COMBINACIONES DE GENES EN ARROZ PARA EL DESARROLLO DE RESISTENCIA DURABLE A *Pyricularia grisea* EN COLOMBIA

Fernando J. Correa-Victoria[1], Didier Tharreau[2], César Martínez[1], Michel. Vales[1,2], Fabio Escobar[1], Gustavo Prado[1] y Girlena Aricapa[1]

[1]Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, AA 6713 Cali, Colombia, [2]Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, CIRAD-CA, 34032 Montpellier, France

RESUMEN

El añublo del arroz causado por *Pyricularia grisea* (*Magnaporthe grisea*) es el principal limitante de la producción en Colombia. La perdida de la resistencia ocurre en períodos de uno a tres años, con la excepción de los cultivares Oryzica Llanos 5 liberado en 1989 y Fedearroz 50 liberado en 1998. Con el objetivo de desarrollar cultivares con resistencia durable al añublo hemos analizado la estructura genética de poblaciones del patógeno utilizando técnicas moleculares como MGR-DNA y rep-PCR "fingerprinting" y estudiamos la diversidad y frecuencias de los genes de avirulencia/virulencia del hongo. *P. grisea* en Colombia es principalmente clonal. Cada clon o linaje exhibe un espectro de virulencia amplio. Sin embargo, algunos genes de resistencia son efectivos contra todos los aislamientos de un linaje. Los genes de avirulencia varían en frecuencia, sugiriendo que dichos genes de avirulencia pueden estar asociados con la supervivencia y reproducción, y por lo tanto, los genes de resistencia correspondientes a dichos genes de avirulencia serían más relevantes en el mejoramiento para una resistencia durable. Nuestros estudios nos permiten identificar y predecir la durabilidad de combinaciones de genes de resistencia basados en las frecuencias de genes de avirulencia. Hemos identificado los posibles genes de resistencia presentes en nuestras variedades de arroz e iniciado un programa de retrocruzamiento para incorporar las combinaciones de genes de resistencia deseadas en variedades de arroz de América Latina, a través de una selección asistida por marcadores moleculares, inoculaciones controladas con aislamientos del patógeno, y evaluaciones de campo.

Palabras claves: *Oryza sativa*, añublo, enfermedades del arroz. fitomejoramiento, resistencia

SUMMARY

Rice blast caused by *Pyricularia grisea* (*Magnaporthe grisea*) is the main limiting factor of rice production in Colombia. Resistance breakdown occurs after one to three years of cultivar release, with the exception of the commercial cultivars Oryzica Llanos 5 released in 1989 and Fedearroz 50 released in 1998. With the objective of developing rice cultivars with durable resistance to blast we have analyzed the genetic structure of blast pathogen populations using techniques such as MGR-DNA and rep-PCR fingerprinting and studied the diversity and frequencies of avirulence/virulence genes in the fungus. *P. grisea* in Colombia is mainly clonal. Each clone or lineage exhibits a broad spectrum of virulence. However, some resistance genes are effective against all isolates of a linage. Avirulence genes vary in frequency, suggesting that these genes could be associated with pathogenic fitness. Therefore, the resistance genes corresponding to those avirulence genes would be more relevant in breeding for durable resistance. Our studies are allowing us to identify and predict the durability of resistance gene combinations based on the frequency of avirulence genes. We have identified the possible resistance genes present in our commercial rice cultivars and initiated a backcrossing program for incorporating desired combinations of resistance genes in rice varieties of Latin America through marker assisted selection, controlled inoculations with pathogenic isolates, and field evaluations.

Keywords: rice, resistance, breeding, rice blight

INTRODUCCIÓN

El añublo del arroz, causado por *Pyricularia grisea* Sacc., estado asexual de *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, es la enfermedad mas ampliamente distribuida y dañina del arroz cultivado, tanto en zonas tropicales como templadas. El hongo ataca prácticamente todas las partes de la planta, pero los daños más frecuentes ocurren en las hojas y las panículas.

Por muchos años, las investigaciones se han concentrado en la identificación de razas del patógeno y la incorporación de genes de resistencia a dichas razas en los cultivares comerciales. Sin embargo, la resistencia de los cultivares en Colombia se ha perdido después de su liberación en períodos de tan solo uno a tres años (Correa-V y Martínez, 1994), con la excepción de los cultivares comerciales Oryzica Llanos 5 liberado en 1989 y el cultivar Fedearroz 50 liberado en 1998 (Tabla 1).

Grandes esfuerzos se están haciendo en el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, para entender la gran variabilidad observada en este patógeno, la cual es considerada como la principal causa de la perdida de la resistencia de los cultivares liberados.

Un extenso estudio de la diversidad de *P. grisea* en Colombia fue iniciado en el año 1990. Estos estudios han considerado tanto la diversidad y frecuencia de los genes de avirulencia así como el espectro de virulencia de varias centenas de aislamientos del hongo recolectados de diferentes cultivares de arroz. Aislamientos del hongo han sido inoculados en condiciones de invernadero sobre cultivares de arroz con genes de resistencia conocidos, cultivares de arroz liberados en Colombia en un período de 30 años, fuentes de resistencia durable, cultivares diferenciales internacionales, y un conjunto de líneas isogénicas que contienen genes de resistencia reportados en la literatura.

Dactiloscopia del ADN, utilizando técnicas moleculares de RFLP y PCR, han sido usadas para determinar la estructura genética de las mismas poblaciones del hongo analizadas por su virulencia. La complejidad del patógeno ha sido de esta forma simplificada en seis familias genéticas, denominadas SRL-1 a SRL-6 (Levy et al, 1993) las cuales son principalmente compatibles con arroz de riego tipo indica, y un linaje genético denominado A-7 compatible con arroz de secano tipo japónico (Figura 1). Estudios sobre la relación entre el espectro de virulencia y una familia o linaje genético del patógeno, indican que denominado A-7 compatible con arroz de secano tipo japónico (Figura 1).

Estudios sobre la relación entre el espectro de virulencia y una familia o linaje genético del patógeno, indican que lo más importante de esta interacción es que existen genes de resistencia en el arroz, los cuales son

efectivos o controlan todos los aislamientos o individuos de un mismo linaje.

Tabla 1 Cultivares de arroz liberados en Colombia, fuentes de resistencia y año del rompimiento de la resistencia a *Pyricularia grisea*

Cultivar	Fuente de Resistencia	Año de Liberación	Rompimiento de la Resistencia	Años de Resistencia
Cica 4	Peta	1971	1972	1
Cica 6	IR-822-432	1974	1975	1
Cica 7	Colombia 1	1976	1978	2
Cica 9	C 46-15	1976	1977	1
Cica 8	Tetep	1978	1980	2
Metica 1	Colombia 1	1981	1982	1
Oryzica 1	C 46-15, Colombia 1, Tetep	1982	1985	3
Oryzica 3	Colombia 1, Tetep	1984	1985	1
Línea 2	C 46-15, Colombia 1, Tetep	1988	1989	1
Oryzica Llanos 5	IR 36, 5685, Colombia 1, Cica 9	1989	?	> 10
Oryzica Caribe 8	Tetep, IR 665, Colombia 1, Cica 9	1993	1995	2
Fedearroz 50	IR 665, 5685, Colombia 1, Cica 9	1998	?	> 4

De esta forma, el proyecto de Arroz de CIAT como objetivo ha venido desarrollando una estrategia de mejoramiento para el desarrollo de resistencia durable al añublo del arroz, la cual está basada en estudios sobre la composición y frecuencia de los genes de avirulencia del patógeno, la caracterización de la estructura genética, la identificación e incorporación en los cultivares de combinaciones de genes de resistencia efectivos contra las poblaciones del hongo de cada familia genética, y la evaluación continua y selección de líneas del programa de mejoramiento bajo una alta presión de la enfermedad y una alta diversidad del patógeno (Correa-V y Zeigler,1993a; 1993b; 1995).

Caracterización de la virulencia y estructura genética de *Pyricularia grisea* en Colombia

El Proyecto de arroz del CIAT realiza sus actividades de mejoramiento por resistencia a *P. grisea* bajo condiciones de secano favorecido en la estación experimental "Santa Rosa" de FEDEARROZ en el departamento del Meta, Colombia, sitio de alta presión de la enfermedad y diversidad del patógeno. Una alta incidencia de la enfermedad es mantenida en las parcelas de mejoramiento durante todo el ciclo del cultivo mediante el uso de surcos esparcidores, los cuales están compuestos por una mezcla de cultivares comerciales susceptibles a las diferentes familias genéticas del hongo. Estos surcos son sembrados en forma perpendicular a las líneas de arroz a ser evaluadas por su resistencia. Gran cantidad de esporas del hongo son producidas sobre los

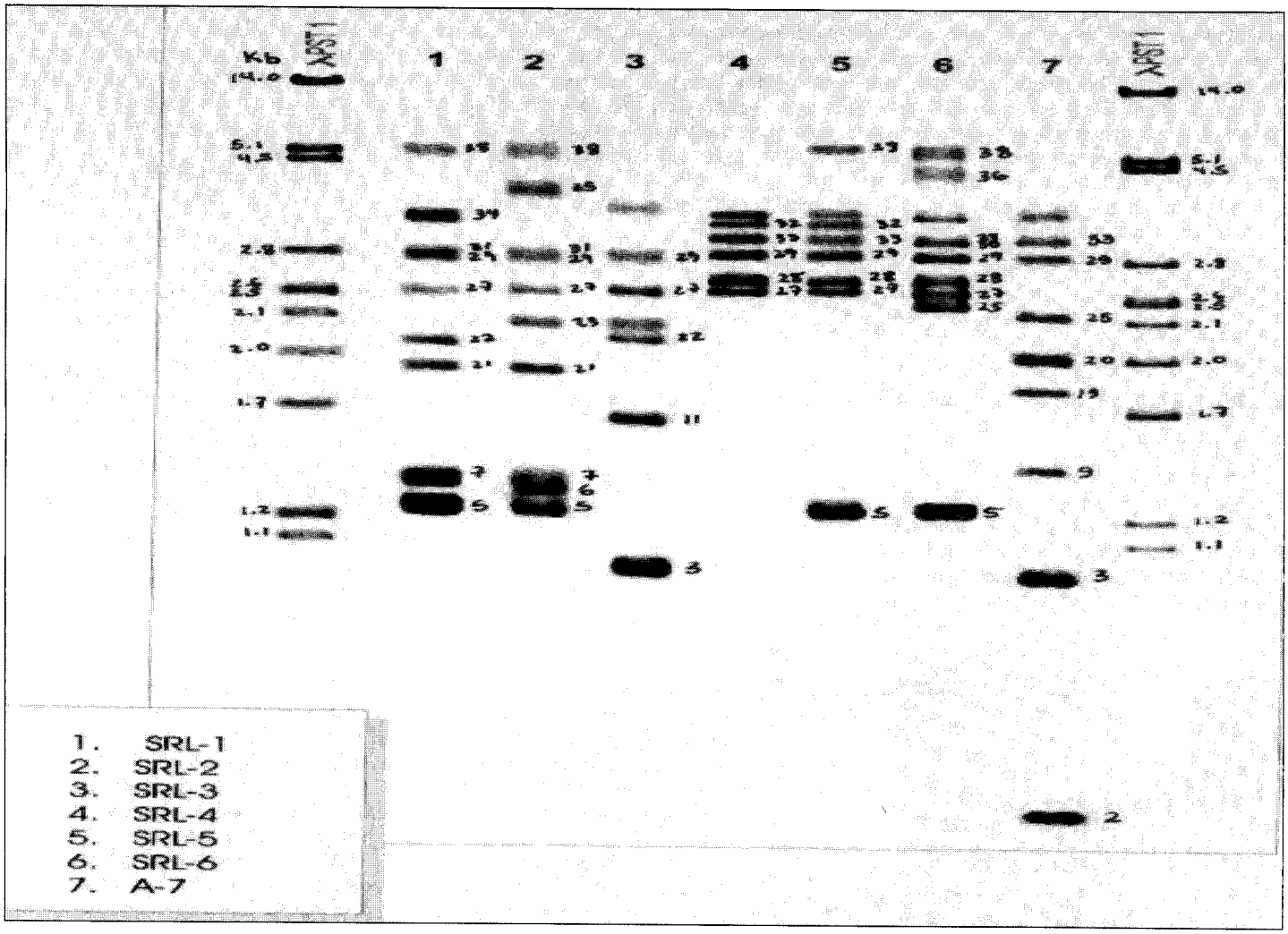

Figura 1. Huella del ADN ("fingerprinting") de *P. grisea* determinado por Pot 2-PCR (George et al, 1997). Linajes genéticos SRL-1 a SRL-6 y Altillanura 7 (A-7) de Colombia

surcos esparcidores siendo estas diseminadas por el viento y el agua sobre las líneas de mejoramiento, aumentando la probabilidad de exposición de una línea al patógeno y reduciendo la posibilidad de escape a la infección (Figura 2).

Bajo estas condiciones de evaluación y selección, se ha encontrado que la resistencia seleccionada es más estable y duradera que bajo condiciones de menor presión. Sin embargo, la durabilidad de la resistencia depende no solo de la planta, sino de la dinámica del patógeno y sus cambios en la virulencia. El establecimiento entonces de un sistema para entender la variabilidad patogénica y su dinámica es esencial para el desarrollo de una estrategia de control de la enfermedad con resistencia genética.

Estudios de poblaciones de P. grisea recolectadas durante 12 años en este sitio han mostrado la existencia de mas de 50 razas del hongo, presentando virulencia o compatibilidad con mas de 13 genes de resistencia. Bajo condiciones de invernadero plántulas de arroz de 21 días de edad son inoculadas en tres replicaciones (10 plantas por repetición) mediante la aspersión de una suspensión de 5x105 esporas/mL, incubadas por 15 días con una alta humedad relativa, y evaluadas por el tipo de lesión y porcentaje de área foliar afectada. Estudios sobre frecuencias de virulencia sobre 42 cultivares de arroz con diferentes genes de resistencia estuvieron entre 0,0 y 0,86 (Correa-V y Zeigler, 1993 a). La mayoría de los aislamientos presentan perdida de un gran número de genes de avirulencia, pero ningún aislamiento es virulento sobre todos los genes de resistencia (Tabla 2) sugiriendo la necesidad de piramidar estos genes para poder lograr resistencia efectiva contra el patógeno (Correa et al, 1994).

El análisis molecular de estas poblaciones del patógeno sugieren que este se reproduce principalmente de forma asexual, estando agrupado en pocas familias genéticas.

La estructura genética es relativamente simple a pesar de la gran diversidad observada en la virulencia. La similitud genética de los aislamientos dentro de un mismo linaje es mayor al 90%, mientras que la similitud entre aislamientos de diferentes linajes está entre 37 a 85% (Levy et al, 1993. El espectro de virulencia de aislamientos dentro de cada linaje es altamente similar, difiriendo en tan solo unos pocos factores de virulencia. Aunque las familias genéticas del hongo comparten un alto número de genes de avirulencia, se ha detectado una alta interacción específica entre algunos genes de avirulencia en el patógeno y algunos genes de resistencia en la planta, siendo esta interacción de mucha importancia desde el punto de vista de mejoramiento para el desarrollo de cultivares resistentes (Tabla 2). Esta interacción específica es la base para la selección de progenitores que deben ser incluidos en un programa de mejoramiento para resistencia al añublo del arroz.

La caracterización de la estructura genética o linajes, junto con el espectro de virulencia y las frecuencias de los genes de avirulencia en la población del patógeno deben entonces proveer un estimativo más real de la durabilidad de la resistencia que el estudio de estos componentes por separado. En la Tabla 2 se observa que un gen de resistencia puede ser atacado por aislamientos de diferentes linajes genéticos como es el caso de los genes Pi-t y Pi-ks. Por otro lado, ciertos genes de resistencia son efectivos controlando todos los patotipos de una misma familia genética o de varias, aunque sean susceptibles a los patotipos de otras familias. De esta forma, se presentan cultivares con genes de resistencia complementarios, los cuales en combinación o después de acumularlos en un mismo cultivar confieren resistencia a toda la población del patógeno en estudio. Las líneas isogénicas CT 13432-68, CT 13432-54 y CT 13432-55 que contienen los genes de resistencia Pi-1, Pi-2 y Pi-33, respectivamente, tienen genes de resistencia complementarios, los cuales en combinación o piramidados en la línea isogénica CT 13432-34 confieren resistencia contra todos los aislamientos del patógeno pertenecientes a las diferentes familias genéticas del hongo encontradas en Colombia (Tabla 2).

La frecuencia de los diferentes genes de virulencia y linajes genéticos depende de los genes de resistencia utilizados en los cultivares comerciales sembrados por el agricultor. La frecuencia de los linajes genéticos cambian entre años dependiendo del área sembrada con un cultivar y del espectro total de virulencia de dicho linaje. En un estudio sobre la frecuencia de compatibilidad de los aislamientos mas virulentos de Colombia sobre 201 cultivares de arroz de América Latina (Correa-V, et al 2000), se observó que la mayoría de los cultivares son susceptibles al linaje SRL-6 (80,6%) seguido por el linaje SRL-5 (68,7%). El patrón de compatibilidad observado con los linajes SRL-6 y SRL-5 deben ser el resultado de una base genética estrecha y similar presente en el germoplasma que ha sido utilizado en América Latina para el desarrollo de sus cultivares.

El linaje SRL-6 ha sido por muchos años el mas frecuente en la población del hongo en Colombia. Los linajes SRL-2 y SRL-4 han aumentado en frecuencia ya que el área sembrada con cultivares susceptibles a estos linajes ha aumentado en los últimos años.

Aislamientos de estos dos linajes exhiben un amplio espectro de virulencia sobre los cultivares de arroz de Colombia y líneas isogénicas. La frecuencia de los linajes SRL-1 y SRL-5 han disminuido en el tiempo ya que los cultivares susceptibles a estos linajes han casi desaparecido de los campos de los agricultores. Estos dos linajes exhiben sin embargo una alta compatibilidad con los cultivares de arroz de América Latina. La frecuencia de los linajes SRL-1 y SRL-3 ha sido casi cero durante los últimos años debido

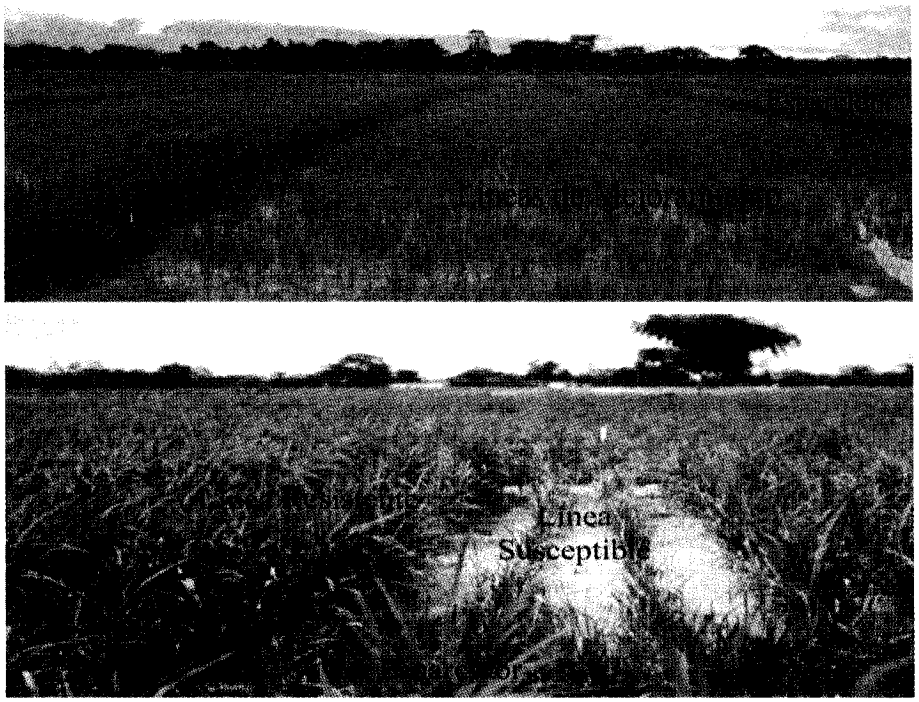

Figura 2. Estación experimental Santa Rosa para la evaluación de la resistencia a *P. grisea* utilizando la metodología de esparcidores para la multiplicación y diseminación del patógeno manteniendo una alta presión de la enfermedad

Tabla 2. Genes de avirulencia presentes en aislamientos de *Pyricularia grisea* de Colombia

Fuente	Gen Resistencia	Aislamiento/ Linaje Genético 1 L6B	2 L6B	3 L6	4 L4	5 L4	6 L4	7 L4	8 L2	9 L5
CT 13432-68	Pi-1			R	R	R	R	R	R	
CT 13432-54	Pi-2									R
CT 13432-55	Pi-33	R[1]	R	R		R			R	
C 104 PKT	Pi-3								R	
C 101 PKT	Pi-4a								R	
C 105 TTP4 (L23)	Pi-4b								R	
F 124-1	Pi-ta									
F 128-1	Pi-ta[2]			R			R	R		
F 80-1	Pi-k			R				R		
F 98-7	Pi-k[m]									
F 129-1	Pi-k[p]			R						
F 145-2	Pi-b			R		R				
Aichi Asahi	Pi-a			R						
K 3	Pi-k[h]			R	R	R	R	R	R	
K 59	Pi-t									
Rico 1	Pi-k[s]									
Norin 2	Pi-sh			R						R
Nato	Pi- i									
OU 244	Pi-z	R	R	R					R	R
Toride	Pi-z[t]		R	R						R
CT 13432-34	Pi-1, Pi-2, Pi-33	R	R	R	R	R	R	R	R	R

1R = Reacción resistente o incompatible como resultado de la interacción entre un gen de avirulencia en el patógeno y un gen de resistencia en la planta.

a la ausencia de cultivares susceptibles en campos comerciales y al espectro de virulencia estrecho exhibido por ellos sobre los cultivares de Colombia.

Se ha observado también una ganancia en virulencia (perdida de genes de avirulencia) para la mayoría de los linajes mas predominantes como se observa en la subdivisión del linaje SRL-6 en SRL-6B y el linaje SRL-4 en la Tabla 2. La identificación temprana o antes de que aumenten en frecuencia, de patotipos con un amplio espectro de virulencia es de uso practico para la identificación de genes de resistencia que puedan ser usados en el evento que se pierda la resistencia de un cultivar comercial.

En el CIAT los fitomejoradores han desarrollado cultivares de arroz con resistencia durable por mas 10 años tal como el cultivar Oryzica Llanos 5 (Tabla 1) cuyos padres exhiben susceptibilidad a los diferentes linajes genéticos del patógeno (Figura 3). Nuestros estudios a partir de poblaciones del hongo recolectadas en campo a partir de cada uno de los cinco progenitores demuestran que los linajes que son aislados son específicos con cada cultivar como se muestra en la Figura 3.

Inoculaciones bajo condiciones de invernadero también demuestran que estos mismos linajes son los que reinfectan al cultivar de

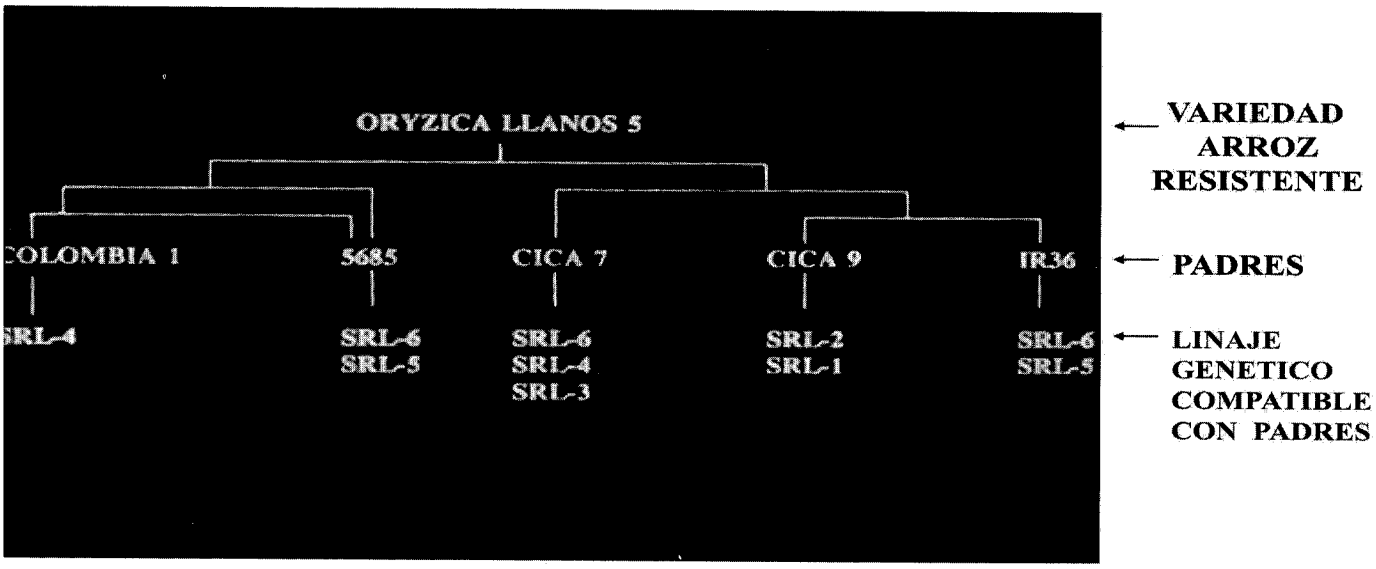

Figura 3. Genealogía de la variedad Oryzica Llanos 5 con resistencia durable a *P. grisea* mostrando la reacción complementaria de la resistencia de los progenitores a diferentes linajes genéticos del patógeno

origen, y que cada progenitor presenta genes de resistencia efectivos contra el resto de los linajes del patógeno. Estos resultados sugieren que estos padres contienen genes de resistencia complementarios los cuales en combinación confieren la resistencia durable observada por mas de 10 años en este cultivar. De acuerdo a Johnson (1984), resistencia durable "es la resistencia que permanece efectiva después de ser usada en grandes extensiones por un período largo de tiempo bajo condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad". El cultivar Oryzica Llanos 5 ha cumplido con esta definición de durabilidad y es por esta razón que es de nuestro interés determinar la composición genética del mismo para la identificación de la combinación de genes que le confieren su durabilidad.

Tabla 3. **Reacción a *Pyricularia grisea* en hoja y cuello en líneas isogénicas con diferentes combinaciones de los genes de resistencia Pi-1, Pi-2 y Pi-33**

Línea isogénica	Gen Resistencia	Añublo Hoja		Añublo Cuello Incidencia (%)
		BL41	BL51	
CT 13432-95	Ninguno	9.	9	Muerte
CT 13432-110	Ninguno	9	9	Muerte
CT 13432-68	1	9	9	Muerte
CT 13432-54	2	9	9	Muerte
CT 13432-6	33	9	9	Muerte
CT 13432-230	1 + 2	9	9	Muerte
CT 13432-26	1 + 33	9	9	Muerte
CT 13432-193	2 + 33	8	5	15
CT 13432-34	1 + 2 + 33	2	2	0
CT 13432-107	1 + 2 + 33	2	1	0
CT 13432-189	1 + 2 + 33	2	1	0
CT 13432-246	1 + 2 + 33	2	1	0

1 Cuarta y quinta evaluaciones de añublo en la hoja (BL)

Identificación y uso de combinaciones de genes de resistencia a *Pyricularia grisea* para el desarrollo de cultivares de arroz con resistencia durable

Un total de 283 líneas recombinantes F7 originadas a partir del cruce entre las líneas isogénicas C 101 LAC (genes de resistencia Pi-1y Pi-33) x C 101 A51 (gen de resistencia Pi-2) fueron desarrolladas para la identificación de microsatélites (McCouch et al, 2001) asociados con estos tres genes de resistencia y el desarrollo de líneas isogénicas con diferentes combinaciones de dichos genes para evaluar su resistencia a *P. grisea* tanto en campo como en inoculaciones controladas. Los resultados demuestran que la combinación de los tres genes de resistencia Pi-1, Pi-2 y Pi-33 es la mas relevante para el mejoramiento y desarrollo de cultivares con una resistencia durable al patógeno.

La frecuencia de virulencia sobre cada uno de los tres genes de resistencia es alta dentro de algunos linajes genéticos pero ningún aislamiento es compatible con los tres genes (Tabla 2, Tabla 3). Hemos demostrado tanto en inoculaciones de invernadero como en evaluaciones de campo que la combinación de los tres genes de resistencia (Pi-1 + Pi-2 + Pi-33) en las líneas isogénicas CT 13432-34, CT 13432-107, CT 13432-189, y CT 13432-246 (Tabla 2, Tabla 3, Figura 4) confiere resistencia completa a las poblaciones de *P. grisea* presentes en Colombia, las cuales son compatibles con cualquiera de los genes o la combinación de dos de ellos (Tabla 3, Figura 4).

De acuerdo a nuestros estudios, los genes de avirulencia avr-Pi-1 y avr Pi-33 se encuentran altamente conservados en la población del patógeno en Colombia, sugiriendo que estos genes de avirulencia tienen una menor frecuencia de mutación hacia virulencia y probablemente son genes muy importantes en el "fitness" o sobrevivencia del hongo función del correspondiente gen de avirulencia para poder sobrepasar dicho gen de resistencia. Por otro lado, el gen de avirulencia avr Pi-2 está presente solo en el linaje genético SRL-5, sugiriendo que este gen de avirulencia tiene una mayor tasa de mutación hacia virulencia y que el gen por si solo sería muy poco durable. Esto se confirma en nuestros resultados dado que la mayoría de aislamientos en cuatro de los seis linajes genéticos son compatibles con el gen de resistencia Pi-2 (Tabla 2). Adicionalmente, los genes de resistencia Pi-kh, Pi-sh, y Pi-z pueden ser considerados de mucho uso potencial (Tabla 2) ya que en combinación también confieren resistencia a toda la población del hongo estudiada.

La interacción patógeno-planta en el complejo arroz-pyricularia se ha demostrado de acuerdo a la hipótesis del gen x gen (Flor, 1971), donde la resistencia resulta de la interacción genética entre los genes de resistencia en la planta y los genes de avirulencia en el patógeno. Solo basta que se presente uno solo de estos genes correspondientes en cada uno de los organismos (planta y patógeno) para que se manifieste la reacción resistente. La mutación o perdida de uno de estos genes en cualquiera de los dos organismos es determinante para que la interacción deje de ser de resistencia y se manifieste como susceptible. Muchos genes de avirulencia pueden ser factores de "fitness" altamente relacionados con la capacidad de un organismo de sobrevivir y reproducirse (Leach et al, 2001).

Se ha sugerido que los genes de avirulencia de fácil capacidad de mutación en el patógeno son probablemente menos críticos sobre los procesos de "fitness" o capacidad de reproducción y sobrevivencia que aquellos que raramente mutan (Flor, 1971), y ha sido indicado que el "fitness" de un patógeno es el factor o fuerza principal en la evolución y estabilidad de un patosistema en la agricultura (Van der Plank, 1968). De esta manera, se considera que la calidad y durabilidad de un gen de resistencia es una función directa de los efectos impuestos al patógeno al perder la

Dos métodos han sido sugeridos para evaluar el efecto sobre el "fitness" impuesto por la mutación de un gen de avirulencia sobre las poblaciones del patógeno (Leach et al, 2001). Primero, determinar si hay una reducción de un gen de virulencia (gen de aviru

Figura 4 Resistencia completa a *Pyricularia grisea* de la línea isogénica CT 13432-34 conferida por la combinación de los genes de resistencia Pi-1, Pi-2, Pi-33

lencia mutado) en ausencia del gen de resistencia correspondiente en el campo. La hipótesis es que si la mutación no confiere ventajas selectivas en el patógeno, entonces el gen mutado desaparecerá de la población. Segundo, determinar directamente en el laboratorio si la inactivación de un gen de avirulencia conlleva un efecto directo sobre los componentes del "fitness" del patógeno. Estos estudios requieren de una validación de los resultados de laboratorio en el campo. Respuestas positivas a estas dos preguntas pueden ser consideradas como evidencia indicadoras de que el efecto de los genes de avirulencia sobre el patógeno puede ser usada como indicador para predecir la durabilidad de un gen o la combinación de varios genes de resistencia. En otras palabras, aquellos genes de resistencia que imponen al patógeno un alto valor o efecto deletéreo al perder el gen correspondiente de avirulencia para poder adaptarse o romper la resistencia de dicho gen, probablemente será un gen de resistencia durable.

De esta forma, nuestros estudios han venido siendo encaminados hacia el desarrollo de la capacidad para predecir la durabilidad de los genes de resistencia con el objetivo de utilizarlos eficientemente en nuestro programa de mejoramiento. Líneas isogénicas desarrolladas en IRRI y CIAT con diferentes genes de resistencia y combinaciones de ellos han sido útiles para determinar la frecuencia de los diferentes genotipos del hongo presentes durante diferentes ciclos de cultivo tanto en la estación experimental como en campos comerciales. Aunque hay muchos casos que demuestran que genes individuales de resistencia pueden conferir una resistencia durable, nuestros estudios indican que este no es el caso en el control de *P. grisea* en Colombia. En la Tabla 3 podemos observar que para los ocho genotipos posibles con la combinación de tres genes de resistencia, el patógeno presenta muy posiblemente siete genotipos, excepto aquel que hubiera perdido la función de los tres genes de avirulencia correspondientes a los genes de resistencia Pi-1, Pi-2 y Pi-33. Combinación única mostrando una resistencia completa (Figura 4). Los resultados sugieren que el patógeno puede perder la función de cualquiera de los genes de avirulencia, o la combinación de dos de ellos, pero no los tres genes (Tabla 2). Es posible que al perder uno o dos de ellos, el otro gen de avirulencia pueda todavía cumplir con todas las necesidades metabólicas y de fitness en general para asegurar la sobrevivencia del hongo, la cual se vería posiblemente afectada al perder los tres genes de avirulencia. En este caso, es necesario que al pretender predecir la durabilidad de la resistencia al utilizar estos genes, sea necesario utilizar la combinación de los tres genes y no uno o dos de los genes.

Es importante observar que aún en aislamientos con un amplio espectro de virulencia (perdida de muchos genes de avirulencia) como es el caso del aislamiento 1 del linaje indicado como L6B (SRL-6) en la Tabla 2, este aislamiento ha perdido los genes de avirulencia para los genes de resistencia Pi-1 y Pi-2, pero ha mantenido el gen de avirulencia para Pi-33. Igualmente se observa para el aislamiento 4 identificado con el linaje L4 (SRL-4), el cual ha perdido los genes de avirulencia para Pi-2 y Pi-33, pero ha mantenido el gen de avirulencia avr-1, y el aislamiento 9 identificado con el linaje L5 (SRL-5) perdiendo los genes de avirulencia avr-1 y avr-33, pero ha mantenido avr-2. Por otro lado, la combinación de los genes de resistencia Pi-kh y Pi-z muestra igual exclusión y resistencia a todos los linajes genéticos en estudio (Tabla 2).

Las líneas isogénicas con diferentes genes de resistencia son también útiles para identificar los posibles genes de avirulencia presentes en diferentes aislamientos del patógeno, los cuales pueden ser utilizados para predecir cuales genes de resistencia pueden estar presentes en un cultivar de arroz. La caracterización de los genes de avirulencia en varios centenares de aislamientos del hongo en Colombia nos ha permitido inferir los posibles genes de resistencia presentes en los cultivares comerciales de arroz de Colombia (Tabla 4) después de realizar inoculaciones controladas en el invernadero con dichos aislamientos.

Tabla 4. Posibles genes de resistencia presentes en los cultivares comerciales de arroz de Colombia inferidos de inoculaciones con aislamientos de *P. grisea* que poseen los correspondientes genes de avirulencia

Cultivar Arroz	Gen de Resistencia									
	Pi-1	Pi-2	Pi-33	Pi-z	Pi-zt	Pi-ta2	Pi-sh	Pi-kh	Pi-k	Pi-b
Oryzica 2	X[1]	X				X	X	X	X	X
Oryzica 3						X			X	
Cica 8	X					X			X	X
Cica 9		X				X				
IR 22						X	X		X	
Linea 2		X								
Oryzica Llanos 4		X					X		X	
Oryzica Caribe 8		X					X		X	
Oryzica Yacu 9		X								
Oryzica Llanos 5		X	X	X	X	X	X		X	X
Fedearroz 50		X	X	X	X	X	X		X	X

[1] X = Presencia del gen de resistencia

Los cultivares Oryzica Llanos 5 y Fedearroz 50 que han tenido una resistencia durable (Tabla 1) presentan el mayor número e iguales genes de resistencia (Tabla 4). Estos dos cultivares parecen contener los genes de resistencia Pi-2 y Pi-33 mas no el gen Pi-1. La durabilidad de la resistencia en estos cultivares se debe entonces a la acción de los genes Pi-2 y Pi-33 junto con los otros genes de acuerdo a la Tabla 2, y posiblemente a la presencia de genes de resistencia no conocidos.

Con el objetivo de predecir el posible rompimiento de la resistencia durable exhibida por los cultivares Oryzica Llanos 5 y Fedearroz 50, para adelantar un programa de mejoramiento que incorpore genes de resistencia a los posibles linajes genéticos del hongo que estén en proceso de evolución para romper dicha resistencia, hemos venido recolectando muestras de lesiones individuales en la hoja o en el cuello en estos dos cultivares. Los resultados del análisis molecular de los aislamientos recolectados de estos dos cultivares en los últimos años muestran que mas del 90% pertenecen al linaje SRL-4 y el resto al linaje SRL-6. Estos aislamientos no reinfectan a los dos cultivares en inoculaciones controladas de invernadero y no inducen lesiones típicas de la enfermedad, y tan solo los aislamientos del linaje SRL-4 inducen ocasionalmente y bajo estrés nutricional la formación de pequeñas lesiones sin esporulación. Sin embargo, los resultados sugieren que el linaje SRL-4 se encuentra en proceso de evolución con mayores probabilidades de romper la resistencia de los cultivares Oryzica Llanos 5 y Fedearroz 50 que los linajes SRL-6 y SRL-5, aunque el linaje SRL-6 ha estado siempre en mayor frecuencia en toda la población del hongo por muchos años. Nuestra pregunta de porque el linaje SRL-4 y

no los otros dos se recuperan en mayor frecuencia de los cultivares Oryzica Llanos 5 y Fedearrroz 50 pudiendo llegar a romper la resistencia de estos, se puede deducir de forma lógica de los datos presentados en la Tabla 2, la cual muestra que en la evolución mas avanzada del linaje SRL-4 mostrada en el aislamiento 4 de la misma tabla, este aislamiento ha perdido todos los genes de avirulencia hacia los genes de resistencia presentes en Oryzica Llanos 5 y Fedearroz 50 de acuerdo a la Tabla 4. Este linaje no ha perdido sin embargo el gen de avirulencia hacia el gen de resistencia Pi-1, y no lo necesita perder ya que el gen Pi-1 no esta presente en ninguno de los dos cultivares (Tabla 4). Por el contrario, los aislamientos que presentan las mayores mutaciones dentro de los linajes SRL-6 (aislamiento 1, Tabla 2) y SRL-5 (aislamiento 9, Tabla 2), tendrían que mutar los genes de avirulencia hacia los genes de resistencia Pi-33 y Pi-2, respectivamente, los cuales si estan presentes en los cultivares Oryzica Llanos 5 y Fedearroz 50. Estos dos linajes ya han perdido el gen de avirulencia hacia Pi-1, y por lo tanto para romper la resistencia de los dos cultivares estarían perdiendo los tres genes de avirulencia, avr-1, avr-2, y avr-33, lo cual de acuerdo a nuestras discusiones anteriores tendrían posiblemente un efecto deletéreo sobre el patógeno. El linaje SRL-4 ha perdido en los últimos años los genes de avirulencia para los genes de resistencia Pi-ta2, Pi-k, y Pi-b (Tabla 2), los cuales se encuentran presentes en dichos cultivares con resistencia durable (Tabla 4). Este linaje no ha perdido el gen de avirulencia hacia el gen Pi-kh, el cual no se encuentra en los cultivares Oryzica Llanos 5 y Fedearroz 50 y por lo tanto este gen junto al gen Pi-1, podrían ser usados en un programa de mejoramiento para ser incorporados en los dos cultivares complementando así la resistencia y de alguna forma tratando de ir delante de los procesos evolutivos del patógeno que le permitan romper a nivel comercial la resistencia durable. Los resultados también sugieren que estos cultivares posiblemente presenten algún otro gen de resistencia desconocido y que necesita ser identificado, ya que todos los genes de resistencia en Oryzica Llanos 5 y Fedearroz 50 presentados en la Tabla 4 son atacados por el aislamiento 4 presentado en la Tabla 2. Dicho estudio se encuentra en progreso actualmente con el fin de elucidar e identificar a nivel molecular todos los genes de resistencia presentes en el cultivar Oryzica Llanos 5.

Con el objetivo de desarrollar cultivares de arroz con resistencia durable a *P. grisea* para otros países de América Latina, hemos iniciado un programa de retrocruzamiento para introducir los genes de resistencia Pi-1, Pi-2, Pi-33 en 14 variedades comerciales de arroz de la región (Tabla 5), las cuales todavía juegan un papel importante en la economía de muchos agricultores a pesar de ser susceptibles a la enfermedad.

El procedimiento de retrocruzamientos se describe en la Figura 5 y la incorporación de los tres genes de resistencia está siendo seguida mediante el uso de microsatelites (McCouch et al, 2001), asociados con los genes de resistencia, inoculaciones controladas en el invernadero con aislamientos apropiados que contengan los genes de avirulencia respectivos, y la evaluación de la resistencia en el campo bajo condiciones de alta presión de la enfermedad y diversidad del patógeno (Figura 2). Poblaciones y líneas seleccionadas con los tres genes de resistencia serán distribuidas a los diferentes países de América Latina para la evaluación y selección de líneas que incorporen tanto la resistencia como las otras características agronómicas deseadas.

Tabla 5. Variedades de arroz de América Latina utilizadas en la incorporación de los genes de resistencia Pi-1, Pi-2, y Pi-33 mediante retrocruzamientos y la ayuda de marcadores moleculares e inoculaciones de *Pyricularia grisea*

Variedad	País
Fedearroz 2000	Colombia
Colombia XX1	Colombia
Oryzica 1	Colombia
Fedearroz 50	Colombia
Epagri 108	Brasil (riego)
Irga 409	Brasil (riego)
Primavera	Brasil (secano)
Bonanza	Brasil (secano)
El Paso 144	Uruguay, Argentina
Cimarron	Venezuela
Capirona	Perú
Panamá 1048	Panamá
CR 1113	Costa Rica
J 104	Cuba

CONCLUSIONES

- La estructura genética de *P. grisea* en Colombia está compuesta por pocas familias o linajes cuya frecuencia depende de los genes de resistencia presentes en las variedades cultivadas
- Los estudios de frecuencias de genes de avirulencia utilizando líneas isogénicas con diferentes genes de resistencia son útiles para la identificación de las combinaciones de genes de resistencia relevantes para el control de *P. grisea*
- *P. grisea* en Colombia presenta virulencia a todos los genes de resistencia conocidos. La resistencia durable al patógeno debe por lo tanto buscarse mediante combinaciones de genes de resistencia
- Basados en la contribución relativa de los genes de avirulencia sobre el "fitness" de *P. grisea*, genotipos de plantas pueden ser diseñados y generados que contengan las combinaciones mas efectivas de genes de resistencia
- Un patógeno como *P. grisea* el cual es principalmente clonal, no parece ser capaz de tolerar un aumento continuo de mutaciones en sus genes de avirulencia aún en el caso de que dichos genes contribuyan con efectos pequeños en fitness
- La combinación de los genes Pi-1, Pi-2, y Pi-33 confiere resistencia a las poblaciones de *P. grisea* en Colombia. El uso de marcadores moleculares e inoculaciones controladas en invernadero son muy útiles para la incorporación de los genes de resistencia en poblaciones de mejoramiento
- Las poblaciones desarrolladas en programas de mejoramiento con el fin de acumular diferentes genes de resistencia a *P. grisea* deben ser evaluadas y seleccionadas utilizando metodologías de campo que ayuden a mantener una alta presión de la enfermedad y diversidad del patógeno

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Correa-Victoria, F. J y Martinez, C. 1994. Genetic structure and virulence diversity of Pyricularia grisea in breeding for rice blast resistance, in Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement, IAEA, Vienna, pp. 133-145.

Correa-Victoria, F. J. y Zeigler, R. S. 1993a. Pathogenic variability in Pyricularia grisea at a rice blast "hot spot" breeding site in eastern Colombia. Plant Disease 77: 1029-1035.

Correa-Victoria, F. J. y Zeigler, R. S. 1993b. Field breeding for durable rice blast resistance in the presence of diverse pathogen populations, in Th Jacobs and JE Parlevliet (eds.), Durability of Disease Resistance, Kluwer Academic Publishers, Dordretch, pp. 215-218.

Correa-Victoria, F. J. y Zeigler, R. S. 1995. Stability of complete and partial resistance in rice to Pyricularia grisea under rainfed upland conditions in eastern Colombia. Phytopathology 85: 977-982.

Correa-Victoria, F. J., Zeigler, R. S. y Levy, M. 1994. Virulence characteristics of genetic families of *Pyricularia grisea* in Colombia, in RS Zeigler, SA Leong and PS Teng (eds.), Rice Blast Disease, CAB International, UK, pp. 211-229.

Correa-Victoria, F. J., Escobar, F., Prado, G. y Aricapa, G. 2000. Population dynamics of the rice blast pathogen in a screening site in Colombia and characterization of resistance, in D Tharreau, MH Lebrun, NJ Talbot and J.L. Notteghem (eds.), Advances in Rice Blast Research, Kluwer Academic Publishers, Dordreth, pp. 214-220.

George, M. L.C., Nelson, R. J, Zeigler, R. S. y Leung, H. 1998. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. Phytopathology 88: 223-229

Johnson, R. 1984. A critical analysis of durable resistance. Annual Review of Phytopathology 22: 309-330

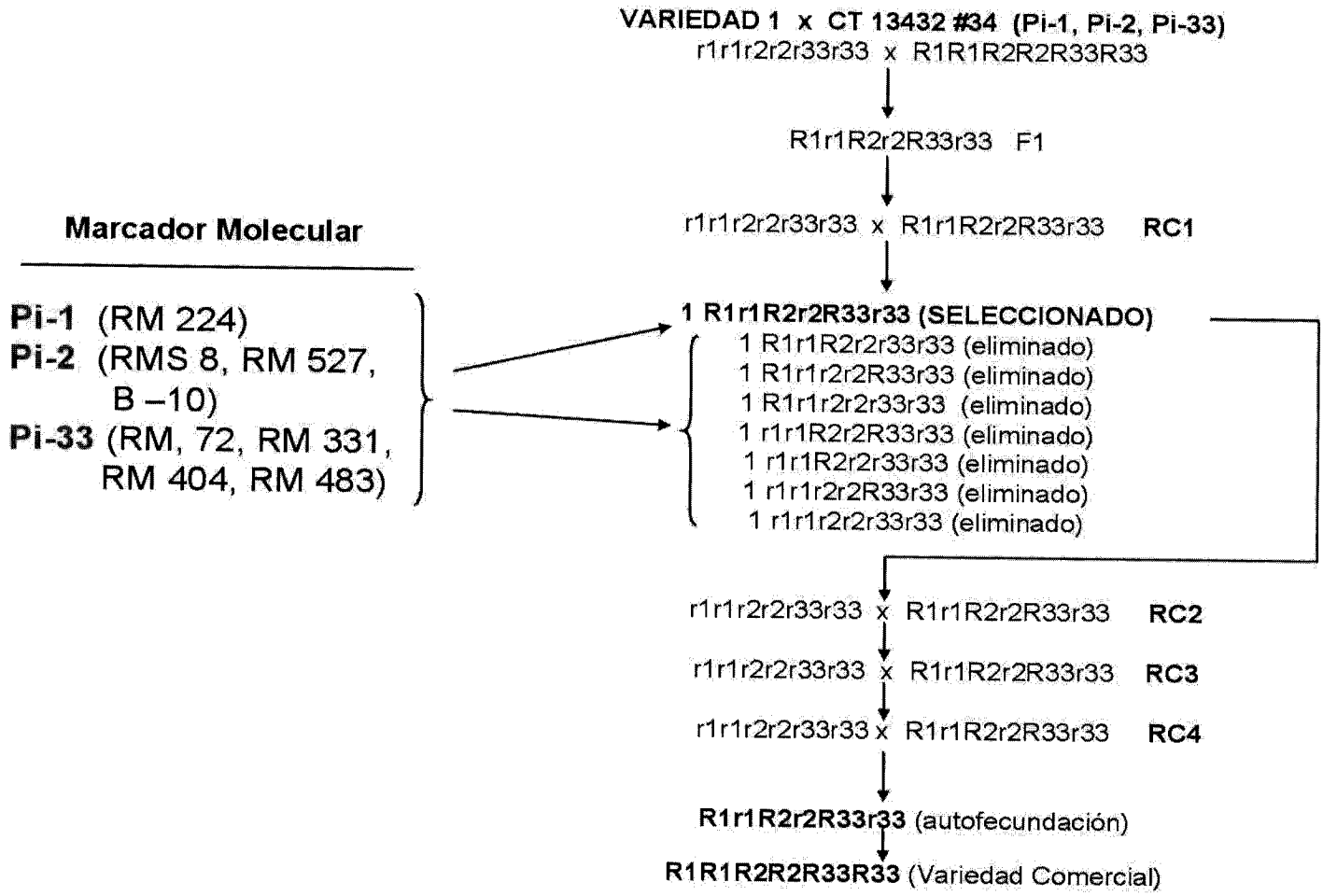

Figura 5. Programa de retrocruzamientos para la incorporación de los genes de resistencia a *P. grisea* Pi-1, Pi-2, y Pi-33 en variedades de arroz de América Latina

Levy, M., Correa-Victoria, F. J, Zeigler, R. S., Xu, S. y Hamer, J. E. 1993. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. Phytopathology 83: 1427-1433

McCouch, S.R., Temnykh, S., Lukashova, A. et al. 2001. Microsatellite markers in rice: abundance, diversity, and applications, in GS Kush, Brar DS and Hardy B (eds.), Rice Genetics IV, IRRI, Los Baños, Philippines, pp. 117-135

Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9: 275-296

Leach, J. E., Vera-Cruz, C., Bai, J. yand Leung, H. 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. Annual Review of Phytopathology 39: 187-224

Van der Plank, J. E. 1968. Disease Resistance in Plants. London-New York: Academic. 206 pp.

Reprinted with permission from Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines ASCOLFI. Originally published in Fitopatología Colombiana 26(1-2): 47-54, Copyright 2002.