

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA DE PANAMÁ
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS Y
BIODIVERSIDAD**

1. INFORMACIÓN GENERAL:

1.1 Título del proyecto:	Variabilidad genética de <i>Magnaporthe oryzae</i> en cultivares de arroz de Panamá
1.2 Responsable del proyecto:	Dra. Délfida Rodríguez Justavino, Micología, delfidar@yahoo.es
1.3 Programa:	Programa de Investigación e Innovación de Recursos Genéticos y Biodiversidad
1.4 Subprograma:	Investigación para la Valoración y Conservación de Recursos Genéticos
1.5 Línea de Investigación:	Prospección del recurso genético animal, vegetal y biodiversidad asociada de interés para la agricultura y la alimentación.
1.6 Ámbito Agro Ecológico:	Zona 2: zona de sequía intermedia
1.7 Tipo de investigación:	Investigación básica-aplicada
1.8 Duración:	4 años
1.9 Sede:	CIA Chiriquí, Subcentro de Alanje
1.10 Equipo ejecutor:	Dra. Délfida Rodríguez Justavino, Dr. Ismael Camargo, Dra. Evelyn Quirós, Ing. José Alexis Quintero, Ing. Luis A. Barahona, Dra. Kristin Saltonstall, Dra. Marta Vargas y Nimiadiana Herrera y Equipo Técnico del CIEMIC, Universidad de Costa Rica

2. ANTECEDENTES: (máx. 2000 caracteres)

Magnaporthe oryzae (Catt.) B.C. Couch, hongo perteneciente a la División Ascomycota (Clase Sordariomycetes, Orden Magnaporthales), anamorfo (estado asexual) *Pyricularia oryzae* Cavara, agente causal de una de las enfermedades más destructivas reportadas a nivel mundial en *Oryza sativa* L. (Poaceae) y conocida como "rice blast" o añublo del arroz (Kirk et al. 2008).

El arroz es de gran importancia a nivel mundial ya que es parte de la dieta básica de aproximadamente 3 billones de personas (Skamnioti & Gurr 2009). En Panamá, *O. sativa* es el cultivo más importante basado en la cantidad de hectáreas sembradas, producción, números de productores y consumo de la población panameña. Por lo tanto, aquí la importancia que representa este rubro en la investigación del IDIAP (Camargo 2014; Camargo et al. 2014).

Cabe resaltar que el proyecto 501.B.01.08. "Variabilidad genética de *Magnaporthe oryzae* e identificación de genes de resistencia en cultivares de arroz en Panamá" del quinquenio anterior logró realizar 70 extracciones de ADN de tejido foliar y granos de diferentes cultivares de arroz colectados en diferentes provincias de Panamá, utilizando las parejas de iniciadores o primers ITS1/ITS2 e ITS1/ITS4. En total se logró obtener 1528 OTU únicos que corresponden a secuencias de ADN de hongos utilizando el Miseq del Laboratorio de NAOS, STRI, Panamá. Con la herramienta BLAST de la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI), se observó que la secuencia de ADN con 251 bp, codificada como IDIAP FL 52-05 Extr. 3, ITS1/ITS4, m3, productor Arnulfo Morales, Finca la Cabezona, Lote 117 bajo, Alanje, Chiriquí, mostró 99% de identidad con *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr (DQ493955.1), como también un 99 % de identidad con *M. oryzae* (JQ747492.1); mientras que la secuencia de ADN codificada como FCA-616 FL Extr. 3, ITS1/ITS2, m8, productor Edwin Araúz, Finca Jobito 2, Alanje, Chiriquí, mostró 96 % de identidad con *Gaeumannomyces arxii* Hern.-Restr. & Crous (KX306479.1).

Con la ejecución de este perfil de proyecto de investigación, se logrará determinar la variabilidad genética de *M. oryzae* y obtener secuencias de ADN de otros hongos asociados al rubro, que van a ser de gran utilidad en el futuro para la investigación de la microbiota asociada a los cultivares de arroz en Panamá.

3. JUSTIFICACIÓN: (máx. 2000 caracteres)

Con la implementación de este proyecto se busca obtener información sobre la variabilidad genética de *M. oryzae* y de otros hongos importantes asociados al rubro arroz, y una de las estrategias es la obtención de un amplio espectro de secuencias de ADN de las regiones ITS I, ITS I, 5.8S, 18S, y 28S, ya que es de relevancia comprender la genética de *M. oryzae*, como también la de otros hongos que causan enfermedades en arroz en Panamá.

Para ello, nos sirve de base, la información de Couch y Kohn (2002), los cuales describieron a *M. oryzae* como una nueva especie, la cual está estrechamente relacionada con otros aislamientos de gramíneas y que es filogenéticamente distinta de los aislamientos de *Digitaria* los cuales están asociados con *M. grisea*, como también Klaubauf et al., 2014 que explican que *Pyricularia oryzae* Cavara (*M. oryzae*) no solamente es responsable de la enfermedad en arroz conocida como "rice blast", sino también de enfermedades foliares en trigo y otras gramíneas (*Eleusine*, *Setaria* y *Triticum*).

Este perfil de investigación se concentrará en la generación de nueva información propia de Panamá en el ámbito de la genética de los hongos que están asociados al rubro arroz, la cual se podrá implementar en un futuro cercano en investigación en el ámbito de estudios más detallados concernientes al tema de control biológico, y bioquímico con los cuales se podrá impactar de forma positiva al sector productivo arrocero del país en los temas relacionados con la capacidad de resiliencia de los diferentes cultivares de arroz al ataque de microorganismos, como también en el tema de sostenibilidad ambiental y productiva.

Para lograr los objetivos de este perfil de investigación, será de gran apoyo los avances alcanzados por el proyecto de investigación 501.B.01.08., el cual logró obtener 1528 OTU únicos que corresponden a secuencias de ADN de hongos de los cultivares de arroz de Panamá utilizando las parejas de iniciadores o primers ITS1/ITS2 e ITS1/ITS4. Además, el proyecto 501.B.01.08, logró hace dos semanas culminar la tercera secuenciación utilizando el Miseq de NAOS y con ello complementa de gran manera los resultados obtenidos hasta la fecha y que corresponden a secuencias de ADN de las muestras IDIAP FL 72-17, IDIAP FL L-7, IDIAP FL 145-05, IDIAP FL 25-03, Estrella 71 e IDIAP FL 137-11.

4. FINALIDAD: (máx. 800 caracteres)

Este perfil de investigación tiene la finalidad de ampliar el conocimiento sobre la biología molecular de *M. oryzae* y la de otros hongos importantes en el rubro arroz en Panamá. Este proyecto contribuirá con el objetivo del Programa y subprograma que tienen como finalidad conservar la diversidad genética nativa de cultivos de importancia económica en nuestra agricultura y de este modo garantizar la seguridad alimentaria y la sostenibilidad del agronegocio nacional; además, generará una plataforma de conocimientos científicos sobre hongos en arroz, que enriquecerán el conocimiento de los productores de arroz, investigadores del IDIAP, MIDA y de la Universidad de Panamá, y servirá de guía para proponer nuevas investigaciones que generarán productos pretecnológicos y tecnológicos.

5. PROPOSITO: (máx. 800 caracteres)

Generar información sobre la variabilidad genética de *M. oryzae* y de otros hongos importantes en arroz, a través de la extracción de ADN a partir de los diferentes aislamientos de los hongos, como también a través de extracción directa de ADN de tejidos foliares de cultivares de arroz infectados con los hongos; por lo tanto, con la obtención de secuencias de ADN de varias regiones se podrán obtener árboles filogenéticos que mostrarán la filogenia de *M. oryzae* y de otros hongos asociados al arroz. Esta información servirá de soporte para los estudios de Mejoramiento Genético en arroz del PIIRGEB del IDIAP que buscan liberar nuevas variedades de arroz con tolerancia a *Pyricularia*.

6. IDENTIFICACIÓN DE LOS BENEFICIARIOS DEL PROYECTO: (máx. 750 caracteres)

Los beneficiarios directos de los resultados que se obtendrán de este proyecto serán todos los investigadores y proyectos del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) que forman parte del Programa de Investigación e Innovación de Recursos Genéticos y

Biodiversidad y su respectivo Subprograma denominado Valoración y Conservación de Recursos Genéticos. También instituciones de investigación tales como el Laboratorio de NAOS, STRI, Panamá, la Universidad de Costa Rica y la Universidad de Viena, Austria. Los beneficiarios indirectos serán todos los productores de arroz de Chiriquí, ya que este perfil de investigación va a concentrarse en las estaciones experimentales del IDIAP en el país, en las plantaciones de productores de arroz comercial y en las plantaciones de arroz de productores de subsistencia de la provincia de Chiriquí.

7. PRODUCTOS PROGRAMADOS: (máx. 3000 caracteres)

Actividad no. 1: “Caracterización a nivel taxonómico de estructuras fúngicas de *M. oryzae* y otros hongos en tejidos de diferentes cultivares de arroz a nivel nacional” generará el/los siguiente/s productos científicos:

- 7.1. Biblioteca con un mínimo de 50 placas semipermanentes de estructuras fúngicas de *M. oryzae* y de otros hongos asociados al rubro arroz.
- 7.2. Una micoteca de medios de cultivo representada por los hongos más comunes aislados de los cultivares de arroz de Panamá.

Actividad no. 2: “Obtención de secuencias de ADN de las regiones 18S rDNA, ITS I, 5.8S, ITS II y 28S rDNA de *M. oryzae* y otros hongos asociados a arroz” generará el/los siguiente/s productos científicos:

- 7.3. Biblioteca de ADN genómico con un mínimo de 75 extracciones de ADN directas de tejido foliar infectado con *M. oryzae* y de otros hongos asociados al cultivo arroz.
- 7.4. Biblioteca de amplicones de ADN con un mínimo de 75 muestras de *M. oryzae* y otros hongos asociados al cultivo arroz.
- 7.5. Biblioteca digital con un mínimo de 75 secuencias de ADN de hongos infectando cultivares de arroz.
- 7.6. Publicación de un artículo científico documentando los resultados concernientes a la obtención de secuencias de ADN de hongos en arroz.

Actividad no. 3: “Obtención de secuencias de ADN de razas de *M. oryzae* en cultivares de arroz” generará el/los siguiente/s productos científicos:

- 7.6. Biblioteca de ADN genómico proveniente de un mínimo de 25 extracciones de ADN directas de hojas de diferentes cultivares de arroz.
- 7.7. Biblioteca de amplicones de ADN provenientes de un mínimo de 25 muestras de tejido foliar de diferentes cultivares de arroz para obtener información sobre razas de *M. oryzae* en arroz.
- 7.8. Biblioteca digital con un mínimo de 25 secuencias de ADN de plantas de arroz relacionadas con razas de *M. oryzae*.

Actividad no. 4: “Análisis de la interacción celular a nivel ultraestructural entre *M. oryzae* y arroz” generará el/los siguiente/s productos científicos:

- 7.9. Biblioteca digital con un mínimo de 75 microfotografías mostrando detalles ultraestructurales de tejido foliar de arroz infectado con *M. oryzae*.

8. ACTIVIDADES: (máx. 5000 caracteres)

1. Caracterización a nivel taxonómico de estructuras fúngicas de *M. oryzae* y otros hongos en tejidos de diferentes cultivares de arroz a nivel nacional.

Para lograr alcanzar los productos de esta actividad, se colectarán muestras de las hojas, inflorescencias y nudos de los diferentes cultivares de arroz en la etapa más susceptible de la planta al ataque de *M. oryzae*. Esta colecta se realizará en la fase vegetativa, fase reproductiva y de maduración después de la siembra. Utilizando un microscopio de luz se prepararán placas semipermanentes de las estructuras asexuales del hongo (*Pyricularia oryzae*) y también de otros hongos asociados a los diferentes tejidos colectados. Una vez identificadas las estructuras asexuales de los

hongos se procederá a sembrar el inóculo en el medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) u otro medio de cultivo bajo condiciones de temperatura apropiados para su crecimiento con la debida información de campo y el respectivo etiquetaje. Los aislamientos de los hongos obtenidos serán purificados hasta llevarlos a monospóricos para la actividad No. 2 que es la parte de Biología Molecular.

2. **Obtención de secuencias de ADN de las regiones 18S rDNA, ITS I, 5.8S, ITS II y 28S rDNA de *M. oryzae* y otros hongos asociados a arroz.**

A partir de las extracciones de ADN directo de tejido infectado con *M. oryzae* y de medios de cultivo puros se utilizarán los primers para las regiones 18S rDNA, 5.8S, ITS I, ITS II y 28S rDNA. Se obtendrán los PCR-Productos, se verificará la presencia de bandas de ADN mediante la realización de electroforesis. Se limpiarán los PCR-productos. Se ejecutará la etapa de secuenciación para obtener las secuencias y su posterior análisis y obtención de árboles filogenéticos.

3. **Obtención de secuencias de ADN de razas de *M. oryzae* en cultivares de arroz.**

Se seleccionará las parejas de primers para secuenciar genes que brinden información sobre razas de *M. oryzae* presentes en diferentes cultivares de arroz en Panamá y para lograr esto, se seguirán los pasos de amplificación, electroforesis, limpieza, secuenciación de ADN y análisis de las secuencias de ADN obtenidas utilizando las bases de datos de hongos.

4. **Análisis de la interacción celular a nivel ultraestructural entre *M. oryzae* y arroz.**

Se cortarán pequeñas secciones de tejido foliar infectado con *M. oryzae* y se colocarán inmediatamente en campo en viales conteniendo la solución fijadora Karnovsky. Este material se procesará en el CIEMIC, Universidad de Costa Rica. Posteriormente se prepararán cortes utilizando un micrótopo para localizar los sitios de interés a estudiar posteriormente con el Microscopio Electrónico de Transmisión. Se realizarán ultracortes de tejido preservado en los bloques de resina utilizando un ultra micrótopo con cuchilla de diamante. Se coleccionarán los ultracortes en las rejillas, se fijarán con un agente químico que proporcione contraste. Etapa de observación en el Microscopio electrónico de Transmisión (MET). Toma de microfotografías y el análisis de los datos ultraestructurales de la interacción celular entre *M. oryzae* y *O. sativa*.

9. ESTRATEGIA METODOLÓGICA: (máx. 3000 caracteres)

Para alcanzar la actividad no. 1, se establecerá un cronograma de trabajo para la realización de varias giras por año a nivel nacional. Las giras se realizarán para coleccionar los cultivares de arroz a estudiar en las etapas de 30, 45, 60, 75, 90 y 110 días de sembrado, ya que el objetivo es coleccionar material fúngico que se encuentre infectando al tejido vegetal en las etapas iniciales, es decir, en la fase vegetativa, la cual es una etapa donde el cultivo de arroz es altamente sensible al ataque de *M. oryzae* y otros hongos, como también en las diferentes etapas de desarrollo de los cultivares de arroz. Se utilizarán las instalaciones del laboratorio del IDIAP ubicado en la Alanje, provincia de Chiriquí, para realizar los estudios de microscopía de luz y obtención de crecimiento fúngico en los medios de cultivo.

Para la actividad no. 2, se utilizará los diferentes aislamientos puros de *M. oryzae* y de otros hongos asociados al rubro arroz, se realizarán los protocolos de extracción de ADN, primers de las regiones 18S rDNA, ITS I, 5.8S, ITS II y 28S, electroforesis de los PCR-Productos, limpieza de los PCR-Productos, secuenciación, editaje de secuencias, Blast en GenBank, preparación de árboles filogenéticos y análisis de la variabilidad genética de *M. oryzae* y otros hongos por medio de la utilización de programas de filogenia.

Para la actividad no. 3, que compete a los genes de ADN que brinden información sobre las razas de *M. oryzae* en los cultivares de arroz en Panamá, se realizará una revisión exhaustiva de las diferentes investigaciones realizadas que han documentado información referente a este punto, la cual servirá de base para el siguiente paso, que será la ejecución de protocolos que identifiquen las razas de *M. oryzae* presentes en los diferentes cultivares de arroz en nuestro país.

Para la actividad no. 4, se coleccionará material foliar infectado con *M. oryzae*, el cual será procesado en el CIEMIC, Universidad de Costa Rica. Se realizarán ultracortes, tinción, observación en el microscopio electrónico de transmisión y análisis de las microfotografías que se obtengan de la interacción celular a nivel ultraestructural de *M. oryzae* y *O. sativa*.

10. ESTRATEGIA DE DIFUSIÓN DE AVANCES Y RESULTADOS: (máx. 1500 caracteres)

La estrategia de difundir los avances y resultados de este proyecto se contemplarán en etapas cada una de seis meses. Por lo tanto, una vez que el proyecto de investigación inicie, se organizará al término de seis meses la primera reunión informativa donde serán invitados los productores de arroz, investigadores del Programa de Investigación e Innovación en Recursos Genéticos y Biodiversidad (PIIRGEB) del IDIAP, extensionistas del Proyecto de arroz del Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA), estudiantes y profesores/as de los colegios secundarios de Alanje, personal de publicidad del IDIAP y del MIDA. El objetivo de esta primera ronda informativa, será presentar los avances que se han logrado alcanzar en los primeros seis meses de vigencia del proyecto en los temas de Taxonomía, Microscopía Electrónica de Transmisión y Biología Molecular. Estas reuniones serán importantes para que los productores de arroz, extensionistas e investigadores comprendan la importancia de utilizar las herramientas de investigación antes mencionadas para lograr los objetivos del proyecto y que se logre ampliar el ámbito de conocimientos de todas las personas involucradas en este proyecto de investigación, ya que este conocimiento será de relevancia en la toma de futuras decisiones concernientes al tema arroz en Panamá. Se prepararán folletos informativos sobre los resultados de la investigación, se informará por la radio, se realizarán presentaciones en el Sistema Nacional de Investigación (SNI), SENACYT y se presentará los resultados en conferencias a nivel nacional e internacional.

11. COSTOS DEL PROYECTO:

Este es el presupuesto de las actividades para el año 2020.

No. De la actividad	Nombre de la actividad	Objeto de gasto	Monto en Balboas
1	Caracterización a nivel taxonómico de estructuras fúngicas de <i>M. oryzae</i> y otros hongos en tejidos de diferentes cultivares de arroz a nivel nacional	141: Viáticos dentro del país	500.00
2	Obtención de secuencias de ADN de las regiones 18S rDNA, ITS I, 5.8S, ITS II y 28S rDNA de <i>M. oryzae</i> y otros hongos asociados a arroz.	274: Útiles y materiales médicos de laboratorio	3000.00
3	Obtención de secuencias de ADN de razas de <i>M. oryzae</i> en cultivares de arroz.	274: Útiles y materiales médicos de laboratorio	3000.00
4	Análisis de la interacción celular a nivel ultraestructural entre <i>M. oryzae</i> y arroz.	669: Otras transferencias	3500.00
Total			10 000.00

COSTOS DEL PROYECTO:

Este es el presupuesto de las actividades 2021-2024.

No. De la actividad	Nombre de la actividad	Objeto de gasto	Año 2021	Año 2022	Año 2023	Año 2024	Monto en Balboas
1	Caracterización a nivel taxonómico de estructuras fúngicas de <i>M. oryzae</i> y otros hongos en tejidos de diferentes cultivares de arroz a nivel nacional.	141:	500.00	500.00	500.00	500.00	2000.00
2	Obtención de secuencias de ADN de las regiones 18S rDNA, ITS I, 5.8S, ITS II y 28S rDNA de <i>M. oryzae</i> y otros hongos asociados a arroz.	274: 142:	5500.00 2000.00	5500.00 2000.00	5500.00 2000.00	5500.00 2000.00	30000.00
3	Obtención de secuencias de ADN de razas de <i>M. oryzae</i> en cultivares de arroz.	274:	3500.00	3500.00	3500.00	3500.00	14000.00
4	Análisis de la interacción celular a nivel ultraestructural entre <i>M. oryzae</i> y arroz.	669:	3500.00	3500.00	3500.00	3500.00	14000.00
Total			15000.00	15000.00	15000.00	15000.00	60000.00

12. IMPACTO: (máx. 3000 caracteres)

La ejecución de este proyecto al cabo de 4 años fortalecerá el conocimiento sobre la variabilidad genética de *M. oryzae* en nuestro país; además, se obtendrán detalles importantes a nivel ultraestructural sobre la interacción celular entre *M. oryzae* y *O. sativa*, lo cual servirá de apoyo a PIIRGEB y a los arroceros del país. Con los datos que generará esta investigación en la parte de ultraestructura, se podrá realizar en el futuro investigaciones dirigidas en la línea de Bioquímica. Con la implementación de los conocimientos que se obtengan de este proyecto, se incentivará el estudio de microorganismos con fuerte potencial para combatir la infección de *M. oryzae* y con el tiempo lograr disminuir la incidencia de la enfermedad en los campos donde se siembran los diferentes cultivares y de este modo reducir el impacto negativo a nivel económico que causa dicha enfermedad.

La seguridad alimentaria es un punto muy importante, por lo cual a medida que en el futuro se vaya ampliando el ámbito del conocimiento sobre el modo de acción a nivel genético de los hongos en arroz, también será de beneficio para los productores y la población panameña.

Un impacto positivo que generó el proyecto de arroz 501.B.01.08., fue que mi persona ganó una convocatoria del SENACYT en el 2017 para el equipamiento del Laboratorio de Subcentro de Alanje, Chiriquí. A la fecha se han ejecutado \$50 000.00 en equipos de Biología Molecular, tales como, un termociclador, micropipetas, un fotodocumentador de gel de agarosa, una centrífuga, un ultracongelador, una incubadora de protocolo, un baño seco y un vortex. Por lo tanto, el Laboratorio de Alanje cuenta con parte de los equipos básicos para realizar extracción de ADN, amplificación de ADN, electroforesis, foto-documentación de geles y conservación de ADN genómico y amplicones a -80 °C.

13. ARTICULACIÓN CON OTROS ACTORES: (máx. 3000 caracteres)

Los actores externos del IDIAP que participarán en este proyecto son los siguientes:

Centro de Estructuras Microscópicas de la Universidad de Costa Rica (CIEMIC) e Investigadores del Laboratorio de NAOS, Smithsonian de Panamá (STRI).

Las responsabilidades o tareas que le competen al CIEMIC están dirigidas a ejecutar todo el procesamiento de las muestras fijadas en Karnovsky (1965) para Microscopía Electrónica de Transmisión. Además, una vez cumplida esta etapa, la responsable de Proyecto realizará en conjunto con el equipo técnico del CIEMIC las preparaciones correspondientes de las muestras para su observación con el TEM.

De parte de Investigadores del STRI junto con la responsable de este proyecto (IDIAP), se revisarán y estandarizarán los protocolos pertinentes para las extracciones de ADN de aislamientos de *M. oryzae* y de otros hongos asociados al rubro arroz. Una vez cumplida esta parte, se analizará la información con el equipo de trabajo para generar los artículos y publicaciones.

Un nuevo actor, será la Universidad de Viena, Austria, con la cual planeamos establecer los primeros contactos de colaboración científica en los temas de Microscopía Electrónica de Barrido y Transmisión.

14. POSIBLES RIESGOS: (máx. 1500 caracteres)

Entre los posibles riesgos que puedan afectar la ejecución de este proyecto de investigación están: recortes presupuestarios de parte de la institución, demoras en los trámites administrativos correspondientes a las solicitudes de bienes para la adquisición de equipos y reactivos importantes para la ejecución de las actividades. Y finalmente, demoras en la entrega por parte de los proveedores de equipos, instrumentación y reactivos.

15. VINCULACIÓN CON ÁREAS PRIORITARIAS NACIONALES E INSTITUCIONALES: (máx. 1500 caracteres)

Este proyecto está alineado con las prioridades que exige a nivel nacional e institucional el sector agropecuario. El arroz es el rubro de mayor importancia a nivel nacional, por lo tanto, es de gran importancia que este proyecto de investigación se apruebe, ya que proporcionará conocimientos con respecto a la variabilidad genética de *M. oryzae* y otros hongos importantes en arroz, información sobre las razas de *M. oryzae* presentes en Panamá y detalles ultraestructurales sobre la interacción celular existente entre *M. oryzae* y *O. sativa*.

LITERATURA:

Camargo Buitrago I (2014). Las variedades mejoradas de arroz del IDIAP: Un aporte al desarrollo del sector arrocero panameño 1975-2012 (11-40 p). En: Innovación Tecnológica para el Manejo Integrado del Cultivo de Arroz en Panamá, Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). 140 p

———, Quirós McIntire EI, Zachrisson Salamina B (2014). Manejo integrado del cultivo de arroz basado en la fenología de la planta (41-57 p). En: Innovación Tecnológica para el Manejo Integrado del Cultivo de Arroz en Panamá, Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). 140 p

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

Karnovsky MJ (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electronmicroscopy. J Cell Biol 27:137A

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008). Dictionary of fungi, 10th edn. CAB International, Wallingford, 771

Klaubauf S, Tharreau D, Fournier E, Groenewald JZ, Crous PW, Vries RP, Lebrun MH (2014). Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). *Studies in Mycology* 79:85-120
Skamnioti P, Gurr SJ (2009). Against the grain: Safeguarding rice from rice blast disease. *Trends in Biotechnology* 27(3):141-150