mancha bandeada de la hoja del maíz, cada punto de muestreo de la transecta fue georeferenciado, la flecha señala esclerocios inmaduros en la lesión. C. Trozos de la lesión del añublo de la vaina cultivados en medio selectivo (Ko & Hora, 1971), la flecha indica un segmento de las hifas extraído para el posterior cultivo en medio PDA. D. Esclerocios maduros (flecha), fueron almacenados sobre sílica esterilizada para conservación a largo plazo a 4 °C.

4 (forward)+ 1 µl de primer ITS-5 (reverse) (White et al., 1990) + 0,1 µl de TAQ-polimerasa), a la cual se añadieron 4µl de ADN (diluido) para completar 20 µl por reacción, luego se depositaron en placas de PCR nuevas con la ayuda de micropipetas.

La amplificación se hizo en un termociclador (BIOMETRA T GRADIENT), las condiciones de la PCR fueron 1 ciclo a 96 °C por 2 min, 35 ciclos a 96 °C por 1min más 55 °C por 1 min más 72° C por 1 min, 1 ciclo a 72 °C por 5 min y finalizó con 15 °C. Para verificar la calidad de la amplificación ADN se realizó una corrida en gel de agarosa 1 % (2 g de agarosa en 200 ml de tampón TBE 0,5 más 1,5 µl de bromuro de etidio), la muestra de 9 µl (5 µl de producto de la PCR + 2 µl Blue juice + 2 µl ABDE) fue comparado contra un marcador de 100 pb (3 µl leader + 2 µl de Blue juice), ajustando a 105 V por 35-45 min en la fuente de poder MBP300V IBI (Kodax). Para el análisis de las secuencias se usó el programa Sequencher™ versión 4.2.2. El grupo de anastomosis de cada aislado fue determinado secuenciando la región de ITS-5.8S (Matsumoto, 2002).

D. Amplificación de ADN por PCR para microsatélites.

Después de analizar los resultados para ITS 5.8S ADN_r, se procedió a tomar 139 muestras de ADN de *R. solani* derivado de arroz y 72 muestras de ADN de *R. solani* derivado de maíz para realizar las amplificaciones usando 10 microsatélites o SSR (TC01, TC02, TC03, TC05, TC06, TC07, TC10, TC11, TC12 y TC13), que resultaron altamente polimorficos (Zala et al., 2007). Los iniciadores fueron marcados con índigo fluorescente (G5 dye set: 6-FAM, NED, VIC, PET; ABI). Las amplificaciones se hicieron en placas de 96 multiceldas en un termociclador Biometra en reacciones de 20 µl, que contenían 10-50 ng de ADN total, 2 µl de tampón de reacción 10× (100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 200 mM Tris-HCl; 20 mM MgCl₂; 0,1% Triton X-100; pH 8,8 NEB), más 0,1–0,2 µM por cada iniciador, 0.1 mM de cada dNTP, y 0.5 U Taq polimerasa (NEB).

Las condiciones para todos los loci SSR fueron de 96 °C por 2,5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 30 °C por 0,5 min, el pegue a 50 °C por 0,5 min, y la elongación a 72 °C por 0,5 min, el tiempo final de extensión 5 min. Para el posterior análisis de los fragmentos, 1-6 µl de los amplicones de PCR fueron mezclados con agua destilada estéril en dos distintos rangos: (i) TC01, TC02, TC03, TC05 y TC11, y (ii) TC06, TC07, TC10, TC12 y TC13, para completar un volumen final de 30 µl. Luego 4 µl del producto combinado de la PCR fueron mezclados con 9 µl de Hi-Di formamida y 0,3 µl de GeneScan-500 LIZ tamaño estándar (ABI). Todas las muestras fueron desnaturalizadas a 95 °C por 2 min y mantenidas en hielo por 2 min antes que el fragmento fuera separado en secuenciador ABI 3100 y analizado usando el programa GeneScan versión 3.7 (ABI).

E. Registro de datos.

Diez loci codominantes polimórficos microsatélites (SSR) fueron utilizados para el genotipaje de los aislados usando iniciadores marcados con fluoróscoros, que previamente habían sido utilizados con *R. solani* (Zala et al., 2007). Los amplicones fueron separados en un secuenciador ABI 3700 (Applied Biosystems, USA) según las instrucciones del fabricante y los análisis de los fragmentos de alelos fueron hechos con los programas Genescan y Genotyper la versión 3.7 suministrada por ABI. El bandeado automatizado de los alelos en los tamaños de fragmentos consistentes con diversos números de unidades de repetición fue ejecutado con el programa FLEXIBIN, disponible en la Internet: <http://www.zoo.cam.ac.uk/zoostaff/amos/> (Amos et al., 2007).

F. Análisis de datos

1. Contenido de información Microsatélite y riqueza alélica de la población.

La variación en tamaños de alelos, el número de repeticiones, el número total y promedio de alelos por locus, y la identificación de alelos ocultos fueron resueltos usando información sobre las frecuencias de alelos mediante el programa Convert v.1.31 (Glaubitz, 2004).

2. Diversidad clonal.

Los aislados con el mismo genotipo multilocus SSR fueron tratados como clones. Varios índices de la diversidad clonal fueron calculados, incluyendo: a) el número de genotipos por población; b) genotipos sitio específicos; c) fracción clonal (o la proporción de aislados fúngicos que se originan de la reproducción asexual), calculado como $1 - [(\text{número de genotipos diferentes})/(\text{número total de aislados})]$ (Zhan et al., 2003); d) la diversidad genotípica de Stoddart y Taylor: $G_o = 1/\sum P_i^2$, donde P_i es la frecuencia del genotipo (Stoddart, 1983, Stoddart y Taylor., 1988), su uniformidad (G_o escalado por el número máximo de genotipos esperados), un indicador para verificar cómo los genotipos se distribuyen uniformemente sobre la población.

Estas medidas fueron determinadas con el programa computacional GenoDive (<http://www.bentleydrummer.nl/software/software/GenoDive.html>) (Meirmans y Van Tienderen, 2004).

Para conocer si las poblaciones apareadas se diferenciaban en su diversidad clonal, se utilizó un acercamiento de remuestreo con reemplazo (bootstrapping), donde los individuos se volvieron a muestrear de las poblaciones y los índices de diversidad fueron comparados después de cada réplica (Manly, 1991), usando 1.000 permutaciones.

3. Diversidad genética y diferenciación entre poblaciones de distintos hospedantes.

Para estos análisis se utilizó un conjunto de datos clones-correctados, en el cual solamente un clón de cada genotipo multilocus SSR fue incluido por población. El grado de subdivisión de la población o la distribución de la diversidad genética entre poblaciones de hospedantes de *R. solani* AG-1 IA fue evaluado por contrastes basada en los análisis jerárquicos de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992; Excoffier et al., 2005; Weir, 1996; Weir y Cockerman, 1984).

Para la definición de grupos de poblaciones, tres contrastes fueron probados: arroz contra maíz, las poblaciones dentro del grupo que infecta al arroz, y las poblaciones dentro del grupo que infectan al maíz. Mientras que para la medida de la distancia se utilizó la suma de cuadrados del tamaño de las diferencias (R_{ST}) entre dos haplotipos (Slatkin, 1995). El análisis jerárquico de varianza fue conducido partiendo los componentes de la covarianza entre grupos de poblaciones del hospedante, entre poblaciones dentro de grupos y dentro de poblaciones. La significación de los índices de estabilidad (Φ_{ST} equivalente al estadístico F_{ST}) fue probada usando 1.023 permutaciones por un acercamiento no paramétrico (Excoffier et al., 1992). Este análisis fue ejecutado con Arlequín v.3.10 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>) (Excoffier et al., 2005).

4. Pruebas del equilibrio gamético de Hardy-Weinberg.

Para determinar las contribuciones relativas de la reproducción asexual y sexual en diversas poblaciones de hospedantes, primero se probó el Equilibrio de Hardy-Weinberg (del inglés Hardy Weinberg Equilibrium, HWE) usando una medida análoga a la prueba exacta de Fisher (Guo y Thompson, 1992). Los valores de P fueron obtenidos usando el acercamiento de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), generando una distribución de probabilidad exacta no predispuesta para los alelos raros (Raymond y Rousset, 1995). Esta prueba fue ejecutada en Arlequin v.3.11 (Excoffier et al., 2005).

También se probó para el desequilibrio gamético una prueba de la asociación del multilocus (Brown et al., 1980) y un algoritmo MCMC. Esta prueba fue ejecutada usando el programa Genepop v.3.4 (<http://genepop.curtin.edu.au/>) (Raymond y Rousset, 1995). También se calculó el índice de la asociación (I_A) para cada población (Maynard et al., 1993) en MultiLocus v.1.3 (<http://www.bio.ic.ac.uk/evolve/software/multilocus/>)

(Agapow y Burt, 2001) basado en 1.000 distribuciones aleatorias. Para estos análisis se utilizaron un conjunto de datos con corrección de clones.

5. Prueba para la detección de embotellamientos evolutivos o de efectos del fundador.

Los efectos recientes del fundador o los embotellamientos evolutivos históricos en las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA de distintos hospedantes fueron evaluados usando una prueba que utiliza un acercamiento coalescente sobre el exceso o la deficiencia del heterocigoto basada en el heterocigoto esperado y el número de alelos observado en cada locus (Cornuet y Luikart, 1996). Esta prueba fue ejecutada mediante el programa Bottleneck v.1.2 (<http://www.montpellier.inra.fr/URLB/bottleneck/bottleneck.html>) (Piry et al., 1999), suponiendo un modelo de mutación gradual (SMM) (Kimura y Ohta, 1975). Las desviaciones del equilibrio deriva-mutación a través de todos los loci fueron determinadas usando la prueba de los signos y la prueba de Wilcoxon para cada muestra de la población y para las poblaciones combinadas dentro de cada hospedante (Luikart et al., 1998).

6. Prueba para la migración histórica.

La migración histórica entre las poblaciones fue estimada con MIGRATE 2.3 (Beerli y Felsenstein, 2001). Este programa se basa en la teoría coalescente y utiliza la máxima probabilidad para estimar tamaños eficaces de la población (θ) y una matriz de la migración. Permite la valoración de la migración asimétrica (M) entre pares de población. Las estimaciones de flujo de genes entre poblaciones fueron obtenidas usando cinco réplicas de 10 cadenas iniciales y de cinco cadenas finales largas y un esquema estático de calentamiento con cuatro temperaturas (1,0; 1,3; 2,6 y 3,9).

El tipo de datos seleccionado, fue de microsatélites con movimiento browniano, si se supone el modelo de la mutación gradual. Las cadenas iniciales fueron realizadas con 1.000 muestras y un intervalo de muestreo de 20 (20.000 pasos), con 1.000 árboles registrados por muestra corta. Las cinco cadenas finales fueron realizadas con 5.000 muestras y un intervalo de muestreo de 20 (200.000 pasos), un marca fuego de

10.000 y 10.000 árboles registrados por cadena larga. El intervalo de confianza para la theta y el parámetro de la migración M fue calculado usando un porcentaje de aproximación.

7. Prueba para la fluctuación del tamaño de la población y los parámetros demográficos.

La fluctuación del tamaño de la población y los parámetros demográficos (N_e y las tasas de migración) para cada población ($M_{Lamarc} = m/\mu$) fueron probados utilizando un método MCMC ejecutado en LAMARC 2.1 (Kuhner, 2006; Kuhner y Smith, 2007). Las estimaciones iniciales del flujo de genes entre poblaciones fueron obtenidas con EMIGRAN 2.3 (Beerli y Felsenstein, 2001), usando dos réplicas de 10 cadenas iniciales y de dos cadenas finales largas. Las cadenas iniciales fueron realizadas con 1.000 muestras y un intervalo de muestreo de 20 (20.000 pasos), mediante un marca fuego de 1000 muestras para cada cadena. Las cinco cadenas finales fueron realizadas con 10.000 muestras y un intervalo de muestreo de 20 (200.000 pasos) y un marca fuego de 10.000.

El intervalo de confianza para theta y la tasa de crecimiento fueron calculados usando el porcentaje de aproximación. El ancestral N_e en el 't' 'tiempo atrás' fue calculado usando la siguiente ecuación del crecimiento demográfico: $\theta_t = \theta_{now} e^{-gt}$, donde ' θ ' es $4N_e\mu$, ' t ', ' t ' es el tiempo en unidades mutacionales, y ' g ' es el parámetro del crecimiento exponencial.

II. RESULTADOS.

A. Colecta de muestras y obtención de cultivos puros de *Rhizoctonia* spp.

En agosto 2005 se recolectaron 285 muestras con síntomas del añublo de la vaina de arroz y 245 con síntomas de mancha bandeada del maíz, por tres localidades ubicadas en el estado Portuguesa. En el laboratorio, usando el medio selectivo Ko y Hora (1971), se obtuvieron 210 y 215 cultivos puros de *Rhizoctonia* spp en arroz y maíz, respectivamente. Se conservó una réplica de 211 aislados en el ETH en Zurich, Suiza

(usados en la caracterización molecular). Una colección más completa de 425, incluyendo los aislados anteriores, fue depositada en el banco de patógenos de Fundación Danac.

B. Secuenciación y análisis de la región ITS 5.8S ADNr de *Rhizoctonia* spp.

La región 5.8 ITS-ADNr de *R. solani* fue secuenciada de 150 aislados provenientes de arroz y 150 aislados de maíz, el 92,6 % de los aislados de arroz y 67,3 % de los aislados de maíz fueron identificados como *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo *Rhizoctonia solani*) del grupo de anastomosis AG-1 IA. En los aislados de maíz, además, se identificaron tres grupos de *Ceratobasidium* sp. (Anamorfo = *Rhizoctonia* binucleada) en 31,3 % de ellos. *Waitea* sp. (Anamorfo = *Rhizoctonia zae*) fue identificada en 0,6 % y por último se identificó el grupo de anastomosis AG4-HG1 en 0,6 %, los cuales no fueron computados en el análisis. Se analizaron 600 secuencias [300 de un solo sentido (Forward) y 300 secuencias en antisentido (Reverse)], comparada con una secuencia consenso de obtenida de la base de datos BLAST (NCBI, 1/11/05).

Un 95,5 % de las secuencias para ITS estuvieron completas, es decir, no hubo pérdidas de bases a lo largo del fragmento de 673-674 pb (pares de bases), solo se corrigió el 4,5 %. Se identificaron las deleciones, inserciones y mutaciones, para completar y agrupar las secuencias (contig). La distribución de haplotipos para el ITS'4/5 ADNr para el grupo AG1-IA está proporcionalmente representada en la Figura 3. En total se obtuvieron 14 haplotipos para los datos clones-correctados, destacándose el haplotipo H01 con 156 individuos, lo cual es indicativo de una mayor frecuencia y se representó en una caja cuadrada, mientras que los otros haplotipos presentaron un menor número de individuos, representados en pequeños óvalos (Figura 3).

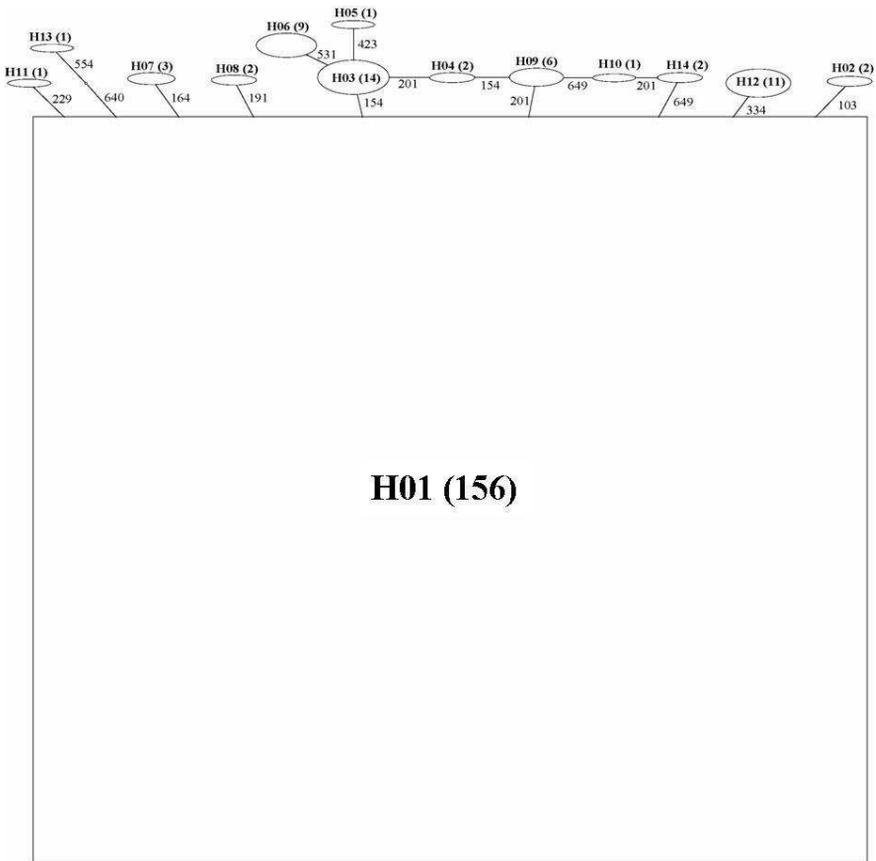


Figura 3. Resultados del análisis de ITS`4/5 realizado mediante el programa SEQUENCHER 4.2.2. Conectando las cajas se encuentran el número de la base de la secuencia de ADN (673-674 pb) donde ocurre la delección, inserción o mutación. El tamaño de los círculos / caja es proporcional a la frecuencia de haplotipos.

C. Contenido de información Microsatélite.

Un total de 211 aislados de *R. solani* (139 de arroz y 72 de maíz) fueron procesados. Las distribuciones de frecuencia del alelo por locus y por población pueden visualizarse en la Figura 4. Entre 3 y 9 alelos fueron encontrados por locus. A través de los 10 loci, el número total de alelos exclusivos fue nueve: cinco fueron detectados en arroz infectado por *R. solani* AG-1 IA y cuatro en la población de maíz infectado por la misma especie (Figura 4).

1. Diversidad clonal.

Hubo diferencias significativas en fracciones clonales entre poblaciones de *R. solani* aisladas del arroz y del maíz en el estado Portuguesa, Venezuela (Cuadro 1). En conjunto, 82 genotipos multilocus (GTML) fueron detectados en las poblaciones combinadas del arroz del estado de Portuguesa. Dentro del grupo que infecta el arroz, cada aislado muestreado del municipio Santa Rosalía presentó un genotipo diferente. En cambio, fracciones clonales más altas (que se extienden a partir de la 0,22 a 0,53) fueron observadas en las poblaciones que infectan el arroz en los municipios Turén y Esteller. Tres de los GTML observado en el arroz fueron encontrados en más de un campo, pero no se encontró ninguno del GTML que infecta el arroz en las poblaciones de *R. solani* derivadas del maíz. Dentro del grupo del maíz, todos los aislados de Esteller tenían diferentes GTML. Las fracciones clonales se extendieron a partir de la 0,13 a 0,25 en las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA de Santa Rosalía y de Turén.

Uno de los 61 GTML fue compartido entre campos de maíz, pero no hubo GTML en común con las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA que se originaron del arroz. Cuando se combinaron a las poblaciones en grupos por hospedante-específico, la diversidad genotípica fue significativamente más alta ($P = 0,05$) para la población que infecta el maíz ($G_o = 48,0$), que también presentó genotipos en mayor frecuencia (uniformidad = 0,79). En Santa Rosalía fue donde se encontró la población con la diversidad

genotípica más alta para ambas poblaciones hospedante-específica ($G_o = 27,0$ para el arroz y $G_o = 22,3$ para la que infecta el maíz).

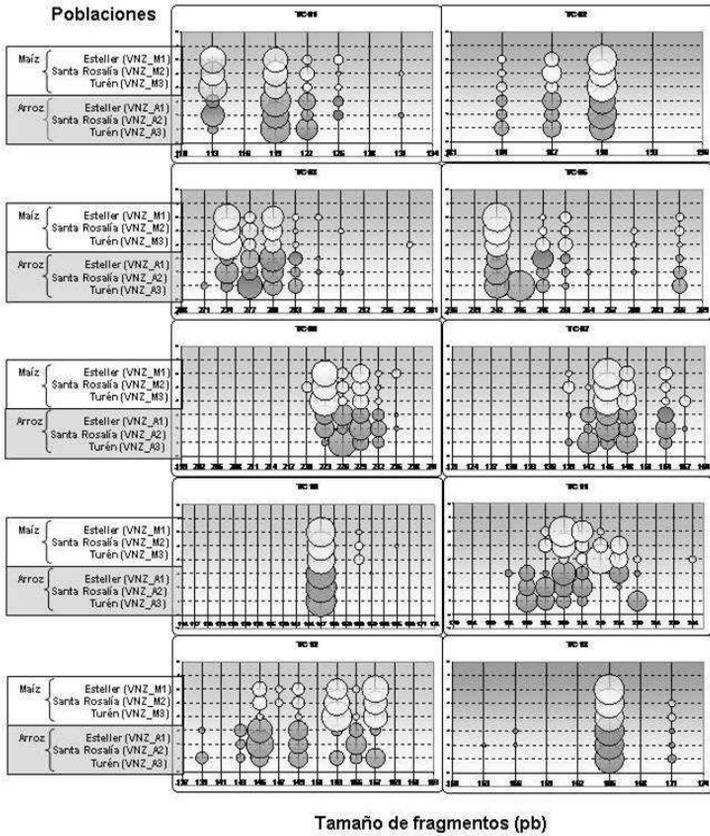


Figura 4. Distribución de la frecuencia de alelos para los 10 loci microsatélites en los seis campos de arroz y cinco campos de maíz infectados por *R. solani* AG1 IA en Portuguesa, Venezuela. Cada caja representa el locus microsatélite (TC01 hasta TC13). El tamaño del alelo para cada locus está representado en el eje de las X para cada caja. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de alelos, el color representa a la población en los distintos hospedantes (arroz = gris y el maíz = blanco), también se encuentra alineado a la izquierda con la fuente geográfica. El NA = número de alelos / locus se cuentan por cada línea horizontal.

Cuadro 1. Medida de la diversidad clonal total de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que infectan el arroz y el maíz en Portuguesa, Venezuela

Hospedante de la población de <i>R. solani</i> AG-1 IA	Localidad	Tamaño de muestra (N) ^a	Número de genotipos	Genotipos sitio específicos ^b	Fracción clonal	Diversidad Genotípica (G_0) ^{c,d}		Uniformidad ^{d,e}		
Infectiva de arroz	Poblaciones combinadas	139	82	82(0)	0,41	20,44	B	0,25	B	
	Turén	18	14	13(1)	0,22	8,53	e	0,61	c	
	Poblaciones individuales	Santa Rosalía	27	27	25(2)	0,00	27,0	a	1,00	a
		Esteller	94	44	41(3)	0,53	10,16	e	0,23	d
Infectiva de maíz	Poblaciones combinadas	72	61	61(0)	0,15	48,00	A	0,79	A	
	Turén	24	18	17(1)	0,25	13,71	d	0,76	bc	
	Poblaciones individuales	Santa Rosalía	32	28	27(1)	0,13	22,26	b	0,80	b
		Esteller	16	16	16(0)	0,00	16,00	c	1,00	a
		Total	211	143						

^a N, tamaño de muestra de cada población.

^b Número de genotipos compartidos con otra(s) poblaciones se muestran en paréntesis.

^c La diversidad genotípica conocida como diversidad de Stoddart fue calculada de acuerdo a Stoddart (1983).

^d Las medias están seguidas por letras mayúsculas en las poblaciones combinadas y en las poblaciones individuales por minúsculas; diferentes letras indican diferencias significativas ($P = 0,05$) para clonalidad basada en la prueba de muestreo con reemplazo (pairwise bootstrap test). Los índices de diversidad entre poblaciones; fueron sub-muestreadas a 1.000 permutaciones para comparar el tamaño de las poblaciones pequeñas.

^e Un valor de uniformidad igual a 1,00 indica que todos los genotipos presentaron igual frecuencia.

2. Distribución jerárquica de la diversidad genética y diferenciación entre poblaciones de hospedantes.

El AMOVA indicó que en estas tres localidades del estado Portuguesa, las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA que infectan el arroz fueron significativamente diferentes a las poblaciones que infectan el maíz ($\Phi_{ST} \approx 0,17$; $P \leq 0.001$; Cuadro 2). Las comparaciones en parejas entre las poblaciones individuales que infectan el arroz y de las que infectan el maíz indicaron grados de subdivisión en los tres municipios (pair-wise Φ_{ST} se extendió de 0,16 a 0,22; $P \leq 0.001$). Las comparaciones dentro de grupos también indicaron subdivisión entre las poblaciones que infectan el arroz ($\Phi_{ST} \approx 0,03$; $P \leq 0,05$) y entre las poblaciones que infectan el maíz ($\Phi_{ST} \approx 0,06$; $P \leq 0.001$) de las tres localizaciones (cuadro 2). Sin embargo, estos valores (Φ_{ST} dentro de grupos fueron significativamente más bajos que los observados para las comparaciones entre grupos [los valores de t se extendieron de 3,16 ($P = 0,034$) a 5,67 ($P = 0,005$)].

3. Pruebas del equilibrio gamético de Hardy-Weinberg (HWE).

Las poblaciones que infectan el arroz demostraron desviaciones significativas de HWE para diversos loci, el HWE fue rechazado en 12 de 28 pruebas en las poblaciones individuales. Cuando las tres poblaciones de *R. solani* AG-1 IA que infectan el arroz fueron combinadas, solamente tres de 10 loci estaban en HWE. En maíz, para las tres poblaciones ocho de los 10 loci estaban en HWE (Cuadro 3). Al usar la prueba del índice de asociación (I_A), se rechaza la hipótesis nula de asociaciones al azar entre loci para todas las poblaciones del arroz, individualmente o combinadas. En cambio, el equilibrio gamético no fue rechazado para las poblaciones que infectan el maíz de Turén y Santa Rosalía.

Después de reunir las tres poblaciones del maíz, no se detectó ninguna desviación del equilibrio gamético (I_A no significativo). También se examinó el desequilibrio gamético en cada población mediante pruebas en parejas entre loci basados en MCMC. Se eligió un valor $P \leq 0,05$ como nivel para la significación y se utilizó el

porcentaje de los valores significativos del desequilibrio como medida de desequilibrio total (Cuadro 3). La proporción de loci con desviaciones significativas del equilibrio en parejas se extendió a partir de 25 a 55,6% dentro de los grupos que infectaban el arroz y a partir el 8,9 a 22,9% en el grupo que infectaban el maíz.

Cuadro 2. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para distribución jerárquica de la diversidad genética y comparación en pares de poblaciones de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que infectan el arroz y el maíz en Portuguesa, Venezuela^a.

Contrastes	Fuente de variación	gl	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Φ_{ST}^b	Valor P
<i>R. solani</i> Infeccivas de arroz vs infeccivas de maíz	Entre grupos	1	2,94	13,95	0,1728	0,001
	Dentro de grupos entre poblaciones	4	0,70	3,33		
	Dentro de poblaciones	288	17,42	82,72		
	Total	293	21,06			
Poblaciones dentro de grupos infeccivos de arroz	Entre poblaciones	2	0,60	2,97	0,0297	0,020
	Dentro de poblaciones	167	19,57	97,03		
	Total	169	20,17			
Poblaciones dentro de grupos infeccivos de maíz	Entre poblaciones	2	0,86	5,59	0,0559	0,001
	Dentro de poblaciones	121	14,46	94,41		
	Total	123	15,32			

^a Análisis AMOVA (Analysis of Molecular Variance) realizado con el programa Arlequin v.3.0 (Excoffier et al., 1992; Excoffier et al., 2005).

^b El método de distancia está basado en la suma de cuadrados del tamaño de las diferencias (R_{ST}) entre dos haplotipos, para la data de microsatélite de acuerdo con Slatkin (1995); número de permutaciones = 1.023

Cuadro 3. Pruebas de Hardy-Weinberg y equilibrio genotípico para poblaciones de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que infectan el arroz y el maíz en Portuguesa, Venezuela.

Hospedantes de Poblaciones de <i>R. solani</i> AG-1 IA	Localidades	Clones corregidos N	Número de loci bajo HWE ^a	I_A ^b	Valor P ^c	Pares de loci en desequilibrio significativo ^d	%
Infectivas de Arroz	Poblaciones combinadas	82	3/10	1,042	<0,001	22/45	48,9
	Poblaciones individuales						
	Turén	14	7/9*	1,390	<0,001	9/36	25,0
	Santa Rosalía	27	5/9*	1,621	<0,001	21/36	55,6
	Esteller	44	4/10	1,105	<0,001	23/45	51,1
Infectivas de maíz	Poblaciones combinadas	61	8/10	0,261	0,052	13/15	28,89
	Poblaciones individuales						
	Turén	18	9/10	0,422	0,075	8/45	17,8
	Santa Rosalía	28	8/10	0,250	0,0196	4/45	8,9
	Esteller	16	9/9*	0,471	0,005	8/35	22,9

^a La prueba de HWE fue desarrollada de acuerdo a una prueba análoga a la prueba exacta de Fisher, usando una cadena Markov con longitud de predicción de 100,000 (Guo y Thompson, 1992); * un locus fue monomórfico.

^b I_A es un índice de desequilibrio gamético multilocus (para la asociación al azar de alelos entre distintos pares de loci) (Maynard et al., 1993).

^c Prueba H_0 = panmixia completa basada en 1000 aleatorizaciones; para la data diploide, los dos alelos de un locus están soportados juntos (la asociación entre alelos de un locus son mantenidos aleatoriamente en el conjunto de datos) de este modo la prueba es meramente para asociaciones entre loci (Agapow y Burt, 2001).

^d Número de loci apareado con desequilibrio significativo de acuerdo a la prueba exacta de Fisher (prueba de probabilidades) usando cadena de Markov con 1000 tandas y 1000 repeticiones / tanda, implementado por Genepop (Raymond y Rousset, 1995).

4. Prueba para los efectos del fundador o los embotellamientos (cuello de botella).

Bajo el modelo de mutación gradual (SMM) de la evolución, no se observó ninguna desviación del equilibrio neutral para todas las poblaciones que infectan el arroz (Cuadro 4). Todas las poblaciones derivadas del maíz demostraron deficiencia significativa del heterocigoto comparada con el equilibrio esperado deriva-mutación bajo SMM usando la prueba de los signos o la prueba de Wilcoxon. Este resultado es consistente con una reciente expansión de la población.

Cuadro 4. Prueba de Cornuet y Luikarts (1996) para los efectos de embotellamientos (desviación del equilibrio neutral) bajo el modelo de mutación gradual de evolución para microsatélites en poblaciones de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA que infectan el arroz y el maíz en Portuguesa, Venezuela.

Poblaciones de <i>R. solani</i> AG-1 IA	Localidades	Probabilidad ^a			Interpretación
		Prueba de signos	Exceso H ^b	Deficiencia H _b	
Infectivas de arroz	Poblaciones combinadas	0,41	0,75	0,28	No hubo desviación
	Poblaciones individuales				
	Turén	0,55	0,29	0,75	No hubo desviación
	Santa Rosalia	0,28	0,63	0,41	No hubo desviación
	Esteller	0,41	0,65	0,38	No hubo desviación
Infectivas de maíz	Poblaciones combinadas	0,003	1,00	0,001	Desviación (deficiencia de H signos y Wilcoxon)
	Poblaciones individuales				
	Turén	0,003	1,00	0,001	Desviación (similar a la combinada)
	Santa Rosalia	0,07	0,99	0,016	Desviación (sólo para Wilcoxon)
	Esteller	0,0004	1,00	0,001	Desviación (similar a la combinada)

^a Las Probabilidades de dos pruebas (Prueba de los signos y prueba de Wilcoxon) fueron calculadas usando el programa Bottleneck (Piry et al., 1999).

^b Prueba de Wilcoxon de una cola para el total del exceso o deficiencia heterocigosis.

^c Proporción de loci con heterocigosis (H) exceso H / deficiencia H: 1 / 9.

5. Pruebas para la migración histórica, parámetros demográficos y tamaño de fluctuación de la población.

El parámetro Θ fue utilizado como medida relativa del tamaño efectivo de la población. Ambas poblaciones, las que infectan el arroz y las que infectan al maíz en las localidades de Portuguesa, tenían estimaciones similares del tamaño de la población ($\Theta = 0,95$ a $0,99$). Las estimaciones del flujo direccional de genes indicaron la migración histórica simétrica entre las poblaciones que infectan el arroz y las que infectan el maíz [tasa de migración $4Nm_{\text{arroz} \rightarrow \text{maíz}} = 2,31$ (C.I._{95%} = $1,90 - 2,74$) y $4Nm_{\text{arroz} \rightarrow \text{maíz}} = 2,76$ (C.I._{95%} = $2,33 - 3,31$)]. La estimación más probable para la tasa de crecimiento g fue $9,7$ (C.I._{95%} = $6,04 - 11,5$) y $6,8$ (C.I._{95%} = $1,45 - 8,22$) para las poblaciones que infectan el arroz y para las que infectan el maíz, respectivamente.

III. DISCUSIÓN.

En los resultados de secuenciación y análisis de la región ITS 5.8S ADNr de aislados de *Rhizoctonia* spp, se identificó a *R. solani* AG-1 IA en el 92,6 % de los aislados de arroz caracterizados (139/150), pero no se descarta que al analizar el resto de los aislados no procesados puedan identificarse otras especies de *Rhizoctonia*. Por otra parte, *R. oryzae* (teleomorfo = *Waitea*) produce manchas en la vaina y también *R. oryzae-sativae* (teleomorfo = *Ceratobasidium*), ambos tienen menor relevancia en el desarrollo de la enfermedad del añublo de la vaina (Ou, 1985). En consecuencia, el diagnóstico de estas enfermedades en campo es extremadamente difícil y a menudo inseguro, sobre todo en las etapas tempranas del desarrollo de las lesiones cuando se deben implementar medidas para su control.

Por lo anterior, es esencial la identificación precisa del patógeno para asegurar el éxito en los programas de mejoramiento para resistencia a esta enfermedad y en el uso eficaz de fungicidas y controladores biológicos. En esta investigación se usó con éxito la secuenciación del ITS 5.8S ADNr para identificar las especies de *Rhizoctonia* del arroz y su grupo de anastomosis, coincidiendo con los resultados de trabajos

similares (Bernardes de Assis et al., 2008; Bernardes de Assis et al., 2009; Ciampi et al., 2007).

En los aislados de *Rhizoctonia* spp derivados de maíz se logró identificar a *R. solani* AG-1 IA (67,3%) *R. zea* (teleomorfo = *Waitea circinata*) en baja proporción (0,6%), *R. binucleada* (teleomorfo = *Ceratobasidium* spp) con 31, 3% y al grupo de anastomosis AG-4 HG1 (0,6%). Los resultados de esta investigación coinciden parcialmente con los obtenidos por Li et al. (1998) en un estudio realizado en 33 localidades representativas de la provincia de Sichuan-China. Estos autores lograron identificar a *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (71,6%), *R. zea* (16,3%), *R. binucleada* (1,4 %) y AG-4 (9,6%) usando el método convencional de anástomosis mediante microscopio de luz; a diferencia de los resultados de esta tesis, además ellos identificaron a *R. solani* AG-1 IB (2,1%) y AG-5 (4,2%). Por la proporción alcanzada por *R. binucleada* en este estudio, se presume que esta especie de *Rhizoctonia* es importante en el complejo de la enfermedad mancha bandeada del maíz en Venezuela.

Antes de discutir la riqueza alélica obtenida, es importante señalar que hasta hace poco no existían marcadores microsátélites (SSR) codominantes disponibles para estudios de genética, la ecología y la evolución de poblaciones de este hongo dicariótico (Zala et al., 2007). Es la primera vez que se usan dichos marcadores en esta investigación y en trabajos recientes realizados en estudios poblacionales de *R. solani* AG-1 IA del arroz en USA (Bernardes de Assis et al., 2008) y en China (Bernardes de Assis et al., 2009), los cuales fueron también útiles para el genotipaje *R. solani* AG-1 IA que infecta la soya en Brasil (Ciampi et al., 2008), considerándose este último un grupo filogenéticamente distinto dentro de AG-1 IA con base al análisis ITS 5.8S ADNr (Ciampi et al., 2005).

El alto polimorfismo en los loci microsátélites usados en esta investigación demuestran la diversidad en poblaciones de *R. solani* AG-1 IA que infectan el maíz en Portuguesa, corroborando los resultados obtenidos Zala et al. (2007), quienes desarrollaron y estandarizaron 10 marcadores SSR los cuales se aplicaron a un

pequeño número de aislados de *R. solani* de maíz provenientes de Venezuela (caracterizados en esta tesis) y en aislados de arroz de Louisiana (USA). El promedio de número de alelos detectados en Louisiana fue de 5,7 a través de todas las poblaciones, un mínimo de cuatro y un máximo de ocho alelos diferentes fueron detectados. Para el total de las poblaciones, la heterocigosis esperada varió de 0,53 a 0,57. La mayoría de los 45 locus apareados (de 86,7% a 93,3%) estuvieron en equilibrio gamético en la población. De dos a cuatro loci se apartaron de las proporciones de HWE en poblaciones que infectaban el maíz y el arroz, respectivamente.

En esta investigación se obtuvo una mayor diversidad genotípica (82/139) multilocus SSR en la población derivada de arroz en Venezuela comparada con la de Texas (USA) analizada por Rosewich et al. (1999). Los mencionados autores encontraron 36 multilocus RFLP de 182 aislados examinados en la población de *R. solani* AG-1 IA derivada de arroz, caracterizada por un mayor flujo de genes y evidencias de recombinación sexual. Asimismo, los resultados de esta tesis difieren a los encontrados en poblaciones de la India, la cual estuvo caracterizada por una moderada dispersión de clones, con evidencias de reproducción sexual (Linde et al., 2005).

La muestra para esta investigación fue más representativa de la población total de *R. solani* derivada del maíz en Portuguesa, que la analizada por Zala et al. (2007). La alta diversidad genotípica encontrada en los aislados de *R. solani* derivados del arroz en Portuguesa es similar a la encontrada en Louisiana y Texas por Bernardes de Assis et al. (2008) en aislados *R. solani* AG-1 IA provenientes de arroz y soya. Demostrando la diferenciación significativa entre poblaciones de *R. solani* AG-1 IA infectivas del arroz y de maíz. Se encontró que la población de *R. solani* infectiva del arroz en Portuguesa experimenta la reproducción sexual con menos frecuencia que las poblaciones que infectan el arroz en Texas (Bernardes de Assis et al., 2008; Rosewich et al., 1999), Louisiana (Bernardes de Assis et al., 2008) y la India (Linde et al., 2005) o a la población que infecta el maíz en Portuguesa. La reproducción

asexual aparentemente hace una contribución más grande a la estructura de la población derivada del arroz en Portuguesa, sugiriendo que los esclerocios flotantes en arroz probablemente juegan un papel mayor en el desarrollo epidémico que las basidiosporas.

Una muy diferente estructura de población fue observada para las poblaciones *R. solani* AG-1 IA que infecta el maíz en Portuguesa. La fracción clonal observada fue más pequeña, extendiéndose desde 0% hasta el 25% después de la corrección clonal en dos de las poblaciones que infecta el maíz donde se observó recombinación de la población en su estructura, incluyendo una alta proporción de loci en HWE y bajo desequilibrio gamético. Esto indica que las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA que infecta el maíz en Venezuela experimentan regularmente la recombinación sexual, sugiriendo que las basidiosporas pueden desempeñar un papel significativo en la epidemiología de la enfermedad, tal como ocurre en poblaciones de *R. solani* derivadas del arroz en otras partes del mundo (Bernardes de Assis et al., 2008; Linde et al., 2005; Rosewich et al., 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos, existe una estructura de población que incluye la reproducción asexual en las poblaciones de *R. solani* derivada de arroz y sexual en la derivada de maíz. Después de la corrección clonal, del 40-67% de los loci tuvieron HWE pero el desequilibrio gamético todavía fue observado en estas poblaciones (el I_A fue significativo y 25 a 56% de locus apareados en desequilibrio). Otra causa posible del desequilibrio gamético es la deriva genética causada por los embotellamientos o los efectos del fundador (McDonald, 1997), pero no se encontró ninguna evidencia de heterocigosis reducida asociada a los embotellamientos.

Los resultados del análisis de varianza molecular entre poblaciones de *R. solani* AG-1 IA indicaron divergencia significativa entre hospedantes. Aunque fue observada una significación menor de subdivisión ($\Phi_{ST} = 0,03 - 0,04$) entre las poblaciones que infectan el arroz y entre dos de las poblaciones que infectan el maíz ($\Phi_{ST} = 0,07-0,08$). De esta manera, se rechaza la hipótesis de la no subdivisión entre diversas

poblaciones de *R. solani* AG-1 IA dentro de hospedantes de Poaceas. Sin embargo, se encontró evidencia de la migración histórica simétrica entre las poblaciones que infectan el arroz y las que infectan el maíz, sugiriendo el intercambio histórico de emigrantes y solamente la aparición reciente de la subdivisión entre las poblaciones que infectan el arroz y las que infectan al maíz. Estos resultados difieren de los encontrados por Bernardes de Assis et al. (2008) quienes detectaron migración histórica asimétrica en el patosistema *Rhizoctonia*-arroz-soya en USA.

Esta probabilidad, se debe presumiblemente, al continuo monocultivo del maíz que se ha practicado durante las últimas décadas en anteriores áreas arroceras (Cabrera, 2001), lo que ha llevado a la aparición de poblaciones divergentes del patógeno en el estado de Portuguesa. Esta hipótesis debería ser sustentada; por ejemplo, comprobando la tradición de la siembra de estos cereales en las fincas que fueron muestreadas. La divergencia podría ser debido a la especialización del hospedante o por diversos factores ambientales tales como el sistema de cultivo; por ejemplo, el arroz se cultiva bajo condiciones de inundación (Cedeño et al., 1996) y el maíz en áreas de secano (Fontana y González, 2000). La divergencia podría también ocurrir si las poblaciones fueron originadas en campos de maíz de otra cosecha o localidad y donde no intervinieron las poblaciones locales del arroz de Portuguesa. Otra posible causa sea que, cada año un número significativo de híbridos de maíz son sembrados en las zonas maiceras de Portuguesa (Fontana y González, 2000), lo cual podría contribuir a la variación de la población de *R. solani* derivada del maíz por la constante presión de selección ejercida (McDonald, 1997).

Bajo el modelo de mutación gradual (SMM), ninguna de las poblaciones de maíz demostraron exceso de heterocigosis, pero si algo de deficiencia de heterocigosis. Se postula que la deficiencia observada en heterocigotos refleja una extensión reciente de la población ($g = 6,8$). Si la selección ocurrió en las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA infectivas de arroz ya presente en estas áreas, habría podido causar inicialmente una reducción significativa del tamaño de la población de *R. solani* infectivas de maíz. Así, las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA del maíz habrían podido alcanzar un

equilibrio más bajo de deriva-mutación después de un embotellamiento inicial, pero podría luego ampliarse (Hartl y Clark, 1997). Bajo este panorama, el actual exceso de homocigosis observada sería reducido eventualmente en el tiempo por la generación de nuevos genotipos con la recombinación.

R. solani AG1-IA se considera endémico en Venezuela, ocurriendo en todas las regiones donde se cultiva el arroz (Cedeño et al., 1996). Puesto que no hay evidencia que las poblaciones que infectan de arroz han experimentado embotellamientos recientes, se postula que las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA han aumentado de tamaño desde la introducción del cultivo del arroz en Portuguesa, la cual data desde mediados del siglo pasado (Malaguti, 1951). El resultado del análisis apoya el crecimiento exponencial histórico para la población de *R. solani* AG-1 IA que infecta el arroz en Portuguesa ($g = 9,7$) y la conformación de una estructura más reciente para las poblaciones de *R. solani* derivadas del maíz, coincidiendo cronológicamente con el primer señalamiento de la enfermedad mancha bandeada (Cardona et al., 1999).

IV. CONCLUSIONES.

Existe alta diversidad genética en las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA derivadas del arroz y del maíz de Portuguesa, Venezuela. No existe flujo de genes entre las poblaciones de *R. solani* que infectan el arroz y las que infectan el maíz, por tanto, existen divergencias entre ellas. Las poblaciones de *R. solani* derivadas de arroz se reproducen de manera predominantemente asexual mientras que las derivadas de maíz tienen reproducción mixta con evidencia de recombinación o posible intervención de la fase sexual. Se encontró evidencia de la migración histórica simétrica entre las poblaciones de *R. solani* que infectan el arroz y las que infectan el maíz, sugiriendo el intercambio histórico de emigrantes y solamente la aparición reciente de la subdivisión entre las poblaciones de *R. solani* que infectan el arroz y las que infectan al maíz. Estos hallazgos señalados por primera vez, representan un avance en el conocimiento de las poblaciones de *R. solani* que infectan al maíz y al arroz en el estado Portuguesa.

Capítulo 3

VIRULENCIA Y ESPECIFICIDAD DE CEPAS DE *Rhizoctonia solani* AG-1 IA DERIVADAS DEL ARROZ Y MAÍZ, BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO Y UMBRÁCULO

I. MATERIALES Y MÉTODOS.

A. Reactivación de aislados y preparación de inóculo.

Los aislados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA utilizados para este ensayo fueron seleccionados por pertenecer a las muestras apareadas geográficamente (Figura 1) provenientes de diferentes campos de arroz y de maíz, asegurando de esta manera la representatividad de las muestras. Los aislados fueron caracterizados molecularmente (González-Vera et al., 2010), resultando cada aislado como un haplotipo o genotipo multilocus (GTML) diferente. La identificación de los aislados y su correspondiente haplotipo (entre paréntesis) se indican a continuación:

1. Para arroz fueron evaluados 12 aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz: A1F2(48), A5F2(115), A5C4(109), A2C2(60), A4D4(91), A5B4(64), A6D3(117), A4F1(94), A3D5(70), A1E3(47), A1A5(44), A1A3(43).

2. Para maíz fueron evaluados 11 aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz: M1F2(128), M4H5(177), M2D4(147), M5A1(182), M3E1(155), M3I4(163), M4H1(175), M1H1(134), M2B1(129), M5C5(187). Adicionalmente, se evaluó un aislado testigo identificado como P2AB2, cuyo AG también fue identificado mediante PCR (Perdomo et al., 2007). Todos los ensayos fueron conducidos en los laboratorios y umbráculos de Fundación Danac, ubicada a 10°21'50" LN y 68°59'15" LO en San Javier estado Yaracuy, Venezuela.

Para las pruebas en umbráculo, esclerocios de *R. solani* infectivos de arroz o de maíz almacenados asépticamente a 4 °C, fueron reactivados colocando un esclerocio por plato Petri con medio PDA (papa-dextrosa-agar) e incubados a 30 °C en oscuridad

durante cinco días. En las pruebas de laboratorio, se depositaron 100 g de arroz pulido en una bolsa de plástico resistente a autoclave y se añadió 30 ml de agua destilada; se esterilizó a 121 °C durante 20 min y se dejó enfriar. Bajo condiciones asépticas se introdujeron 10 discos de PDA colonizados con los aislados correspondientes y se dejaron incubar en cámara de crecimiento con luz continua durante 8 días a 27 °C y 68% de humedad relativa (HR) promedio (termohigrógrafo OAKTON mod. 08369-70).

B. Selección y siembra de cultivares de arroz y líneas de maíz.

Las variedades de arroz y las líneas de maíz fueron seleccionadas por presentar diferentes grados de susceptibilidad, señalados en la literatura.

1. En arroz se seleccionaron como cultivares con alto nivel de resistencia o resistencia a ‘Jefferson’ (Kloesterboer, 1999), ‘Tetep’ (Groth and Nowick, 1992), ‘Amistad 82’ (Martínez et al., 2005), ‘Jasmine 85’ (Jia et al., 2007), ‘Remadja’ (Prado et al., 2001), mientras que como cultivar susceptible se seleccionó a ‘Lemont’ (Bollich et al., 1985; Li et al., 1995). Toda la fuente de semilla fue tomada del Banco de Germoplasma de Arroz (BGA) de Fundación Danac. Seis semillas fueron sembradas en potes plásticos tipo A12 con tierra estéril, se ralearon y se dejaron tres plántulas por pote. Para las pruebas de inoculación cruzada se dejaron 2 plantas/pote.

2. En maíz se seleccionaron como líneas resistentes a ‘CML-1’ (Kumar y Singh, 2002), ‘CML-55’ y ‘CML-254’ (Vasal et al., 1999), líneas resistentes del programa de mejoramiento de maíz de Danac ‘03MN06A-5-3-2’, ‘03MN04A-2-2-1’ y ‘80702-1-1-1’. Como línea susceptible a 82201-25-1-1 y el híbrido D-3273 usado en las pruebas de inoculación cruzada. Todos los genotipos de maíz fueron suministrados por el Banco de Germoplasma de Maíz (BGM) de Fundación Danac. Dos semillas por punto fueron sembradas en bandejas (3 m x 1,20 m x 0,20 m) con tierra estéril a una densidad de 14 cm x 14 cm, se ralearon y se dejó una planta por punto de siembra. Dos semillas por pote (A12) fueron sembradas en potes con tierra para las pruebas de inoculación cruzada.

C. Inoculación de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de laboratorio.

El método de laboratorio (Ahuja y Payak, 1981) modificado por Perdomo et al. (2007) fue usado en hojas sanas de plántulas de 30 días de edad de seis cultivares de arroz y de siete líneas de maíz cortadas en trozos de 6 cm, dos trozos fueron colocados en platos Petri con dos compartimientos (uno por compartimiento), el cual contenía 10 ml de solución de cinetina a 2 ppm. Se inocularon colocando un grano de arroz colonizado con el aislado correspondiente sobre la superficie adaxial cerca de la vena en el centro del segmento de la hoja, se incubaron durante 48 h a temperatura ambiente (27 °C, promedio). La evaluación se hizo a las 48 h utilizando la escala diagramática propuesta por Ahuja and Payak (1981) para evaluar la reacción de germoplasma a la mancha bandeada del maíz.

El diseño utilizado fue completamente al azar con cuatro observaciones (repeticiones) y la unidad experimental fue de dos trozos de hoja/plato, con un arreglo factorial del aislado correspondiente por cultivar arroz ($12 \times 6 + 1$) o línea de maíz ($11 \times 6 + 1$), más un testigo inoculado con un grano de arroz estéril. Al igual que los ensayos subsiguientes la aleatorización de tratamientos fue realizada con el programa FIELDBOOK (El programa de maíz del Cimmyt, 1999). El análisis de la varianza de aislados, cultivar de arroz/línea de maíz y la interacción se hizo con el programa Infostat versión 1.1. (Infostat, 2002).

Para identificar el aislado de *R. solani* más confiable, se tomó como criterio un índice para medir la dureza del grano en trigo aplicado por Meppelink et al. (1967), de forma tal que se estableció el coeficiente D/S, donde D = rango fue la diferencia entre el máximo grado de enfermedad (Máx) y el mínimo grado de enfermedad (Mín), de acuerdo a la escala de evaluación, considerándose el valor de S igual a la desviación estándar de los datos. Con base a esta expresión, el resultado de mayor valor de este cociente fue el aislado(s) de mayor confiabilidad al considerar el D y el S estadístico.

Otro índice Iev (índice de espectro de virulencia) dado por la expresión: $I_{ev} = R(\text{sus})/R(\text{res})$; donde R (sus) o rango de susceptibilidad = (grado Máx-2,5) +1 y R (res) o rango de resistencia = (2,5-grado Mín)+1 fue aplicado para seleccionar el aislado de *R. solani* más confiable, el cual estimó la consistencia de los testigos de acuerdo a su reacción esperada. La constante 2,5 fue tomada arbitrariamente por ser el valor intermedio de la escala de severidad con valores del 0-5 diseñada por Ahuja y Payak (1981), por lo que toda reacción por encima o por debajo de ese valor, se consideró como indicador de clases de resistencia distinta. El grado máximo y el grado mínimo fue aportado por los valores de estadística descriptiva, el 1 ($(2,5/2,5) = 1$) fue un valor arbitrario que se le suma al cociente de R (sus) y R (res) para eliminar la posibilidad del valor 0. Cuando el cociente dió negativo se consideró el valor absoluto y el aislado quedó fuera de selección por la poca capacidad de discriminación.

D. Inoculación de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de umbráculo.

1. El método de microcámaras de Jia et al. (2007) para medir la reacción el añublo de la vaina de arroz, fue usado para inocular plántulas de arroz (3-4 hojas) en la primera hoja basal con discos de PDA de 8 mm de diámetro, colonizados con micelio de *R. solani* AG-1 IA infectivas de arroz, luego fueron cubiertas con botellas plásticas transparentes (2-3 L) para mantener la humedad. Después de ocho días se evaluaron tres plantas / pote usando el índice calculado como longitud de la lesión dividida por la longitud del culmo en mm multiplicado por nueve. El diseño del experimento fue completamente al azar con cuatro observaciones y un arreglo factorial ($12 \times 6 + 1$) = (aislados x cultivares + testigo inoculado sólo con discos de PDA). Se calculo el D/S y el Iev, este último fue modificado en el valor de la constante, tomando el valor arbitrario medio del índice de Jia et al. (2007) como 4,5. El valor más alto del Iev, indicó que el aislado(s) fue el más confiable para medir la reacción de susceptibilidad, considerando al genotipo más resistente.

2. El método de inoculación de plántulas de maíz en umbráculo (Perdomo et al., 2007) fue modificado para inocular plántulas de maíz de 15 días edad, colocando en la hoja cotiledonal un disco de PDA de 8 mm de diámetro, colonizado con micelio de *R. solani* AG1-IA infectiva de maíz. La evaluación se llevó a cabo a los ocho y a los 15 días después de la inoculación, la Altura de la Mancha (AM) fue medida en cm, de la misma manera la Altura de la Plántula (AP) considerando el ultimo nudo distal, para después calcular el Avance Relativo de la Mancha en %, mediante la expresión: $\text{Avance (\%)} = (\text{AM}/\text{AP}) * 100$. El diseño fue de bloques completos al azar con dos repeticiones y la unidad experimental de seis plantas por parcela, con arreglo factorial (10 x 7). Se realizaron dos evaluaciones, una a los 8 días de inoculado (ddi) y otra a los 15 días. Se calculó el D/S y el Iev para el espectro de virulencia, cambiando la constante por el valor 50 (mitad de 100%) y el $\text{Iev} = \text{R (sus)}/\text{R (res)} + 1 * 10$.

E. Inoculación cruzada de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de umbráculo.

Nueve aislados de *R. solani* infectivos de maíz [M2B1(129), M1D2(130), M1H1(134), M1J3(140), M2D4(147), M3D1(152), M3E1(155), M3F1(156), M4A5(168)] y 10 aislados de *R. solani* infectivos de arroz [A1A3 (43), A1A5(44), A1F2(48), A2C2(60), A5B4(64), A3D5(70), A4D4(91), A4F1(94), A5C4(109), A6D3(117)] fueron reactivados en PDA y luego multiplicados en arroz estéril. Se tomó 1 g de arroz colonizado que fue mezclado con el suelo cerca de la base de plántulas sanas de arroz o maíz de 15 días de edad (Pineda et al., 2005), los aislados *R. solani* infectivos de maíz fueron colocados en la base de la plántula de arroz y viceversa. Las plántulas infestadas fueron cubiertas con una botella plástica de 2 L que funcionó como cámara húmeda y se incubó por ocho días a una temperatura de 30° C y 71 HR promedio (termohigrógrafo OAKTON mod. 37250-10).

El diseño fue completamente al azar con tres y cuatro observaciones (repeticiones) para maíz y arroz, respectivamente. La unidad experimental fue de 2 plántulas de arroz o maíz/pote. El avance de la lesión se midió en mm a los ocho días de inoculado y se estimó el índice (Jia et al., 2007). El experimento fue repetido dos

veces en el tiempo. El análisis de varianza fue desarrollado usando el programa estadístico SAS (version 9.1 of the SAS System for Windows; SAS Institute Inc., Cary, NC). Los contrastes ortogonales fueron calculados por PROC MIXED y CONTRAST, se estimaron dos contrastes de interés.: i) tratamientos inoculados versus no inoculados y ii) aislados derivados de maíz versus aislados derivados de arroz.

II. RESULTADOS.

A. Inoculación de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de laboratorio.

1. Inoculación de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz. Los datos cumplieron con los supuestos del análisis de la varianza (ANAVAR). En el Cuadro 5, se muestran las diferencias altamente significativas para el modelo, para los cultivares, entre los aislados de *R. solani* inoculados y la interacción cultivar por aislado. Esto fue indicativo que el modelo es capaz de explicar la hipótesis en cuanto a que existen diferencias entre las variables probadas.

En la Figura 5, en la prueba de medias de Tukey ($P = 0,05$) se conformaron nueve grupos. Sin embargo, del grupo 'c' hasta 'def' promediaron un valor de escala cercano 2,8, por lo cual existen mínimas diferencias en virulencia entre los aislados de estos grupos. El menor valor de la escala lo presentó A4D4 (91), presentando el testigo (discos de PDA sin colonizar) un valor 0 en la escala visual (1-5). Se identificaron dos aislados de virulencia alta A5F2 (115) y A5C4 (109) con valores que superan a 3,8.

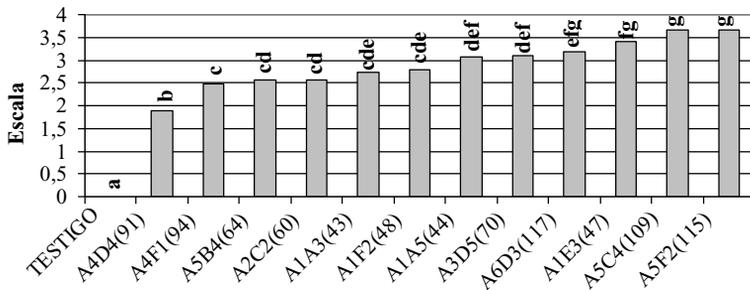
En la Figura 6, se formaron cuatro grupos homogéneos (Tukey, $P = 0,05$), son mínimas las diferencias en susceptibilidad entre los cultivares de arroz, promediando valores cercanos a 2,7 lo que es indicativo de susceptibilidad intermedia. No obstante, 'Jefferson' mostró valores promedios de 2,3 siendo el menos susceptible y 'Lemont' y 'Jasmine 85', los más susceptibles con valores promedios de 2,9.

Cuadro 5. Análisis de la Varianza (SC Tipo III) para virulencia de cepas de *R. solani* AG-1 IA infectivas de arroz bajo el método de Laboratorio modificado.

F.V. (fuente de variación)	SC	gl	CM	F	Valor p	R ²	R ² Aj	CV
Modelo	317,51	77	4,12	13,44	<0,0001	0,82	0,75	20,52
Aislado	262,14	12	21,84	71,22	<0,0001			
Cultivar	17,32	5	3,46	11,30	<0,0001			
Aislado*Cultivar	38,05	60	0,63	2,07	0,0001			
Error	71,78	234	0,31					
Total	389,29	311						

SC = Suma de Cuadrados; gl = grados de libertad; CM = Cuadrados Medios; F = Probabilidad de Fisher; Valor p = significancia o no significancia al valor de Alfa: 0,05; R² = R cuadrado; R² Aj = R cuadrado ajustado; CV = coeficiente de variación.

Letras distintas indican diferencias significativas. Tukey Alfa: 0,05 DMS: 0,54412



Aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz

Figura 5. Virulencia de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz inoculados bajo condiciones de laboratorio modificado.

Letras distintas indican diferencias significativas Tukeyv Alfa: 0.05 DMS: 0.31628

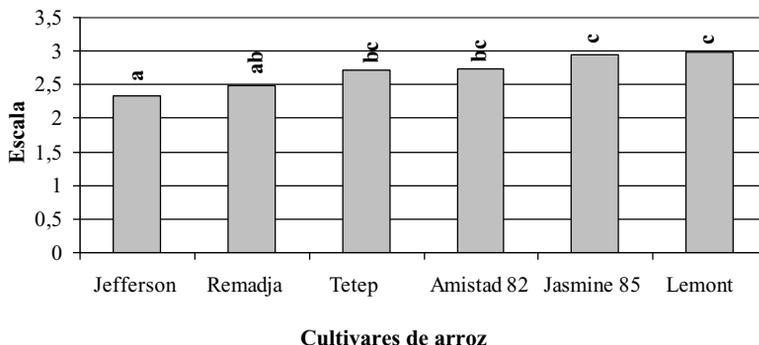


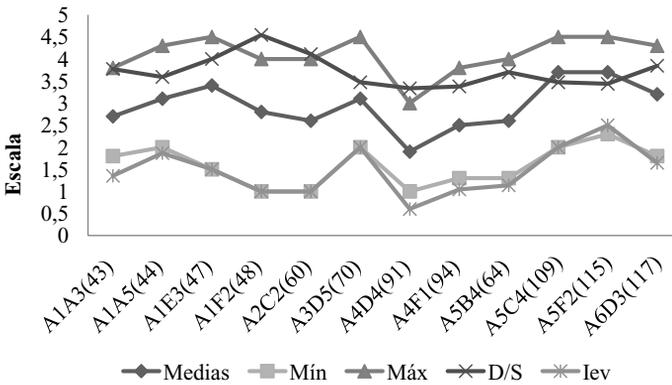
Figura 6. Severidad del añublo de la vaina producida por aislados de *R. solani* AG-1 IA inoculadas en cultivares de arroz bajo condiciones de laboratorio modificado.

En el Cuadro 6, con base al cociente D/S calculado indicaron que el aislado más confiable para las pruebas en general fue A1F2 (48) con un valor de 4,5 (resaltado) mostrando de esta manera confiabilidad para evaluar la virulencia general. Sin embargo, su valor de Máx y Mín no fueron los mayores. Los valores de Iev presentado por los aislados A3D5 (70), A5C4 (109) y A5F2 (115) fueron más altos que para el resto de los aislados. Para visualizar mejor los resultados se procedió a construir una gráfica de virulencia general (Figura 7) que permitiera explicar los valores del Cuadro 6, correspondientes al D/S y al Iev. En la Figura 8, se muestra un aspecto general de las modificaciones hechas a la metodología de laboratorio de evaluación de la mancha bandeada del maíz de Ahuja y Payak (1981), para adaptarla al añublo de la vaina del arroz.

En la Figura 7, se representa el comportamiento general de la virulencia, se observa que los aislados de *R. solani* con amplio espectro de virulencia son aquellos que muestran un alto valor de medias, Mín y Máx, corroborado por Iev que estima la severidad en los cultivares resistentes (línea con asterisco que se solapa con línea con cuadrados), mientras que el D/S (equis) se encuentra fuera del valor Máx (triangulo) y muy distante a los valores de Mín (cuadrado).

Cuadro 6. Índice del espectro de virulencia (Iev) de los aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz bajo condiciones de laboratorio modificado.

Aislado	Valores			Rango (D)	Desviación estándar (S)					
	Medias	Mín	Máx		D/S	R(res)	R(sus)	Iev		
A1A3(43)	2,7	1,8	3,8	2,0	0,5	3,8	1,7	2,3	1,4	
A1A5(44)	3,1	2,0	4,3	2,3	0,6	3,6	1,5	2,8	1,9	
A1E3(47)	3,4	1,5	4,5	3,0	0,8	4,0	2,0	3,0	1,5	
A1F2(48)	2,8	1,0	4,0	3,0	0,7	4,5	2,5	2,5	1,0	
A2C2(60)	2,6	1,0	4,0	3,0	0,7	4,1	2,5	2,5	1,0	
A3D5(70)	3,1	2,0	4,5	2,5	0,7	3,5	1,5	3,0	2,0	
A4D4(91)	1,9	1,0	3,0	2,0	0,6	3,3	2,5	1,5	0,6	
A4F1(94)	2,5	1,3	3,8	2,5	0,7	3,4	2,2	2,3	1,0	
A5B4(64)	2,6	1,3	4,0	2,7	0,7	3,7	2,2	2,5	1,1	
A5C4(109)	3,7	2,0	4,5	2,5	0,7	3,5	1,5	3,0	2,0	
A5F2(115)	3,7	2,3	4,5	2,2	0,6	3,4	1,2	3,0	2,5	
A6D3(117)	3,2	1,8	4,3	2,5	0,7	3,8	1,7	2,8	1,6	



Aislados de *R. solani* AG-1 infectivos de arroz

Figura 7. Agresividad de los aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz inoculados sobre seis cultivares de arroz por el método de Cinetina.

2. Inoculación de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz. Se observaron manchas típicas de la enfermedad en todos los trozos de hojas de los genotipos de maíz inoculados bajo el método de laboratorio, la sintomatología fue tan severa que promedió 4,5 en la escala de nueve grados (1-5) propuesta por Ahuja y Payak (1981). Por lo que no se detectaron diferencias significativas entre aislados y líneas de maíz.

La Figura 8, muestra diferentes fases del método de Laboratorio modificado por González et al. (2008), el cual fue efectivo para determinar la virulencia de aislados de *R. solani* AG-1 IA bajo las condiciones probadas.

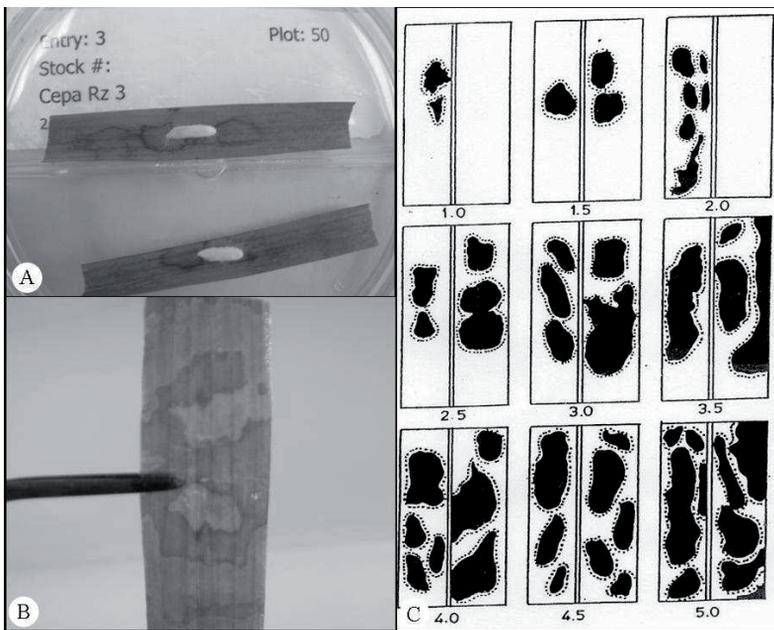


Figura 8. A. Desarrollo de la mancha o síntoma del añublo de la vaina del arroz a las 48 h de inoculado con un aislado de *R. solani* infectivo de arroz, como medio de soporte la solución de Cinetina a 2 ppm en plato Petri de dos compartimientos. B. Mancha obtenida al momento de la evaluación sin el grano de arroz, la cual se puede comparar con la escala diagramática. C. Escala diagramática descrita por Ahuja and Payak (1981), diseñada para evaluar la reacción de la mancha bandeada en germoplasma de maíz.

B. Inoculación de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de umbráculo.

1. Para el método de microcámaras para el añublo de la vaina de arroz los datos cumplieron los supuestos del ANAVAR. En el Cuadro 7, se resume el análisis de la varianza que muestra las diferencias altamente significativas para el modelo, entre los aislados de *R. solani* inoculados, entre los cultivares, mientras que la interacción cultivar por aislado no presentó diferencias significativas ($p = 0,05$); esto fue indicativo que las variables actúan independientemente una de la otra.

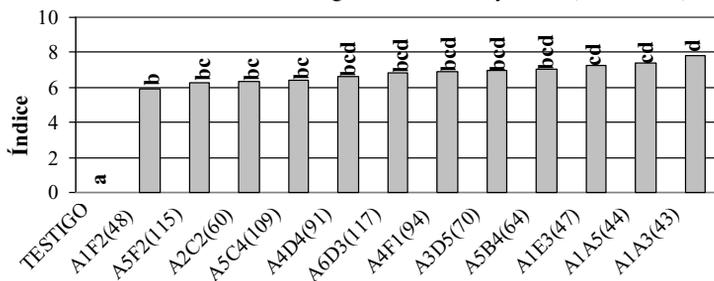
Cuadro 7. Análisis de la Varianza (SC Tipo III) en inoculación de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivas de arroz, bajo el método de microcámaras.

F.V (fuente de variación)	SC	gl	CM	F	Valor p	R ²	R ² Aj	CV
Modelo	1136,90	77	14,76	8,92	<0,0001	0,75	0,66	20,36
Aislado	958,66	12	79,89	48,26	<0,0001			
Cultivar	72,12	5	14,42	8,71	<0,0001			
Aislado*Cultivar	106,59	60	1,78	1,07	0,3494			
Error	385,68	233	1,66					
Total	1522,59	310						

SC = Suma de Cuadrados; gl = grados de libertad; CM = Cuadrados Medios; F = Probabilidad de Fisher; Valor p = significancia o no significancia al valor de Alfa: 0,05; R² = R cuadrado; R² Aj = R cuadrado ajustado; CV = coeficiente de variación.

En la Figura 9, seis grupos homogéneos fueron separados mediante la prueba Tukey ($P = 0,05$). Un grupo muy compacto ‘bc-bcd’ que promedió un índice de 6,6 evidenció que existen mínimas diferencias en virulencia entre los aislados de este grupo. Se destaca la alta virulencia exhibida por el aislado A1A3 (43) sobre todos los cultivares probados.

Letras distintas indican diferencias significativas. Tukey Alfa: 0,05 DMS: 1,26607



Aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz

Figura 9. Virulencia de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz inoculados bajo el método de microcámara.

En la Figura 10, sólo se formaron dos grupos homogéneos (Tukey, $P = 0,05$). Las diferencias en susceptibilidad entre los cultivares de arroz son menos apreciables que en la prueba de cinetina, promediando valores del índice cercanos a 6,3 lo que indica una tendencia a la susceptibilidad, mientras que ‘Lemont’ tuvo un valor de 7,2.

En el Cuadro 8, se observó que el aislado de *R. solani* que presentó el mayor D/S fue A5F2 (115) resultando 4,5. Según la aplicación de este índice, el aislado con mayor D/S general debiera ser el más confiable. Los mayores valores de Iev lo mostraron los aislados A3D5 (70), seguido por A4F1 (94) y A6D3 (117), con valores de 6,8 promedio, los mismos se destacan sobre el resto de los aislados.

En la Figura 11, los aislados de *R. solani* que presentaron el mayor espectro de virulencia son aquellos que muestran un alto valor de medias, Mín y Máx. El valor de Iev que estima la severidad en los cultivares de arroz (línea morada) se encuentra muy cercano del valor Mín (cuadrado) mientras que el D/S (equis) se encuentra alejado en algunos puntos. La Figura destaca los picos alcanzados por los altos valores de los aislados A3D5 (70), A4F1 (94) y A6D3 (117) cercano a la media general (línea azul oscura), indicando alta confiabilidad para medir la reacción.

Letras distintas indican diferencias significativas Tukey Alfa: 0.05 DMS: 0.75338

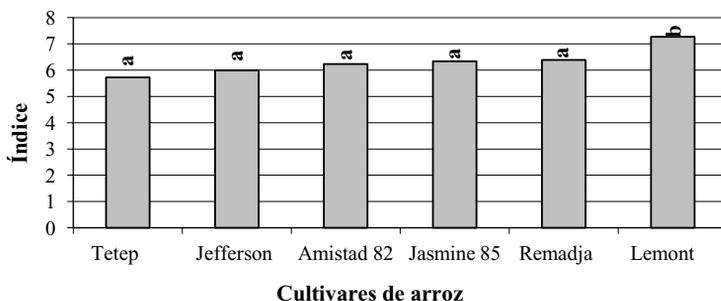


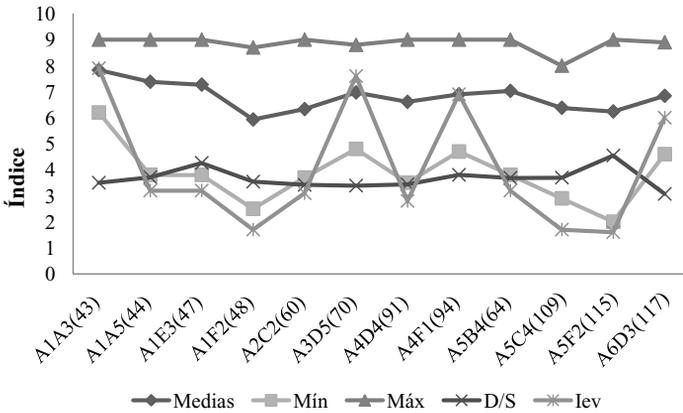
Figura 10. Severidad del añublo de la vaina por aislados de *R. solani* inoculados en cultivares de arroz bajo el método de microcámaras.

Cuadro 8. Índice del espectro de virulencia (Iev) con los aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz bajo condiciones de microcámaras.

Aislado	Medias	Valores		Rango (D)	Desviación estándar (S)	D/S	R(res)	R(sus)	Iev
		Mín	Máx						
A1A3(43)	7,8	6,2	9,0	2,8	0,8	3,5	-0,7*	5,5	7,9
A1A5(44)	7,4	3,8	9,0	5,2	1,4	3,7	1,7	5,5	3,2
A1E3(47)	7,3	3,8	9,0	5,2	1,2	4,3	1,7	5,5	3,2
A1F2(48)	5,9	2,5	8,7	6,2	1,8	3,5	3,0	5,2	1,7
A2C2(60)	6,3	3,7	9,0	5,3	1,6	3,4	1,8	5,5	3,1
A3D5(70)	7,0	4,8	8,8	4,0	1,2	3,4	0,7	5,3	7,6
A4D4(91)	6,6	3,5	9,0	5,5	1,6	3,4	2,0	5,5	2,8
A4F1(94)	6,9	4,7	9,0	4,3	1,1	3,8	0,8	5,5	6,9
A5B4(64)	7,0	3,8	9,0	5,2	1,4	3,7	1,7	5,5	3,2
A5C4(109)	6,4	2,9	8,0	5,1	1,4	3,7	2,6	4,5	1,7
A5F2(115)	6,2	2,0	9,0	7,0	1,5	4,5	3,5	5,5	1,6
A6D3(117)	6,8	4,6	8,9	4,3	1,4	3,1	0,9	5,4	6,0

* El valor negativo indicó que el aislado fue muy virulento, con poca capacidad de discriminación, afectando a los cultivares con un valor Mín (resaltado) por encima de 5, por esta razón dio negativo.

El aislado A1A3 (43) no se consideró dentro de este grupo por presentar un valor negativo. Como se observa en la Figura 11 este aislado presenta altos valores de media, Mín y Máx, el mismo puede infectar a los cultivares de arroz con índice parecido, incluyendo a los resistentes, con poca capacidad de discriminación. Detalles del ensayo se presentan en la Figura 12.



Aislados de *R. solani* AG-1 infectivos de arroz

Figura 11. Agresividad de los aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz inoculados sobre seis cultivares de arroz en condiciones de microcámara.

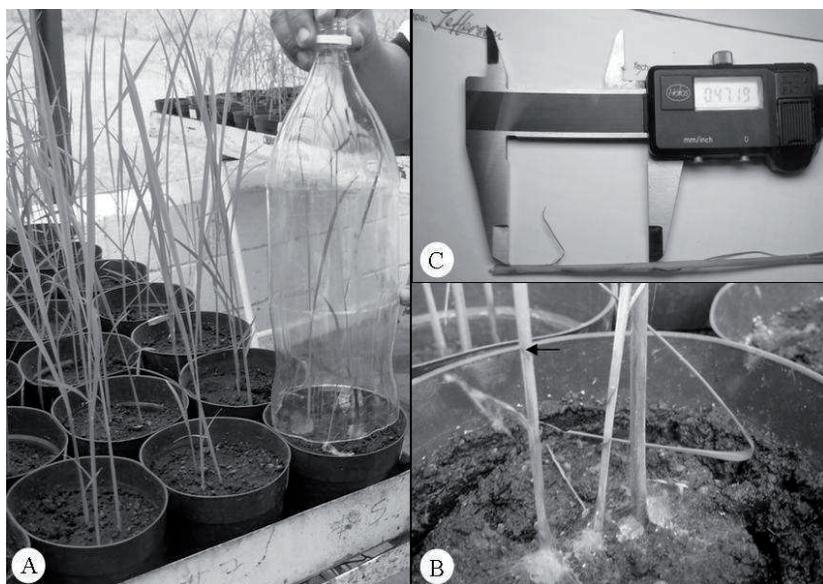


Figura 12. Método de microcámara para evaluar la reacción del añublo de la vaina del arroz (Jia et al., 2007). A. Colocación del disco de PDA colonizado con *R. solani* AG-1 IA en la base de la plántula de arroz, la incubación cubriendo con botella plástica desechable de refresco (2 L) duró ocho días. B. Altura de la mancha al momento de la evaluación a los ocho días de la inoculación. C. La altura de la mancha se midió con vernier digital o con regla graduada en mm.

2. Método de inoculación de plántulas de maíz en umbráculo.

a. En la evaluación realizada a los ocho días después de inoculado (ddi), la data cumplió con los supuestos del ANAVAR. El Cuadro 9, resume el análisis de la varianza que muestra las diferencias altamente significativas para el modelo, para las líneas de maíz y entre los aislados de *R. solani* inoculados. No hubo diferencias significativas en la interacción línea por aislado. Esto indica que el modelo es capaz de explicar las diferencias existentes entre las líneas de maíz y entre los aislados de *R. solani* probados. No obstante, la interacción línea por aislado indicó que el aislado de *R. solani* es virulento independientemente de la línea de maíz infectada.

Cuadro 9. Análisis de la Varianza (SC Tipo I) del avance de la mancha del experimento de virulencia de 11 aislados de *R. solani* infectivos de maíz, a los ocho días de la inoculación.

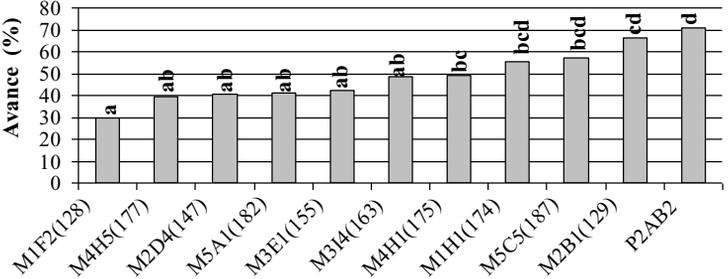
F.V (fuente de variación)	SC	gl	CM	F	Valor p	R ²	R ² Aj	CV
Modelo	49578,64	76	652,35	2,87	<0,0001	0,74	0,48	30
Línea	22190,67	6	3698,44	16,29	<0,0001			
Aislado	21083,47	10	2108,35	9,29	<0,0001			
Línea*Aislado	6304,49	60	105,07	0,46	0,9989			
Error	17480,97	77	227,03					
Total	67059,60	153						

SC = Suma de Cuadrados; gl = grados de libertad; CM = Cuadrados Medios; F = Probabilidad de Fisher; Valor p = significancia o no significancia al valor de Alfa: 0,05; R² = R cuadrado; R² Aj = R cuadrado ajustado; CV = coeficiente de variación.

La Figura 13, muestra la prueba de separación de medias de Tukey (P = 0,05) donde se conformaron siete grupos homogéneos. Se observó que existe una alta variabilidad entre los aislados, detectándose diferencias apreciables entre ellos. El aislado que presentó mayor virulencia fue P2AB2 (Testigo) con un avance promedio de 71 %. Por el contrario, el aislado de menor virulencia fue M1F2 (128) con 29,9 %. Entre los dos extremos se encontraron ubicados el resto de los aislados de *R. solani* derivados de maíz.

En la Figura 14 se observó la separación de medias en seis grupos (Tukey P = 0,05). El cultivar que presentó menor avance de la mancha fue ‘CML-254’ (31,1%), mientras que el de mayor avance fue la línea ‘82201-25-1-1’ (71,4%). Se observó que la variabilidad de la susceptibilidad a la enfermedad estuvo muy bien distribuida en el resto de las líneas, aunque ‘03MN06A-5-3-2’ fue menos afectada.

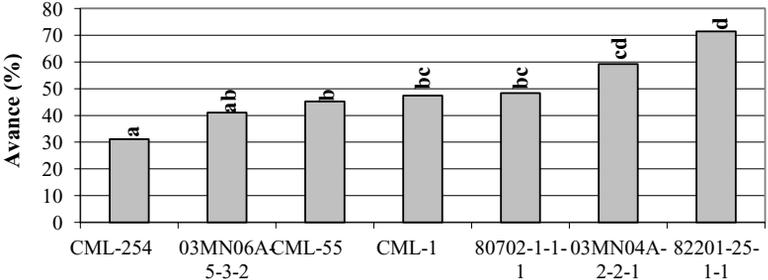
Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) Test: Tukey Alfa: 0,05 DMS: 18,95070



Aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz

Figura 13. Virulencia de aislados de *R. solani* AG1-IA de inoculadas sobre siete líneas de maíz bajo condiciones de umbráculo, ocho días después de la inoculación.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) Test: Tukey Alfa: 0,05 DMS: 13,79072



Líneas de maíz

Figura 14. Avance (%) de la mancha bandeada en siete líneas de maíz inoculadas con 11 aislados de *R. solani* AG1-IA infectivos de maíz, a los ocho días de inoculados.

En el Cuadro 10, se observó que el mayor valor del D/S lo presentó el aislado M2D4 (147) con 37,2 indicando que es confiable en la prueba general de virulencia. Sin embargo, el aislado M2B1 (129) mostró un valor de Iev con 24,5 sobre el aislado P2AB2 (testigo) que fue de 20,4 indicando que el primero posee un mayor espectro de virulencia que el aislado testigo.

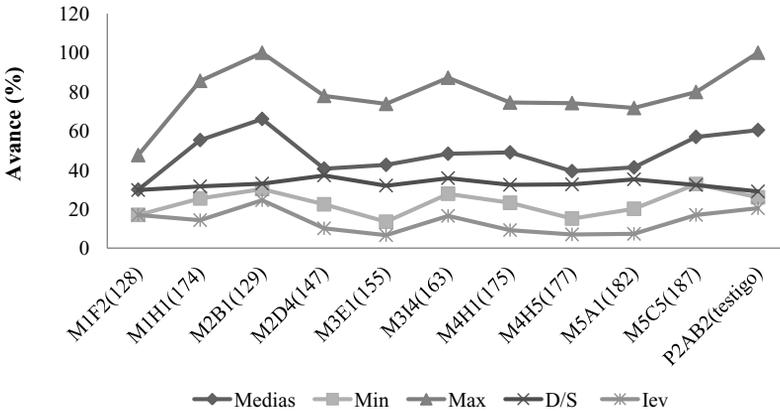
Cuadro 10. Índice de virulencia de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz bajo condiciones de umbráculo, a los ocho días de inoculados.

Aislado	Medias	Valores		Rango (D)	Desviación estándar (S)	D/S ^a	R(res)	R(sus)	Iev ^b
		Mín	Máx						
M1F2(128)	29,9	17,0	47,6	30,6	10,3	29,7	34,0	-1,4 ^c	17,0
M1H1(174)	55,3	25,4	85,6	60,2	19,1	31,6	25,6	36,6	14,3
M2B1(129)	66,1	30,2	100,0	69,8	21,2	33,0	20,8	51,0	24,5
M2D4(147)	40,7	22,4	77,9	55,5	14,9	37,2	28,6	28,9	10,1
M3E1(155)	42,6	13,5	73,8	60,3	18,9	32,0	37,5	24,8	6,6
M3I4(163)	48,3	27,8	87,2	59,4	16,6	35,8	23,2	38,2	16,5
M4H1(175)	49,0	23,2	74,5	51,3	15,8	32,4	27,8	25,5	9,2
M4H5(177)	39,4	15,1	74,2	59,1	18,1	32,6	35,9	25,2	7,0
M5A1(182)	41,3	20,1	71,7	51,6	14,7	35,2	30,9	22,7	7,3
M5C5(187)	56,9	32,8	79,9	47,1	14,6	32,3	18,2	30,9	17,0
P2AB2(testigo)	60,4	26,0	100,0	74,0	25,5	29,0	25,0	51,0	20,4

^a El D/S fue multiplicado por 10, para compensar con el valor del eje 'y'.

^b El Iev fue multiplicado por 10, para compensar con el valor del eje 'y'. ^c se consideró el valor entero.

En la Figura 15, se observó que los aislados M2B1 (129) y P2AB2 (Testigo), presentaron el mejor comportamiento con un Iev = 22,4 promedio en virulencia, para la evaluación de los ocho días. La línea de Iev (asterisco) muestra que estos aislados presentan valores muy cercanos al valor Mín de severidad en los hospedantes resistentes (cuadrado) lo que indicó confiabilidad.



Aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz

Figura 15. Virulencia de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz inoculados sobre siete líneas de maíz bajo condiciones de umbráculo, a los ocho días de inoculados.

b. Análisis del avance de la mancha de la enfermedad (%) medidos a los 15 días. Los datos cumplieron con los supuestos del ANAVAR. El Cuadro 11, resume el análisis de la varianza que muestra las diferencias altamente significativas para el modelo, para las líneas y entre los aislados de *R. solani* inoculados. No hubo diferencias significativas en la interacción línea por aislado. Esto indica que el modelo es capaz de explicar las diferencias existentes entre las líneas de maíz y entre los aislados de *R. solani*, la falta de significancia en la interacción indica que su comportamiento es independiente de la línea de maíz inoculada.

Cuadro 11. Análisis de la Varianza (SC Tipo III) del avance de la mancha (%) medidos a los 15 días de inoculado, del experimento de virulencia de 10 aislados de *R. solani* infectivos de maíz.

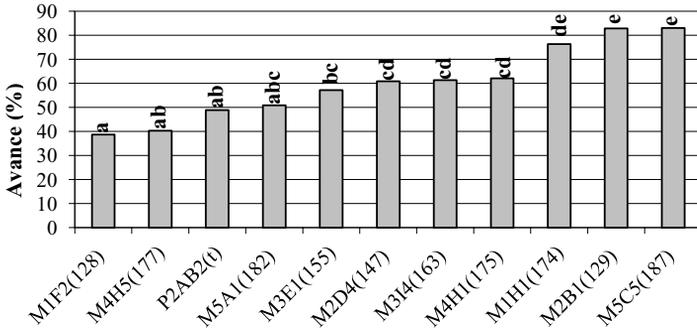
F.V (fuente de variación)	SC	gl	CM	F	Valor p	R ²	R ² Aj	CV
Modelo	100410,01	76	1321,18	6,45	<0,0001	0,86	0,73	23,76
Aislado	33307,06	10	3330,71	16,26	<0,0001			
Línea	53872,62	6	8978,77	43,84	<0,0001			
Aislado*Línea	13230,33	60	220,51	1,08	0,3774			
Error	15771,27	77	204,82					
Total	116181,28	153						

SC = Suma de Cuadrados; gl = grados de libertad; CM = Cuadrados Medios; F = Probabilidad de Fisher; Valor p = significancia o no significancia al valor de Alfa: 0,05; R² = R cuadrado; R² Aj = R cuadrado ajustado; CV = coeficiente de variación.

En la Figura 16, se muestra la alta variabilidad existente en la virulencia conformándose siete grupos (Tukey, P = 0,05) de los aislados de *R. solani* infectivos inoculados en maíz. En consecuencia, el aislado que causó el mayor avance de la mancha bandeada fue M5C5 (187) con 83 %, mientras que el menor avance lo ocasionó M1F2 (128) con 38,7%. El aislado P2AB2 (t) tuvo un comportamiento cercano al aislado de menor virulencia con 48,8 % y muy alejado del más virulento.

En la Figura 17, se puede observar la separación de medias en siete grupos (Tukey P = 0,05). De igual manera, el cultivar ‘CML-254’ presentó menor avance de la mancha (33,3%), mientras que el de mayor avance fue la línea ‘82201-25-1-1’ (89,5%). Se observó que la variabilidad de la susceptibilidad a la enfermedad estuvo muy bien distribuida en el resto de las líneas, ‘CML-55’ fue menos afectada que ‘03MN06A-5-3-2’.

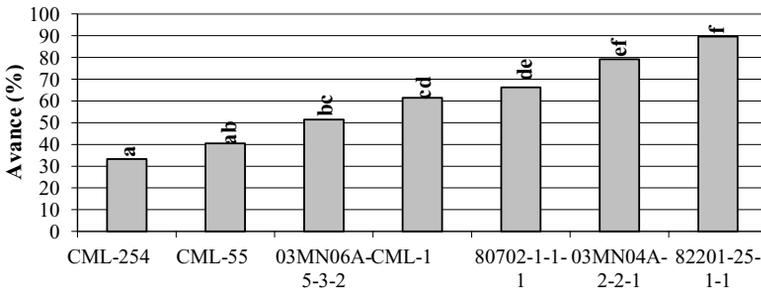
Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) Test: Tukey Alfa: 0,05 DMS: 18,00014



Aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz

Figura 16. Virulencia de aislados de *R. solani* AG1-IA de inoculadas sobre siete líneas de maíz bajo condiciones de umbráculo, a los 15 días de la inoculación.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) Test: Tukey Alfa: 0,05 DMS: 13,09898



Genotipos de maíz

Figura 17. Avance (%) de la mancha bandeada en siete líneas de maíz inoculadas con 11 aislados de *R. solani* AG1-IA infectivos de maíz, a los 15 (ddi).

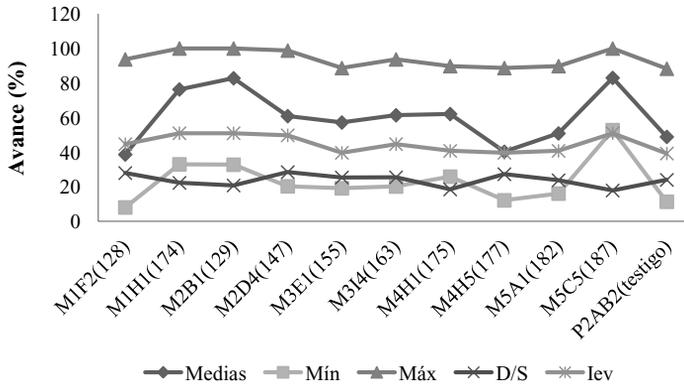
En el Cuadro 12, se observó que el aislado M4H1 (175) tuvo el mayor D/S, indicativo de confiabilidad general. Los aislados M1H1 (174), M2B1 (129), presentaron los mayores valores de Iev y Máx. La Figura 18, muestra le virulencia general de los aislados.

Cuadro 12. Índice de virulencia con los aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz bajo condiciones umbráculo, a los 15 días de inoculado.

Aislado	Medias	Rangos		Rango (D)	Desviación estándar (S)	D/S ^a	R(res)	R(sus)	Iev ^b
		Mín	Máx						
M1F2(128)	38,7	8,1	93,7	85,6	28,0	30,5	42,9	44,7	10,4
M1H1(174)	76,3	33,0	100,0	67,0	22,3	30,1	18,0	51,0	28,3
M2B1(129)	82,8	32,8	100,0	67,2	20,8	32,3	18,2	51,0	28,0
M2D4(147)	60,9	20,3	98,8	78,5	28,5	27,5	30,7	49,8	16,2
M3E1(155)	57,2	19,2	88,7	69,5	25,4	27,4	31,8	39,7	12,5
M3I4(163)	61,4	20,2	93,7	73,5	25,5	28,8	30,8	44,7	14,5
M4H1(175)	62,1	25,9	89,8	63,9	18,5	34,6	25,1	40,8	16,3
M4H5(177)	40,3	12,2	88,7	76,5	27,3	28,0	38,8	39,7	10,2
M5A1(182)	50,9	16,1	89,8	73,7	23,8	30,9	34,9	40,8	11,7
M5C5(187)	83,0	52,8	100,0	47,2	17,9	26,4	-1,8 ^c	51,0	283,3 ^d
P2AB2(testigo)	48,9	11,4	88,3	76,9	24,0	32,0	39,6	39,3	9,9

^a El D/S fue multiplicado por 10, para compensar con el valor del eje 'y'. ^b El Iev fue multiplicado por 10, para compensar con el valor del eje 'y'. ^c El valor negativo se multiplico por (-1). ^d Se consideró el valor entero y no se multiplicó *10, porque pasaba el valor del eje 'y', el cociente final fue 28,3.

En la Figura 18, se observan que los aislados M1H1 (174), M2B1 (129) y M2D4 (147) cuyos valores de Iev se encuentran resaltados en el Cuadro 11, presentaron el mayor espectro de virulencia. La cercanía de los puntos de Iev (asterisco) y Mín (cuadrado), es indicativo de mayor confiabilidad. El aislado M5C5 (187) presentó un valor negativo por que sobrepasó el límite R (res), los valores de medias, Máx y Mín son elevados, por lo que este aislado presenta una alta agresividad y no fue considerado en el grupo.



Aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz

Figura 18. Virulencia de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz sobre siete líneas de maíz bajo condiciones de umbráculo, a los 15 de inoculados.

En la Figura 19 se presenta un aspecto general del ensayo para medir la reacción de la mancha bandeada del maíz bajo condiciones de umbráculo en Fundación Danac.

A. Inoculación cruzada de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz, bajo condiciones de umbráculo.

Como se explicó en materiales y métodos, el ensayo de inoculación cruzada fue conducido bajo un solo ambiente (umbráculo), el método de infestación de arroz colonizado con los aislados colocado en suelo en la base de la plántula (Pineda et al., 2005), fue efectivo para causar la enfermedad de manera cruzada (Cuadro 13). Se seleccionó dicho método para evitar causar heridas o maltrato a las plántulas y asemejar lo más posible al mecanismo de infección natural de este patógeno. Para determinar la severidad de los aislados de *R. solani* correspondientes, la enfermedad fue medida usando el índice de Jia et al. (2007), con base al promedio de la longitud de la mancha sobre la longitud del culmo (arroz) o del último nudo distal (maíz), multiplicado por nueve. Los detalles del experimento se muestran en la Figura 20.

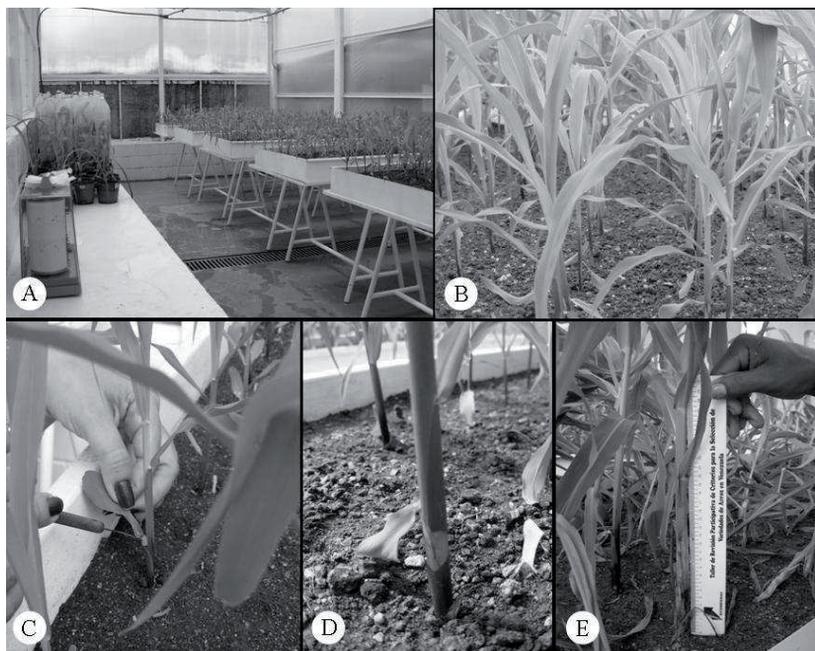


Figura 19. A. Vista general del ensayo de virulencia de aislados de *R. solani* infectivos de maíz, en umbráculo. B. Parcelas con tratamientos en bandejas con tierra estéril, a las 48 h de inoculado. C. Colocación de discos de PDA colonizados con aislados en la primera hoja cotiledonal de plántulas sanas de maíz de 15 días de edad. D. Síntomas de la mancha bandeada a las 48 h de inoculado. E. Segunda evaluación a los 15 días de la inoculación, el avance vertical de mancha fue medida con regla graduada en mm, posteriormente se calculo el avance de la mancha en (%) con respecto al nudo distal.

Cuadro 13. Prueba de inoculación cruzada de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz y arroz con distintos genotipos multilocus SSR (GTML) ^a.

Origen de los aislados	Genotipos multilocus SSR ^b	Aislados	Agresividad sobre dos Poaceas	
			Arroz 'Lemont'	Maíz 'D-3273'
Aislados infectivos de maíz	129	M2B1	6,8	9,0
	130	M1D2	5,4	9,0
	134	M1H1	6,5	8,4
	140	M1J3	6,0	9,0
	147	M2D4	8,1	9,0
	152	M3D1	6,3	9,0
	155	M3E1	5,1	9,0
	156	M3F1	6,8	9,0
	168	M4A5	6,1	8,5
Todos los Aislados infectivos de maíz			6,3	8,9
Aislados infectivos de arroz	43	A1A3	8,4	5,3
	44	A1A5	8,2	6,6
	48	A1F2	7,6	4,9
	60	A2C2	7,9	5,5
	64	A5B4	8,4	5,1
	70	A3D5	8,3	5,7
	91	A4D4	8,2	5,3
	94	A4F1	7,8	5,3
	109	A5C4	7,4	4,6
	117	A6D3	7,7	5,9
	Todos los Aislados infectivos de arroz			8,0
Todos los aislados			7,2	7,1
Testigo no inoculado			0,0	0,0
Contrastes				
Inoculado vs. No Inoculado	Estimados		236,93	134,05
	Valor de F		68,5	178,2
	P		<0,0001	<0,001
Aislados de maíz vs. Aislados de arroz	Estimados		14,88	31,12
	Valor de F		17,3	205,7
	P		<0,0001	<0,001

^a Los experimentos de arroz y maíz fueron conducidos independientemente. El sombreado resalta la media de la severidad de la enfermedad para cada grupo de aislados.

^b Los dos grupos de GTML en la prueba de hospedante-asociación rindieron un pairwise Φ_{ST} maíz vs arroz = 0,0099, $P \leq 0,01$, indicando divergencia significativa (resultados del Capítulo 2).

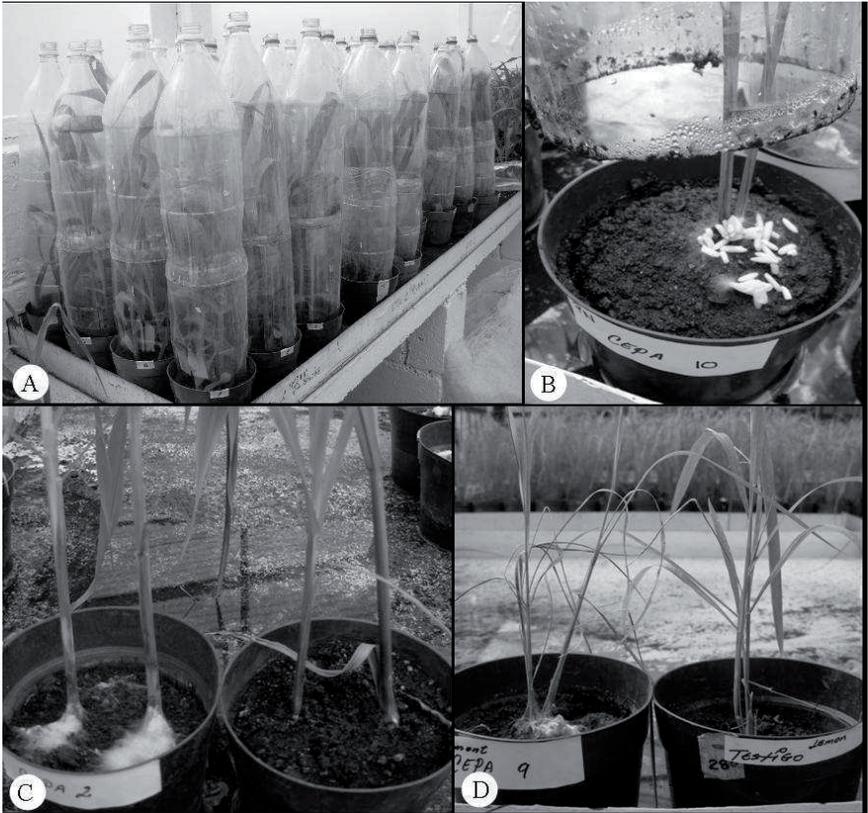


Figura 20. A. Aspecto general del ensayo de inoculación cruzada, se observan plántulas de maíz con suelo infectado con granos colonizados con *R. solani* cubiertas por microcámaras, bajo condiciones de umbráculo, la incubación duró ocho días. B. Granos colonizados por *R. solani* AG-1 IA infeccioso de maíz invadiendo plántulas de arroz (24 h), a las 48 h de inoculado. C. Lesiones causadas por *R. solani* AG-1 IA infeccioso de arroz en plántulas de maíz y testigo infestado con arroz estéril (a la derecha) sin síntoma. D. plántulas de arroz infectadas por aislado de *R. solani* infeccioso de maíz comparados con los testigos (a la derecha) que no desarrollaron síntomas.

III. DISCUSIÓN.

Para la reactivación de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz y de maíz se seleccionaron aislados caracterizados molecularmente por González-Vera et al. (2010) quienes identificaron 82 genotipos (GTML) derivados de arroz y 61 derivados de maíz, de las 211 muestras apareadas geográficamente colectadas mediante transectas en el estado Portuguesa. La alta diversidad genética encontrada coincidió con los resultados de un estudio similar sobre poblaciones de *R. solani* derivados de arroz y soya en Louisiana y Texas (Bernardes de Asis et al., 2008). El número de aislados analizados en esta investigación de *R. solani* derivados del arroz y maíz garantizaron la representatividad de la población infectivas de arroz y de maíz según el modelo de muestreo por transectas propuesto por McDonald (1997).

Los genotipos de maíz y arroz usados en las pruebas de virulencia en su mayoría se encuentran referenciados en la literatura especializada reseñada en materiales y métodos. Sin embargo, la variedad venezolana de arroz ‘Fedearroz PN1’ considerada altamente susceptible (Delgado et al., 2004) originalmente propuesta en el anteproyecto de tesis no fue considerado en los análisis estadísticos por presentar reacciones inespecíficas, imputables a la fuente de origen. Tanto los aislados y lo cultivares bajo estudio se evaluaron en condiciones laboratorio y umbráculo para asegurar que el comportamiento diferencial de los aislados de *R. solani* y de los cultivares fueran atribuibles al genotipo (McDonald, 1997), disminuyendo en lo posible la interferencia ambiental (Niks and Lindhout, 1999). Principalmente, para mantener la identidad del patógeno, debido a que este factor se puede controlar mejor bajo ambientes controlados que en el campo (Niks and Lindhout, 1999).

En la determinación de la virulencia de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz bajo condiciones de laboratorio, el método diseñado para medir la reacción de la mancha bandeada del maíz por Ahuja and Payak (1981) fue modificado por González et al. (2008), resultando efectivo para evaluar el añublo de la vaina del arroz bajo nuestras condiciones de laboratorio. Este difiere del primero por emplear granos de arroz colonizados a cambio de los de cebada, también difiere a la técnica

de discos de PDA colonizados colocados sobre trozos de hojas de arroz soportada sobre papel filtro humedecido (Prasad y Eizenga, 2008) y al de la gota de suspensión colocada en hoja de arroz perforada sujeta a portaobjeto en platos Petri humedecidos (Martínez et al., 2005).

No se detectaron diferencias significativas en la prueba de laboratorio ensayada para identificar la virulencia de aislados de *R. solani* infectivos de maíz, a diferencia de los resultados altamente significativos obtenidos por Perdomo et al. (2007) en la caracterización de la virulencia de 25 aislados de *R. solani* derivado del maíz en Venezuela. La falta de significación presumiblemente se debió al cambio del método utilizado en este estudio consistiendo en platos Petri de dos compartimientos o a que los aislados probados fueron más virulentos y/o menos discriminantes que los caracterizados por Perdomo et al. (2007). Este ensayo fue repetido al menos dos veces con los mismos resultados.

Las pruebas de virulencia de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz, bajo condiciones de umbráculo, arrojaron diferencias altamente significativas para las variables aislado, variedad y su interacción, indicando que el método de microcámara (Jia et al., 2007) fue sensible para medir la reacción del añublo de la vaina en cultivares de arroz y detectar diferencias en virulencia entre los aislados de *R. solani* infectivos de arroz. Esto coincide con los resultados obtenidos en la evaluación de germoplasma de arroz ante el añublo de la vaina en USA y Colombia realizado por los citados autores. En el análisis de esta prueba fue evidente que el Índice de espectro de virulencia (Iev) propuesto fue más sensible que el índice D/S (Meppelink, 1967) el cual también fue usado de manera confiable para medir la dureza del grano de maíz (Tran et al., 1981). El Iev fue capaz de estimar el mayor valor de susceptibilidad de los cultivares o genotipos resistentes, lo cual es una característica de importancia para evaluar la resistencia parcial o cuantitativa (Jia et al., 2007; Park et al, 2008, Parlevliet and Zadoks, 1977).

El Iev mayor calculado en la prueba de virulencia de los aislados de *R. solani* infectivos de arroz bajo el método de laboratorio modificado incluyeron al aislado

A3D5 (70) que también fue identificado mediante el método de microcámaras, lo cual corrobora este último resultado. Aunque, la virulencia no es aceptada como criterio de diferenciación de aislados de *R. solani* (Carling y Summer, 1992; Eizenga et al., 2002); en Venezuela, se determinó la identidad y la virulencia de los grupos de anastomosis (AGs) asociados con papa en 12 localidades de Mérida y una de Trujillo (Cedeño et al., 2001) y la virulencia de aislados de *R. solani* obtenidas de semillas de caraota de diferentes localidades (Díaz, 1968).

En esta investigación se pudo determinar la virulencia de los aislados *R. solani* infectivos de arroz y medir la reacción del añublo de la vaina sobre la misma gama de hospedantes usando métodos de laboratorio y umbráculo. Por esta razón, se rechaza la hipótesis nula que consideraba a los aislados de *R. solani*AG-1 IA infectivos de arroz con igual nivel de virulencia y se acepta la hipótesis alternativa que los aislados de *R. solani* derivados de arroz presentan diferente espectro de virulencia.

El método de microcámara usado en esta investigación fue seleccionado con base a los resultados obtenidos por otros investigadores (Jia et al., 2007), quienes en los ensayos de invernadero comparados con los de campo encontraron una alta correlación existente entre ellos, además del comportamiento consistente de ‘Jasmine 85’ (resistente) y de ‘Lemont’ (susceptible). Los citados autores concluyeron que el método de microcámara fue efectivo para evaluar la resistencia al añublo de la vaina del arroz bajo condiciones de invernadero y fue útil para seleccionar germoplasma. Recientemente estos resultados fueron corroborados por otros autores (Prasad and Eizenga, 2008).

Los resultados obtenidos en esta investigación con relación a la respuesta de los cultivares de arroz ante la inoculación de *R. solani* difieren a los encontrados por otros autores. Por ejemplo, el cultivar ‘Jasmine 85’ considerado entre los de mayor resistencia en USA (Jia et al., 2007; Pan et al., 1999) fue el cultivar más susceptible en la prueba de laboratorio y después se ubicó entre el grupo de los más resistentes en la prueba de microcámaras, lo cual se presume es indicativo de diferencias en sensibilidad de los métodos empleados y/o a la fuente de origen de este cultivar. A

diferencia, ‘Tetep’ (Groth y Nowick, 1992) y ‘Jefferson’ (Kloesterboer, 1999) fueron los cultivares más resistentes; mientras que ‘Lemont’ (Bollich et al., 1985) fue el más susceptible, de manera consistente en ambas pruebas, coincidiendo con lo reportado por estos autores.

En cuanto a la virulencia de *R. solani* AG-1 IA infectivas de maíz bajo condiciones de umbráculo, la evaluación efectuada a los ocho días de la inoculación presentó un coeficiente de variación alto (30%) y un $R^2 = 0,74$. Sin embargo, el ANAVAR detectó diferencias altamente significativas para el modelo, para las líneas y entre los aislados de *R. solani* inoculados, mientras que no hubo diferencias significativas en la interacción línea por aislado, al igual que en la segunda evaluación. En la evaluación efectuada a los 15 días el $CV = 23,7\%$; con un $R^2 = 86$, tratándose del mismo ensayo, esto indica que no hubo mejor control de las variables sino que las variables y condiciones fueron más estables en el tiempo. Los resultados de la primera evaluación coincide con el comportamiento del aislado P2AB2 de *R. solani* AG-1 IA (Perdomo et al., 2007), el cual se usa de manera rutinaria en la evaluación de germoplasma a la mancha bandeada del maíz en Fundación Danac.

Los resultados indicaron que la expresión $I_{ev} = R(\text{sus})/R(\text{res}) * 10$ pudo estimar mejor la virulencia general que el D/S. La línea de maíz ‘CML-254’ mostró el mayor nivel de resistencia a la enfermedad, lo cual coincide con los resultados alcanzados por otros autores bajo infestación en campo (Vasal et al., 1999); ‘CML 254’ también fue usado en la caracterización de virulencia de 25 aislados de *R. solani* realizada bajo condiciones de invernadero (Perdomo et al., 2007). En consecuencia, fue consistente el comportamiento de la línea ‘82201-25-1-1’ como la más susceptible y de ‘CML-254’ como la más resistente.

Para resumir las diferencias de esta investigación con el método usado por Perdomo et al. (2007): 1) se realizó una segunda evaluación a los 15 días de la inoculación; 2) el disco de PDA se colocó en la hoja cotiledonal basal y 3) el avance de la mancha fue calculado mediante la expresión $\text{Avance (\%)} = AM/AP * 100$. Los resultados alcanzados permiten rechazar la hipótesis nula que los aislados de *R. solani* AG-1 IA

infectivos del maíz presentan la misma virulencia y se acepta la hipótesis alternativa que los aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz y del maíz poseen diferente espectro de virulencia.

Los resultados de la inoculación cruzada de aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz o de maíz bajo condiciones de umbráculo, indicaron que existen grados de especialización de los aislados de *R. solani* por su hospedante de origen. Los resultados obtenidos en las pruebas de inoculación cruzada coinciden con los resultados obtenidos recientemente en el patosistema *Rhizoctonia*-arroz-soya (Bernardes de Assis et al., 2008), lo cual es indicativo de mayor especificidad de *R. solani* por su hospedante principal.

La especialización de *R. solani* quedó demostrada hace tiempo cuando se señaló que dos tipos morfológicamente similares, pueden tener diferencias en patogenicidad sobre un mismo hospedante. Además, tipos subespecíficos (ahora conocidos como AGs) con igual morfología, aun teniendo el mismo grado de virulencia hacia su hospedante de origen, puede no tenerlo igual con respecto a otro cultivo hospedante (Houston, 1945). Este tipo de hallazgos también se han señalado en Venezuela, un trabajo pionero sobre la virulencia de diferentes AGs de *R. solani* patogénicos en caraota (*Phaseolus vulgaris*) fue realizado por Díaz y Salas (1973) demostrando las diferencias en la habilidad de los aislados para afectar diferentes partes de la planta. En el presente estudio *Rhizoctonia solani* AG-1 IA pudo provocar una respuesta diferencial en agresividad, la cual consiste en la capacidad de un aislado para infectar una especie o genotipo en mayor grado que otros aislados (Niks y Lindhout, 1999).

Existen algunas posibles explicaciones para el nivel de especificidad encontrado, bajo el enfoque de la genética de poblaciones iniciada en el Capítulo 2: 1) Está la probabilidad que el continuo monocultivo del maíz (Fontana y González, 2000) durante las pasadas cuatro décadas en áreas anteriormente cultivadas por arroz haya conducido a la divergencia de la población del patógeno en el estado Portuguesa. La respuesta diferencial en agresividad demostrada en cualquiera de los hospedantes podría indicar la adaptación ecológica (Huyse et al., 205; Konh, 2005), en uno de los

hospedantes bien sea el arroz o el maíz. 2) La extensión de la diferenciación genética entre poblaciones de patógenos probablemente esté relacionada al grado de parentesco del hospedante de origen. Por ejemplo, cuando fueron comparadas la población de *R. solani* derivada del arroz (Poacea) y de la soya (Fabaceae) de Louisiana (Bernardes de Assis et al., 2008), la extensión de la diferenciación fue mucho más alta ($\Phi = 0,39 - 0,40$) que la observada en este estudio ($\Phi = 0,17 - 0,22$), la cual incluye poblaciones de dos hospedantes pertenecientes a la misma familia Poaceae. Y, 3) Como la población de *R. solani* derivada del arroz y maíz todavía son patogénicas de manera cruzada, se postula que la divergencia genética es muy reciente, tal vez desde hace unos 40 años, cuando el maíz empezó a ocupar las áreas de siembra tradicional de arroz. Entonces hay mayor probabilidad que las poblaciones *R. solani* infectivas de maíz hayan surgido de poblaciones que infectan el arroz.

Discutidos los resultados de la inoculación cruzada, se rechaza la hipótesis nula que los aislados de *R. solani* no son patogénicos en arroz y maíz; y se acepta la hipótesis alternativa que son patogénicos en ambos hospedantes, arroz y maíz. Complementando los resultados sobre genética de poblaciones iniciado en el Capítulo 2, se considera que existe divergencia genética entre las poblaciones de *R. solani* infectivas de arroz y las infectivas de maíz, con base al mayor grado de agresividad de los aislados de *R. solani* en su hospedante de origen.

IV. CONCLUSIONES.

En esta investigación, se modificó con éxito una prueba de laboratorio y se estandarizó el método de microcámaras de umbráculo, con la finalidad de evaluar la reacción del añublo de la vaina del arroz. Se determinó la virulencia de aislados de *R. solani* infectivos de arroz, identificándose tres aislados que mostraron un alto índice de espectro de virulencia (Iev) por el método de laboratorio modificado (González et al., 2008) y dos aislados por el método de microcámaras. También se identificaron dos cultivares de arroz con buen nivel de resistencia y a un cultivar susceptible, consistentemente.

En la primera y segunda evaluación de virulencia de *R. solani* infectivos de maíz se identificó un aislado con Iev y un aislado con el D/S, respectivamente. Fue consistente el comportamiento de una línea de maíz como resistente y una línea como más susceptible. Estos resultados permitieron identificar aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de arroz y de maíz confiables por su capacidad discriminante; así como cultivares de arroz y líneas de maíz con niveles de resistencia y/o susceptibilidad que pueden ser utilizados como testigos en pruebas de evaluación de germoplasma ante el añublo de la vaina y de la mancha bandeada del maíz, respectivamente. Mediante la prueba de inoculación cruzada, se pudo comprobar que existen niveles de especificidad de *R. solani* AG-1 IA en hospedantes como el maíz y el arroz, evidenciado por la mayor agresividad de los aislados en sus hospedantes de origen, lo cual es consistente con los resultados de divergencia de las poblaciones de *R. solani* AG-1 IA infectivas de arroz o de maíz evaluadas en el capítulo anterior.

Capítulo 4

EVALUACIÓN DE GERMOPLASMA DE ARROZ Y MAÍZ PARA RESISTENCIA A *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS Y DE CAMPO.

I. MATERIALES Y MÉTODOS.

A. Ensayos de umbráculo para evaluar el añublo de la vaina de arroz.

1. Se estableció un ensayo por el método de microcámaras de Jia et al. (2007) para evaluación del añublo de la vaina en 23 genotipos de arroz, los cuales fueron inoculados con el haplotipo A5B4 (64) de *R. solani* AG-1 IA con un espectro de virulencia intermedio. El diseño fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue de tres plántulas/pote. A los ocho días se evaluó la enfermedad usando un índice calculado como longitud de la lesión dividida por la longitud del culmo en mm multiplicado por nueve (Jia et al., 2007).

2. Se estableció un ensayo por el método de bola de micelio diseñado por Park et al., (2008) para evaluación del añublo de la vaina en 23 genotipos de arroz, los cuales fueron inoculados con el haplotipo A3D5 (70) de *R. solani* AG-1 IA que mostró un alto índice de virulencia en microcámaras. Consistiendo en la inoculación de plántulas de arroz de 45 días con una de bola de micelio del hongo (6 a 8 mm de Ø) en la inserción de la tercera hoja basal, cubriendo la vaina inoculada con un trozo de papel aluminio para mantener la humedad. El diseño fue de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue de tres plántulas/pote. La evaluación se realizó a los ocho días, se aplicó la fórmula compuesta por la medida de la longitud de la lesión en cm y el grado de severidad de la enfermedad en cada hoja de la vaina inoculada.

La longitud total fue la suma de la longitud de la lesión en cada trozo o entrenudo del culmo. El grado de severidad fue 0 = no hay lesión, 1 = aparición de manchas húmedas, 2 = aparición de manchas necróticas, 3 = menos del 50% de necrosis en el trozo de culmo, 4 = más del 50% necrosis en el trozo de culmo y 5 = necrosis en el trozo de culmo resultando en muerte de la hoja. La fórmula utilizada fue: Índice (ID) = $(5n_5 + 4n_4 + 3n_3 + 2n_2 + 1n_1 + 0n_0)/5N \times 100$, Donde n_0-5 es el número de hojas en cada grado (Park et al., 2008).

B. Ensayos de laboratorio para evaluar el añublo de la vaina de arroz.

Se estableció un ensayo para evaluación de 23 genotipos de arroz ante el añublo de la vaina bajo un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones, la unidad experimental fue de dos hojas/plato. Se inocularon con un grano colonizado con A5F2 (115) usando un método de laboratorio modificado (González et al., 2008). La evaluación se realizó a las 48 horas.

C. Ensayos de campo para el añublo de la vaina del arroz y la mancha bandeada del maíz.

Los ensayos de campo se establecieron en Fundación Danac, ubicada en San Javier - Estado Yaracuy, a 10°21'50'' LN y 68°59'15'' LO. El suelo usado fue de la serie YAR-02 (Tut convencional), sin problemas de salinidad, con alta disponibilidad de P, a.C., K y Mg; con bajo contenido de materia orgánica y bajo contenido de N. El suelo presentó la clase textural Franco arcillo limoso/franco arenoso. El suministro de riego fue por aspersión o por gravedad cuando fue requerido.

Después de la preparación de suelo, se tomaron 10 muestras de suelo de 1 Kg cada una a una profundidad de 5 a 10 cm y fueron secadas a la sombra por 14 días. Posteriormente, se pulverizaron, se colocaron en vaso de precipitado de 1000 ml, se añadió agua hasta cubrir y se agitaron, para luego dejarlas en reposo durante la noche. Seguidamente, se vertió el sobrenadante en dos Cribas de diferentes diámetros, para separar material grueso del pequeño. El material pequeño ($< 1, 7$ mm) se colocó en

papel absorbente para cuantificar los esclerocios al estereoscopio, por cada una de las muestras de suelo (Carling y Summer, 1992).

1. Se estableció un ensayo para evaluación de 23 genotipos de arroz ante el añublo de la vaina, los cuales fueron infestados con el haplotipo A3D5 (70). Después del acondicionamiento de suelo mediante batido o fangueo, se realizó el trasplante de plantas de 20 dde a una densidad de 0,2 m entre plantas x 0,30 m entre hileras. Las parcelas se infestaron con inóculo de arroz pulido colonizado por el micelio del hongo, esparcido en hileras sobre suelo drenado a una dosis de 100 ml (medido en cilindro graduado de 500 ml) entre las dos hileras centrales cuando el cultivo se encontraba embuchamiento o prefloración coincidiendo con los 65 dde. El diseño fue de bloques completos al azar con tres repeticiones, la unidad experimental fue de 40 plantas (10 plantas/hilera). Las evaluaciones de las dos hileras centrales de cada parcela se hicieron a los 30 después de la infestación, con la escala del IRRRI según Delgado et al. (2004) y midiendo el avance en % [$\text{Avance (\%)} = (\text{AM}/\text{AP}) \cdot 100$], simultáneamente.

2. Se estableció un ensayo para evaluación de 23 genotipos de arroz ante el añublo de la vaina, los cuales fueron infestados con el haplotipo A5B4 (64). El diseño fue de bloques completos al azar con tres repeticiones, la unidad experimental fue de 40 plantas y se usó la metodología descrita para el ensayo anterior (Delgado et al., 2004), más la medición del avance en %.

3. Se estableció un ensayo de campo para evaluar siete líneas endocriadas de maíz frente a la mancha bandeada, infestando con el haplotipo M2D4 (147) de *R. solani* AG-1 IA, con amplio espectro de virulencia. Dos semillas por punto fueron sembradas a una distancia de 25 cm entre planta y 50 cm entre hileras, raleadas a los 25 días para dejar las 10 planta más desarrolladas. Plantas de 25 días de edad fueron infestadas por medio de 1 g de arroz colonizado colocados en suelo en un perímetro de 5 cm cercano a la base de la planta (Pineda et al, 2005). El diseño fue de bloques completos al azar por cuatro repeticiones, la parcela o unidad experimental fue de 20 plantas. La primera evaluación se realizó a los 60 días de edad y la segunda

evaluación se efectuó a los 70 días, se registraron cinco plantas por parcela midiendo la altura de la mancha en cm (AM) y altura de la planta en el nudo de la mazorca principal (AMP), con regla graduada. La expresión usada para avance de la mancha en % fue: Avance (%) = (AM/AMP)*100.

4. Se estableció un ensayo de campo para evaluar siete líneas endocriadas de maíz a la mancha bandeada infestando con el aislado P2AB2 de *R. solani* AG-1 IA (Perdomo et al., 2007) seleccionado como testigo. El diseño fue de bloques completos al azar por cuatro repeticiones, la parcela o unidad experimental fue de 20 plantas, y se usó el método de inoculación descrito anteriormente.

La aleatorización de tratamientos para todos los ensayos fue realizada con el programa FIELDBOOK (El programa de maíz del Cimmyt, 2002). El análisis de la varianza (aislados x genotipos de arroz o línea de maíz), las correlaciones, las covarianzas, el análisis de componentes principales fue ejecutado con el programa Infostat versión 1.1. (Infostat, 2002) y la regresión lineal con el programa Statistix 8.0. (Statistix, 2003).

Los ensayos de campo para evaluar el añublo de la vaina de arroz mediante la infestación de dos aislados fueron conducidos simultáneamente bajo las mismas condiciones y fueron repetidos en la misma época en el año 2007 y 2008. La evaluación con la escala del IRRI para el añublo de la vaina fue hecha por la misma persona, al día siguiente a la evaluación del avance en porcentaje, en las primeras horas de la mañana para disminuir el efecto de fatiga y luminosidad. Para la evaluación de la mancha bandeada, las mediciones fueron hechas por la misma persona y los ensayos fueron repetidos en el 2008 (secano) y 2009 (norte verano), registrándose precipitaciones regulares en ambos periodos, el último ensayo fue regado por aspersión solo una vez. Se construyó un cuadro resumen (Cuadro 14) sobre los métodos usados para la evaluación del añublo de la vaina y la mancha bandeada del maíz, indicando el lev y D/S de los aislados de *R. solani* AG-1 IA y los testigos para cada una de las pruebas.

Cuadro 14. Resumen de la serie de ensayos establecidos en umbráculo, laboratorio y campo para la evaluación de germoplasma de arroz y maíz ante el añublo de la vaina y la mancha bandeada, respectivamente.

Serie Ensayo		Método	Aislado inoculado			Serie Testigos	
Nº	Condiciones		Haplotipo	Iev ^a	D/S ^b	Arroz ^c	Maíz ^d
Añublo de la vaina del arroz	1	Umbráculo	Microcámara (Jia et al., 2007)	A5B4(64)	3,7 (I)	3,2 (I)	'Tetep' (res), 'Lemont' (sus)
	2	Umbráculo	Bola de micelio (Park et al., 2008)	A3D5(70)	7,6 (A)	3,4 (I)	'Tetep' (res), 'Lemont' (sus)
	3	Laboratorio	Laboratorio (González et al., 2008)	A5F2(115)	7,6 (A)	3,4 (I)	'Tetep' (res), 'Lemont' (sus)
	4	Campo	Arroz colonizado en hilera (Delgado et al., 2004)	A3D5(70)	7,6 (A)	3,4 (I)	'Tetep' (res), 'Lemont' (sus)
	5	Campo	Arroz colonizado en hilera (Delgado et al., 2004)	A5B4(64)	3,7 (A)	3,2 (I)	'Tetep' (res), 'Lemont' (sus)
Mancha bandeada del maíz	1	Campo	Arroz colonizado en suelo (Pineda et al., 2005)	M2D4(147)	10,1 (I)	37,2 (A)	CML-254(res), 82201-25-1-1 (sus)
	2	Campo	Arroz colonizado en suelo (Pineda et al., 2005)	P2AB2(t)	29 (A)	20,4 (A)	CML-254(res), 82201-25-1-1 (sus)

^a El Índice de espectro de virulencia (Iev) fue fijado en alto (A), intermedio (I) y bajo (B).

^b El D/S fue fijado en alto (A), intermedio (I) y bajo (B).

^c Para los testigos: (res) = cultivares de arroz resistentes y (sus) = susceptibles.

^d Para los testigos: (res) = líneas de maíz resistentes y (sus) = susceptibles

II. RESULTADOS.

A. Ensayos de umbráculo y laboratorio para evaluar el añublo de la vaina de arroz.

Se consideraron en conjunto los métodos de microcámaras, bola de micelio y laboratorio, los haplotipos de *R. solani* AG-1 IA y testigos (Cuadro 14, serie N° 1, 2, 3). Todos los datos cumplieron los supuestos de la varianza. En el Cuadro 15, se muestran los resultados del ANAVAR indicando que hubo diferencias significativas ($P = 0,05$) para el modelo y los genotipos de arroz en los diferentes métodos usados para medir la reacción de la severidad del añublo de la vaina en germoplasma de arroz.

Cuadro 15. Análisis de la Varianza (SC Tipo III) de 23 genotipos de arroz inoculado con la cepa de *R. solani* AG-1 IA haplotipo A5B4 (64), A3D5 (70) y A5F2 (115) bajo el método Microcámaras, Bola de micelio y Laboratorio, respectivamente.

Método	Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	Valor p	R ²	R ² Aj	CV
Microcámaras	Modelo	55,72	22	2,53	1,99	0,0162	0,39	0,19	15,76
	Genotipos	55,72	22	2,53	1,99	0,0162			
	Error	87,85	69	1,27					
	Total	143,56	91						
Bola de micelio	Modelo	5920,4	22	269,1	1,87	0,0259	0,37	0,17	17,80
	Genotipos	5920,4	22	269,1	1,87	0,0259			
	Error	9929,8	69	143,9					
	Total	15850	91						
Laboratorio	Modelo	26,33	22	1,2	2,2	0,0069	0,41	0,23	24,94
	Genotipos	26,33	22	1,2	2,2	0,0069			
	Error	37,5	69	0,54					
	Total	63,83	91						

SC = Suma de Cuadrados; gl = grados de libertad; CM = Cuadrados Medios; F = Probabilidad de Fisher; Valor p = significancia o no significancia al valor de Alfa: 0,05; R² = R cuadrado; R² Aj = R cuadrado ajustado; CV = coeficiente de variación.

En el Cuadro 16, en la separación de medias para el método de microcámara se formaron siete grupos, hubo un grupo muy compacto 'bcd' (6,9 promedio), el genotipo de arroz más resistente al añublo de la vaina fue 'Tetep' (testigo resistente) con 5,1, mientras que el genotipo más susceptible fue 'Jasmine 85' (8,7), seguido por 'Lemont' (testigo susceptible) con 8,3. Por el método de bola de micelio se formaron cinco grupos homogéneos el genotipo más resistente fue 'Tetep' (testigo resistente) con 48,0; mientras que el más susceptible fue Lemont' (testigo susceptible) con 78,3.

A diferencia de los métodos anteriores, en Laboratorio los genotipos más resistentes fueron 'SD20A' y 'CENTAURO', mientras que los más susceptibles fueron 'CT15675-7-1-4-2-3-M-1' y 'Remadja'. En esta última prueba, los testigos quedaron ubicados en el mismo grupo 'abc' inclusive 'Tetep' con valor más alto de severidad que 'Lemont', lo cual no fue consistente con los resultados obtenidos en ensayos anteriores. Los detalles del ensayo de bola de micelio, uno de los métodos empleados se muestran en la Figura 21.

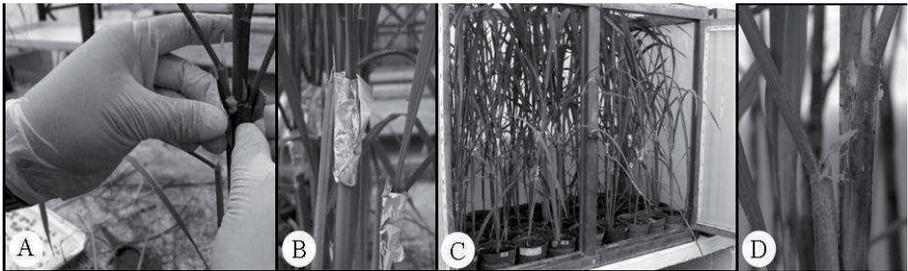


Figura 21. Método de la bola de micelio (Park et al., 2008). A. colocación de la bola de micelio en el tercer internado basal. B. Cubrimiento con papel aluminio. C. Incubación en cámara húmeda. D. Desarrollo de la lesión cinco días después de inoculado.

Cuadro 16. Comparación de medias de la severidad del añublo de la vaina del arroz en 23 genotipos de arroz inoculados con *R. solani* AG-1 haplotipos A5B4 (64), A3D5 (70) y A5F2 (115) bajo el método Microcámaras, Bola de micelio y Cinetina y Laboratorio, respectivamente.

Cultivares	Microcámara				Bola de micelio				Cinetina			
	Medias	N	Grupos ^{a,b}		Medias	N	Grupos ^{a,b}		Medias	N	Grupos ^{a,b}	
Amistad 82	6,9	4	a	b c d	63,3	4	a	b c	3,4	4	a	b c
CENTAURO	7,4	4		b c d	69,5	4		b c	2,1	4	a	
CT 15150-M-11-4-3-2-M	6,4	4	a	b c	65,5	4	a	b c	2,5	4	a	b
CT 15150-M-79-7-2-2-M	6,7	4	a	b c	77,0	4		c	3,1	4	a	b c
CT 15150-M-79-9-1-2-M	7,5	4		b c d	78,0	4		c	2,3	4	a	
CT 15150-M-79-9-2-3-M	6,1	4	a	b	75,5	4		c	3,6	4		b c
CT 15150-M-79-9-5-1-M	7,4	4		b c d	64,8	4	a	b c	2,6	4	a	b c
CT15675-7-1-4-2-3-M-1	7,0	4	a	b c d	65,3	4	a	b c	3,9	4		c
CT15696-3-4-1-3-2-M-1	7,9	4		b c d	64,8	4	a	b c	3,6	4		b c
D-ORYZA	7,2	4		b c d	72,0	4		c	3,6	4		b c
D-SATIVA	6,6	4	a	b c	58,8	4	a	b c	2,6	4	a	b c
FD0226-M-14-2-4-2-M	7,1	4		b c d	70,3	4		b c	3,1	4	a	b c
FD0248-M-14-3-1-2-M-1	8,0	4		b c d	58,5	4	a	b c	3,3	4	a	b c
FD0248-M-14-5-1-1-1-1	6,8	4	a	b c d	60,0	4	a	b c	2,4	4	a	b
FD0248-M-6-6-1-1-1-1	7,7	4		b c d	69,3	4		b c	3,3	4	a	b c
FD-03B01	6,4	4	a	b c	50,5	4	a	b	2,1	4	a	
FEDEARROZ 50	8,0	4		c d	74,3	4		c	2,8	4	a	b c
Jasmine 85	8,7	4		d	69,5	4		b c	2,6	4	a	b c
Jefferson	6,6	4	a	b c	69,5	4		b c	2,6	4	a	b c
Lemont	8,3	4		c d	78,3	4		c	2,6	4	a	b c
Remadja	7,3	4		b c d	75,0	4		c	3,9	4		c
Tetep	5,1	4	a		48,0	4	a		2,8	4	a	b c
VENEZUELA 21	7,6	4		b c d	73,0	4		c	3,3	4	a	b c

^a Test: Duncan Alfa: 0,05. Se estimaron las probabilidades según Duncan porque estos resultados se van a correlacionar con los de campo, y esta es la prueba de medias más usada bajo esas condiciones.

^b Sombreado resalta al genotipo más susceptible y sombreado resalta al genotipo más resistente, en el cuadro se debe relacionar con los respectivos promedios, no se incluyeron el resto de genotipos dentro del grupo homogéneo.

B. Ensayos para la evaluación del añublo de la vaina de arroz bajo condiciones de campo.

No se observaron estructuras de resistencias como esclerocios de *R. solani* en ninguna de las 10 muestras de suelo tomadas y analizadas por el método de cuantificación del inóculo natural (Carling y Summer, 1992), concluyendo que el suelo se encontraba libre de propágulos del hongo.

En la evaluación del añublo de la vaina del arroz bajo condiciones de campo, se agruparon los dos ensayos infectados con los dos haplotipos de *R. solani* AG-1 IA y testigos señalados en el Cuadro 14, en la serie N° 4 y 5. Todos los datos cumplieron los supuestos de la varianza. En el Cuadro 17 se muestran los resultados del ANAVAR, se observó que hubo diferencias significativas ($P = 0,05$) para el modelo y los genotipos de arroz infectados con los respectivos aislados de *R. solani*, esto fue indicativo que el método usado fue confiable para medir la reacción del añublo de la vaina bajo condiciones de campo. Hubo control de las variables del ensayo evidenciado por el valor de CV, mientras que el R^2 fue bajo.

El Cuadro 18, muestra la separación de medias de los diferentes ensayos de campo para evaluar el añublo de la vaina.

1. Para el ensayo infestado por A3D5 (70), se observó que en el avance (%) se formaron 11 grupos homogéneos, en los extremos, el genotipo ‘CT 15150-M-11-4-3-2-M’ (36,2%) fue el más resistente, mientras que ‘Lemont’ fue el más susceptible con 66,2% promedio. Asimismo, para la variable escala se observó la formación de cinco grupos quedando el genotipo ‘CT 15150-M-11-4-3-2-M’ (4,3 promedio de la escala) como el más resistente, dentro de este grupo también se encontraron ‘Tetep’ y ‘Remadja’ entre los más resistentes, aunque ‘Jasmine 85’ fue el más susceptible con 9 y ‘Lemont’ le sucedió con 8,3 el cual se encuentra resaltado en el Cuadro 18.

2. Para el ensayo de campo infestado con el haplotipo A5B4 (64) la variable avance (%) registró la formación de cinco grupos homogéneos, el genotipo ‘D-SATIVA’ fue el más resistente con 41,6%, mientras que el más susceptible fue

‘FD0248-M-14-5-1-1-1-1’ con 63,9%, ‘Lemont’ estuvo dentro de los más susceptibles con 60,1%. Por su parte, en la variable escala se formaron ocho grupos homogéneos, el genotipo ‘Tetep’ fue el más resistente (3,0 promedio en la escala), mientras que el susceptible fue ‘Lemont’ con 9,0 promedio.

En general, por los valores obtenidos en el Cuadro 17 y 18 se considera que hubo control de las variables y el error experimental fue bajo. La variable escala también fue analizada mediante el método no paramétrico Kruskal y Wallis (no mostrado), dando resultados similares a los del análisis de la varianza paramétrico para la separación de medias, por lo que no fue necesario incluirlo. En las Figuras 22 y 23, se muestran los detalles de los ensayos de campo para medir la reacción del añublo de la vaina del arroz.

Cuadro 17. Análisis de la Varianza (SC Tipo III) de 23 genotipos de arroz inoculado con el hongo *R. solani* AG-1 IA haplotipo A3D5 (70) y A5B4 (64), bajo condiciones de campo.

Haplotipo/Medida	Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	Valor p	R ²	R ² Aj	CV
A3D5 (70)/Avance (%)	Modelo	4112,7	22	186,9	2,9	0,0012	0,58	0,38	14,80
	Cultivares	4112,7	22	186,9	2,9	0,0012			
	Error	2965,4	46	64,46					
	Total	7078,1	68						
A3D5 (70)/Escala (1-9)	Modelo	100,99	22	4,59	2,4	0,0062	0,53	0,31	23,00
	Cultivares	100,99	22	4,59	2,4	0,0062			
	Error	88	46	1,91					
	Total	188,99	68						
A5B4 (64)/Avance (%)	Modelo	3397,2	22	154,4	1,81	0,0446	0,46	0,21	17,03
	Cultivares	3397,2	22	154,4	1,81	0,0446			
	Error	3918,4	46	85,18					
	Total	7315,6	68						
A5B4 (64)/ Escala (1-9)	Modelo	121,28	22	5,51	2,8	0,0016	0,57	0,37	22,07
	Cultivares	121,28	22	5,51	2,8	0,0016			
	Error	90,67	46	1,97					
	Total	211,94	68						

SC = Suma de Cuadrados; gl = grados de libertad; CM = Cuadrados Medios; F = Probabilidad de Fisher; Valor p = significancia o no significancia al valor de Alfa: 0,05; R² = R cuadrado; R² Aj = R cuadrado ajustado; CV = coeficiente de variación.

Cuadro 18. Comparación de medias de la severidad del añublo de la vaina del arroz en 23 genotipos de arroz 1 infectados con *R. solani* AG-1 haplotipos A3D5 (70) y A5B4 (64), bajo condiciones de campo.

Genotipos de arroz	A3D5 (70) / Avance (%)			A3D5 (70) / Escala (1-9)			A5B4 (64) / Avance (%)			A5B4 (64) / Escala (1-9)		
	Medias	N	Grupos ^{a,b}	Medias	N	Grupos ^{a,b}	Medias	N	Grupos ^{a,b}	Medias	N	Grupos ^{a,b}
Amistad 82	65,6	3	f	7,0	3	a	63,5	3	c	7,0	3	b
CENTAURO	50,9	3	a	5,0	3	a	51,8	3	a	6,3	3	b
CT15150-M-11-4-3-2-M	36,2	3	a	4,3	3	a	45,7	3	a	4,3	3	a
CT15150-M-79-7-2-2-M	60,5	3	d	7,0	3	a	60,2	3	b	7,0	3	b
CT15150-M-79-9-1-2-M	52,6	3	b	5,7	3	a	59,4	3	a	7,0	3	b
CT15150-M-79-9-2-3-M	58,5	3	c	6,3	3	a	63,6	3	c	7,7	3	c
CT15150-M-79-9-5-1-M	56,6	3	b	6,3	3	a	55,7	3	a	7,0	3	b
CT15675-7-1-4-2-3-M-1	55,8	3	b	5,7	3	a	58,7	3	a	7,0	3	b
CT15696-3-4-1-3-2-M-1	47,9	3	a	6,3	3	a	47,2	3	a	6,3	3	b
D-ORYZA	60,4	3	d	7,0	3	a	61,2	3	c	7,7	3	c
D-SATIVA	52,1	3	b	5,0	3	a	41,6	3	a	5,0	3	a
FD0226-M-14-2-4-2-M	63,8	3	e	7,0	3	a	51,2	3	a	5,7	3	a
FD0248-M-14-3-1-2-M-1	48,6	3	a	5,0	3	a	61,9	3	c	5,0	3	a
FD0248-M-14-5-1-1-1	53,2	3	b	5,7	3	a	63,9	3	c	7,0	3	b
FD0248-M-6-6-1-1-1	54,9	3	b	5,0	3	a	56,2	3	a	7,0	3	b
SD20A	42,9	3	a	5,0	3	a	47,3	3	a	5,7	3	a
FEDEARROZ 50	63,1	3	e	7,0	3	a	47,5	3	a	5,7	3	a
Jasmine 85	61,6	3	d	9,0	3	c	57,4	3	a	8,3	3	d
Jefferson	55,4	3	b	5,7	3	a	46,8	3	a	5,7	3	a
Lemont	66,2	3	f	8,3	3	b	60,1	3	b	9,0	3	e
Remadja	46,0	3	a	4,3	3	a	47,3	3	a	5,0	3	a
Tetep	41,8	3	a	4,3	3	a	42,8	3	a	3,0	3	a
VENEZUELA 21	53,6	3	b	6,3	3	a	55,5	3	a	7,0	3	b

^a Test: Duncan Alfa: 0,05. Se estimaron las probabilidades según Duncan, porque es la prueba de medias más usada bajo condiciones de campo. □

^b Sombreado ■ resalta al genotipo más susceptible y ■ resalta al genotipo más resistente, en el cuadro se debe relacionar con los respectivos promedios.

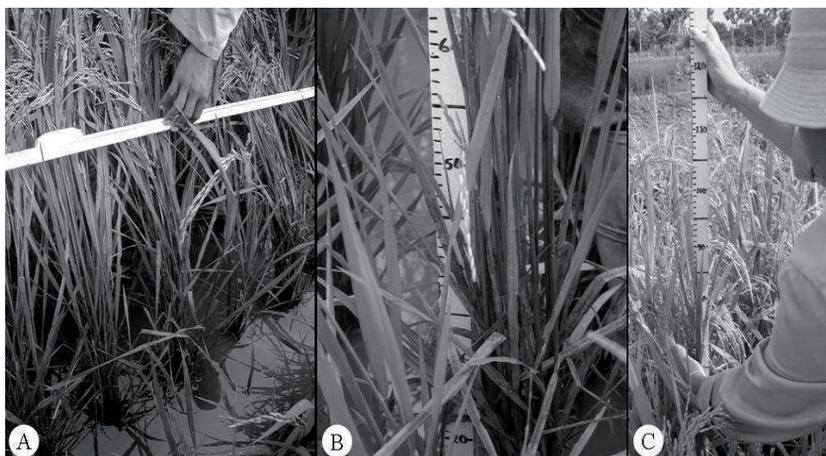


Figura 22. A. Manchas típicas del añublo de la vaina del arroz uniformemente distribuidas en todas las plantas (hojas basales) de una hilera central, a los 8 días de la infección con arroz inoculado. B. Altura del avance vertical de la mancha (cm) medida con regla graduada, se registró la mayor altura en culmo por macollos. C. Altura total de planta (cm) medida hasta la inflorescencia o panícula.

3. Se realizó un análisis de correlación de los ensayos de evaluación de 23 genotipos de arroz ante el añublo de la vaina. Se elaboró una matriz con los promedios de los resultados de todos los ensayos. En el Cuadro 19 se muestran los resultados de la prueba de coeficientes todos contra todos. En los valores de las correlaciones (Pearson) tanto para el método como para los aislados, se pudo apreciar que el método más robusto fue Microcámara (MicA5B4), el cual dió estadísticamente significativo ($P = 0,05$ y $P = 0,01$) al correlacionarse con el método de Bola de micelio (BolA5D3), Campo avance (CpoaA3D5) y Campo escala (CpoeA3D5, CpoeA5B4), alcanzando un coeficiente promedio de 0,50; independientemente del aislado de *R. solani* usado para medir la reacción al añublo de la vaina del arroz.

EL método que le siguió en cuanto a confiabilidad fue el de Bola de micelio (BolA3D5), detectándose diferencias significativas ($P = 0,05$ y $P = 0,01$) al correlacionarse con Campo avance (CpoaA3D5, CpoaA5B4) y Campo escala

(CpoeA3D5 y CpoeA5B4), con un coeficiente promedio de 0,49; independientemente del aislado usado. A diferencia de los métodos anteriores, el de laboratorio modificado (CinA5F2) no fue significativo en ninguna de las correlaciones, indicando que este método es poco confiable para medir la reacción del añublo de la vaina comparando con los resultados de campo.

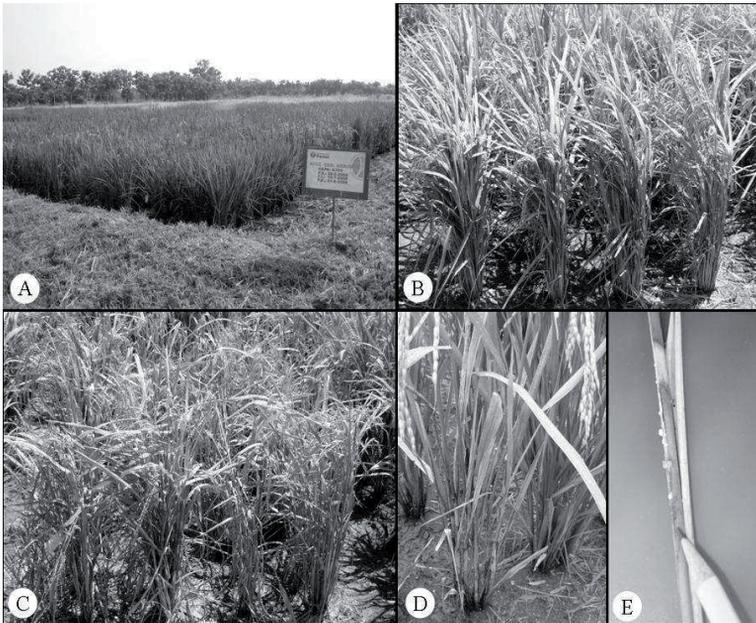


Figura 23. A. Aspecto general de los ensayos de germoplasma de arroz ante el añublo del arroz causado por *R. solani* AG-1 IA, al frente ensayo infestado con el haplotipo A3D5 (70), plantación de 70 días de edad. B. Parcela del cultivar ‘Tetep’, ubicado entre los genotipos de mayor resistencia a la enfermedad, al momento de la evaluación (90 días). C. Parcela del cultivar ‘Lemont’, ubicado entre los genotipos más susceptibles, nótese las dos hileras centrales muy afectadas por la enfermedad, las plantas presentaron tizón con aspecto de paja seca. D. Síntomas típicos del añublo en planta infestada (izquierda), mientras que las plantas no infestadas no presentaron síntomas (derecha). E. Síntomas y signos (esclerocios inmaduros), presentes en el tallo de la hoja bandera en genotipo susceptible.

Cabe destacar que el haplotipo seleccionado (A5B4) para la prueba de microcámara tuvo un Iev y D/S intermedio. Siendo el haplotipo A3D5 (70), el que registró el valor más alto para el índice Iev en la prueba de virulencia (Cuadro 8, del Capítulo 3), lo que hace suponer que este método tendrá mayor confiabilidad inoculando con dicho aislado. En cuanto a los aislados se corrobora que A3D5 (70) fue el mejor con un coeficiente promedio de 0,58 estimado para los valores de correlación con significancia estadística, mientras que el aislado A5B4 (64), presentó un coeficiente de 0,54 promedio; lo cual corrobora los resultados obtenidos en las pruebas de virulencia.

Cuadro 19. Coeficientes de correlación de los diferentes métodos usados en la evaluación del añublo de la vaina en 23 genotipos de arroz inoculados con haplotipos de *R. solani* AG-1 IA bajo condiciones de laboratorio, umbráculo y campo.

Coefficientes \ Probabilidades ^a	MicA5B4 ^b	BolA3D5	CinA5F2 ^c	CpoaA3D5	CpoeA3D5	CpoaA5B4	CpoeA5B4
MicA5B4	1	0,02	0,795	0,042	0,007	0,172	0,007
BolA3D5	0,480*	1	0,302	0,007	0,021	0,093	0,003
CinA5F2 ^c	0,057	0,225	1	0,409	0,829	0,261	0,674
CpoaA3D5	0,427*	0,544**	0,181	1	0,000	0,007	0,000
CpoeA3D5	0,550**	0,477*	0,048	0,835**	1	0,024	0,000
CpoaA5B4	0,295	0,358 *	0,245	0,548**	0,468*	1	0,000
CpoeA5B4	0,549**	0,585**	0,093	0,713**	0,756**	0,735**	1

^a Correlación de Pearson: coeficientes\probabilidades: * Correlación significativa ($p = 0,05$); ** Correlación significativa ($p = 0,01$).

^b Para la identificación del métodos y el aislado, se utilizó un código compuesto: tres primeras letras para el método, seguido por el haplotipo, la abreviatura Cpoa(e) = Campo (tres primeras letras), seguido de a ó e (avance % ó escala 1-5, respectivamente).

^c El método de Laboratorio se identificó con las siglas Cin.

Para verificar estos resultados se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) cuyos valores se presentan en el Cuadro 20, donde se observa que los autovalores fueron altos, lo que permite explicar el modelo en 70% (sombreado) con sólo dos componentes, lo cual se consideró suficiente. Por lo demás, las correlaciones del Cuadro 20 coinciden con los valores de la matriz de covarianza (no mostrada), la correlación cofenética fue alta 0,94 indicando la robustez de los métodos. A partir de estos valores se construyó la Figura 23, por medio de la cual se realizó un análisis cualitativo en conjunto de todos los métodos usados para medir la severidad del añublo de la vaina del arroz bajo condiciones de controladas y de campo.

Cuadro 20. Análisis de los componentes principales (ACP): autovalores, autovectores y correlaciones entre los métodos y aislados de *R. solani* AG-1 IA usados para medir la reacción del añublo de la vaina en 23 genotipos de arroz.

Variables ^a	Autovalores				Autovectores		Correlaciones con variables originales	
	Lambda	Valor	Proporc.	Prop. Acum ^b	e1	e2	CP1	CP2
MicA5B4	1	3,86	0,55	0,55	-0,341	0,233	-0,67	0,238
BolA3D5	2	1,05	0,15	0,70	-0,364	-0,104	-0,716	-0,106
CinA5F2	3	0,77	0,11	0,81	-0,117	-0,908	-0,23	-0,929
CpoaA3D5	4	0,55	0,08	0,89	-0,441	0,025	-0,867	0,025
CpoeA3D5	5	0,50	0,07	0,96	-0,44	0,227	-0,864	0,232
CpoaA5B4	6	0,18	0,03	0,99	-0,366	-0,228	-0,72	-0,234
CpoeA5B4	7	0,10	0,02	1,00	-0,464	0,082	-0,912	0,084
							Correlación cofenética: 0,941	

^a Para la identificación del métodos y el aislado, se utilizó un código compuesto: tres primeras letras para el método, seguido por el haplotipo, la abreviatura Cpo = Campo (tres primeras letras), seguido por a y e (avance % y escala 1-5, respectivamente).

^b Indica los valores de proporción acumulada, a partir de la proporción general.

La Figura 24, muestra que todos los métodos de bola, microcámara y campo fueron capaces de discriminar los genotipos de arroz, el tamaño o longitud del vector indica la robustez del método dependiendo del ángulo. Sin embargo, se destaca la orientación del vector de MicA5B4 que siempre apuntó hacia los testigos más susceptibles junto con los métodos de campos ubicados en el mismo cuadrante, en consecuencia, también pudo discriminar los genotipos más resistentes que se encuentran en la derecha de la diagonal de 90° en el cuadrante superior derecho, lo cual genera confianza en el método de evaluación.

El método de laboratorio modificado no tuvo buena capacidad de discriminación y estuvo ubicado muy cercano a cero en la diagonal de 90°, indicando discriminación nula, lo cual es indicativo que este método no es confiable para la evaluación del añublo de la vaina. En general, el genotipo más resistente al añublo fue ‘Tetep’ (en la figura como Tete) muy alejado hacia la derecha de la figura, mientras que ‘Lemont’ (Lemo) fue el más susceptible, ubicado a la izquierda de la figura.

Cabe destacar que el genotipo ‘CT151 50-M-11-4-3-2-M’ (CT-1) fue el segundo con mayor resistencia, seguido por ‘SD-20A’ (SD20) y después por ‘D-SATIVA’ (DSAT), estos dos últimos son cultivares de arroz desarrollados por el programa de mejoramiento de Fundación Danac, siendo la última la de mayor superficie cosechada (56%) en Venezuela en el año 2008 (Fundación Danac, 2008). Para determinar en qué proporción el método de microcámara de umbráculo (MicA5B4) puede predecir los resultados de campo, fue necesario desarrollar una prueba de regresión simple entre dicho método y los métodos de campo CpoeA5B4 y CpoeA3D5.

4. Análisis de regresión simple para el método de microcámaras para medir la reacción del añublo de la vaina del arroz. Los datos cumplieron los supuestos del ANAVAR. El cuadro 21, muestra los valores del ANAVAR de la regresión lineal del método Microcámara aislado A5B4 de *R. solani* (MicA5B4), en relación con los resultados de la evaluación mediante escala (IRRI) del añublo de la vaina de arroz (CpoeA5B4 y CpoeA3D5), el análisis para las dos pruebas mostró un $R^2 = 0,18$ y

0,25, respectivamente. Estos valores de R^2 son considerados bajos, por lo cual no se puede considerar a MicA5B4 una prueba definitiva y prescindir de los ensayos de campo, al menos que se pueda aumentar el valor de R^2 . No obstante, hubo diferencias significativas ($P = 0,05$), indicando que la combinación método\aislado explican el modelo e influyen positivamente en los resultados de campo (Figura 25). Aunque, pudiera aumentarse el R^2 con el uso de otro aislado que posea un alto nivel de Iev y D/S como A3D5 (70) y aumentar el control de las variables en umbráculo.

Cuadro 21. Valores de los Cuadrados Mínimos de las regresión lineal de MicA5B4

Variable del predictor	Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	Valor p	R^2	R^2 Aj	Coef
MicA5B4 \ CpoeA5B4	Regresión	8,0545	1	8,05448	4,9	0,0381	0,18	0,15	0,75
	Residual	34,5542	21	2,64544					
	Total	42,6087	22						
MicA5B5 \ CpoeA3D5	Regresión	9,4763	1	9,47630	7,0	0,0151	0,25	0,21	0,81
	Residual	28,3467	21	1,354113					
	Total	37,913	22						

SC = Suma de Cuadrados; gl = grados de libertad; CM = Cuadrados Medios; F = Probabilidad de Fisher; Valor p = significancia o no significancia al valor de Alfa: 0,05; R^2 = R cuadrado; R^2 Aj = R cuadrado ajustado; Coef = coeficiente de la correlación.

C. Ensayos de campo para evaluar la mancha bandeada del maíz.

1. Se evaluaron siete líneas endocriadas de maíz frente a la mancha bandeada, infestando con el aislado M2D4 (147) de *R. solani* AG-1 IA y con el testigo P2AB2. Los datos cumplieron los supuestos del ANAVAR. En el cuadro 22, se resumen los resultados de los dos ensayos establecidos simultáneamente, con dos evaluaciones para cada ensayo por separado. Los mismos mostraron diferencias altamente significativas ($P = 0,01$) para el modelo y para las líneas de maíz probadas, indicando que el modelo, el método y el aislado fueron confiables para medir la reacción de la mancha bandeada del maíz. El R^2 , R^2 Aj y los valores de CV fueron adecuados, indicando confiabilidad.

Cuadro 22. Análisis de varianza (SC III) de la evaluación a los 60 y 70 días de edad (dde) de siete líneas de maíz infestadas con el haplotipo M2D4 (147) y el testigo P2AB2 de *R. solani*, bajo condiciones de campo.

Aislado	Evaluación	Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	Valor p	R ²	R ² Aj	CV
M2D4	60 dde	Modelo	87234,53	6	14539,09	74,24	<0,0001	0,95	0,94	15,97
		Líneas	87234,53	6	14539,09	74,24	<0,0001			
		Error	4112,6	21	195,84					
		Total	91347,13	27						
(147)	70 dde	Modelo	133811,3	6	22301,88	137,24	<0,0001	0,98	0,97	12,42
		Líneas	133811,3	6	22301,88	137,24	<0,0001			
		Error	3412,44	21	162,5					
		Total	137223,8	27						
P2AB2	60 dde	Modelo	66145,86	6	11024,31	50,92	<0,0001	0,94	0,92	18,54
		Líneas	66145,86	6	11024,31	50,92	<0,0001			
		Error	4546,31	21	216,49					
		Total	70692,17	27						
(testigo)	70 dde	Modelo	104083,8	6	17347,3	34,4	<0,0001	0,91	0,88	23,52
		Líneas	104083,8	6	17347,3	34,4	<0,0001			
		Error	10588,94	21	504,24					
		Total	114672,7	27						

SC = Suma de Cuadrados; gl = grados de libertad; CM = Cuadrados Medios; F = Probabilidad de Fisher; Valor p = significancia o no significancia al valor de Alfa: 0,05; R² = R cuadrado; R² Aj = R cuadrado ajustado; CV = coeficiente de variación.

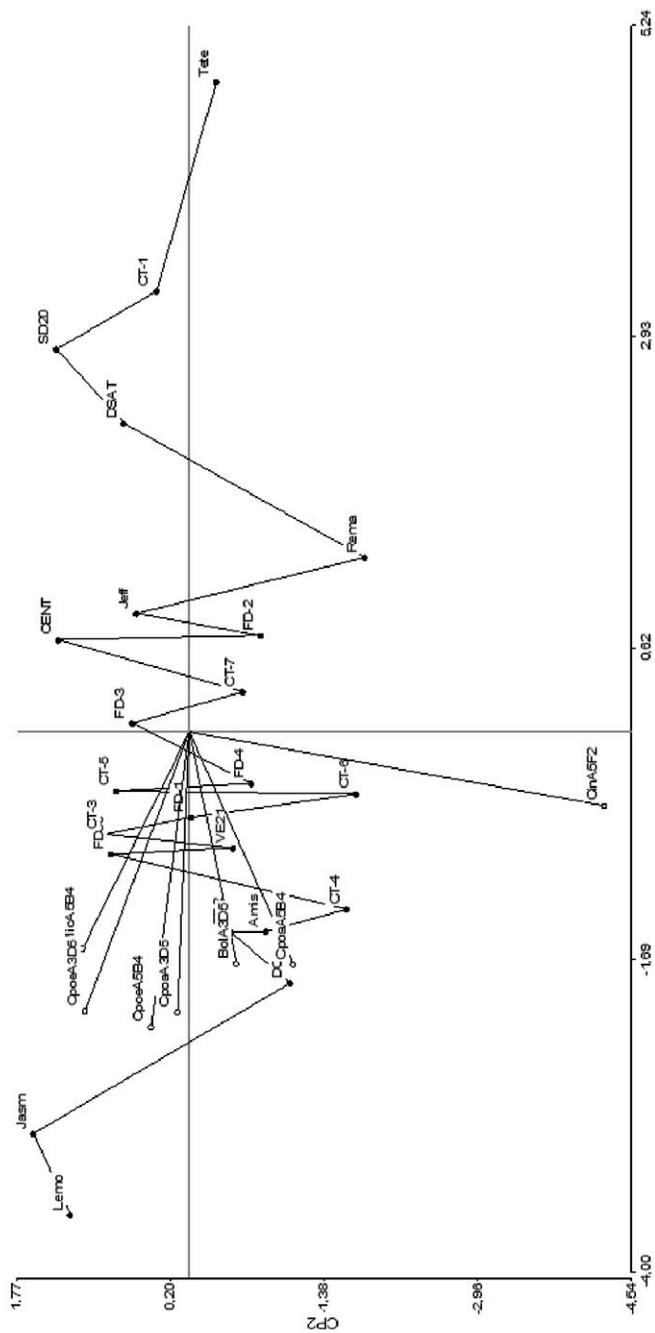


Figura 24. Componentes principales de los métodos y aislados de *R. solani* AG-1 IA usados para medir la reacción del añulo en genotipos de arroz.

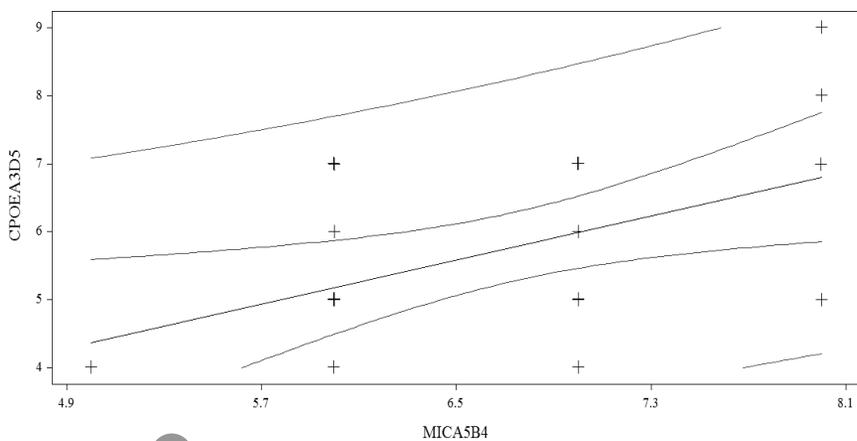
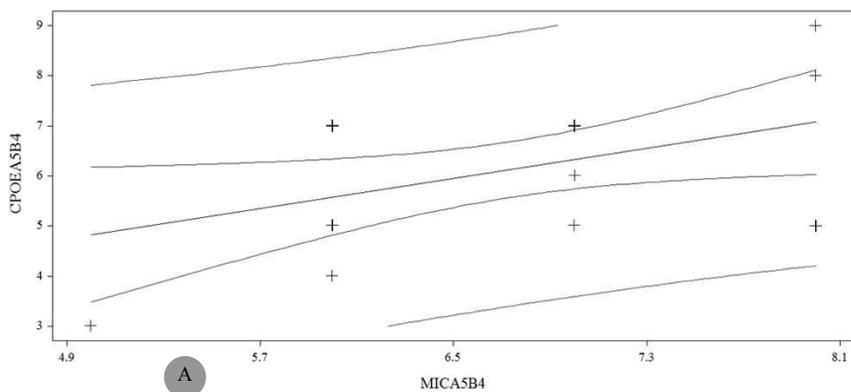


Figura 25. A. Representación de la distribución de los genotipos de arroz en el resultado de la regresión lineal Mica5B4 con respecto a CpoeA5B4. B. Representa la distribución de los genotipos de arroz en el resultado de la regresión lineal Mica5B4 con respecto a CpoeA3D5. Al pie de la figura se observa la ecuación generada.

En el cuadro 23, se muestran las comparaciones de medias de los ensayos de campo infectados con dos aislados de *R. solani* y evaluados a los 60 y 70 dde. En la primera evaluación, se observó un avance de 87,7% y en la segunda 102,6% en el ensayo infestado con *R. solani* haplotipo M2D4 (147), conformándose cuatro grupos homogéneos en las dos evaluaciones, presentando igual disposición en las líneas de maíz para ambas evaluaciones, indicativo que el aislado usado fue confiable. Estos resultados coinciden con el comportamiento del aislado ($D/S = 37,2$) obtenido en el Capítulo 3, favorecido por las condiciones ambientales predominantes durante los ensayos que fueron muy estables. Por consiguiente, las líneas más resistentes fueron ‘CML-1’, ‘CML-55’ y ‘CML-254’, mientras que la línea ‘82201-25-1-1’ fue la más susceptible, consistentemente a través de todos los ensayos (solo se resaltaron las más resistentes y susceptibles, tomando en consideración la media).

La línea ‘03MN06A-5-3-2’ presentó una ligera resistencia para el aislado M2D4 (147) más no para P2AB2, al ser comparada con la línea ‘80702-1-1-1’, las cuales compartieron el mismo grupo homogéneo. Los resultados de la evaluación de los 60 dde del ensayo infestado con el aislado testigo P2AB2 fueron parecidos a la del ensayo infestado con el aislado M2D4 (147). A diferencia de la evaluación de los 70 dde, donde solo se formaron dos grupos, los valores del avance promedio fueron de 79,4% y 95%, respectivamente. El comportamiento de las líneas de maíz ante la infestación con el aislado P2AB2 de *R. solani* fue parecido al ensayo infestado con M2D4 (147).

2. Correlaciones, análisis multivariado y regresión lineal para líneas de maíz

a. Se realizó un análisis de correlación de los ensayos de evaluación de siete líneas de maíz frente a la mancha bandeada. Se elaboró una matriz con los promedios de los resultados de los ensayos de campo incluyendo la evaluación de los 60 y 70 dde. Adicionalmente, se incluyeron los promedios de los métodos de inoculación de umbráculo (evaluación a los 8 y 15 días después de la inoculación o ddi) obtenidos en el Capítulo 3, para el aislado M2D4 (147) y P2AB2 (testigo), debido a que se utilizaron las mismas líneas de maíz para ambos métodos.

Cuadro 23. Comparación de medias de la evaluación a los 60 y 70 días de edad (dde) de siete líneas de maíz infestadas con el haplotipo M2D4 (147) y el testigo P2AB2 de *R. solani*, bajo condiciones de campo.

Líneas de maíz	<i>R. solani</i> haplotipo M2D4 (147)						<i>R. solani</i> P2AB2 (testigo)					
	Avance (%), 60 dde ^c			Avance (%), 70 dde ^c			Avance (%), 60 dde ^c			Avance (%), 70 dde ^c		
	Medias	N	Grupos ^a	Medias	N	Grupos ^b	Medias	N	Grupos ^c	Medias	N	Grupos ^d
03MN04A-2-2-1	103,7	4	b	105,8	4	b	90,8	4	b	95,0	4	a
03MN06A-5-3-2	71,3	4	a	81,1	4	a b	67,5	4	a b	78,9	4	a
80702-1-1-1	71,6	4	a b	82,3	4	a b	59,8	4	a b	70,2	4	a
82201-25-1-1	217,0	4	c	267,7	4	c	193,0	4	c	241,8	4	b
CML-1	55,5	4	a	58,7	4	a	54,5	4	a	68,2	4	a
CML-254	44,3	4	a	60,8	4	a	47,2	4	a	59,3	4	a
CML-55	50,3	4	a	62,0	4	a	42,9	4	a	55,0	4	a

^a Test: Tukey Alfa: 0,05 DMS: 32,20068. ^b Test: Tukey Alfa: 0,05 DMS: 29,33187. ^c Test: Tukey Alfa: 0,05 DMS: 33,85608. ^d Test: Tukey Alfa: 0,05 DMS: 51,66939. Se usó la prueba de comparación de medias de Tukey por ser más estricta, dada las condiciones de los ensayos que fueron muy estables, corroborado por el alto valor de R^2 y el bajo valor de CV promedio.

^e Sombreado  resalta al genotipo más susceptible y  resalta al genotipo más resistente, el cual se debe relacionar con sus respectivos promedios.

El cuadro 24 muestra los resultados de las correlaciones de los métodos de campo, umbráculo y las diferentes evaluaciones en una comparación todos contra todos. Los ensayos de campo evaluados a los 60 y 70 días dieron altamente significativos ($P = 0,01$), lo que indica que es igual evaluar a las diferentes fechas, lo cual da una ventaja comparativa en usar la primera fecha. Como se observó en el Cuadro 23, la media del testigo susceptible había superado en más del 200% del avance de la mancha con relación a la mazorca y algunos de las líneas ya habían alcanzado el 100% a los 60 dde, lo cual puede conducir a un ahorro de recursos e igualmente se está midiendo las

diferencias cuantitativas en la reacción en las líneas de maíz probadas. Por su parte, la prueba de umbráculo con el aislado M2D4 (147) con un $D/S = 37, 2$ (cuadro 10) evaluada a los 8 ddi fue altamente significativa con todos los ensayos de campo ($P = 0,01$), lo que sumado a los $R^2 = 0,74$ (Cuadro 9) da una alta confiabilidad en el uso de esta método y del aislado.

Se encontró que dicho aislado y P2AB2 usado como testigo también dieron correlaciones significativas ($P = 0,05$), lo que pone en evidencia que el método es confiable al usar un aislado con un alto Iev ó D/S . De este modo, se puede suponer que de haberse usado otro aislado de *R. solani* con un alto valor de Iev como el aislado M2B1 (129), el cual resultó con mayor espectro de virulencia para las evaluaciones de los 60 y 70 dde (Cuadros 10 y 11) se hubieran alcanzado o superado los resultados de estos ensayos.

En el cuadro 25, se observa que los autovalores fueron muy altos lo que permite explicar el modelo en 91% (sombreado) con sólo un componente, sin embargo, se utilizaron dos componentes para un total de 96% (sombreado), con la finalidad de representar los resultados en un plano bidimensional. Por lo demás, las correlaciones corroboran la matriz de covarianza (no mostrada) y la correlación cofenética fue muy alta 0,99 indicando la robustez de los métodos usados para medir la reacción a la mancha bandeada del maíz en siete líneas endocriadas, lo cual se muestra en la Figura 26.

Cuadro 24. Coeficientes de correlación del método de invernadero y campo y de los aislados de *R. solani* derivados de maíz para la evaluación de la mancha bandeada en siete líneas de maíz.

Coeficientes \ probabilidades ^a	CpM2D4 ²	CpP2AB2 ²	CpM2D4 ¹	CpP2AB2 ¹	UbM2D4 ²	UbP2AB2 ²	UbM2D4 ¹	UbP2AB2 ¹
CpM2D4 ²	1	0,000	0,000	0,000	0,040	0,036	0,001	0,012
CpP2AB2 ²	0,996**	1	0,000	0,000	0,038	0,040	0,001	0,015
CpM2D4 ¹	0,993**	0,989**	1	0,000	0,027	0,014	0,000	0,004
CpP2AB2 ¹	0,993**	0,994**	0,997**	1	0,033	0,021	0,001	0,007
UbM2D4 ²	0,777*	0,781*	0,811*	0,793*	1	0,022	0,020	0,025
UbP2AB2 ²	0,788*	0,777*	0,854*	0,829*	0,828*	1	0,018	0,000
UbM2D4 ¹	0,958**	0,956**	0,963**	0,957**	0,834*	0,839*	1	0,006
UbP2AB2 ¹	0,864*	0,853*	0,914*	0,891*	0,816*	0,985**	0,900*	1

^a Correlación de Pearson: coeficientes\probabilidades: * Correlación significativa p = 0,05; ** Correlación significativa p = 0,01.

¹ Para la evaluación de los 60 dde y 8 ddi, se utilizó un código compuesto: dos primeras letras (Cp = campo y Ub = Umbráculo, respectivamente) seguido por el haplotipo.

² Para la evaluación de los 70 dde y 15 ddi, se utilizó un código compuesto: dos primeras letras (Cp = campo y Ub = Umbráculo, respectivamente) seguido por el haplotipo.

Cuadro 25. Análisis de los componentes principales (ACP) y las correlaciones entre los métodos de umbráculo y campo usando los aislados M2D4 (147) y P2AB2 (testigo) de *R. solani* AG-1 IA usados para medir la reacción de la mancha bandeada en siete líneas de maíz.

Variables	Autovalores				Autovectores		Correlaciones con variables originales	
	Lambda	Valor	Prop.	Prop. Acum ^a	e1	e2	CP1	CP2
UbP2AB2 ¹	1	7,24	0,91	0,91	-0,35	0,36	-0,95	0,24
UbM2D4 ¹	2	0,46	0,06	0,96	-0,36	-0,12	-0,97	-0,08
UbP2AB2 ²	3	0,23	0,03	0,99	-0,34	0,57	-0,9	0,39
UbM2D4 ²	4	0,05	0,01	1	-0,32	0,43	-0,87	0,29
CpP2AB2 ¹	5	0,01	0	1	-0,36	-0,26	-0,98	-0,17
CpM2D4 ¹	6	0	0	1	-0,37	-0,19	-0,99	-0,13
CpP2AB2 ²	7	0	0	1	-0,36	-0,36	-0,97	-0,24
CpoM2D4 ²	8	0	0	1	-0,36	-0,34	-0,97	-0,23

Correlación cofenética:
0,998

^a Indica los valores de proporción acumulada, a partir de la proporción general.

¹ Para la evaluación de los 60 dde y 8 ddi, se utilizó un código compuesto: dos primeras letras (Cp= campo y Ub = Umbráculo, respectivamente) seguido por el haplotipo.

² Para la evaluación de los 70 dde y 15 ddi, se utilizó un código compuesto: dos primeras letras (Cp= campo y Ub = Umbráculo, respectivamente) seguido por el haplotipo.

En la Figura 26, se observó que los vectores se encuentran orientados hacia la izquierda del punto de corte '0' o de la diagonal vertical, con un grado de inclinación menor a 45° buscando la diagonal horizontal, indicando que tanto los métodos de umbráculo como los de campo fueron confiables para medir la reacción de la mancha bandeada. No obstante, los autovalores (0,96) tan altos para UbM2D4¹ (método de umbráculo con el aislado M2D4, evaluado a los 8 ddi) hace que las diferencias entre los métodos y aislados sea notoria, se pudo apreciar que esta combinación se

encuentra junto a todos los ensayos de campo, corroborando los resultados de la alta significancia ($P = 0,01$) de las correlaciones encontradas en el cuadro 26, por lo que queda comprobado que dicho método y aislado tiene una alta confiabilidad para medir la reacción de la enfermedad.

En consecuencia, la línea 'CML-254' se encuentra más alejada hacia la izquierda indicando la mayor resistencia en el análisis APC que estima todas las variables en conjunto, mientras que la línea '82201-25-1-1' fue proporcionalmente la más susceptible y se encuentra muy alejada hacia la izquierda de la diagonal. Asimismo, 'CML-55' y la línea '03MN06A-5-3-2' se ubican cerca del eje horizontal con buen nivel de resistencia, estos resultados fueron consistente con lo que se observó en campo donde se apreciaron síntomas muy uniformes como los observados en la figura 25D.

c. Después de comprobar la alta confiabilidad del método de umbráculo para evaluar germoplasma de maíz ante la mancha bandeada, se procedió a realizar un análisis de regresión simple para evaluar la capacidad de predicción de la combinación método de umbráculo con el aislado M2D4 evaluado a los 8 ddi, los resultados del ANAVAR se muestran en el Cuadro 26 y los intervalos de predicción y confianza se presentan en la Figura 27.

En el cuadro 26, se observan diferencias altamente significativas para la regresión ($P = 0,01$), con altos valores para el R^2 lo cual es indicativo que el predictor es suficientemente confiable para predecir los resultados de la variable regresora CpM2D4b.

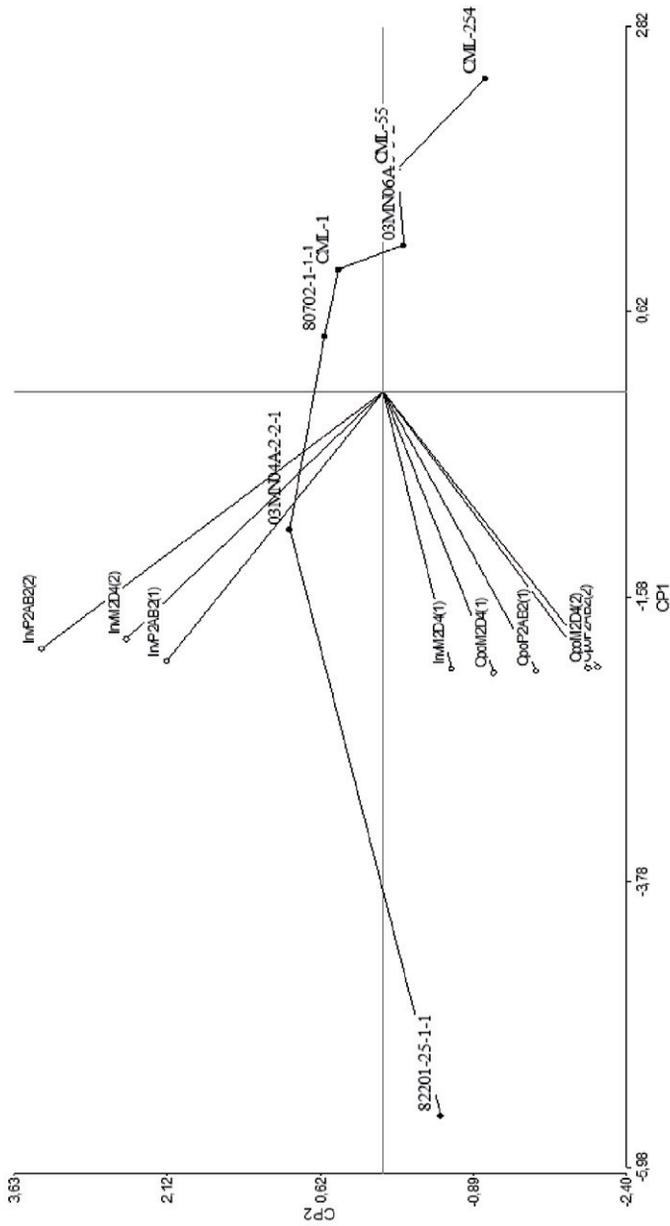


Figura 26. Componentes principales de los métodos y aislados de *R. solani* AG-1 IA infectivos de maíz usados para medir la reacción a la mancha bandeada del maíz.

Cuadro 26. Valores de los Cuadrados Mínimos de las regresión lineal de un método de umbráculo (UbM2D4b) con relación a los resultados de la evaluación a la mancha bandeada del maíz en campo (CpM2D4b).

Variable del predictor	Fuente de Variación	SC	gl	CM	F	Valor p	R ²	R ² Aj
UbM2D4b \ CpM2D4b	Regresión	20086,0	1	20086,0	64,18	0,0005	0,93	0,91
	Residual	1564,8	5	313				
	Total	21650,9	6					

SC = Suma de Cuadrados; gl = grados de libertad; CM = Cuadrados Medios; F = Probabilidad de Fisher; Valor p = significancia o no significancia al valor de Alfa: 0,05; R² = R cuadrado; R² Aj = R cuadrado ajustado.

En la Figura 27, se observó que existe una tendencia de las líneas de maíz a alinearse en torno a la diagonal (línea en azul), lo cual es indicativo de confiabilidad en la regresión. La ecuación, se muestran al pie de la figura, reflejando los valores que debe tomar UbM2D4b para poder predecir el comportamiento en campo de CpM2D4b a un nivel de confianza de 95% en la predicción. Un aspecto general del ensayo de campo se muestra en la figura 28.

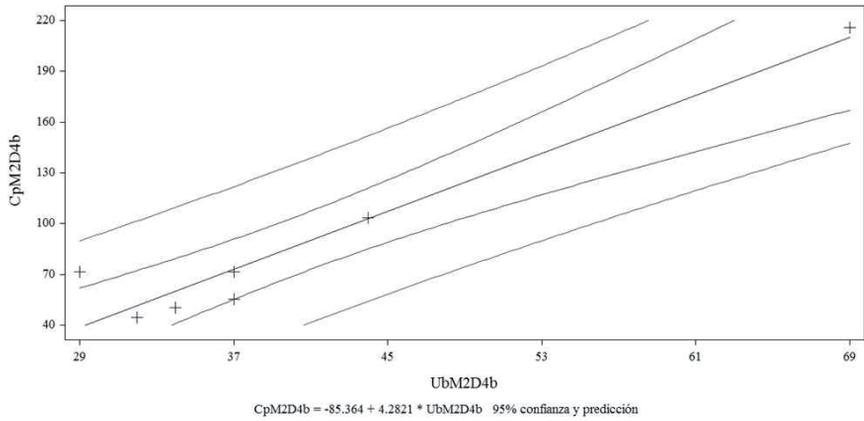


Figura 27. Representación de la distribución de las líneas de maíz regresión lineal de un método de umbráculo (Ubm2D4b) con relación a los resultados de la evaluación a la mancha bandeada del maíz en campo (CpM2D4b).

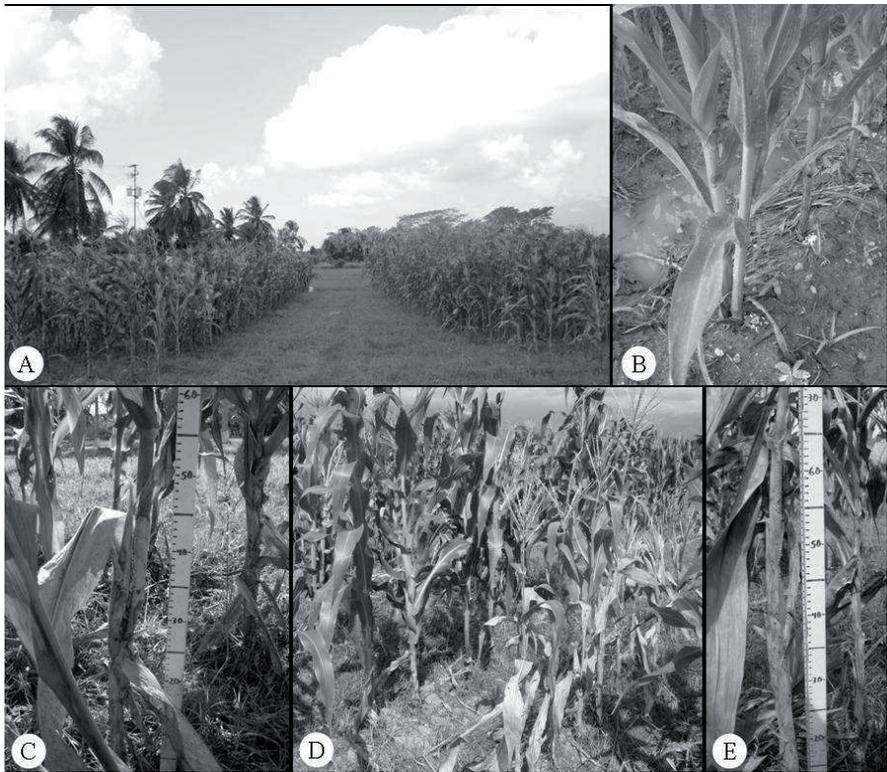


Figura 28. A. Ensayos de la mancha bandeada del maíz, a los 60 días, a la izquierda se encuentra el ensayo infectado con el haplotipo M2D4 (147) de *R. solani* y a la derecha el ensayo infestado con P2AB2 (testigo). B. Forma de infestación del ensayo colocando 1 g de arroz colonizado con los aislados de *R. solani* (15 días de incubación), alrededor del pie de la planta de 25 días de edad. C. Evaluación de los 60 días, se observa que en la línea 82201-25-1-1 la mancha bandeada rebasó la mazorca principal. D. Parcela de la línea 82201-25-1-1 afectada (derecha), en comparación con otras líneas menos afectadas. E. Síntomas típicos y signos (esclerocios) en plantas de maíz de 70 días de edad.

III. DISCUSIÓN.

Rhizoctonia solani posee un sistema mixto de reproducción y un bajo potencial para el flujo de genes/genotipo, por tanto se recomienda a los fitomejoradores centrarse en la resistencia cuantitativa (McDonald and Linde, 2002; Parlevliet and Zadok, 1977). Sin embargo, el desarrollo de cultivares resistentes al añublo de la vaina alcanzado tan sólo un éxito limitado, debido principalmente a la carencia de germoplasma resistente adaptado, a la limitada eficiencia y efectividad de los métodos de evaluación aprovechables en el pasado y a la naturaleza poligénica de la resistencia (Pinson et al, 2005). Como resultados de esta investigación, se puede señalar que el método de microcámara (Jia et al., 2007) fue eficiente para evaluar la reacción del añublo de la vaina, identificándose fuentes de resistencia en el germoplasma de arroz probado.

Entre los métodos comparados bajo condiciones controladas se encontraban el de microcámaras (Jia et al., 2007), bola de micelio (Park et al., 2008) y laboratorio (Ahuja and Payak, 1981) modificado por González et al. (2008). No obstante, se observó mayor sensibilidad del método de microcámaras y bola de micelio en la comparación de medias permitiendo una mejor ubicación de los testigos (Cuadro 16), con respecto al de laboratorio. Este último, no discriminó los testigos como se esperaba, agrupando a ‘Tetep’ señalada entre las variedades de mayor resistencia al añublo de la vaina (Groth and Nowick, 1992; Li et al., 1995) junto con ‘Lemont’, un cultivar de arroz semienano muy susceptible (Bollich et al., 1985; Groth and Nowick, 1992; Jia et al., 2007; Li et al., 1995).

Antes de realizar el ensayo de campo fue recomendable determinar el potencial de inóculo de *R. solani* del suelo (Carling y Summer, 1992; Delgado et al., 2004), con el propósito de disminuir la interferencia de otras fuentes de inóculo con el aislado que se quiere probar. Un esclerocio detectado por 1 Kg de suelo es suficiente para considerarlo como un suelo con alto potencial de inóculo, en el cual se deberán tomar medidas de para minimizar el impacto de la enfermedad (Zambrano et al., 2001). Según el método de Carling y Summer (1992) empleado en esta investigación, no se

detectaron esclerocios de *R. solani* garantizando que el aislado del patógeno usado mantuvo su identidad genética durante el desarrollo de los ensayos de campo bajo las condiciones de San Javier (Yaracuy).

En campo, se evaluaron dos ensayos con 23 genotipos de arroz ante el añublo de la vaina usando el método recomendado por Delgado et al. (2004), el cual resultó ser confiable para medir la reacción del añublo detectándose diferencias altamente significativas y una buena discriminación entre los testigos ‘Tetep’ con mayor nivel de resistencia y ‘Lemont’ el más susceptible. Los resultados de la serie de ensayos de laboratorio y umbráculo fueron correlacionados con los resultados de los ensayos de campo. El método de bola de micelio diseñado por Park et al. (2007) fue menos robusto que el de microcámaras (Jia et al., 2007). Los resultados de estas correlaciones coinciden con lo señalado por Jia et al. (2007), cuyos resultados en microcámaras de siete ensayos desarrollados en diferentes localidades fueron consistentes con los resultados de campo, alcanzando una alta correlación entre ellos.

Con respecto al comportamiento de los cultivares de arroz, ‘Jasmine 85’ fue el cultivar con mayor nivel de resistencia y ‘Lemont’ el más susceptible fueron consistentes en los ensayos conducidos por Jia et al. (2007). A diferencia de los resultados señalados por los citados autores, en esta investigación se encontró que ‘Jasmine 85’ tuvo un comportamiento parecido a ‘Lemont’ el cultivar de mayor susceptibilidad (Figura 23), lo cual puede ser atribuible a la fuente de origen de la semilla de este cultivar. En los ensayos de campo infestados con los aislados de *R. solani* AG-1 IA, ‘Tetep’ (Tetep) fue el genotipo de arroz con mayor resistencia al añublo de la vaina (Groth and Nowick, 1992) y ‘Lemont’ (Lemo) fue el más susceptible (Bollic et al, 1985) consistentemente, coincidiendo con lo señalado por estos autores.

En consecuencia, se pudo identificar al genotipo ‘CT 15150-M-11-4-3-2-M’ (CT-1) con buen nivel de resistencia, esta accesión es una línea avanzada obtenida de una cruce con *Oryza glaberrima* un parental silvestre. Este resultado coincide con los resultados de Prasad and Eizenga (2008) quienes afirmaron que los parientes

silvestres del arroz cultivado constituyen una valiosa fuente de características agronómicas y de resistencia a estreses bióticos y abióticos, los cuales pueden ser aprovechados por los programas de mejoramiento. También, se identificaron a ‘SD20A’ (SD20) y a ‘D-SATIVA’ (DSAT) cultivares desarrollados por Fundación Danac, siendo esta última la principal variedad sembrada en el año 2008, en Venezuela (Fundación Danac, 2008). Estos resultados fueron soportados por la ubicación en la Figura 23 de ‘Remadja’ (Rema) (Prado et al., 2001) y ‘Jefferson’ (Jeff) (Klosterboer, 1999) señalados por poseer buen nivel de resistencia.

En otro trabajo realizado en Venezuela, Graterol et al. (1996) lograron detectar herencia transgresiva en el cruce de los cultivares ‘Fonaiap 1 x Palmar’ a pesar de la influencia del ambiente sobre el grado de severidad de los síntomas (GSS). Los resultados obtenidos en el cruce permitieron detectar variabilidad genética para la reacción a *Rhizoctonia* spp. Aunque la metodología utilizada por los citados autores difiere de la empleada en esta investigación; sin embargo, apoya los resultados encontrados sobre la posibilidad de identificar fuentes de resistencia en el germoplasma de arroz local, lo cual confiere una ventaja adaptativa sobre el germoplasma foráneo.

El análisis del ANAVAR de la regresión lineal simple detectó diferencias significativas ($P = 0,05$), pero se obtuvo un R^2 bajo lo que indicó que la prueba de microcámara por sí sola no tiene el suficiente peso para predecir lo que va a ocurrir en campo con un nivel de confianza y predicción del 95%. Por lo tanto, hasta el momento deben efectuarse evaluaciones de germoplasma conjuntas de umbráculo y campo para medir la reacción del añublo de la vaina del arroz, sin prescindir de ninguna de ellas. También, pueden tomarse medidas para aumentarse el valor de R^2 ; como por ejemplo, utilizar una cepa de *R. solani* AG-1 IA como A3D5 (70) con un alto valor de Iev o capacidad discriminante en la evaluación de germoplasma de arroz al añublo de la vaina, lo cual es factible.

Las evaluaciones en campo de la mancha bandeada del maíz realizadas a los 60 y 70 días de sembrado los ensayos, arrojaron diferencias altamente significativas ($P =$

0,05), indicando que los aislados y el método aplicado fueron confiables para medir la reacción de la mancha bandeada del maíz. Las líneas ‘CML-254’, ‘CML-55’ y ‘CML-1’ conformaron el grupo de las más resistentes, intercambiando el primer lugar con pocas variaciones entre ellos, mientras que ‘82201-25-1-1’ fue la más susceptible. Los datos obtenidos en los ensayos de campo fueron correlacionados con los resultados de los ensayos de virulencia de aislados M2D4 y P2AB2 de *R. solani* infectivos de maíz desarrollados en umbráculo en el Capítulo 3 de esta tesis (Cuadro 11 y Figura 18). Básicamente, porque estos aislados fueron inoculados sobre las mismas líneas de maíz usadas en los ensayos de campo.

Se detectaron diferencias significativas en la correlación con el método UbM2D4² y UbP2AB2² (evaluación a los 15 ddi). No obstante, el método UbM2D4¹ (evaluación a los ocho ddi) fue el más robusto por la alta correlación existente con los resultados de campo con 0,95 promedio (Cuadro 24). Este resultado fue corroborado mediante el análisis de componentes principales (Figura 26) donde se aprecian claramente los vectores UbM2D4¹, CpM2D4¹ y CpP2AB2¹, CpM2D4² y CpP2AB2² de magnitud parecida en el mismo cuadrante. En consecuencia, el análisis de regresión lineal resultó altamente significativo para la variable regresora CpM2D4¹ y el R² tuvo un promedio de 0,923 lo que indicó que dicha prueba es altamente confiable para predecir los resultados de campo según la ecuación obtenida en la Figura 27. Por consiguiente, se puede prescindir del ensayo de campo y emplear solo el método de umbráculo inoculando con el aislado M2D4 (147) de *R. solani* infectivo de maíz, usado en la presente investigación.

La expresión Avance (%) = (AM/AP) *100 permitió una mayor precisión al estimar el daño o pudrición de la mazorca que la escala modificada del Cimmyt (Cabrera, 2001), la cual estima el avance de la mancha en cm, sin considerar el daño del producto comercial (Zambrano et al., 2002). Además, dicha escala no es precisa para detectar diferencias significativas bajo condiciones de campo por el efecto del porte o tamaño de la planta, exhibida por híbridos, líneas o variedades comerciales (Inv. Alezones, comunicación personal). Los daños económicos producidos por la mancha

bandeada del maíz en el sudeste de China, han alcanzado cerca del 100 % en la reducción del rendimiento cuando predomina la fase de pudrición en la mazorca (Tang et al., 2004). De allí, que la estimación del daño en la mazorca sea uno de los parámetros más importantes a considerar.

En el análisis multivariado la línea de maíz ‘CML-254’ fue la de mayor resistencia, seguida por ‘CML-55’, estos resultados coinciden con la evaluación de enfermedades en vivero bajo condiciones de campo en Asia donde es endémica esta enfermedad (Vasal et al., 1999). Después se ubicó ‘03MN06A-5-3-2’ una de las líneas promisorias del programa de Fundación Danac y seguido ‘CML-1’ considerada por tener genes mayores contra la enfermedad (Kumar and Singh, 2002). La mancha bandeada del maíz se disemina rápidamente a nuevas áreas bajo prácticas de cultivo intensivo. Por ello, se están haciendo esfuerzos para identificar fuentes de resistencia a la enfermedad y de QTLs que puedan favorecer el desarrollo de híbridos resistentes a *R. solani* (Zhao et al., 2006).

Con base a estos resultados, se rechaza la hipótesis nula que no existen fuentes de resistencia al añublo del arroz y a la mancha bandeada del maíz evaluadas bajo condiciones locales. Se acepta la hipótesis alternativa de la existencia de fuentes de resistencias a las referidas enfermedades; evidenciadas por la identificación de la línea ‘CT 15150-M-11-4-3-2-M’, los cultivares ‘SD20A’ y a ‘D-SATIVA’ con buen nivel de resistencia al añublo de la vaina del arroz. Mientras que las líneas ‘CML-254’, ‘CML-55’ y ‘03MN06A-5-3-2’ pudieran ser una fuente de resistencia parcial para la mancha bandeada del maíz. De igual modo, se rechaza la hipótesis nula, que no existen métodos confiables para evaluar germoplasma de arroz al añublo de la vaina y la mancha bandeada. Se acepta la hipótesis alternativa que existen métodos confiables, como el de microcámaras para la evaluación del añublo de la vaina del arroz y de la inoculación en umbráculo para medir la reacción de la mancha bandeada del maíz.

Un sondeo realizado en campos de maíz del estado Portuguesa, plantados con semilla tratada y aspersión aérea con el hongo *Trichoderma harzianum* usado como

biocontrol de *R. solani*, se encontró que el campo más afectado (68 % de incidencia) estuvo localizado en el municipio Turén. En este predio, el arroz y el maíz corrientemente se sembraban en áreas separadas, pero usando la misma maquinaria para la preparación de suelo, lo cual pudo facilitar la migración de la fuente de inóculo del arroz a los campos de maíz (Cabrera, 2001). Junto al traslado de inóculo en suelo, las especies de malezas comunes para ambos cultivos pueden jugar un papel muy importante en la dispersión de la enfermedad. Esclerocios de *R. solani* aislados de maíz infectado, fueron usados para inocular varias especies de malezas sobre las hojas inferiores de la base del tallo, las especies de poaceas *Rottboelia exaltata*, *Ischaemun rugosum*, *Cynodon dactylon*, *Sorghum verticilliflorum* y *Sorghum halepense*, así como la especie de fabacea *Rynchosia minima* mostraron 100 % de incidencia, mientras que la especie de malvacea *Sida acuta* fue inmune (Bastidas, 2003). Esta situación permite recomendar el establecimiento de ensayos bajo condiciones de infestación natural en Portuguesa, para corroborar los resultados obtenidos en esta investigación.

IV. CONCLUSIONES.

El método de microcámaras tuvo una correlación media con los resultados de campo, permitiendo identificar tres genotipos de arroz con buen nivel de resistencia al añublo de la vaina del arroz; mientras que los testigos fueron consistentes. El método de inoculación en bandejas bajo condiciones de umbráculo fue confiable para predecir los resultados de campo identificando a tres líneas de maíz con buen nivel de resistencia a la mancha bandeada del maíz, comparado contra el testigo susceptible consistentemente. Por lo tanto, se puede prescindir del ensayo de campo para la evaluación de la mancha bandeada del maíz. Los métodos señalados se caracterizan por ser baratos, rápidos y emplean poca mano de obra, lo que se traduce en un ahorro de recursos, espacio y tiempo, vitales en el fitomejorador. Estos resultados revisten gran importancia, porque entre ellos se encuentran genotipos y líneas ya desarrolladas por los programas nacionales, es decir, que son adaptadas a nuestras condiciones tropicales y el grano al gusto o paladar de los venezolanos, lo que sin duda es un avance en el proceso de mejoramiento para la resistencia a la mancha bandeada del maíz y al añublo de la vaina del arroz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agapow, P. M., and Burt, A. 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Notes* 1 (1-2):101-102.
2. Ahuja, S., and Payak, M. 1981. A laboratory method for evaluating maize germplasm to banded leaf and sheath blight. *Indian Phytopath.* 34 (1): 34-37.
3. Ahuja, S., and Payak, M. 1984. Screening of maize germplasm for resistance to banded leaf and sheath blight. *Indian J. Agric. Sci.* 54 (12): 1019-1022
4. Amante, A., De la Peña, R., Sitch, L., Leung, H., and Mew, T. 1990. Sheath blight (ShB) resistance in wild rices. *Int. Rice Res. Newsl.* 15:5.
5. Amos, W., Hoffman, J.I., Frodsham, A., Zhang, L., Best, S., and Hill, A.V.S. 2007. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Mol. Ecol. Notes* 7 (1):10-14.
6. Bastidas, R. O. 2003. Comportamiento de cincuenta líneas de maíz (*Zea mays* L.) ante la incidencia de *Rhizoctonia solani* Kühn, en las condiciones de Agua Blanca, estado Portuguesa. Trabajo de grado para optar a Magister Scientiarum en Fitopatología. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. 127 p.
7. Beerli, P., and Felsenstein, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *PNAS* 98 (8):4563-4568.
8. Bernardes de Assis, J., Peyer, P., Rush, M. C., Zala, M., McDonald, B. A., and Ceresini, P. C. 2008. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-IIA. *Phytopathology* 98:1326-1333.
9. Bernardes de Assis, J., Storari, M., Zala, J., Wang, W., Jiang, W., ShiDong, L., Jin, M., McDonald, B. A., and Ceresini, P. C. 2009. Genetic structure of populations of the rice-infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from China. *Phytopathology* 99:1090-1099
10. Binder, M., Hibbett, D., Larsson, K., Larsson, E., Langer, E., and Langer, G. 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms across the major

- clades of mushroom-forming fungi (Homobasidiomycetes). *System. Biodivers.* 3 (2):1–45.
11. Bollich, C.N., Webb, B.D., Marchetti, M. A., and Scout, J. E. 1985. Registration of Lemont rice. *Crop. Sci.* 25: 883-885.
 12. Brooks, S. A. 2007. Sensitivity to a phytotoxin from *Rhizoctonia solani* correlates with sheath blight susceptibility in rice. *Phytopathology* 97:1207-1212
 13. Brown, A.H.D., Feldman, M.W., and Nevo, E. 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96:523–536.
 14. Burdon, J., and Silk, J. 1997. Sources and Patterns of Diversity in Plant-Pathogenic Fungi. *Phytopathology* 87 (7):664-669.
 15. Cabrera, S. 2001. Prácticas de manejo para el control de la mancha bandeada de la hoja (*Rhizoctonia*). Determinación de los niveles de incidencia, severidad y efecto sobre el peso de la mazorca en siembras comerciales de maíz. VII Curso sobre Producción de Maíz. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas-Asoportuguesa. Acarigua. 315-334 p.
 16. Cardona, R., Rodríguez H., y Nass, H. 1999. Manchas bandeadas en maíz causada por *Rhizoctonia solani* en el estado Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 12: 32-33.
 17. Carling, D. Baird, R., Gitaitis, R., Brainard, K., and Kuninaga, S. 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 92:893-899.
 18. Carling, D., and Summer, D. 1992. *Rhizoctonia*. In: *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungus*. Edited by L.L. Singleton., J.D. Mihail and C.M. Rush. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
 19. Carling, D., Baird, R., Gitaitis, R., Brainard, K., and Kuninaga, S. 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 92:893-899.
 20. Carling, D.E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. In *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology,

- Pathology and Disease Control, edited by B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. M. Neate and G. Dijst. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
21. Castro, C., Davis, J. R., and Wiese, M.V. 1988. Quantitative estimation of *Rhizoctonia solani* AG-3 in soil. *Phytopathology* 78:1287-1292.
 22. Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., Araujo, Y., Pino, H., y García, R. 2001. Identificación y virulencia de grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* Kühn asociados con papa en Mérida, Venezuela. *Interciencia* 26: 296-300.
 23. Cedeño, L., Nass, H., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H., y Alemán, L. 1996. *Rhizoctonia solani* AG1 – IA, causa principal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 9: 6 – 9.
 24. Ciampi, M. B., Kuramae, E. E., Fenille, R. C., Meyer, M. C., Souza, N.L., and Ceresini, P. C. 2005. Intraspecific evolution of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associated with soybean and rice in Brazil based on polymorphisms at the ITS-5.8S rDNA operon. *Eur. J. Plant Pathol.* 113:183-196.
 25. Ciampi, M. B., Meyer, M. C., Costa, M. J. N., Zala, M., McDonald, B. A., and Ceresini, P. C. 2008. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. *Phytopathology* 98:932-941.
 26. Cornuet, J.M., and Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144 (4):2001-2014.
 27. Cubeta, M.A., and Vilgalys, R. 2000. *Rhizoctonia*. In *Encyclopedia of Microbiology*, edited by J. Lederberg. San Diego: Academic Press.
 28. De León, C. 1999. La mancha bandeada de la hoja del maíz (*Rhizoctonia solani* Kühn). VI Curso de Producción de Maíz. FONAIAP, Portuguesa; Venezuela. 8 pp. (Mimeografiado).
 29. De Sharma, R. C., Leon, C., and Payak, M.M. 1993. Diseases of maize in South and Southeast Asia: problems and progress. *Crop Prot.* 12:414-422.
 30. Delgado, N., Rodríguez, H., y Ramón, M. 2004. Evaluación de métodos de inoculación de *Rhizoctonia solani* sobre germoplasma de arroz en campo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 21: 374- 384.

31. Díaz, C. 1968. Virulencia de cepas de *Rhizoctonia solani* obtenidas de semilla de caraota (*Phaseolus vulgaris*). Agron. Trop. 18: 475-479.
32. Díaz, C., y Salas, G. 1973. Variabilidad en la virulencia de grupos subespecíficos de *Rhizoctonia solani* patogénicos en leguminosas. Agron. Trop. 23:47-58.
33. Eizenga, G., Lee, F., and Rutger, J. 2002. Screening Oryza species plants for rice sheath blight resistance. Plant Dis. 86:808-812.
34. El Programa de Maíz del CIMMYT. 1999. Manual de usuario de Fieldbook 5.1/7.1 y Alfa. México, D. F. CIMMYT.
35. Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinform. Online 1:47-50.
36. Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131 (2):479-491.
37. Fedegro. 2009. Estadísticas Agropecuarias. Consultado el 5 de Julio de 2009. Disponible en: <http://www.fedegro.org/agricola/default.asp>
38. Fontana, H., y González, C. 2000. El cultivo de maíz en Venezuela. 1ra. Edición. Fundación Polar. Venezuela.
39. Fundación para la investigación agrícola Danac. 2008. Informe de Gestión 2007 – 2008: Contribuciones a la Alimentación y la Agricultura. San Javier, DANAC, 52 p.
40. Glaubitz, J.C. 2004. Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. Mol. Ecol. Notes 4:309-310.
41. Godoy, G., Kuninaga, S., Steadman, J., and Powers, K. 2008. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA. J. Gen. Plant Pathol. 74 (1):32-40.

42. González, D., Carling, D.E., Kuninaga, S., Vilgalys, R., and Cubeta, M.A. 2001. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. *Mycologia* 93:1138-1150.
43. González, D., Cubeta, M.A., and Vilgalys, R. 2006. Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and [beta]-tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40 (2):459-470.
44. González, A., Graterol, E., Borges, B., and Hernández, F. 2008. In vitro kinetin test of the virulence of *Rhizoctonia solani* AG 1-IA isolates on rice varieties. *Internacional Symposium on Rhizoctonia*, 20-22 August 2008, Berlin (Abstracts). 86 p.
45. González-Vera, A. D., Bernardes-de-Assis, J., Zala, M., McDonald, B. A., Correa-Victoria, F., Graterol-Matute, E. J., and Ceresini, P. C. 2010. Divergence between sympatric rice- and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from Latin America. *Phytopathology* 100:172-182.
46. Graterol, E., Borges, O., Nass H., y Sali, A. 1996. Herencia transgresiva para la resistencia a *Rhizoctonia* spp. En poblaciones segregantes de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Investigación Agrícola – DANAC*. Vol. 1.
47. Groth, D. E., and Nowick, E. M. 1992. Selection for resistance to rice sheath blight through number of infection cushions and lesion type. *Plant Dis.* 76:721-723
48. Groth, D. E., Rush, M. C., and Lindberg, G. D. 1990. Foliar fungicides for control of rice diseases in the United States. Pages 31-52 in: *Pest Management in Rice*. B. T. Grayson, ed. Elsevier Applied Science, London and New York.
49. Guo, S.W., and Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48:361-372.
50. Gutierrez, W.A., H.D. Shew, and Melton, T. 1997. Sources of inoculum and management for *Rhizoctonia solani* damping-off on tobacco transplants under greenhouse conditions. *Plant Disease* 81:604-606.

- 51.Hartl, D., and Clark, A. 1997. Principles of population genetics. 3° ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachussets.
- 52.Hennis, Y., Ghafar, A., Baker, R., and Gillespie, S.L. 1978. A new pellet soil sampler and its use for the study of population dynamics of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 68:371-376.
- 53.Houston, B. 1945. Culture types and pathogenicity of isolates of *Corticium solani*. *Phytopathology* 35: 371-393.
- 54.Huysse, T., Poulin, R., and Theron, A. 2005. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends Parasitol.* 21:469-475.
- 55.InfoStat. (2002). InfoStat versión 1.1. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- 56.Jia, Y., Correa-Victoria, F., McClung, A., Zhu, L., Liu, G., Wamishe, Y., Xie, J., Marchetti, M.A., Pinson, S. R. M., Rutger, J. N., and Correll, J. C. 2007. Rapid determination of rice cultivar responses to the sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* using a micro-chamber screening method. *Plant Dis.* 91:485-489.
- 57.Jones, R.K., and Belmar, S.B. 1989. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolated from rice, soybean, and other crops grown in rotation with rice in Texas. *Plant Dis.* 73:1004-1010.
- 58.Kimura, M., and Ohta, T. 1975. Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. *PNAS* 72 (7):2761-2764.
- 59.Kloesterboer, A. 1999. Jefferson has resistance to sheath blight, recently release rice variety also resistance to many races of blast. *Southwest Farm Press.* Vol. 26, No. 8.
- 60.Ko, W., and Hora, F. 1971. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* (61):707-710.
- 61.Kobayashi, T., Mew, T.W., and Hashiba, T. 1997. Relationship between incidence of rice sheath blight and primary inoculum in the Philippines: Mycelia in plant debris and sclerotia. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63:324-327.

- 62.Kohn, L.M. 2005. Mechanisms of fungal speciation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:279-308.
- 63.Kuhner, M.K. 2006. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22 (6):768-770.
- 64.Kuhner, M.K., and Smith, L.P. 2007. Comparing likelihood and bayesian coalescent estimation of population parameters. *Genetics* 175 (1):155-165.
- 65.Kumar, R., and Singh I. 2002. Inheritance of resistance to banded leaf and sheath blight *Rhizoctonia solani* f. sp. Sasakii) of maize (*Zea mays* L.). Proceedings of the 8th Asian Regional Maize Workshop, Bangkok, Thailand. 356-360 pp.
- 66.Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., and Yokosawa, R. 1997. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* 32 (3):237-243.
- 67.Lakshmanan, P. 1991. Resistance to sheath blight (ShB) and brown spot (BS) in lines derived from *Oryza officinalis*. *Int. Rice Res. Newsl.* 16:8.
- 68.Li, H., Wu B., and Yan S. 1998. Aetiology of *Rhizoctonia* in sheath blight of maize in Chichuan. *Plant Pathology.* 47: 16-21
- 69.Li, Z., Pinson, S., Marchetti, M., Stansel, J., and Park, W. 1995. Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Theo. Appl. Genet.* 91:382-388.
- 70.Linde, C., Zala, M., Paulraj D., McDonald, B., and Gnanamanickam, S. 2005. Population structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG1-IA from India. *Eur. J. Plant Pathol.* 112: 113 - 121
- 71.Liu, G., Jia, Y., Correa-Victoria, F. J., Prado, G. A., Yeater, K. M., McClung, A., and Correll, J. C. 2009. Mapping quantitative trait loci responsible for resistance to sheath blight in rice. *Phytopathology* 99:1078-1084.
- 72.Liu, Y.C., Double, M.L., MacDonald, W.L., Cortesi, P., and Milgroom, M.G. 1996. Diversity and multilocus genetic structure in populations of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 86:1344-1351.

73. Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M., and Sherwin, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* 89 (3):238-247
74. Malaguti, G. 1951. Mancha de la hoja envainadora del arroz causada por *Rhizoctonia solani*. *Agronomía Tropical*. 1 (1): 71-75.
75. Manly, B.F. 1991. Randomization and Monte Carlo methods in biology. London: Chapman & Hall.
76. Marchetti, M., y McClung, A. 1994. Inheritance of sheath blight resistance in progeny of the cross RU8703196/'Rosemont'. In: Proceedings of the twenty-fifth rice technical working groups. New Orleans, Louisiana. 6-9 pp.
77. Martínez, B., González, F., Reyes, Y., González, E., y Pérez, S. 2005. Método in vitro de selección de genotipos con resistencia al tizón de la vaina en arroz. Resúmenes del III Encuentro Internacional del Arroz. La Habana, Cuba (Resumen).
78. Matsumoto, M. 2002. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primer PCR analysis. *Mycoscience* 43 (2):185-189.
79. Matsumoto, M., Furuya, N., and Matsuyama, N. 1996. PCR-RFLP Analysis of amplified 28S ribosomal DNA for identification of *Rhizoctonia* spp., the causal agents of sheath diseases of rice plants. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 41: 39-44.
80. Maynard Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M., and Spratt, B.G. 1993. How clonal are bacteria? *PNAS* 90:4384-4388.
81. McDonald, B. A. 1997. The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. *Phytopathology*. 87 (7): 664-669.
82. McDonald, B.A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40 (1):349-379.
83. Meirmans, P.G., and Van Tienderen, P.H. 2004. GenoType and GenoDive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 4 (4):792-794.

84. Meppelink, E. K. 1967. Kernel hardness and its relation to mechanical and technological properties of wheat and flour. Inst. Voor Graan en Brood TNO. Wageningen. The Netherlands.
85. Ministerio de Agricultura y Tierras. 2006. Anuario 2006. Dirección de estadísticas del M.A.T.
86. Naito, S. 2006. Ecological studies on teleomorphic and anamorphic stages in *Rhizoctonia* fungi. J. Gen. Plant Pathol. 72 (6):400-403.
87. Nass, H., y Rodríguez, H. 1994. Efecto de la lamina de agua y la densidad de siembra sobre el desarrollo de *Rhizoctonia solani* en arroz. Bioagro 6:31-34.
88. Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.
89. Niks, R. E., and Lindhout, W.H. 1999. Curse on plant breeding to plant diseases and pest resistance. 2nd. Ed. Wageningen Agricultural University. The Netherlands.
90. Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annu. Rev. Phytopathol. 25 (1):125-143.
91. Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Ann. Rev. Phytopathol. 25:125-143.
92. Oniki, M., Ogoshi, A., and Araki, T. 1986. Development of the perfect state of *Rhizoctonia solani* Kühn AG-1. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 52:169-74.
93. Ou, S.H. 1985. Rice Diseases. C. A. B. International. 2nd Ed. United Kingdom.
94. Pan, X. B., Rush M. C., Sha, X. Y., Xie, Q. J., Linscombe, S. D., Stetina, S. R., and Oard, J. H. 1999. Major gene nonallelic sheath blight resistance from the rice cultivars Jasmine 85 and Teqing. Crop Sci. 89: 338-346.
95. Pan, X., Chen, Z., Xu, J., Tong, Y., Wang, Z., and Pan, X. 1997. The effects of different methods of inoculation and investigation on genetic research of resistance to rice sheath blight. J. Jiangsu Agric. College 18(3):27-32.
96. Park, D., Sayler, R., Hong, Y., Nam, M., and Yang, Y. 2008. A method for inoculation and evaluation of rice sheath blight disease. Plant Dis. 92:25-29.

97. Parlevliet, J., and Zadoks, J. 1977. The integrated concept of disease resistance: a new view included horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* 26:5-21.
98. Pascual, C.B., and Hyakumachi, M. 2000. Distribution of vegetatively compatible populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in a field planted with different host species. *J. Gen. Plant Pathol.* 66:206-209.
99. Perdomo, R., Hernández, A., González, A., Pineda, J., y Alezones, J. 2007. Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la mancha bandeada en maíz. *Interciencia* 32 (1):48-55.
100. Pineda, J., Hernández, A., González, A., Barrientos, V., Nass, H., y Gil, E. 2005. Técnica de evaluación rápida y eficiente para la evaluación de materiales de maíz ante *Rhizoctonia solani* Kühn. *Bioagro* 17 (2): 93-98
101. Pinson, S., Capdevielle, F., and Oard, J. 2005. Confirming QTLs and finding additional loci conditioning sheath blight resistance in rice using recombinant inbred lines. *Crop. Sci.* 45: 503-510.
102. Piry, S., Luikart, G., and Cornuet, J.M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *J. Hered.* 90:502-503.
103. Prabhu, A., Filippi, M., Barata, G., e Gil, R. 2002. Resistencia de cultivares de arroz a *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia oryzae*. *Pesq. Agropec. Bras.* 37 (5): 589-595.
104. Prado, G., Correa-Victoria, F., Aricapa, G., y Escobar, F. 2001. Caracterización preliminar de la resistencia de germoplasma de arroz al añublo de la vaina (*Rhizoctonia solani* Kühn). *Foro Arroceros Latinoamericano*. Mayo. 8-11p.
105. Prasad, B., and Eizenga, G. C. 2008. Rice sheath blight disease resistance identified in *Oryza* spp. accessions. *Plant Dis.* 92:1503-1509
106. Raymond, M., and Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86 (3):248-249.

107. Rieger, R., Michaelis, A., and Green, M. 1976. Glossary of genetics and cytogenetics. 4^o ed. Springer-Verlag, New York.
108. Rodríguez, H., Cardona, R., Arteaga, L., y Alemán, L. 2001. Control químico del añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* Kühn en arroz. Bioagro. 13: 32- 35.
109. Rodríguez, H., Nass, H., Cardona, R., y Alemán, L. 1999. Alternativas para controlar el añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* Kühn en arroz. Fitopatol. Venez. 12: 18-21.
110. Rosewich, U., Pettway, R., McDonald, B., and Kistler, H. 1999. High levels of gene flow and heterozigote excess characterize AG1-IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. Fungal genetics and biology. 28: 148-159.
111. Rush, M. C., and Lee, F. N. 1992. Sheath blight. Pages 22-23 in: Compendium of Rice Diseases. R. K. Webster and P. S. Gunnell, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
112. Sanz, S., Arnao, E., Borges, B., y González, A. 2007. Estandarización de la técnica AFLP para la caracterización genética de géneros de hongos (Resumen). Fitopatol. Venez. 20 (2): 70.
113. Sato, H., Ideta, O., Ando, I., Kunihiro, Y., Hirabayashi, H., Iwano, M., Miyasaka, A., Nemoto, H., and Imbe, T. 2004. Mapping QTLs for sheath blight resistance in the rice line WSS2. Breed. Sci. 54:265-271.
114. Sharma, G., and Saxena, S. 2002. Integrated management of banded leaf & sheath blight of maize (*Zea mays* L.) caused by *Rhizoctonia solani* (Kühn). Adv. Plant. Sci. 15(1):107–113.
115. Singh, A., Rohilla, R., Singh, U.S., Savary, S., Willocquet, L., and Duveiller, E. 2002. An improved inoculation technique for sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Can. J. Plant Pathol. 24: 65–68.
116. Singh, V., and Singh, M. 2003. Fingerprinting the rice isolates of *R. solani* using RAPD markers. IRRN. December: 28-30.
117. Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139:457-462.

118. Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., and Dijkstra, G. 1996. *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
119. Statistix 8.0. Copyright (C). 1985-2003. Analytical Software.
120. Stoddart, J.A. 1983. A genotypic diversity measure. *J. Hered.* 74 (6):489-490.
121. Stoddart, J.A., and Taylor, J.F. 1988. Genotype diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics* 118:705-711.
122. Taheri, P., Gnanamanickam, S., and Höfte, M. 2007. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases in India. *Phytopathology* 97:373-383.
123. Tang, H.T., Rong, T.Z., and Yang, J.P. 2004. Research advance on sheath blight (*Zea mays* L.) in maize. *J. Maize Sci.* 12(1): 93-96.
124. Tran, T., de Man, J., and Rasper, V. 1981. Measurement of corn and kernel hardness. *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 14: 42-48.
125. Ulacio, D., Nass, H., y Pineda, J. 1999. Viabilidad de *Rhizoctonia solani* bajo condiciones de inundación I. *Bioagro* 11 (2):61-68.
126. Vasal, S., Srinivasan, G., Cordova, H., Pandey, S., Jeffers, D., Bergvinton, D., and Beck, D. 1999. Inbred lines evaluation nurseries and their role in maize breeding at Cimmyt. *Maydica.* 44: 341-351
127. Weir, B.S. 1996. *Genetic Data Analysis.* 2 ed. Sinauer. Sunderland, Massachusetts.
128. Weir, B.S., and Cockerman, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
129. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., Eds. pp. 315-322. Academic Press, San Diego, CA.
130. Zala, M., McDonald, B.A., Bernardes de Assis, J., Ciampi, M.B., Storari, M., Peyer, P., and Ceresini, P.C. 2007. Highly polymorphic microsatellite loci in

- the maize- and rice-infecting fungal pathogen *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 IA. Mol. Ecol. Resour. 8:686-689.
131. Zambrano, C., Molina, N., y Cabrera, S. 2002. Manejo integrado de la mancha bandeada (*Rhizoctonia solani* Kühn) de la hoja del maíz. IX curso sobre producción de maíz. Asoportuguesa-Cimmyt e INIA. 261 – 275 p.
 132. Zhan, J., Pettway, R.E., and McDonald, B.A. 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. Fungal Genet. Biol. 38 (3):286-297.
 133. Zhao, M., Zhang, Z., Zhang, S., Li, W., Jeffers, D.P., Rong, T., and Pan, G. 2006. Quantitative trait loci for resistance to banded leaf and sheath blight in maize. Crop Sci. 46:1039–1045.
 134. Zou, J., Pan, X., Chen, Z., Xu, J., Lu, J., Zhai, W., and Zhu, L. 2000. Mapping quantitative trait loci controlling sheath blight resistance in two rice cultivars (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 101: 569-573.



MoreBooks!
publishing



yes i want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at

www.get-morebooks.com

¡Compre sus libros rápido y directo en internet, en una de las librerías en línea con mayor crecimiento en el mundo! Producción que protege el medio ambiente a través de las tecnologías de impresión bajo demanda.

Compre sus libros online en

www.morebooks.es



VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de
www.vdm-vsg.de

