

P06-061

Caracterización molecular y patogénica de *Burkholderia glumae* causante del Añublo Bacterial de la Panícula del arroz, en Colombia

Bravo Guerrero, Daniela¹; Fory, Paola¹; Aricapa, Girena¹; Prado, Gustavo¹; Torres, Edgar²; Mosquera, Gloria¹

¹CIAT; ²CIAT-FLAR

El añublo bacterial de la panícula de arroz causado por *Burkholderia glumae*, se reportó en 1950 en Japón, y se convirtió en una enfermedad de gran importancia desde 1970. Hoy se ha extendido a varios países reduciendo la producción hasta en un 75% en las regiones gravemente afectadas, debido a que el fitopatógeno infecta principalmente la panícula interfiriendo con el llenado del grano. En Colombia, se desconocen los mecanismos de virulencia, variabilidad del patógeno y potenciales fuentes de resistencia en el hospedero. Estos factores son críticos para el efectivo manejo y control de la enfermedad. Con el objetivo de reconocer la variabilidad genética y patogénica de *B. glumae* en Colombia, se seleccionó un grupo de 39 cepas aisladas de ocho departamentos y 24 variedades representativas del cultivo de arroz del país. La variabilidad genética se analizó mediante la caracterización molecular generada por la técnica Rep-PCR y sus tres variantes BOX-PCR, ERIC-PCR Y REP-PCR. Para la caracterización patogénica, en invernadero, se inocularon los mismos aislamientos en panículas de la variedad ColombiaXXI. Según el análisis de diversidad genética, las tres técnicas moleculares conjuntas generaron mayor poder de discriminación que su uso individual. La población se estructuró en 5 grupos que se organizaron según el origen geográfico, un grupo en el Tolima, dos en el Meta, uno en Córdoba y un grupo mixto. La diversidad observada fue mayor dentro de los grupos (Hs0.87) que entre estos (Hst0.10), donde sólo el 10% de la heterogeneidad total, se debe a la diferenciación entre regiones. En contraste no se observó agrupamiento por variedad. Para la evaluación de patogenicidad, se calculó el porcentaje de semillas con daño generado por cada cepa y se analizaron la temperatura y la humedad relativa como covariables en un diseño de BCA. No se encontró efecto significativo ($p > 0.05$) para los factores ambientales, pero sí para las cepas. Con el apoyo de una separación de medias (LSD) se establecieron dos niveles: "Virulento" con daño mayor al 50% [86%- 53%] y "Poco virulento" menos del 20% [6%-18%]. En el nivel Virulento se agruparon las cepas que produjeron pigmento, el segundo nivel aquellas cepas no pigmentadas. La estructura de la población, permitió agrupar las cepas según el origen geográfico pero no el nivel de patogenicidad de estos, debido a que el marcador molecular neutral utilizado no necesariamente abarca los genes asociados a patogenicidad. Se recomienda 1. Validar el pigmento como un indicador indirecto del poder de virulencia de la cepa. 2. Utilizar la estructura poblacional y la patogenicidad obtenida y constituir una colección de cepas representativas en términos de su origen y virulencia, para ser implementadas en posteriores evaluaciones de cultivares de arroz en busca de materiales tolerantes.

P06-062

Avances en el diagnóstico molecular de *Burkholderia glumae* (Kurita & Tabei) en zonas arroceras de Colombia

Fory, Paola andrea; Aricapa, Girena; Prado, Gustavo; Mosquera, Gloria
CIAT

La enfermedad conocida como Añublo Bacterial de la Panícula del arroz, causada por *Burkholderia glumae*, fue reportada por primera vez en los años 1950 en Japón y en Colombia en 1987 (Zeigler y Alvarez, 1989). Sin embargo, solo hasta el año 2007, los síntomas típicos de la enfermedad se manifestaron con mayor frecuencia en la región de Montería, produciendo pérdidas en rendimiento hasta de un 80%. Los síntomas de esta enfermedad han sido ampliamente documentados en la fase de plántula. No obstante, en campo esta se hace evidente principalmente en la etapa de floración provocando la esterilidad de las espiguillas, decoloración y manchado de la gluma en desarrollo. Teniendo en cuenta que en Colombia la presión de la enfermedad ha aumentado en los tres últimos años, los objetivos de este estudio fueron I) Estandarizar y optimizar el diagnóstico molecular de *B. glumae* mediante la prueba de PCR para caracterizar 297 muestras de semillas de arroz provenientes de 12 localidades nacionales y de variedades comerciales diferentes. II) Confirmar por secuenciación la identidad de la especie y III) Cuantificar el número de bacteria presente en muestras de semillas de arroz aparentemente sanas infectadas de forma natural. Los análisis de la amplificación de PCR, con

los cebadores especie – específico de las regiones espaciadoras 16S-23S de ADN_r, reportados por Saylor et al (2006), revelaron que 161 (54%) de 297 muestras evaluadas fueron positivas para *B. glumae*. Así mismo, la prueba de PCR detectó la presencia de la bacteria en semillas de arroz sin ningún tipo de daño aparente. Del total de las muestras evaluadas, 193 (64%) muestras no presentaron ningún tipo de daño, de estas el análisis reveló que 67 (35%) fueron positivas para la especie. El análisis de secuencia de los productos de PCR muestra una homología del 100% con otras secuencias de *B. glumae* ya reportadas en el Genbank. Por otro lado, se encontró que la concentración (ufc/ml) de bacteria en semillas aparentemente sanas fue de 7.5×10^3 , en contraste con 1.75×10^7 en semillas afectadas severamente por la bacteria. En general, nuestros resultados han demostrado que la enfermedad causada por *B. glumae* se ha extendido rápidamente a lo largo de las principales zonas arroceras de Colombia, teniéndose registros hoy en día, de la presencia de la bacteria en 8 departamentos del país, adicionalmente, se puede inferir que semillas sanas pueden portar la bacteria sin mostrar síntomas de la enfermedad, siendo este el principal factor relacionado con la diseminación de este patógeno.

P06-063

Avances en la Caracterización Patotípica de la Población de *Magnaporthe Oryzae* en Colombia

Prado, Gustavo; Aricapa, Girena; Mosquera, Gloria
CIAT

La resistencia genética es la estrategia más adecuada para el control del Añublo del Arroz causado por *Magnaporthe oryzae*, la enfermedad más limitante del cultivo a nivel mundial. Sin embargo, el éxito está limitado por la alta variabilidad del patógeno. En este sentido, los estudios para determinar la frecuencia de genes de virulencia/avirulencia en la población del hongo y de los genes de resistencia útiles para generar cultivares con resistencia durable, son fundamentales para el éxito del mejoramiento genético. En Colombia se llevaron estudios para caracterizar la población del hongo hasta el año 2004. En 2009 se caracterizó una subpoblación conformada por 29 aislamientos colectados en los años 2006 y 2008, en los departamentos del Meta y Tolima. Los resultados de este trabajo mostraron que los aislamientos provenientes del Tolima tienen un patrón de virulencia diferente a los aislamientos del Meta. Estos aislamientos rompen la resistencia de la mayoría de los genes de resistencia con excepción de los genes *Pi-1*, *Pi-kh* y *Pi-9*. Actualmente, se está iniciando un estudio para determinar nuevamente la composición de la estructura patotípica del hongo en Colombia. Para ello se utilizarán 200 aislamientos, los cuales serán inoculados sobre 34 líneas monogénicas desarrolladas por el IRRI. También se incluirán 8 líneas isogénicas y 15 variedades diferenciales de Kiyosawa. Los resultados preliminares de campo indican que del total de genes (29) expuestos en la Estación Experimental de Santa Rosa, sólo los genes *Pi-9*, *Pi-40* y *Pi-kp*, muestran resistencia al patógeno. En inoculaciones en invernadero el gen *Pi-40* presentó susceptibilidad a 6 aislamientos (37.5%) de un total de 16 aislamientos inoculados hasta el momento. El gen *Pi-kp* proveniente de las líneas monogénicas del IRRI presenta susceptibilidad a todos los aislamientos. La línea K60, de las variedades diferenciales de Kiyosawa, que posee el gen de resistencia *Pi-kp*, es susceptible a sólo dos de los aislamientos (12.5%) y el gen *Pi-9* proveniente de las líneas de IRRI presenta susceptibilidad a 2 de 14 aislamientos inoculados (14%); por el contrario, el *Pi-9* contenido en línea 75-1-127, presenta resistencia a los 14 aislamientos inoculados sobre esta línea. Los resultados indican que estos tres genes son de gran importancia en la búsqueda de resistencia durable a este patógeno. Además un estudio genético en las líneas K60 y 75-1-127 es clave para determinar si en ellas están presentes otros genes de resistencia. Se continuará con más inoculaciones con un mayor número de aislamientos que permita monitorear la estructura real del patógeno en Colombia. Este trabajo se complementará con estudios moleculares para determinar la estructura genética de la población del hongo y hacer análisis de genes de virulencia/avirulencia que a su vez ayuden a inferir en las posibles combinaciones de los genes de resistencia que combinados entre sí puedan generar una resistencia durable a *Magnaporthe oryzae*.