

Identificación de QTLs asociados a resistencia a *Magnaporthe oryzae* en arroz (*Oryza sativa* L.)

Maia Lia Escobar Bonora

Programa de Posgrado en Biotecnología Facultad de Ciencias Universidad de la República

> Montevideo – Uruguay Julio de 2017



Identificación de QTLs asociados a resistencia a *Magnaporthe oryzae* en arroz (*Oryza sativa* L.)

Maia Lia Escobar Bonora

Tesis de Maestría presentada al Programa de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Magíster en Biotecnología.

Director:

Dra. María Victoria Bonnecarrère

Codirectores:

Dr. Sebastían Martínez MSc. Gastón Quero

Director académico: Doc. Omar Borsani

> Montevideo – Uruguay Julio de 2017

Escobar Bonora, Maia Lia

Identificación de QTLs asociados a resistencia a *Magnaporthe oryzae* en arroz (*Oryza sativa* L.) / Maia Lia Escobar Bonora. - Montevideo: Universidad de la República, Facultad de Ciencias, 2017.

XV, 50 p.: il.; 29,7cm.

Director:

María Victoria Bonnecarrère

Codirectores:

Sebastían Martínez

Gastón Quero

Director académico:

Omar Borsani

Tesis de Maestría – Universidad de la República, Programa en Biotecnología, 2017.

Referencias bibliográficas: p. 39 – 50.

 Magnaporthe oryzae, 2. Oryza sativa, 3. Resistencia a Brusone, 4. QTL, 5. Selección asistida por marcadores.
 Bonnecarrère, María Victoria, et al. II. Universidad de la República, Programa de Posgrado en Biotecnología.
 III. Título.

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dra. Sabina Vidal

Dra. Inés Ponce de León

MSc. Juan Rosas

Montevideo – Uruguay Julio de 2017

A mi padre, que me enseñó a usar un microscopio

Agradecimentos

Quisiera agredecer a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por su apoyo económico. Y al Insitituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por el material, las instalaciones y el capital humano brindados para esta investigación.

A mis tutores, en especial a Victoria Bonnecarrère que tuvo la paciencia de enseñarme y que supo acompañarme en los momentos más difíciles de este proceso.

A todos los compañeros de INIA (Las Brujas y Treinta y Tres), Facultad de Ciencias y Facultad de Agronomía que estuvieron ahí para aconsejarme y ayudarme durante este proceso. En especial a: Wanda Iriarte, Silvia Garaygochea, Claudia Schvartzman, Matías Maidana, Sara Murchio, Letica Chao, Alicia Castillo, Pablo Sandro, Inés Rebollo, Pablo Peraza, Fernando Macedo, Agustina Alvarez, Ana Alvarez, Mariana Menoni, Fernando Escalante, Patricio Estevez, Yanel Cuello, Belén Bonilla, Daniela Dieppa, Valeria López, Maribel Ceppa y a todos los que cuidaron de mis plantas

A Inés Vique mi profesora de botánica del Instituto de Profesores Artigas, que me enseñó la belleza y complejidad de las plantas.

A Joaquín Ricci por siempre estar para darme ánimos.

A Fede Abellá por el café.

A mi padre Francisco Escobar por siempre creer en mi y ayudarme a mantener mi entusiasmo.

Y a Luis Maulelo por recordarme siempre que juntos podemos lograr cualquier cosa.

RESUMEN

El arroz ha alimentado a la humanidad por cientos de años. Actualmente es uno de los cultivos más importantes del mundo, alimentando alrededor de un 50% de la población mundial [Khush, 2005]. La principal limitante biológica que presenta el cultivo de arroz es la enfermedad conocida como el quemado de arroz o Brusone, causada por el hongo *Magnaporthe oryzae* [Khush, 2005]. La enfermedad puede causar pérdidas de hasta el 50% de rendimiento dependiendo de las condiciones ambientales, el estado de crecimiento de la planta y la suceptibilidad de los cultivares utilizados [Tanweer et al., 2015]. La estrategia más sustentable para manejar la enfermedad es el desarrollo de cultivares resistentes [Tanweer et al., 2015].

Este trabajo plantea mediante dos metodologías complementarias, identificar regiones genómicas que proporcionan resistencia a Brusone en el germoplasma nacional. Por un lado partir de una población biparental F2:3 resultado de un cruce entre una variedad resistente (INIA Caraguatá) y una susceptible (INIA Olimar) encontrar marcadores del tipo de SSR (Simple Sequence Repeats por sus siglas en inglés repetidos de secuencia simple) asociados con la resistencia al patógeno. Por otro, realizar un mapeo asociativo (GWAS, del inglés Genome-Wide Association Study) a partir de dos poblaciones de germoplasma localmente adaptado del programa de mejoramiento de arroz de INIA: una formada por 240 líneas de la sub especie *japónica tropical* y la otra por 340 líneas de la sub especie *indica*.

En el de la población biparental F2:3 se encontraron se encontraron siete marcadores asociados con la resistencia durable de la variedad INIA Caraguatá: RM72, RM164, RM201, RM208, RM7102, RM527 y RM224. Mientras que el análisis de GWAS dió como resultado ocho QTL en la población de japónica tropical, uno de los cuales (q.MOR.j.9.1) colocaliza con al menos un gen mayor (Pi5) y varios genes menores asociados a resistencia. Estos QTL y marcadores asociados podrían ser rápidamente incluídos en los programas de mejoramiento.

Palabras claves:

Magnaporthe oryzae, Oryza sativa, Resistencia a Brusone, QTL, Selección asistida por marcadores.

ABSTRACT

Rice had fed humanity for thousands of years. Nowadays it is one of the most important staple foods worldwide, providing food for almost half of the world population. One of the mayor threats to the production of rice around the world are diseases, especially Rice blast [Khush, 2005] caused by *Magnaporhe oryzae*. This disease can cause yield losses of above 50% depending on the environmental conditions and the growth stage of the plant and and the susceptibility of the rice cultivar used [Tanweer et al., 2015]. The most sustainable way of dealing with this disease is the development of resistant rice cultivars [Tanweer et al., 2015].

The objective of this study is the identification of genomic regions or major genes involved in *M. oryzae* resistance in local germplasm. We used two strategies using two different populations. First, we used a biparental F2:3 population derived from a cross between a susceptible cultivar (INIA Olimar) and a resistant one (INIA Caraguata) to identify molecular markers of the Simple Sequence Repeats (SSR) kind associated with rice blast resistance. Second, using two locally adapted breeding population: *tropical japonica* population of 240 lines and *indica* population of 340 lines we performed a GWAS (Genome-Wide Association Study) to identify QTL associated with resistance.

For the F2:3 population we found five markers associated with rice blast resistance: RM72, RM164, RM201, RM208 y RM7102. Also, the GWAS analysis was able to identify eigth QTL. One of them (q.MOR.j.9.1) includes the mayor resistance gene Pi5 and other minor genes associated with disease resistance. These QTLs and their associated markers could be rapidly introduced to the breeding programs.

Keywords:

Magnaporthe oryzae, Oryza sativa, Rice blast resistance, QTL, marker assisted selection.

Tabla de contenidos

Li	Lista de figuras x						
Li	sta d	e tablas	xv				
1	Intr	Introducción					
	1.1	Importancia del cultivo de arroz y el efecto de <i>Magnaporthe</i> <i>oryzae</i> en Uruguay	1				
	1.2	Resistencia genética a Magnaporthe oryzae	3				
	1.3	Mapeo de QTL de Resistencia a ${\it Magnaporthe~oryzae}$ en arroz $~$.	7				
	1.4	Evaluación fenotípica de las enfermedades	8				
	1.5	Hipótesis del trabajo	9				
	1.6	Objetivos de la tesis	9				
	1.7	Estrategias	10				
2	Mat	eriales y métodos	12				
	2.1	Material vegetal usado en las poblaciones de mapeo $\ .\ .\ .\ .$	12				
	2.2	Inóculo	12				
	2.3	Modelos estadísticos para el ensayo de fenotipado $\ . \ . \ . \ .$	13				
		2.3.1 Población F2:3	13				
		2.3.2 Población de mapeo asociativo	13				
	2.4	Evaluación de la enfermedad	14				
	2.5	Extracción de ADN	15				
	2.6	Genotipado de la población F2:3	15				
	2.7	Genotipado de la población de mapeo asociativo	16				
	2.8	GWAS	17				
	2.9	Estudio de la estructura poblacional	18				
	2.10	Haplotipos y genes candidatos $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	18				

3	\mathbf{Res}	esultados 19				
	3.1	Fenoti	ро	19		
	3.2	Pobla	ción F2:3	22		
	3.3	Anális	is de GWAS en dos poblaciones de mejoramiento	27		
		3.3.1	Estructura genética de las poblaciones de mapeo	27		
		3.3.2	Identificación de regiones genómicas asociadas a la resis-			
			tencia a Magnaporthe oryzae	29		
		3.3.3	Identificación de genes candidatos	31		
		3.3.4	Haplotipos	33		
4	Dise	cusión		35		
	4.1	Pobla	ción F2:3	35		
	4.2	Anális	is de GWAS en dos poblaciones de mejoramiento	36		
4.3 Conclusión						
Re	efere	ncias l	bibliográficas	39		

Lista de figuras

1.1	Síntomas de brusone en hoja	2
1.2	Mapa físico de arroz mostrando los genes y QTL asociados con	
	la resistencia a M . oryzae. Se observa la escala del tamaño de	
	los cromosomas (en millon de pares de bases) basada en la in-	
	formación de Gramene. La posición y nombre de marcadores	
	moleculares y genes de resistencia se indican a la derecha de ca-	
	da cromosoma. A la izquierda las barras representan $MetaQTL$	
	de resistencia parcial en negro y otros tipos de resistencia en	
	blanco. Las letras F, G y P en cada QTL representa el ti-	
	po de ensayo del que se obtivieron. F para ensayos a campo,	
	G ensayos de invernadero y P ensayos parciales (Adaptado de	
	$[Ballini et al., 2008]) \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots $	11
2.1	Línea de tiempo de eventos para evaluación de la enfermedad.	
	Arriba se pueden ver los días y abajo los distintos eventos con el	
	día en el que se hicieron tomando como día 1 la fecha de siembra	14
2.2	Mapa de marcadores utilizados en la población F2:3 se muestran	
	los nombres de los marcadores y su localización aproximada en	
	los cromosomas de arroz	16
3.1	Escala utilizada para medir la enfermedad (A). Gráfico de Bur-	
	bujas para las medidas tomadas con la escala de enfermedad pa-	
	ra las poblaciones F2:3 (B), <i>japonica tropical</i> (C) y <i>indica</i> (D).	
	El diámetro de la burbuja representa la cantidad de plantas que	
	tuvieron la medida señalada en el ej e \boldsymbol{y} en la fecha señalada en	
	el eje x	20
3.2	Correlación entre AUDPC (Rojo) y AUDPS (Azul) para las	
	poblaciones F2:3 (A), indica (B) y japonica tropical (C)	21

3.3	Medias ajustadas e histograma de densidad para los marcadores RM72 (A y B) y RM164 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)	24
3.4	Medias ajustadas (izquierda) e histograma de densidad (dere- cha) para los marcadores RM185 (A y B) y RM201 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)	24
3.5	Medias ajustadas (izquierda) e histograma de densidad (dere- cha) para los marcadores RM208 (A y B) y RM224 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)	25
3.6	Medias ajustadas (izquierda) e histograma de densidad (dere- cha) para los marcadores RM249 (A y B) y RM404 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)	26
3.7	Medias ajustadas (izquierda) e histograma de densidad (dere- cha) para los marcadores RM527 (A y B) y RM7102 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)	27
3.8	Análisis de componentes principales de las poblaciones de <i>japonica tropical</i> (A) e <i>indica</i> (B). Resultados de Structure para <i>japonica tropical</i> (C) e <i>indica</i> (D). Graficó de probabilidad Ln de los datos (LnP(D)) en función del número de poblaciones (K) <i>japonica tropical</i> (E) y <i>indica</i> (F). Se seleccionaron como números más probables $K = 5$ para <i>japonica tropical</i> y $K = 2$ para <i>indica</i> .	28
3.9	Manhattan plot para las poblaciones <i>indica</i> (A) y <i>japonica tro-</i> <i>pical</i> (B). En azul se representa la linea del umbral de Li & Ji. Se observan los QTL nombrados sobre su ubicación en B	30
3.10	Manhattan plot de <i>japonica tropical</i> con el SNP más significati- vo de q.MOR.j.9 como covariable. En rojo se representa la linea del umbral de Li & Ji. Se observan los QTL nombrados sobre	
	su ubicación	31

3.11	Grupos funcionales más representados en los QTL encontrados	
	en la población <i>japonica tropical</i> clasificados utilizando el crite-	
	rio de Gene Ontology	32
3.12	Haplotipos con medias de AUDPC comparadas para q.MOR.j1	
	(A, B), q.MOR.j.2 (C, D), q.MOR.j.8 (E, F), q.MOR.j.11 (G,	
	H) y q.MOR.j.12 (I, J). Derecha gráficas de medias ajustadas	
	para los Haplotipos. Izquierda esquema de variantes de SNP en	
	cada haplotipo.	34

Lista de tablas

1.1	Genes AVR y sus genes Pi correspondientes. Adaptado de	
	[Berruyer et al., 2003] y [Terauchi et al., 2016] $\ldots \ldots \ldots$	5
2.1	Marcadores utilizados en la población F2:3	17
3.1	Medidas resumen de las medias ajustadas de AUDPC para las	
	tres poblaciones estudiadas	20
3.2	Tabla resumen de los resultados de todos los marcadores utili-	
	zados en la población F2:3	22
3.3	Medidas resumen de las medias ajustadas de AUDPC para cada	
	marcador según alelo	23
3.4	Listado de QTL encontrados en la población $japonica\ tropical$.	29

Capítulo 1

Introducción

1.1. Importancia del cultivo de arroz y el efecto de *Magnaporthe oryzae* en Uruguay

El arroz es uno de los cultivos más importantes del mundo y es la fuente primaria de alimento para alrededor de un 50% de la población mundial [Khush, 2005]. En Uruguay es uno de los principales cultivos, después de soja y trigo, siendo principalmente un producto de exportación. El país ocupa el séptimo lugar en exportación de arroz a nivel mundial [FAO, 2016] obteniendo rendimientos de aproximadamente 8.000 kilos/ha [MGAP, 2016]. Estos rendimientos se deben principalmente al manejo agronómico y a las variedades de alto potencial de rendimiento sembradas en Uruguay. Actualmente la principal limitante biológica que presenta el cultivo de arroz en Uruguay es la enfermedad conocida como el quemado de arroz o brusone, causada por el hongo filamentoso ascomiceto Magnaporthe oryzae B. C. Couch [Khush, 2005] también conocido como Pyricularia oryzae o Magnaporthe grisea.

Brusone puede atacar a la planta de arroz desde etapas tempranas de su desarrollo hasta la producción de grano. Puede encontrarse en todas las partes aéreas de la planta. En la hoja como consecuencia de la infección por este hongo se observan lesiones son de forma alargada con bordes irregulares y con un tamaño que va desde los 3 a 15 milímetros. Estas son de color marrón pálido. Su centro puede tomar una coloración gris donde aparecen los cuerpos fructíferos del hongo 1.1 [Ou, 1980].

En Uruguay una de las causas principales del aumento de la incidencia de la enfermedad es la homogeneidad genética de cultivares. Aunque existe



Figura 1.1: Síntomas de brusone en hoja

una tendencia en los últimos años a incorporar nuevos cultivares por parte de los productores [MGAP, 2016], aproximadamente 65% del área está cultivada por tan solo tres variedades: El Paso 144 (susceptible en hoja), INIA Olimar (susceptible en hoja) y INIA Tacuarí (moderadamente resistente en hoja) [PerezdeVida et al., 2014]. Esta enfermedad puede propagarse rápidamente cuando se dan las condiciones ambientales apropiadas y producir pérdidas que pueden llegar al 100%, en el caso de desarrollarse una epidemia en siembras con cultivares muy susceptibles [Sharma et al., 2012].

La enfermedad se encuentra presente en la mayor parte de las áreas de cultivo de arroz alrededor del mundo, y es considerada internacionalmente como una amenaza para la seguridad alimentaria [Sharma et al., 2012]. En los últimos años *M. oryzae* ha afectado alrededor de la mitad de la superficie sembrada en Uruguay aumentando significativamente la aplicación de fungicidas y disminuyendo consecuentemente los márgenes de ganancia del cultivo [MGAP, 2010]. Además, la aplicación de fungicidas para controlar la enfermedad puede representar un riesgo para la sostenibilidad del medio ambiente [Tanweer et al., 2015]. Por lo tanto, la estrategia más sostenible económica y ambientalmente para combatir dicha enfermedad es la liberación de cultivares resistentes [Tanweer et al., 2015].

En los últimos años la secuenciación completa del genoma del patógeno M. oryzae [Dean et al., 2005] y su huésped Oryza sativa [Goff et al., 2002] han permitido desarrollar una variedad de herramientas genómicas para comprender y combatir el avance de la enfermedad. El genoma del arroz es realitivamente pequeño en comparación con otros cereales, 420 Mbp aproximadamente [Goff et al., 2002], lo que facilita aún más su manejo.

El cambio climático puede alterar tanto el comportamiento del patógeno como el de su hospedero. Las temperaturas elevadas pueden aumentar el estrés abiótico en plantas, lo que tiende a favorecer la incidencia de enfermedad es [Garrett et al., 2006]. A su vez algunos patógenos pueden aumentar su tasa reproductiva en respuesta a mayor temperatura o cambiar su reproducción de asexual a sexual lo que puede aumentar su potencial evolutivo [Garrett et al., 2006]; lo que podría permitirles quebrar la resistencia genética de las plantas. Dicha resistencia está dada por genes y regiones genómicas que regulan las defensas de la planta frente a un ataque por parte del patógeno [Ballini et al., 2008].

1.2. Resistencia genética a Magnaporthe oryzae

Existen dos tipos de resistencia genética en plantas: horizontal y vertical. La resistencia vertical (específica, mayor, monogénica o cualitativa) está controlada por un solo gen o un grupo pequeño de genes, conocidos como genes mayores. Estos genes son llamados genes R y son parte de un sistema de reconocimiento de la planta que activa la defensa vegetal. Esta resistencia puede desencadenar una respuesta hipersensible, inmunidad o detener el desarrollo del patógeno y la multiplicación del mismo [Agrios, 2005]. Esta resistencia es específica para una raza del patógeno, ya que involucra un sistema de reconocimiento entre el gen de resistencia de la planta y un gen de avirulencia del patógeno descripto por Flor en 1946 [Agrios, 2005], pudiéndose distinguir a las plantas según su suceptibilidad a una raza particular de patógeno [Agrios, 2005]. Una estrategia es apilar diferentes genes de resistencia mayores (piramidación de genes) para dar a la planta un mayor espectro de defensa [Agrios, 2005]; [Kumar Joshi and Nayak, 2010]; [Tacconi et al., 2010]. La resistencia dada por genes mayores ha sido utilizada durante varios años en arroz, sin embargo tiende a ser quebrada rápidamente. Esto se relaciona con la gran capacidad adaptativa de M. oryzae que favorece la virulencia [Ballini et al., 2008] [Tacconi et al., 2010]. Por lo tanto, encontrar nuevas fuentes de genes de resistencia y estrategias para su implementación en cultivares de elite es un esfuerzo constante. El uso de los marcadores moleculares facilita la identificación y selección de estos genes para su introducción en los programas de mejoramiento [Tacconi et al., 2010]. Para ello es esencial contar con marcadores estrechamente ligados a los genes de interés.

Por otro lado, la resistencia horizontal (general, menor, poligénica o cuantitativa) está controlada por varios genes, los cuales son efectivos contra los patógenos como grupo y no individualmente. Estos controlan diferentes pasos de las vías metabólicas de la planta involucradas en la defensa. Algunos de ellos pueden ser idénticos a los relacionados con la resistencia vertical. En general, el efecto de estos genes está relacionado con el control de la expansión y desarrollo de la enfermedad más que con la inmunidad de la planta. En este caso, no se puede distinguir a la plantas diferencialmente por su reacción a los patógenos como ocurre con la resistencia vertical. En general los genes mayores enmascaran la actividad de estos genes y pueden ser difíciles de detectar. Este tipo de resistencia tiende a ser más duradera ya que están involucrados varios mecanismos de defensa diferentes, regulados por numerosos genes [Agrios, 2005].

Actualmente se entiende que la resistencia de las plantas se divide en dos ramas: La primera utiliza proteínas transmembrana (PRRs por sus siglas en inglés Transmembrane Pattern Recognition Receptors) que reconocen moléculas asociadas con los patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns) como la flagelina o la quitina. Estas activan una primera respuesta de defensa conocida como respuesta inducida por PAMPs (PTI por sus siglas en inglés PAMP-Triggered Immunity), que intenta detener el avance del patógeno con estrategias como la liberación de sustancias antimicrobianas o el engrosamiento de la cutícula cerosa de las hojas [Jones and Dangl, 2006] [Vasudevan et al., 2014].

Los patógenos pueden pasar estas barreras utilizando efectores, moléculas que liberan para aumentar su capacidad de infección, también conocidos como, factores de virulencia, que desencadenan una suceptibilidad inducida por efectores (effector-triggered susceptibility ETS por sus siglas en inglés) [Jones and Dangl, 2006] [Vasudevan et al., 2014].

La segunda rama de defensa utiliza las proteínas codificadas por los genes R, en su mayoría del tipo de sitio de unión a nucleótidos rico en repetidos de leucina NB-LRR [Jones and Dangl, 2006], que se caracterizan por un sitio de unión a nucléotidos (NBS por sus siglas en inglés "Nucleotide Binding Site") y una zona con en repetidos ricos en el aminoácido Leucina (LRR por sus siglas en inglés "Leucine Rich Repeat"). En estas proteínas los dominios carboxilo y amino terminal pueden ser variables, contienen entre 860 y 1,900 aminoácidos, lo que las convierte en algunas de las proteínas más grandes conocidas en las plantas [McHale et al., 2006]. Los genes NBS-LRR tienden a formar grupos funcionales en los cromosomas de las plantas [Marone et al., 2013].

Estas proteínas pueden detectar los efectores de los patógenos o los efectos del daño celular causados por el patógeno para desencadenar las diversas vías de defensa de las plantas como la respuesta hipersensible [McHale et al., 2006] [Jones and Dangl, 2006]. Uno de los modelos propuestos para su acción es el modelo 'navaja' en el cual un efector del patógeno causa un cambio en la proteína NBS-LRR que libera alguno de sus dominios (ya sea el carboxilo terminal, el sitio de unión a nucléotidos, la zona de repetidos de leucina o una combinación de estos) cambiando de conformación a la molécula para que entre en un estado de reconocimiento que permite que sus dominios interactúen con otras proteínas, activando las vías de respuesta de la planta [Marone et al., 2013]. Las respuestas de defensa desencadenadas por estos genes se conoce como inmunidad inducida por efectores (ETI por sus siglas en inglés effector-triggered immunity) [Jones and Dangl, 2006].

Gen AVR	Gen Pi correspondiente
AVR-Pita [Orbach et al., 2000]	Pita [Bryan et al., 2000]
AVR1-CO39 [Ribot et al., 2013]	Pi-CO39 (=Pia) [Cesari et al., 2013] [Okuyama et al., 2011]
AVR-Pizt [Li et al., 2009]	Pizt [Zhou et al., 2006]
AVR-Pi9 [Wu et al., 2015]	Pi9 [Qu et al., 2006]
AVR-Pia [Yoshida et al., 2009]	Pia [Okuyama et al., 2011]
AVR-Pii [Yoshida et al., 2009]	Pii [Takagi et al., 2013]
AVR-Pik [Yoshida et al., 2009]	Pik [Ashikawa et al., 2008]
AVR-Pib [Zhang et al., 2015]	Pib [Wang et al., 1999]
AVR-Pi54 [Devanna et al., 2014]	Pi54 [Devanna et al., 2014]
ACE1 [Berruyer et al., 2003]	Pi33 [Berruyer et al., 2003]

Tabla 1.1: Genes AVR y sus genes Pi correspondientes. Adaptado de [Berruyer et al., 2003] y [Terauchi et al., 2016]

En el mundo se han identificado más de 100 genes y alrededor de 350 QTL relacionados con la resistencia *M. oryzae* en arroz [Tanweer et al., 2015]. Estos últimos son regiones genómicas que pueden contener más de un gen y regulan caracteres cuantitativos. Los QTL pueden poseer tanto genes de resistencia parcial como completa.

Los genes mayores que confieren resistencia a M. oryzae en arroz se denominan genes Pi y fueron descritos por primera vez en 1923 por Sasaki. Estos confieren resistencia completa. Según [Terauchi et al., 2016] se han clonado 9 genes de avirulencia (AVR) en M. oryzae relacionados a genes Pi en arroz. Estos se detallan en la tabla 1.1. El 80 % de los genes Pi corresponden a proteínas del tipo NBS-LRR [Ballini et al., 2008], el otro 20 % corresponde a genes de naturaleza variada. En el caso del arroz la mayoría de los genes Pi se encuentran localizados en los cromosomas 6, 11 y 12 (Figura 1.2) [Ballini et al., 2008].

Gran parte de los genes Pi o QTL de resistencia a *M. oryzae* fueron identificados con razas del patógeno de origen tropical y debido a la especificidad en las interacciones entre genes R y genes de avirulencia, pueden no conferir resistencia a razas locales. A partir del proyecto "Desarrollo de una estrategia para la obtención de resistencia durable a Pyricularia grisea de arroz en el cono sur" [Livore et al., 2001] en el que participó Uruguay se identificaron los genes Pi1 [Hittalmani et al., 2000]; [Campbell et al., 2004], Pi2 [Hittalmani et al., 2000]; [Liu et al., 2002], y Pi33 [Berruyer et al., 2003] como los más efectivos frente a las cepas locales del patógeno. Estos genes son utilizados actualmente por CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) y el programa de mejoramiento de INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) para generar materiales con resistencia durable.

En Uruguay la variedad "INIA Caraguatá", desde que fue liberada en 1995, ha demostrando resistencia a M. oryzae en ensayos anuales de inoculación en viveros trampa [Livore et al., 2001]. Este comportamiento evidencia la presencia de genes de resistencia (resistencia vertical) y/o QTL (resistencia horizontal) que confieren resistencia a las razas de M. oryzae presentes actualmente en Uruguay. De esta manera, INIA Caraguatá puede ser una fuente de resistencia genética a M. oryzae para los programas de mejoramiento de la región del Cono Sur.

1.3. Mapeo de QTL de Resistencia a Magnaporthe oryzae en arroz

Los QTL son regiones genómicas que pueden contener más de un gen y regulan caracteres cuantitativos como el rendimiento, la altura de la planta, o resistencia horizontal a una enfermedad [Tanweer et al., 2015].

Los estudios de mapeo son análisis estadísticos que permiten relacionar el fenotipo de interés con las regiones del genoma que podrían ser responsables del mismo. Para encontrar asociaciones es necesario contar con datos sólidos de fenotipo y genotipo, en este caso marcadores moleculares, que cubran el genoma en la mayor medida posible. Aquellos marcadores que se encuentren ligados a las zonas del genoma responsables del fenotipo evaluado segregarán en la población junto con estos y mostrarán una asociación; por el contrario no se observará dicha asociación con marcadores no ligados [Miles and Wayne, 2008].

Tradicionalmente se utilizan poblaciones biparentales para el mapeo de QTL, pero esta estrategia sólo es capaz de capturar la diversidad que se encuentra en cruzamientos específicos [Korte and Farlow, 2013]. Otra estrategia es el mapeo asociativo (o GWAS del inglés, Genome-Wide Association Study) que en general utiliza una población de alta diversidad de individuos con diverso grado de parentesco entre sí. Estos estudios han probado ser una herramienta eficaz para el estudio de diversos caracteres en diferentes organismos desde ratones y humanos, hasta plantas de cultivo como el arroz [Korte and Farlow, 2013], [Begum et al., 2015], [McCouch et al., 2016]. En general, con el fin de aumentar el poder de resolución del mapeo, estos estudios utilizan poblaciones altamente diversas de individuos. Sin embargo, la estrategia de GWAS puede utilizarse sobre poblaciones de mejoramiento, que aunque son menos diversas, son de líneas o cultivares que ya poseen las características agronómicas deseadas por los mejoradores. De esta forma los QTL identificados pueden ser rápidamente introgresados en material adaptado en el programa de mejoramiento [Begum et al., 2015].

Los estudios de GWAS son afectados por la estructura poblacional, dando lugar a falsos positivos al considerar significativo un alelo no causal. Las poblaciones muy estructuradas aumentan el número de falsos positivos [Malosetti et al., 2008]. Si los estados alélicos de un marcador se correlacionan con las sub poblaciones que componen la población de mapeo asociativo, pueden producirse asociaciones en regiones cromosómicas que no tienen una relación causal con el fenotipo [Yu et al., 2006], [Zhang et al., 2010]. Este problema puede solucionarse implementando modelos mixtos que tomen en cuenta el grado de parentesco entre los individuos, incluyendo la familiaridad entre ellos como un cofactor aleatorio en el modelo. El uso de este tipo de modelos reduce significativamente la cantidad de falsos positivos mejorando la calidad de la predicción [Korte and Farlow, 2013].

1.4. Evaluación fenotípica de las enfermedades

El fenotipado o evaluación fenotípica de la enfermedad es crucial para la correcta implementación de las estrategias de mapeo. Existen diversos métodos para evaluar la severidad de una enfermedad en plantas. Un método cualitativo de evaluar la enfermedad es utilizar una escala que mida la severidad de los síntomas provocados y repetir medidas a intervalos de tiempo regulares. De esta manera se obtiene una idea general del progreso de la enfermedad durante un período de tiempo.

Para convertir las medidas cualitativas obtenidas en una única variable cuantitativa es posible utilizar varios métodos, dos de estos son: el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC por sus siglas en inglés: Area Under the Disease Progress Curve) [Agrios, 2005] y el área bajo la escalera del progreso de la enfermedad (AUDPS por sus siglas en inglés: Area Under the Disease Progress Stairs) [Simko and Piepho, 2012].

El AUDPC es un método para resumir el progreso de una enfermedad en el tiempo, ya que incluye en el cálculo la cantidad de veces que ha sido evaluada la enfermedad, la severidad de la enfermedad en cada medida y el tiempo total de evaluación. De esta manera se combinan varias observaciones en un único valor [Agrios, 2005]. La forma más común de calcular el AUDPC es a través de una fórmula que divide el área bajo la curva en trapecios, calculando el área de cada uno para luego combinarlas [Simko and Piepho, 2012]. La fórmula es la siguiente:

$$AUDPC = \sum_{n=1}^{i=1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

- $y_i =$ La medida de enfermedad tomada en la i-ésima observación
- $t_i = \text{El tiempo (en días) a la i-ésima observación}$
- n = El número total de observaciones

El AUDPS es un método similar, cuya fórmula es:

$$AUDPS = AUDPC + \left[\frac{y_1 + y_n}{2} \times \frac{t_n - t_1}{n - 1}\right]$$

 $y_i\,=$ La medida de enfermedad tomada en la i-ésima observación

- $y_n =$ La medida de enfermedad tomada en la n-ésima observación
- n = El número total de observaciones
- $t_n = \text{El tiempo (en días) a la n-ésima observación}$
- $t_1 = \text{El tiempo (en días) a la primera observación}$

La mayor diferencia entre ambos es que el AUDPS le otorga mayor peso a la primera y última observación, que en AUDPC poseen menor peso que las observaciones intermedias. De esta manera iguala el peso de todas las observaciones, estimando mejor el progreso general de la enfermedad. Este método tiende a ser más efectivo que el AUDPC, excepto en casos en los que la varianza en la primera y la última observación es relativamente grande [Simko and Piepho, 2012].

1.5. Hipótesis del trabajo

Existen regiones genómicas asociadas a la resistencia frente a el patógeno *Magnaporthe oryzae* en la población de mejoramiento de INIA las cuales pueden ser identificadas.

1.6. Objetivos de la tesis

Objetivo general

Identificar regiones genómicas asociadas a resistencia el aislamiento utilizado del patógeno M. oryzae en la población de mapeo representativa del germoplasma de arroz de INIA

Objetivos específicos

- Identificar marcadores moleculares de tipo SSR asociados a resistencia a *M. oryzae* en la población biparental F2:3 resultante del cruce entre INIA Caraguatá (*japónica tropical*, altamente resistente a *M. oryzae*) e INIA Olimar (*indica*, altamente suceptible a *M. oryzae*)
- 2. Identificar las regiones genómicas responsables de la resistencia a *M. oryzae* en el germoplasma avanzado de arroz de INIA.

1.7. Estrategias

Se realizó la búsqueda de QTLs asociados a la resistencia a *M. oryzae* en el germoplasma del programa de mejoramiento de INIA siguiendo dos metodologías. Para el primer objetivo específico se realizó un mapeo de QTLs en una población F2:3 resultante del cruzamiento entre una variedad susceptible INIA Olimar y una resistente INIA Caraguatá. Para el segundo objetivo específico se realizó un GWAS en la población del programa de mejoramiento de INIA.



Figura 1.2: Mapa físico de arroz mostrando los genes y QTL asociados con la resistencia a *M. oryzae*. Se observa la escala del tamaño de los cromosomas (en millon de pares de bases) basada en la información de Gramene. La posición y nombre de marcadores moleculares y genes de resistencia se indican a la derecha de cada cromosoma. A la izquierda las barras representan MetaQTL de resistencia parcial en negro y otros tipos de resistencia en blanco. Las letras F, G y P en cada QTL representa el tipo de ensayo del que se obtivieron. F para ensayos a campo, G ensayos de invernadero y P ensayos parciales (Adaptado de [Ballini et al., 2008])

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1. Material vegetal usado en las poblaciones de mapeo

La población biparental F2:3 la conforman 162 líneas resultantes del cruzamiento entre INIA Olimar (altamente susceptible a M. oryzae) e INIA Caraguatá (altamente resistente a M. oryzae).

La población de mapeo asociativo cuenta con 580 genotipos de líneas avanzadas seleccionadas del programa de mejoramiento de arroz de INIA de entre las que en 2012 tenían más de un año de evaluación en campo. Se divide en 240 genotipos de la subespecie *japonica tropical* (incluyendo los cultivares comerciales Parao, INIA Tacuarí e INIA Caraguatá) y 340 genotipos de la subespecie *indica* que incluyen los cultivares comerciales El Paso 144 e INIA Olimar.

2.2. Inóculo

Se utilizó la cepa Po188 de *M. oryzae* aislada de hoja de la variedad Samba de 'Casarone Agroindustrial' en Rio Branco en el año 2014. La cepa se encuentra depositada en la colección del Laboratorio de Patología Vegetal de INIA Treinta y Tres en papel a -20°C. Se eligió debido a su gran virulencia (com. pers. Sebastián Martínez). El inóculo se produjo en placas de Petri conteniendo medio agar/salvado de arroz (20g agar, 20g salvado de arroz en un litro de agua destilada) inoculados en el centro con micelio fresco. Las placas fueron incubadas en estufa a 25°C por 15 días. Se expusieron a las placas a la luz solar indirecta 4 días previos a la cosecha para estimular la esporulación. Se recogieron los conidios mediante raspado superficial del medio de cultivo con espátula metálica. El resultado del raspado se filtró con gasa y se centrifugó dos veces durante 30 minutos a 8000 rpm. Se obtuvo el pellet que se re suspendió en 10 mL de agua destilada. Los conidios se contaron en cámara de Neubauer para calcular su concentración. La solución se preparó mezclando los conidios obtenidos con agua destilada estéril conteniendo 4,0% de gelatina sin sabor de tipo comercial (1,6% de gelatina pura por paquete de 7g) para facilitar la adhesión de los mismos a las hojas. Se realizó una primera inoculación con un aspersor manual con una concentración de inoculo de $3x10^5$. En plantas con un mes de sembradas. A los 7 días se realizó una segunda inoculación con concentración de inoculo de $8x10^4$, mediante la misma técnica.

2.3. Modelos estadísticos para el ensayo de fenotipado

2.3.1. Población F2:3

Se utilizó la siguiente fórmula para el diseño experimental del sembrado e inoculación:

 $Y_{ij} = \mu + G_i + A_j + \varepsilon_{ij}$

Donde Y_{ij} es la variable de respuesta (AUDPC), μ la Media general, G_i el efecto del i-ésimo genotipo, A_j el efecto de la j-ésima almaciguera y ε_{ij} corresponde al error para el que se asume una varianza homogénea y media = 0.

2.3.2. Población de mapeo asociativo

Para esta población se utilizó la siguiente fórmula para diseño experimental del sembrado e inoculación:

 $Y_i = \mu + G_i + \varepsilon_i$

Donde Y_i es la variable de respuesta (AUDPC), μ la Media general, G_i el efecto del i-ésimo genotipo y ε_{ij} corresponde al error para el que se asume una varianza homogénea y media = 0.

2.4. Evaluación de la enfermedad

Para evaluar el fenotipo de las poblaciones se adaptó una escala de lectura que toma en cuenta la severidad de las lesiones producidas en las hojas de las plantas de arroz. Se tomaron medidas en una misma hoja marcada en tres medidas independientes a intervalos de 8 días aproximadamente comenzando a 7 días a partir de la segunda inoculación. En la figura 2.1 puede verse una línea de tiempo que esquematiza estos eventos.



Figura 2.1: Línea de tiempo de eventos para evaluación de la enfermedad. Arriba se pueden ver los días y abajo los distintos eventos con el día en el que se hicieron tomando como día 1 la fecha de siembra

La escala utilizada fue adaptada a partir de los trabajos de [Moytri RoyChowdhury, 2012] y [Campbell et al., 2004], puede verse en la figura 3.1 (A). En base a esta se evaluó una planta como 0 si no presentaba síntomas. Se evaluaron como tipo 1 las plantas que presentaron lesiones puntuales, de menos de 1 mm de diámetro, en general evidencia de resistencia de tipo reacción de hipersensibilidad. Las plantas con manchas tipo 2 fueron aquellas que presentaban lesiones puntuales de mayor tamaño que 1mm y con una zona de clorosis alrededor. Las plantas con manchas tipo 3 presentaron lesiones circulares de mayor tamaño y tejido necrosado no esporulante en el centro. Las plantas con mancha tipo 4 tenían manchas similares pero de forma romboidal de 4 mm o más de largo y con tejido necrosado capaz de esporular. Las plantas con manchas tipo 5 fueron aquellas que presentaron manchas similares al tipo 4 pero con un daño sustancial en la hoja, con varias manchas se fusionan destruyendo parcial o totalmente la hoja. Todo el manejo de los datos de fenotipo se realizó mediante software R [R Core Team, 2013]. Para ambas poblaciones el AUDPC se calculó utilizando el paquete Agricolae [de Mendiburu, 2016].

2.5. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN de la población F2:3 se realizaron mediante extracción con CTAB adaptado del manual "Mutant Germoplasm Characterization using Molecular Markers" preparado por FAO/IAEA [FAO/IAEA, 2002]. De 0.5 a 1 gramos de tejido se picaron con nitrógeno líquido y se mezclaron con 20 μl 1.5% de CTAB con 25 μl de beta mercaptoethanol. Luego se incubaron por 45 minutos a 60°C. Se permitió que la mezcla retomara temperatura ambiente y se le agregaron 20 μl de cloroformo alcohol isolamínico (1:4). Se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm a 10°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregargaron 2/3 del volumen de isopopanol y se mezcló. Se colocó a -20°C durante 1 hora. Se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se lavó el pellet con etanol 70 %, se dejó secar y se resuspendióe en 100 μl de agua destilada. A la población de mapeo asociativo se le extrajo ADN de 100 mg de tejido fresco obtenidas de plántulas de arroz usando el kit Qiagen DNeasy kit (www.giagen.com). La concentración y calidad de ambas extracciones se evaluó mediante Nanodrop (Themo Scientific), Qubit 2.0 (life technologies) y gel de agarosa 1.8%.

2.6. Genotipado de la población F2:3

Esta población fue genotipada con marcadores flanqueantes a genes Pi previamente reportados. Los marcadores utilizados fueron microsatélites o repeticiones de secuencias únicas (single sequence repeat, SSR). Las PCR para los marcadores descriptos se realizaron en un mix de 25 μl , con 2,5 mM de $MgCl_2$, 1X Taq Buffer con KCl (Themo Scientific), 0,12nM dNTPs (Themo Scientific), 0,22 μ M de cada cebador, 0,8 unidades de Taq Polimerasa (Themo Scientific) por μl y 50 ng/ μl de ADN. El programa comprendió un ciclo de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 95°, 1 minuto a 56°, 1 minuto a 72° y finalmente un ciclo de 7 minutos a 72°C. Los marcadores utilizados y sus primers pueden verse en la tabla 2.1. La ubicación de estos marcadores en el

genoma se representa en la figura 2.2



Figura 2.2: Mapa de marcadores utilizados en la población F2:3 se muestran los nombres de los marcadores y su localización aproximada en los cromosomas de arroz

2.7. Genotipado de la población de mapeo asociativo

La secuenciación fue realizada por "Biotechnology Resource Center, Genomic Diversity Facility" de la Universidad de Cornell en Estados Unidos. Las muestras se presentaron en placas de 96 pocillos y las bibliotecas se prepararon utilizando el protocolo descrito por [Elshire et al., 2011].La búsqueda de SNPs se realizó a partir de archivos FASTQ utilizando la pipeline de TASSEL3.0 [Bradbury et al., 2007] como se encuentra descripta en [Spindel et al., 2013]. La alineación se realizó utilizando BWA-0.7.5 a la referencia del genoma ver-

Marcador	Cebador directo	Cebador reverso
RM 72	CCGGCGATAAAACAATGAG	GCATCGGTCCTAACTAAGGG
RM 107	AGATCGAAGCATCGCGCCCGAG	ACTGCGTCCTCTGGGTTCCCGG
RM 164	TCTTGCCCGTCACTGCAGATATCC	GCAGCCCTAATGCTACAATTCTTC
RM 166	GGTCCTGGGTCAATAATTGGGTTACC	TTGCTGCATGATCCTAAACCGG
RM 185	AGTTGTTGGGAGGAGAAAGGCC	AGGAGGCGACGGCGATGTCCTC
RM 201	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCTTTCTAGACCGATA
RM 208	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTGTGTGGACC
RM 212	CCACTTTCAGCTACTACCAG	CACCCATTTGTCTCTCATTATG
RM 224	ATCGATCGATCTTCACGAGG	TGCTATAAAAGGCATTCGGG
RM 226	AGCTAAGGTCTGGGAGAAACC	AAGTAGGATGGGGGCACAAGCTC
RM 246	GAGCTCCATCAGCCATTCAG	CTGAGTGCTGCTGCGACT
RM 249	GGCGTAAAGGTTTTGCATGT	ATGATGCCATGAAGGTCAGC
RM 404	CCAATCATTAACCCCTGAGC	GCCTTCATGCTTCAGAAGAC
RM 527	GGCTCGATCTAGAAAATCCG	TTGCACAGGTTGCGATAGAG
RM 1233	GTGTAAATCATGGGCACGTG	AGATTGGCTCCTGAAGAAGG
RM 7102	TTGAGAGCGTTTTTAGGATG	TCGGTTTACTTGGTTACTCG

Tabla 2.1: Marcadores utilizados en la población F2:3

sión 7.0 MSU Nipponbare.

Los SNPs con frecuencia del alelo minoritario (MAF) por debajo de 1%, se retiraron de los conjuntos de datos. Para facilitar los análisis estadísticos, los conjuntos de datos genotípicos finales fueron transformados de codificación de nucleótidos (es decir, A, C, G, T) a la codificación numérica (0 para la clase I homocigotos, 1 para la clase II homocigotos).

2.8. GWAS

El análisis de GWAS se realizó ajustando un modelo mixto para corregir por la estructura de la población. Se seleccionó el modelo de eigenstrat $Y = X\beta + Qv + e$ [Price et al., 2006]; [Malosetti et al., 2008], que modela al efecto genotípico como un factor aleatorio, donde: Y es la variante fenotípica, X la matriz de marcadores moleculares, β el vector de efectos alélicos, Q es la matriz de incidencia de efectos aleatorios, v es el vector de efectos aleatorios (genotipos) $v \sim N(0, K\sigma_G^2)$ y e es el vector de efectos residuales con $e \sim N(0, I\sigma_e^2)$.

Para la identificación de QTL, se implementó un procedimiento de ventana deslizante. El marcador con la más alta asociación marcador-fenotipo fue elegido como un ancla y a continuación, se utilizó una ventana deslizante de un millón de pares de bases para identificar todos los marcadores significativos dentro de esa ventana. Un QTL se definió cuando tres o más SNPs significativos (p-valor 1×10^{-4}) se encontraron dentro de la ventana de 1 Mb. El umbral de significancia fue ajustado por el número efectivo de pruebas independientes [Li and Ji, 2005]. Para *japonica tropical* el umbral de Li & Ji es $2, 8 \times 10^{-5}$ y $2, 7 \times 10^{-5}$ *indica*. Los análisis de QTL se completaron usando el paquete de R lmem.gwaser [Gutierrez et al., 2016].

2.9. Estudio de la estructura poblacional

La estructura poblacional fue analizada via PCA y algoritmos de agrupación basados en modelos implementados con el programa informático AD-MIXTURE v1.2362. [Alexander et al., 2009]. Los análisis de PCA se realizaron sobre las matrices genotípicas. La estructura poblacional fue realizada por separado para las sub poblaciones de *indica* y *japonica tropical* utilizando el programa programa Structure [Pritchard et al., 2000]; [Falush et al., 2003]; [Falush et al., 2007]; [Hubisz et al., 2009] cuyos resultados se analizaron con la herramienta structure harvester [Earl and VonHoldt, 2012].

2.10. Haplotipos y genes candidatos

Para el estudio de genes candidatos se subió el genoma en formato gff3 de arroz del proyecto MSU (www.rice.plantbiology.msu.edu/) a una base de datos MySQL (www.mysql.com). Se utilizó lenguaje de consulta estructurado SQL para cada SNP dentro de los QTL encontrados y la posición que ocupa en el genoma. Y si el SNP se encontró en una región dentro de un gen se obtuvo la información del mismo.

El análisis de los haplotipos se realizó utilizando el paquete clusterhap en R software [Quero et al., 2016]. Este agrupa los individuos que tienen una probabilidad diferente a 0 de tener el mismo alelo en la secuencia de SNPs. Este programa no imputa los datos faltantes.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Fenotipo

El uso de las herramientas bioestadísticas disponibles de mapeo asociativo y de poblaciones segregantes requiere preferentemente, aunque no de manera excluyente, de la obtención de datos cuantitativos de fenotipo, los que no han sido reportados para la enfermedad en estudio.

Existen dos métodos similares para la conversión de datos cualitativos de avance de la enfermedad (tomados con la escala de la figura 3.1 A) en cuantitativos: AUDPC o AUDPS. Se realizó una comparación entre ambos métodos para los datos obtenidos.

En el caso de las poblaciones utilizadas los resultados de ambos métodos correlacionan, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.99 como se observa en la figura 3.2. De esta manera, se considera que son igualmente válidos a la hora de medir el progreso de la enfermedad. En este trabajo es utilizado AUDPC debido a que es el más reportado en la bibliografía.

Las dos poblaciones de GWAS fueron fenotipadas por AUDPC. Las medias ajustadas de los 240 genotipos de *japonica tropical* presentaron valores de AUDPC comprendidos entre el 0 y 66.50. El porcentaje de genotipos con AUDPC 0 fue 8,75%. Por otro lado, las medias ajustadas de los 304 genotipos *indica* presentaron valores comprendidos entre 0 y 81. El porcentaje de genotipos con AUDPC 0 fue 12,5%. En el caso de la población biparental F2:3, los 162 genotipos F2:3 presentaron un máximo de AUDPC de 103.3 y un mínimo de 4.4. Ninguna de las medias ajustadas de AUDPC para la población F2:3 fue 0. Cabe recordar que cada experimento y el cálculo de AUDPC asociado a cada uno fueron realizados por separado y los valores no son comparables entre las poblaciones. El resumen de los datos puede observarse en la tabla 3.1.



Figura 3.1: Escala utilizada para medir la enfermedad (A). Gráfico de Burbujas para las medidas tomadas con la escala de enfermedad para las poblaciones F2:3 (B), *japonica tropical* (C) y *indica* (D). El diámetro de la burbuja representa la cantidad de plantas que tuvieron la medida señalada en el eje y en la fecha señalada en el eje x

Población	Min	Max	Media	Desviación standart	Coeficiente de variación
F2:3	4.4	103.3	43.64	22.89	0.52
japonica tropical	0	66.5	21.76	17.04	0.78
indica	0	81	19.94	16.26	0.82

Tabla 3.1: Medidas resumen de las medias ajustadas de AUDPC para las tres poblaciones estudiadas







Figura 3.2: Correlación entre AUDPC (Rojo) y AUDPS (Azul) para las poblaciones F2:3 (A), *indica* (B) y *japonica tropical* (C)

3.2. Población F2:3

Se estudiaron las medias ajustadas de AUDPC para cada marcador para los individuos homocigotos INIA Caraguatá (BB), homocigotos INIA Olimar (AA) o heterocigotos (AB), y se realizó una comparación de las medias para cada uno en un histograma de distribución.

De los marcadores utilizados no se obtuvieron resultados para RM166, RM107, RM 246, RM 226 y RM 212, ya que estos no pudieron ser amplificados mediante PCR. Mientras que los marcadores RM 155 y RM 1233 resultaron monomórficos para esta población. El resumen de estos datos puede verse en la tabla 3.2. Los 10 marcadores restantes fueron polimórficos y se reportan los resultados para estos en la tabla 3.3 y las figuras 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7.

Marcador	Resultado			
RM72	Existe una diferencia de medias a favor de INIA Caraguatá			
RM164	Existe una diferencia de medias a favor de INIA Caraguatá			
RM185	Existe una diferencia de medias a favor de INIA Caraguatá			
RM201	Existe una diferencia de medias a favor de INIA Caraguatá			
RM208	Existe una diferencia de medias a favor de INIA Caraguatá			
RM7102	Existe una diferencia de medias a favor de INIA Caraguatá			
RM249	No se observa diferencia de medias de AUDPC			
RM404	No se observa diferencia de medias de AUDPC			
RM224	Datos no concluyentes			
RM527	Datos no concluyentes			
RM 155	Monomórfico			
RM 1233	Monomórfico			
RM166	No hubo amplificación por PCR			
RM107	No hubo amplificación por PCR			
RM 246	No hubo amplificación por PCR			
RM 226	No hubo amplificación por PCR			
RM 212	No hubo amplificación por PCR			

Tabla 3.2: Tabla resumen de los resultados de todos los marcadores utilizados en la población F2:3

Se observa una diferencia de medias de AUDPC para los marcadores RM72, RM164, RM185, RM201, RM208 y RM7102. No se observa en los marcadores RM249 y RM404. Mientras que RM224 y RM527 muestran una diferencia de medias entre los homocigotos con los alelos de INIA Olimar (AA) y el heterocigoto (AB), pero para los homocigotos con los alelos de INIA Caraguatá (BB) es difícil de determinar con exactitud, ya que el ADN de las muestras mostraba un alto grado de degradación y algunas de estas no reportaron resultados concluyentes (Figuras 3.5 y 3.7).

Marcador	Media ajustada de AUDPC	Tamaño del alelo
RM72 AA	$43,59 \pm 3,44$	150
RM72 AB	$44,53 \pm 2,57$	
RM72 BB	$36,56 \pm 5,38$	183
RM164 AA	$45,64 \pm 3,21$	287
RM164 AB	$43,79 \pm 3,06$	
RM164 BB	$36,07 \pm 5,05$	314
RM185 AA	$44,01 \pm 2,95$	209
RM185 AB	$42,\!37 \pm 3,\!04$	
RM185 BB	$37,14 \pm 4,82$	212
RM201 AA	$45,42 \pm 4,09$	173
RM201 AB	$46,41 \pm 3,57$	
RM201 BB	$35,50 \pm 4,84$	159
RM208 AA	$44,61 \pm 3,13$	153
RM208 AB	$44,84 \pm 2,58$	
RM208 BB	$33,75 \pm 5,13$	142
RM224 AA	$48,09 \pm 2,22$	150
RM224 AB	$27,\!88 \pm 4,\!61$	
RM224 BB	$26,80 \pm 22,59$	172
RM249 AA	$42,12 \pm 4,50$	229
RM249 AB	$45,56 \pm 3,81$	
RM249 BB	$42,31 \pm 3,40$	218
RM404 AA	$40,62 \pm 3,91$	177
RM404 AB	$42,\!61 \pm 4,\!62$	
RM404 BB	$45,77 \pm 4,22$	188
RM527 AA	$47,54 \pm 2,07$	177
RM527 AB	$31,44 \pm 3,56$	
RM527 BB	$26,80 \pm 21,96$	188
RM2702 AA	$48,44 \pm 4,12$	207
RM2702 AB	$44,07 \pm 2,68$	
RM2702 BB	$35,16 \pm 4,52$	193

Tabla 3.3: Medidas resumen de las medias ajustadas de AUDPC para cada marcador según alelo



Figura 3.3: Medias ajustadas e histograma de densidad para los marcadores RM72 (A y B) y RM164 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)



Figura 3.4: Medias ajustadas (izquierda) e histograma de densidad (derecha) para los marcadores RM185 (A y B) y RM201 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)



Figura 3.5: Medias ajustadas (izquierda) e histograma de densidad (derecha) para los marcadores RM208 (A y B) y RM224 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)



Figura 3.6: Medias ajustadas (izquierda) e histograma de densidad (derecha) para los marcadores RM249 (A y B) y RM404 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)



Figura 3.7: Medias ajustadas (izquierda) e histograma de densidad (derecha) para los marcadores RM527 (A y B) y RM7102 (C y D). En rojo (AA) se representa al homocigoto Olimar, en verde al heterocigoto (AB) y en azul al homocigoto INIA Caraguatá (BB)

3.3. Análisis de GWAS en dos poblaciones de mejoramiento

3.3.1. Estructura genética de las poblaciones de mapeo

Ambas poblaciones de mapeo asociativo fueron analizadas por su estructura poblacional 3.8 mediante un análisis de componentes principales o PCA, de manera de incluir dichos resultados en el modelo de mapeo por asociación y evitar de esta forma el hallazgo de asociaciones espurias.

En el caso de la población de *japonica tropical*, los dos primeros componentes principales explican el 16 % de la variación de la población (3.8 A). En el caso de la población *indica* los dos primeros componentes principales explican el 24 % de la variación (3.8 B).



Figura 3.8: Análisis de componentes principales de las poblaciones de *japonica* tropical (A) e indica (B). Resultados de Structure para *japonica tropical* (C) e indica (D). Graficó de probabilidad Ln de los datos (LnP(D)) en función del número de poblaciones (K)*japonica tropical* (E) y indica (F). Se seleccionaron como números más probables K = 5 para *japonica tropical* y K = 2 para indica.

Para profundizar el análisis de la estructura poblacional se utilizó el programa Structure [Pritchard et al., 2000]; [Falush et al., 2003]; [Falush et al., 2007]; [Hubisz et al., 2009] y sus resultados se analizaron con la herramienta structure harvester [Earl and VonHoldt, 2012].

Se graficó la probabilidad a posteriori, LnP(D), para cada número de grupo (K) probado y se determinó el número de sub poblaciones en el inicio del plateau de dicha gráfica (3.8 E y F). Ya que al iniciarse el plateau empiezan a bajar las probabilidades de que ese número de poblaciones sea correcto. Se seleccionaron como números más probables K = 5 para *japonica tropical* y K = 2 para *indica*.

Para la población de *japonica tropical* se observan 5 grupos que corresponden a los diferentes ancestros utilizados para generar la población. En el caso de la población *indica* existen 2 grupos. Esto se debe a que la población utilizada combina plantas de dos orígenes diferentes, INIA (Uruguay) y FLAR (Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego, Colombia).

3.3.2. Identificación de regiones genómicas asociadas a la resistencia a *Magnaporthe oryzae*

Se realizó el análisis de QTL de las poblaciones *japonica tropical* e *indica* obteniendo resultados diferentes en ambas poblaciones. En la figura 3.9 pueden observarse los manhattan plot. En la Tabla 3.4 se describen los QTL encontrados para la población de *japonica tropical*. No se encontraron QTL asociados a *M. oryzae* en la población *indica*.

QTL	Cromosoma	Inicio	Fin
q.MOR.j.1	1	41259852	41577392
q.MOR.j.2.1	2	16510163	17188097
q.MOR.j.2.2	2	35250646	35250665
q.MOR.j.8	8	4092877	15623958
q.MOR.j.9.1	9	6999053	9729222
q.MOR.j.9.2	9	12323256	12333754
q.MOR.j.11	11	4458227	4793932
q.MOR.j.12	12	234382	995182

Tabla 3.4: Listado de QTL encontrados en la población japonica tropical

En el caso de la población de *japonica tropical* el modelo de asociación utilizado muestra un 8 QTL distribuídos en los cromosomas 1, 2, 8, 9, 11 y 12. El más significativo de estos se ubica en el cromosoma 9 nombrado q.MOR.j.9.1. De acuerdo a los criterios de selección de QTL usados en este trabajo, los SNP flanqueantes a esta región genómica son S9_6999053 y S9_9729222, siendo el tamaño total del QTL de 2730169 bases. Una búsqueda de genes dentro de este QTL da como resultado 456 loci que expresan para diferentes proteínas putativas, 19 de estos relacionados con respuestas a estrés general y 5 con respuesta a estrés biótico específicamente. Entre ellos se encuentran: LOC_Os09g15840 y LOC_Os09g15850 que corresponden al gen mayor Pi5 [Lee et al., 2009b].



Figura 3.9: Manhattan plot para las poblaciones *indica* (A) y *japonica tropical* (B). En azul se representa la linea del umbral de Li & Ji. Se observan los QTL nombrados sobre su ubicación en B.

Al utilizar el SNP más significativo de q.MOR.9.1 como cofactor para un nuevo análisis (3.10), se observa un QTL en el cromosoma 8 (q.MOR.j.8) el

cual se encuentra entre las posiciones 15667575 y 21165809. De acuerdo a las posiciones se presume que es el mismo QTL nombrado como q.MOR.j.8 en el primer análisis.

No se observaron otros QTL que cumplieran los criterios de selección. Sin embargo, se observa 1 SNP significativo en el cromosoma 1: S1_37498960 ubicado en la posición 37498960. Su cercanía a q.MOR.j.1 (primer análisis) indicaría que se trata de la misma región en el genoma. Además, en el cromosoma 11 existen dos SNPs significativos: S11_4793932 y S11_4794051 en las posiciones 4793932 y 4794051 respectivamente, cercanos al QTL del primer análisis q.MOR.j.11, lo cual sugiere una asociación de esa región del cromosoma 11 con la resistencia a *M. oryzae*.



Figura 3.10: Manhattan plot de *japonica tropical* con el SNP más significativo de q.MOR.j.9 como covariable. En rojo se representa la linea del umbral de Li & Ji. Se observan los QTL nombrados sobre su ubicación

3.3.3. Identificación de genes candidatos

Mediante la búsqueda in sílico, utilizando las herramientas de anotación genómica disponibles en arroz, se buscaron genes candidatos dentro de las regiones genómicas delimitadas por los QTL. Estos genes fueron clasificados utilizando el criterio de Gene Ontology que clasifica los genes de acuerdo a su función ([Ashburner et al., 2000]). Se seleccionaron los grupos funcionales más representados dentro de cada región genómica, enfocando particularmente aquellos involucrados en la respuesta a estrés biótico.



Figura 3.11: Grupos funcionales más representados en los QTL encontrados en la población *japonica tropical* clasificados utilizando el criterio de Gene Ontology

Los análisis mostraron genes relacionados con la respuesta a estímulos bióticos (3.11). En q.MOR.j.1 se identificó el gen para una proteína putativa de la familia 17 de las glicosil hidrolasas. En q.MOR.j.11 se encontraron genes para dos proteínas putativas relacionadas con el estrés biótico, una lipasa y un miembro de la familia de la familia DnaK. A su vez q.MOR.j.12 presenta un transportador de amonio, una enzima activadora de ubiquitinas y un factor de transcripción llamado WRKY, todos estos genes relacionados con el estrés biótico. Los QTL q.MOR.j.2.1 y q.MOR.j.8 no presenta genes para proteínas putativas directamente relacionadas con el estrés biótico (al menos no clasificadas). Sin embargo, presentan genes relacionados con el estrés en general, la modificación de proteínas, la estructura celular o la respuesta a estímulos abióticos y endógenos. Este tipo de genes putativos fueron encontrados en todos los QTL observados (3.11). En el intervalo comprendido en los QTL q.MOR.j.2.2 y el q.MOR.j.9.2 no se encontraron genes anotados.

3.3.4. Haplotipos

Los haplotipos son combinaciones de SNP que se heredan juntas, los haplotipos de un mismo QTL son variantes en los SNP que lo conforman. Se identificaron haplotipos 3.12 utilizando el primer análisis de QTL realizado. En el caso de q.MOR. j.1.1 se observan 3 haplotipos, siendo el 1 y el 3 los que poseen medias más bajas de AUDPC. Para q.MOR. j.2.1 se observaron dos, el segundo con menor media de AUDPC. Para q.MOR. j.8 se observaron 4, el primero con una media de AUDPC menor que la de los otros. En el QTL q.MOR. j.11 se observan 5 haplotipos, el primero posee una media de AUDPC menor. Finalmente para q.MOR.j.12 se observan 2 haplotipos, el segundo posee una media de AUDPC mayor que el primero.



Figura 3.12: Haplotipos con medias de AUDPC comparadas para q.MOR.j1 (A, B), q.MOR.j.2 (C, D), q.MOR.j.8 (E, F), q.MOR.j.11 (G, H) y q.MOR.j.12 (I, J). Derecha gráficas de medias ajustadas para los Haplotipos. Izquierda esquema de variantes de SNP en cada haplotipo.

Capítulo 4

Discusión

El esfuerzo de encontrar regiones genómicas relacionadas con la resistencia a M. oryzae es una tarea importante para el programa de mejoramiento de arrroz de INIA. En este trabajo se utilizaron dos acercamientos distintos con el fin de descubrir las causas genéticas de la resistencia al patógeno en el germoplasma del programa de mejoramiento de INIA.

4.1. Población F2:3

En el caso de la población biparental INIA Olimar x INIA Caraguatá se encontraron cinco marcadores: RM72, RM164, RM201, RM208 y RM7102 cuyos alelos provenientes de la variedad INIA Caraguatá presentan menores medias de AUDPC que los individuos con el alelo proveniente de INIA Olimar. A estos podrían sumarse RM527 y RM224 ya que muestran una diferencia de medias entre heterocigoto y homocigoto INIA Olimar, aunque el homocigoto INIA Caraguatá no haya aportado datos significativos por la degradación de las muestras. Además, RM72 y RM527 se utilizan rutinariamente para identificar la presencia de dos genes mayores Pi33 y Pi2, ya reportados como los más efectivos contra cepas locales del patógeno [Livore et al., 2001].

El marcador RM164 está asociado a la región del cromosoma 5 en la que se encuentra el gen mayor Pi23 [Ahn et al., 1997]. RM185 se encuentra cercano al gen mayor Pi(t) [Hsieh, 1976] en el cromosoma 4. El marcador RM201, en el cromosoma 9, se asocia con Pi42 [Lee et al., 2009a]. Mientras que RM208 se encuentra en una región del cromosoma 2 que posee los genes: Pi23(t)C [Ahn et al., 1997], Pitq5 [Tabien et al., 2000], Pi-y(t)

[Huang, 2005], Pi-x(t) [Huang, 2005] y Pi-g (t) [Zhou et al., 2004]. RM224 se encuentra en el cromosoma 11 en la misma región que Pik [Kiyosawa, 1970], Pi18 [Lee and Cho, 1990], Pi1 [Yu et al., 1991], Pi7 [Wang et al., 1994] y Pif [Yunoki et al., 1970]. El marcador RM7102 está ubicado en una región del cromosoma 12 altamente rica en genes Pi, que incluye: Pita2 [Kiyosawa, 1967], Pi14(t) [Hayashi et al., 1996], Pi32(t) [Sallaud et al., 2003], Pi62 [Wu et al., 1996], Pi6 [Tanksley et al., 1993], Pi19 [Hayashi et al., 1998], Pi12 [Inukai et al., 1994], Pi21 [Ahn et al., 1997] y Pi157 [Causse et al., 1994] (1.2). Estas son regiones prometedoras para continuar estudiando la resistencia durable que ha mostrado INIA Caraguatá.

4.2. Análisis de GWAS en dos poblaciones de mejoramiento

En el análisis de GWAS para *japonica tropical* se observaron 8 QTL que poseen genes relacionados con la resistencia a *M. oryzae*. Todos estos poseen genes interesantes en ellos que podrían formar parte de las estrategias de mejoramiento en el futuro.

En primer lugar se observó el gen mayor de resistencia pi5 en el cromosoma 9. Este gen no había sido reportado dentro de la población de mejoramiento utilizada en este trabajo hasta ahora y posee marcadores asociados lo cual hace posible su rápida inserción en el programa de mejoramiento INIA.

En cuanto a los genes candidatos a ser genes responsables de resistencia parcial: en el cromosoma 1 se encontró un gen de la familia 17 de las glicosil hidrolasas. Estas enzimas han sido relacionadas en plantas con la activación de componentes de defensa, las hormonas vegetales y los precursores de la pared celular [Opassiri et al., 2006]. Seis miembros de esta familia han sido reportados como sobre expresados en el cultivar resistente Gigante Vercelli (japonica templada) post inoculación con *M. oryzae* por [Bagnaresi et al., 2012]. Según dicho trabajo la activación de este tipo de proteínas, que se da en el cultivar resistente en contraste con el suceptible, estaría coordinada por miembros de vías se señalización como los factores de transcripción de la familia WRKY, la familia de los receptores de elicitores WAK, la maquinaria de detección de oligosacáridos de quitina y las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés mitogen-activated protein kinase). En relación a lo anteriormente mencionado en este trabajo se ha identificado en el cromosoma 12 un factor de transcripción de la familia WRKY. Que además también están involucrados con la defensa mediada por PAMPs [Marone et al., 2013], la asociada al ácido salicílico y la inducida por benzotiadiazol en arroz [Shimono et al., 2012]. Sin embargo no se puede establecer una relación causal entre ambas zonas del genoma en este trabajo.

Por otro lado en el cromosoma 11 se identificaron miembros de la familia de proteínas DnaK, chaperonas que evitan la desnaturalización de proteínas bajo condiciones de stress en plantas y han sido reportadas expresadas en arroz tanto bajo estrés abiótico o biótico [Zang and Komatsu, 2007]; [Kim et al., 2014]; [Khan et al., 2016]. Ademas en este cromosoma se encontró una lipasa, las cuales también han sido relacionadas con el estrés biótico en plantas. Estas regulan cambios en la bicapa lipídica que pueden alterar la forma en las que las membranas permiten el intercambio entre diferentes compartimientos celulares. Además, están relacionadas con la biosintesis de oxilipinas, importantes en la respuesta a patógenos de diversos tipos [Prost et al., 2005], que requieren la liberación de acídos grasos o derivados de los lípidos de membrana [van Loon et al., 2006]; [Grienenberger et al., 2010]. Las oxipilinas pueden funcionar como moléculas señal, están involucradas en la síntesis del ácido jasmónico, pueden formar parte de la cutícula de las hojas, funcionan como compuestos antibacteriales o de cicatrización de heridas [Blée, 2002].

Los otros QTL identificados poseen candidatos menos claros, en general relacionados con el estrés en general o la modificación de componentes celulares.

La pérdida de QTL al utilizar a q.MOR.9.1 como cofactor se debe a que q.MOR.j.2.1 y q.MOR. j.12 son co-lineales a este. Estos resultados pueden deberse a una asociación matemática en la cual los SNPs q.MOR. j.2.1 y q.MOR.j.12 y los de q.MOR.9.1 segregan en la población de *japonica tropical* de forma similar. De esta forma los primeros serían simplemente falsos positivos. Otra posibilidad es que exista una relación causal entre estas zonas del genoma, como es el caso de los complejos co-adaptados [Allard, 1988] en los cuales dos regiones distantes del genoma dependen la una de la otra para que se exprese un determinado fenotipo. Estas zonas tienden a seleccionarse juntas y no sería extraño encontrar este tipo de asociación en poblaciones de mejoramiento. Existen ejemplos de genes de resistencia que forman complejos co-adaptados en diversas plantas, incluso el arroz [Hulbert et al., 2001].

Lamentablemente este análisis no puede distinguir entre ambas situacio-

nes. Los estudios de QTL son en general muy pobres a la hora de determinar epístasis entre los loci que los componen, ya que esta limita la capacidad de interpretar el efecto de cada locus individual. Se requieren poblaciones de gran tamaño y un gran número de comparaciones para estudiar la epítasis estadística entre los QTL [Demuth and Wade, 2006].

En la La población *indica* no se identificó ningún QTL. Esto puede deberse a varias razones, posiblemente ligadas al fenotipo. La población fue la segunda en ser inoculada, casi 2 meses luego de la población *japonica tropical*. Este tiempo pudo haber actuado en contra de la patogenicidad de las muestras de *M. oryzae*. Además, durante el tiempo que las plantas estuvieron en el invernáculo se registraron temperaturas anormalmente altas que también pudieron perjudicar al patógeno.

4.3. Conclusión

Este trabajo buscó indagar sobre la resistencia a *M. oryzae* en el las poblaciones de mejoramiento de arroz de Uruguay. Por un lado se encontraron varios marcadores asociados con la resistencia durable de la variedad INIA Caraguatá. Por otro, un análisis de GWAS, que incluía esa variedad, mostró al menos un gen mayor (Pi5) y varios genes menores asociados a resistencia. Estos resultados son un buen punto de partida para investigaciones futuras que continúen evaluando el potencial de estos genes para el mejoramiento del arroz en Uruguay.

Referencias bibliográficas

[Agrios, 2005] Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Elsevier Ltd.

- [Ahn et al., 1997] Ahn, S., Kim, N. Y. K., Hong, H. C., Han, S. S., Choi, H. C., Moon, H. P., and McCouch, S. R. (1997). Molecular mapping of genes for resistance to Korean isolates of rice blast, harmonizing agricultural productivity and conservation of biodiversity. Breeding and ecology. 8th SABRAO Congr. Annu. Meet. Korean Breed. Soc., pages 435–436.
- [Alexander et al., 2009] Alexander, D., Novembre, J., and Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individualsl. *Genome Re*search, 19:1655–1664.
- [Allard, 1988] Allard, R. W. (1988). Genetic changes associated with the evolution of adaptedness in cultivated plants and their wild progenitors. *Journal* of Heredity, 79(4):225 –238.
- [Ashburner et al., 2000] Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., Sherlock, G., and Consortium, G. O. (2000). Gene Ontology: Tool for The Unification of Biology. *Nature Genetics*, 25(1):25–29.
- [Ashikawa et al., 2008] Ashikawa, I., Hayashi, N., Yamane, H., Kanamori, H., Wu, J., Matsumoto, T., Ono, K., and Yano, M. (2008). Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer Pikm-specific rice blast resistance. *Genetics*, 180(4):2267–2276.
- [Bagnaresi et al., 2012] Bagnaresi, P., Biselli, C., Orr??, L., Urso, S., Crispino, L., Abbruscato, P., Piffanelli, P., Lupotto, E., Cattivelli, L., and Val??, G. (2012). Comparative Transcriptome Profiling of the Early Response to Magnaporthe

oryzae in Durable Resistant vs Susceptible Rice (Oryza sativa L.) Genotypes. *PLoS ONE*, 7(12):1–26.

- [Ballini et al., 2008] Ballini, E., Morel, J.-B., Droc, G., Price, A., Courtois, B., Notteghem, J.-L., and Tharreau, D. (2008). A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular plant-microbe interactions :* MPMI, 21(7):859–68.
- [Begum et al., 2015] Begum, H., Spindel, J. E., Lalusin, A., and Borromeo, T. (2015). Genome-Wide Association Mapping for Yield and Other Agronomic Traits in an Elite Breeding Population of Tropical Rice (Oryza sativa). pages 1–19.
- [Berruyer et al., 2003] Berruyer, R., Adreit, H., Milazzo, J., Gaillard, S., Berger, A., Dioh, W., Lebrun, M.-H., and Tharreau, D. (2003). Identification and fine mapping of pi33, the rice resistance gene corresponding to the magnaporthe grisea avirulence gene ace1. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(6):1139– 1147.
- [Blée, 2002] Blée, E. (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. Trends in Plant Science, 7(7):315–321.
- [Bradbury et al., 2007] Bradbury, P., Zhang, Z., Kroon, D., Casstevens, T., Ramdoss, Y., and Buckler., E. (2007). Tassel: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23:2633–5.
- [Bryan et al., 2000] Bryan, G. T., Wu, K. S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H. P., McAdams, S. A., Faulk, K. N., Donaldson, G. K., Tarchini, R., and Valent, B. (2000). A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. *The Plant cell*, 12(11):2033–46.
- [Campbell et al., 2004] Campbell, M. a., Chen, D., and Ronald, P. C. (2004). Development of Co-Dominant Amplified Polymorphic Sequence Markers in Rice that Flank the Magnaporthe grisea Resistance Gene Pi7(t) in Recombinant Inbred Line 29. *Phytopathology*, 94(3):302–7.
- [Causse et al., 1994] Causse, M., Fulton, T., Cho, Y., Ahn, S., Chunwongse, J., Wu, K., Xiao, J., Yu, Z., Ronald, P., Harrington, S., Second, G., McCouch, S.,

and Tanksley, S. (1994). Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics*, 138:1251–1274.

- [Cesari et al., 2013] Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., Rivas, S., Alaux, L., Kanzaki, H., Okuyama, Y., Morel, J.-B., Fournier, E., Tharreau, D., Terauchi, R., and Kroj, T. (2013). The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the <i>Magnaporthe oryzae</i> effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *The Plant cell*, 25(4):1463–1481.
- [de Mendiburu, 2016] de Mendiburu, F. (2016). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.
- [Dean et al., 2005] Dean, R. a., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R., Pan, H., Read, N. D., Lee, Y.-H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y. Y., Donofrio, N., Jeong, J. S., Soanes, D. M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.-H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.-J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J. E., and Birren, B. W. (2005). The genome sequence of the rice blast fungus Magnaporthe grisea. *Nature*, 434(7036):980–986.
- [Demuth and Wade, 2006] Demuth, J. P. and Wade, M. J. (2006). Experimental methods for measuring gene interactions. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics, 37:289–316.
- [Devanna et al., 2014] Devanna, N. B., Vijayan, J., and Sharma, T. R. (2014). The blast resistance gene Pi54of cloned from Oryza officinalis interacts with Avr-Pi54 through its novel non-LRR domains. *PLoS ONE*, 9(8).
- [Earl and VonHoldt, 2012] Earl, D. A. and VonHoldt, B. M. (2012). STRUC-TURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2):359–361.
- [Elshire et al., 2011] Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., and Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (gbs) approach for high diversity species. *PLOS ONE*, 6(5):1–10.

- [Falush et al., 2003] Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4):1567–1587.
- [Falush et al., 2007] Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7(4):574–578.
- [FAO, 2016] FAO (2016). Rice Marker Monitor December 2016. Technical Report December, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [FAO/IAEA, 2002] FAO/IAEA (2002). Mutant Germplasm Characterization using Molecular Markers. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Wagramer Strasse 5 P.O. Box 100 A-1400 Vienna, Austria.
- [Garrett et al., 2006] Garrett, K., Dendy, S., Frank, E., Rouse, M., and Travers, S. (2006). Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 44:489–509.
- [Goff et al., 2002] Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T.-h., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., and Glazebrook, J. (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (Oryza sativa L. ssp. japonica). *science*, 296(April):92–100.
- [Grienenberger et al., 2010] Grienenberger, E., Geoffroy, P., Mutterer, J., Legrand, M., and Heitz, T. (2010). The interplay of lipid acyl hydrolases in inducible plant defense. *Plant Signaling and Behavior*, 5(10):1181–1186.
- [Gutierrez et al., 2016] Gutierrez, L., Quero, G., Fernandez, S., Brandariz, S., and Simondi, S. (2016). *lmem.gwaser: Linear Mixed Effects Models for Genome-Wide Association Studies.*
- [Hayashi et al., 1998] Hayashi, N., Ando, I., and Imbe, T. (1998). Identification of a new resistance gene to a chinese blast fungus isolate in the Japanese rice cultivar aichi asahi. *Phytopathology*, 88(8):822–7.
- [Hayashi et al., 1996] Hayashi, N., Ando, I., and Naito, H. (1996). Gene analysis of a new blast resistance in the paddy rice variety, Aichi Asahi. *Breeding Science*, 46(Suppl. 2).
- [Hittalmani et al., 2000] Hittalmani, S., Parco, A., Mew, T. V., Zeigler, R. S., and Huang, N. (2000). Fine mapping and dna marker-assisted pyramiding

of the three major genes for blast resistance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(7):1121–1128.

- [Hsieh, 1976] Hsieh, S. (1976). Recent advances in rice breeding and genetical studies in Taiwan. Scientific Agriculture, Taipei, 4(25):48–68.
- [Huang, 2005] Huang, D. (2005). Characterization and Mapping of Rice Blast Resistance Genes. PhD thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences.
- [Hubisz et al., 2009] Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9(5):1322–1332.
- [Hulbert et al., 2001] Hulbert, S. H., Webb, C. a., and Smith, S. M. (2001). R ESISTANCE G ENE C OMPLEXES : Evolution and Utilization. *Most*, pages 285–312.
- [Inukai et al., 1994] Inukai, T., Nelson, R., Zeigler, R., Sarkarung, S., Mackill, D., Bonman, J., Takamure, I., and Kinoshita, T. (1994). Allelism of blast resistance genes in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology*, 84:1278–1283.
- [Jones and Dangl, 2006] Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(November):323–329.
- [Khan et al., 2016] Khan, N. U., Liu, M., Yang, X., and Qiu, D. (2016). Fungal elicitor MoHrip2 induces disease resistance in rice leaves, triggering stressrelated pathways. *PLoS ONE*, 11(6):1–14.
- [Khush, 2005] Khush, G. S. (2005). What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology*, 59(1):1–6.
- [Kim et al., 2014] Kim, S. T., Kim, S. G., Agrawal, G. K., Kikuchi, S., and Rakwal, R. (2014). Rice proteomics: A model system for crop improvement and food security. *Proteomics*, 14(4-5):593–610.
- [Kiyosawa, 1967] Kiyosawa, S. (1967). Inheritance of resistance of the rice variety Pi No.4 to blast. Japan. J. Breeding, 17:165–172.
- [Kiyosawa, 1970] Kiyosawa, S. (1970). Inheritance of a particular sensitivity of the variety Se- kiguchi Asahi to pathogens and chemicals and linkage relationship with blast resistance genes. Bull. Natl. Inst. Agric. Sci., 21:61–71.

- [Korte and Farlow, 2013] Korte, A. and Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, 9(1):29.
- [Kumar Joshi and Nayak, 2010] Kumar Joshi, R. and Nayak, S. (2010). Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 5(3):51–60.
- [Lee and Cho, 1990] Lee, E. and Cho, S. (1990). Variation in races of rice blast disease and varietal resistance in Korea. Paper presented at the Focus on Irrigated Rice. Seoul, Korea., pages 27–31.
- [Lee et al., 2009a] Lee, S., Wamishe, Y., Jia, Y., Liu, G., and Jia, M. (2009a). Mapping Two Major Resistance Genes In An Indica Cultivar Zhe733 To The Race IE-1k Of Magnaporthe oryzae.
- [Lee et al., 2009b] Lee, S. K., Song, M. Y., Seo, Y. S., Kim, H. K., Ko, S., Cao, P. J., Suh, J. P., Yi, G., Roh, J. H., Lee, S., An, G., Hahn, T. R., Wang, G. L., Ronald, P., and Jeon, J. S. (2009b). Rice Pi5-mediated resistance to Magnaporthe oryzae requires the presence of two coiled-coil-nucleotidebinding-leucine-rich repeat genes. *Genetics*, 181(4):1627–1638.
- [Li and Ji, 2005] Li and Ji (2005). Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity*, 95:221–227.
- [Li et al., 2009] Li, W., Wang, B., Wu, J., Lu, G., Hu, Y., Zhang, X., Zhang, Z., Zhao, Q., Feng, Q., Zhang, H., Wang, Z., Wang, G., Han, B., Wang, Z., and Zhou, B. (2009). The Magnaporthe oryzae avirulence gene AvrPiz-t encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene Piz-t. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22(4):411–420.
- [Liu et al., 2002] Liu, G., Lu, G., Zeng, L., and Wang, G.-L. (2002). Two broadspectrum blast resistance genes, pi9(t) and pi2(t), are physically linked on rice chromosome 6. *Molecular Genetics and Genomics*, 267(4):472–480.
- [Livore et al., 2001] Livore, A., Correa, F., Levy, M., Avila, S., Blanco, P., Capdevielle, F., Bonell, L., Castroagudín, V., Gutiérrez, S., Maya, M. M., Pedraza, V., Plata, M. I., Bonnecarrere, V., Beldarrain, G., Casales, L., and Escobar, F. (2001). Desarrollo de una Estrategia para la Obtención de Resistencia

Durable a Pyricularia grisea en Arroz en el Cono Sur. Technical Report 598 2.

- [Malosetti et al., 2008] Malosetti, M., Ribaut, J. M., Vargas, M., Crossa, J., and van Eeuwijk, F. A. (2008). A multi-trait multi-environment qtl mixed model with an application to drought and nitrogen stress trials in maize (zea mays l.). Euphytica, 161(1):241–257.
- [Marone et al., 2013] Marone, D., Russo, M. A., Laidò, G., Leonardis, A. M. D., and Mastrangelo, A. M. (2013). Plant Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR) Genes: Active Guardians in Host Defense Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:7302–7326.
- [McCouch et al., 2016] McCouch, S. R., Wright, M. H., Tung, C.-W., Maron, L. G., McNally, K. L., Fitzgerald, M., Singh, N., DeClerck, G., Agosto-Perez, F., Korniliev, P., Greenberg, A. J., Naredo, M. E. B., Mercado, S. M. Q., Harrington, S. E., Shi, Y., Branchini, D. A., Kuser-Falcão, P. R., Leung, H., Ebana, K., Yano, M., Eizenga, G., McClung, A., and Mezey, J. (2016). Open access resources for genome-wide association mapping in rice. *Nat. Commun.*, 7:10532.
- [McHale et al., 2006] McHale, L., Tan, X., Koehl, P., and Michelmore, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome biology*, 7:212.
- [MGAP, 2010] MGAP (2010). El Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca , a través de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) comunica : RESULTADOS DE LA ENCUESTA DE ARROZ. Technical report.
- [MGAP, 2016] MGAP (2016). Encuesta de arroz. Technical report, Ministerio de ganadería, agricultura y pesca.
- [Miles and Wayne, 2008] Miles, C. and Wayne, M. (2008). Quantitative trait locus (qtl) analysis. *Nature Education*, 1:1–8.
- [Moytri RoyChowdhury, 2012] Moytri RoyChowdhury, Yulin Jia, A. J. M. H. J. R. F. R. D. C. (2012). Analysis of rice blast resistance gene Pi - z in rice germplasm using pathogenicity assays and DNA markers. *Euphytica*, 184(1):35–46.

- [Okuyama et al., 2011] Okuyama, Y., Kanzaki, H., Abe, A., Yoshida, K., Tamiru, M., Saitoh, H., Fujibe, T., Matsumura, H., Shenton, M., Galam, D. C., Undan, J., Ito, A., Sone, T., and Terauchi, R. (2011). A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *Plant Journal*, 66(3):467–479.
- [Opassiri et al., 2006] Opassiri, R., Pomthong, B., Onkoksoong, T., Akiyama, T., Esen, A., and Ketudat Cairns, J. R. (2006). Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 beta-glucosidase. *BMC plant biology*, 6:33.
- [Orbach et al., 2000] Orbach, M. J., Farrall, L., Sweigard, J. A., Chumley, F. G., and Valent, B. (2000). A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *The Plant cell*, 12(11):2019–32.
- [Ou, 1980] Ou, S. H. (1980). A look at worldwide rice blast disease control. Plant Disease, 64(5):439–445.
- [PerezdeVida et al., 2014] PerezdeVida, F., Blanco, P., and Carracelas, G. (2014). Evaluacion final de cultivares indica. Technical report, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.
- [Price et al., 2006] Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A., and Reich, D. (2006). Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, 38:904 – 909.
- [Pritchard et al., 2000] Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2):945–959.
- [Prost et al., 2005] Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M. J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerré-Tugayé, M.-T., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M., and Fournier, J. (2005). Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. *Plant Physiology*, 139:1902–1913.
- [Qu et al., 2006] Qu, S., Liu, G., Zhou, B., Bellizzi, M., Zeng, L., Dai, L., Han, B., and Wang, G. L. (2006). The broad-spectrum blast resistance gene Pi9

encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics*, 172(3):1901–1914.

- [Quero et al., 2016] Quero, G., Sebastian Simondi, w. c. f. V. B., and Gutierrez,
 L. (2016). clusterhap: Clustering Genotypes in Haplotypes.
- [R Core Team, 2013] R Core Team (2013). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- [Ribot et al., 2013] Ribot, C., Césari, S., Abidi, I., Chalvon, V., Bournaud, C., Vallet, J., Lebrun, M. H., Morel, J. B., and Kroj, T. (2013). The Magnaporthe oryzae effector AVR1-CO39 is translocated into rice cells independently of a fungal-derived machinery. *Plant Journal*, 74(1):1–12.
- [Sallaud et al., 2003] Sallaud, C., Lorieux, M., Roumen, E., Tharreau, D., Berruyer, R., Svestasrani, P., Garsmeur, O., Ghesquiere, A., and Nottenghem, J. (2003). Identification of five new blast resistance genes in the highly blastresistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theor. Appl. Genet.*, 106:794–803.
- [Sharma et al., 2012] Sharma, T. R., Rai, a. K., Gupta, S. K., Vijayan, J., Devanna, B. N., and Ray, S. (2012). Rice Blast Management Through Host-Plant Resistance: Retrospect and Prospects. *Agricultural Research*, 1(1):37–52.
- [Shimono et al., 2012] Shimono, M., Koga, H., Akagi, A., Hayashi, N., Goto, S., Sawada, M., Kurihara, T., Matsushita, A., Sugano, S., Jiang, C.-J., Kaku, H., Inoue, H., and Takatsuji, H. (2012). Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Molecular Plant Pathology*, 13(1):83–94.
- [Simko and Piepho, 2012] Simko, I. and Piepho, H.-p. (2012). The Area Under the Disease Progress Stairs : Calculation, Advantage and Application. *Phy*topathology, 102(4):381–389.
- [Spindel et al., 2013] Spindel, J., Wright, M., Chen, C., Cobb, J., Gage, J., Harrington, S., Lorieux, M., Ahmadi, N., and McCouch, S. (2013). Bridging the genotyping gap: using genotyping by sequencing (gbs) to add high-density snp markers and new value to traditional bi-parental mapping and breeding populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(11):2699–2716.

- [Tabien et al., 2000] Tabien, R., Li-Z, Paterson, A., Marchetti, M., Stansel, J., and Pinson, S. (2000). Mapping of four major rice blast resistance genes from 'Lemont'and 'Teqing' and evaluation of their combinatorial effect for field resistance. *Theoretical and Applied Geneticsi*, 101:1215–1225.
- [Tacconi et al., 2010] Tacconi, G., Baldassarre, V., Lanzanova, C., Faivre-Rampant, O., Cavigiolo, S., Urso, S., Lupotto, E., and Valè, G. (2010). Polymorphism analysis of genomic regions associated with broad-spectrum effective blast resistance genes for marker development in rice. *Molecular Breeding*, 26(4):595–617.
- [Takagi et al., 2013] Takagi, H., Uemura, A., Yaegashi, H., Tamiru, M., Abe, A., Mitsuoka, C., Utsushi, H., Natsume, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Yoshida, K., Cano, L. M., Kamoun, S., and Terauchi, R. (2013). MutMap-Gap: Whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene Pii. New Phytologist, 200(1):276–283.
- [Tanksley et al., 1993] Tanksley, S., Fulton, T., and McCouch, S. (1993). Linkage map of rice (Oryza sativa) (2N=24). Genetic Maps, Locus Maps of Complex Genomes, Plants. S.J. O'Brien ed. Cold Spring Harbour Lab. Press., Book 6:61-79.
- [Tanweer et al., 2015] Tanweer, F. a., Rafii, M. Y., Sijam, K., Rahim, H. a., Ahmed, F., and Latif, M. a. (2015). Current advance methods for the identification of blast resistance genes in rice. *Comptes Rendus Biologies*, 338(5):321– 334.
- [Terauchi et al., 2016] Terauchi, R., Kanzaki, H., Fujisaki, K., Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Okuyama, Y., Tamiru, M., and Saitoh, H. (2016). Whole genome sequencing approaches to understand Magnaporthe-rice interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 95:4–7.
- [van Loon et al., 2006] van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual review of phytopathology, 44:135–62.
- [Vasudevan et al., 2014] Vasudevan, K., Cruz, C. M. V., Gruissem, W., and Bhullar, N. K. (2014). Large scale germplasm screening for identification of novel rice blast resistance sources. *Frontiers in Plant Science*, 5:1–10.

- [Wang et al., 1994] Wang, G., Mackill, D., Bonman, J., McCouch, S., Champoux, M., and Nelson, R. (1994). RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistance rice cultivar. *Genetics*, 136:1421–1434.
- [Wang et al., 1999] Wang, Z. X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., Hayasaka, H., Katayose, Y., and Sasaki, T. (1999). The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 19(1):55–64.
- [Wu et al., 2015] Wu, J., Kou, Y., Bao, J., Li, Y., Tang, M., Zhu, X., Ponaya, A., Xiao, G., Li, J., Li, C., Song, M. Y., Cumagun, C. J. R., Deng, Q., Lu, G., Jeon, J. S., Naqvi, N. I., and Zhou, B. (2015). Comparative genomics identifies the Magnaporthe oryzae avirulence effector AvrPi9 that triggers Pi9-mediated blast resistance in rice. New Phytologist, 206(4):1463–1475.
- [Wu et al., 1996] Wu, K., Martinez, C., Lentini, Z., Tohme, J., Chumley, F., Scolnik, P., and Valent, B. (1996). Cloning a blast resistance gene by chromosome walking. *Rice Genetics III. IRRI, Manila, Philippines.*, pages 669–674.
- [Yoshida et al., 2009] Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Tosa, Y., Chuma, I., Takano, Y., Win, J., Kamoun, S., and Terauchi, R. (2009). Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen Magnaporthe oryzae. *Plant Cell*, 21(5):1573–1591.
- [Yu et al., 2006] Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W. H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J. F., McMullen, M. D., Gaut, B. S., Nielsen, D. M., Holland, J. B., Kresovich, S., and Buckler, E. S. (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature* genetics, 38(2):203–8.
- [Yu et al., 1991] Yu, Z., Mackill, D., Bonman, J., and Tanksley, S. (1991). Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 81(4):471–476.
- [Yunoki et al., 1970] Yunoki, T., Ezuka, A., Sakurai, Y., Shinoda, H., and Toriyama, K. (1970). Studies on the varietal resistance to rice blast. 3. Testing

methods for field resistance on young seedling grown in greenhouse. Bull. Chugoku Agric. Exp. Stn., Ser.E, 6:1–19.

- [Zang and Komatsu, 2007] Zang, X. and Komatsu, S. (2007). A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry*, 68:426–437.
- [Zhang et al., 2010] Zhang, M., Wu, Y. H., Lee, M. K., Liu, Y. H., Rong, Y., Santos, T. S., Wu, C., Xie, F., Nelson, R. L., and Zhang, H. B. (2010). Numbers of genes in the NBS and RLK families vary by more than four-fold within a plant species and are regulated by multiple factors. *Nucleic Acids Research*, 38(19):6513–6525.
- [Zhang et al., 2015] Zhang, S., Wang, L., Wu, W., He, L., Yang, X., and Pan, Q. (2015). Function and evolution of Magnaporthe oryzae avirulence gene AvrPib responding to the rice blast resistance gene Pib. *Scientific reports*, 5(May):11642.
- [Zhou et al., 2006] Zhou, B., Qu, S., Liu, G., Dolan, M., Sakai, H., Lu, G., Bellizzi, M., and Wang, G.-L. (2006). The eight amino-acid differences within three leucine-rich repeats between Pi2 and Piz-t resistance proteins determine the resistance specificity to Magnaporthe grisea. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 19(11):1216–28.
- [Zhou et al., 2004] Zhou, J. H., Wang, J. L., Xu, J. C., Lei, C. L., and Ling, Z. Z. (2004). Identification and mapping of a rice blast resistance gene Pi-g (t) in the cultivar Guangchangzhan. *Plant Paththology*, 53(2):191–196.