

Creación de un Acervo Genético para Mejorar la Resistencia Parcial a Piricularia en el Arroz de Secano, mediante Selección Recurrente



Brigitte Courtois

Brigitte Courtois¹, Rebecca Nelson² y
Edouard Roumen³

¹Investigadora del Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Département des cultures annuelles (CIRAD-CA), quien trabaja en el International Rice Research Institute (IRRI), P.O. Box 933, Manila 1099, Filipinas;
²Investigadora del IRRI; ³Investigador del CIRAD-CA

Contenido

Introducción

Estrategia para el Proyecto de Selección Recurrente

Selección para varios caracteres

Población de base genética amplia

Enfoque en la resistencia parcial para garantizar durabilidad

Creación del Acervo Genético

Elección del aislamiento

Elección de los progenitores

Esquema de la hibridación

Utilización del Acervo Genético

Esquema de mejoramiento

Técnica de selección basada en el fenotipo

Uso de marcadores genéticos

Conclusión

Referencias

Introducción

Una serie de factores bióticos y abióticos limitan la estabilidad del rendimiento del arroz de secano en el continente asiático. Los más mencionados son las malezas, la sequía, los suelos pobres y la piricularia. La herencia de la resistencia o de la adaptación a esos problemas es principalmente de naturaleza cuantitativa.

Suponiendo que las características bajo selección presenten un rango razonable de heredabilidad en el sentido estricto, la selección recurrente es la mejor técnica para incrementar la frecuencia de los alelos favorables que controlan genes menores; por lo tanto, se incrementa la probabilidad de extraer de la población líneas con genotipos deseados. Al mismo tiempo, debido al sistemático proceso de recombinación de los progenitores y a que la selección se hace en generaciones tempranas y a moderada intensidad, el método de selección recurrente reduce las desventajas potenciales asociadas con los métodos clásicos de piramidización de líneas élite, los cuales estrechan la base genética y bajan la frecuencia de la recombinación, cuando el período entre dos rondas de cruzamientos es largo.

El método de selección recurrente está perfectamente ubicado en la estrategia del International Rice Research Institute (IRRI), orientada hacia la investigación estratégica, para dejar el desarrollo de líneas mejoradas a los Programas Nacionales. Con este propósito, este instituto proveerá a tales programas poblaciones heterocigóticas con un valor superior en términos de alternativas de extracción de líneas. Debido a su heterocigosidad, estas poblaciones ofrecerán posibilidades para la adaptación local, las cuales se expresarán durante el proceso

descentralizado de obtención de líneas. Este punto es de importancia singular para el arroz de secano, ya que la interacción genotipo x ambiente es bastante marcada en el ecosistema de secano.

Este capítulo presenta, en líneas generales, el proyecto de selección recurrente que desarrolla el IRRI para el mejoramiento del arroz de secano. Hasta el momento, el progreso que se ha hecho es la creación de un acervo genético y el diseño de la estrategia que será utilizada para la exploración futura de la población.

Estrategia para el Proyecto de Selección Recurrente

Selección para varios caracteres

En el pasado, los fitomejoradores de los cultivos autógamos, en general, creaban y seleccionaban sus poblaciones con un solo objetivo en la mente, mientras que hoy día hay un creciente interés en seleccionar para varias características de una sola vez (Goldringer y Brabant, 1993): Esta última estrategia de selección es preferible porque casi siempre las características de interés están correlacionadas negativamente, de tal manera que se corre el riesgo de obtener ganancias en una y pérdidas en la otra.

El objetivo primario para la creación del acervo genético a que se refiere este capítulo es obtener resistencia parcial a la enfermedad causada por el hongo *Pyricularia grisea* Sacc. Sin embargo, durante el proceso de selección también se pondrá gran énfasis en el rendimiento y sus componentes, en resistencia a la sequía (mediante la manipulación del sistema radical) y en la calidad del grano. La relación entre las

características bajo selección debe ser objeto de un cuidadoso seguimiento, ya que ella va a cambiar en cada ciclo de selección recurrente, con las generaciones de intercrucos y la ruptura de los ligamentos. Para facilitar la selección de varios caracteres de una sola vez, se establecerá un índice que tomará en consideración la definición de los valores económicos empíricos de cada una de las características.

Población de base genética amplia

Las variedades del sur y el sureste de Asia pertenecen a tres importantes grupos varietales: indica, aus y japónica tropical, los cuales corresponden a los Grupos 1, 2 y 6, según el análisis isoenzimático de Glaszmann (1987). Las japónicas son ampliamente consideradas como las mejores fuentes para adaptación a las condiciones desfavorables de secano; acervos genéticos alternativos pueden aportar diferentes alelos, principalmente para resistencia a piricularia.

Se puede explorar la complementariedad entre indicas y japónicas lo cual, como se ha observado, puede conllevar a segregaciones transgresivas de interés (Second, comunicación personal). El problema de recombinar variedades de diferentes grupos es la posible esterilidad, pero la presencia en la población de algunos genotipos con amplia compatibilidad, como Palawan, puede mantener el problema bajo condiciones manejables (Virmani, comunicación personal).

Enfoque en la resistencia parcial para garantizar durabilidad

La piricularia es una de las enfermedades del arroz más

distribuidas en el mundo, y puede ser seria en el arroz de secano de Asia cuando las condiciones ambientales son favorables. La durabilidad de la resistencia a la enfermedad es un problema prioritario. Se conoce la posibilidad de que la resistencia completa, debida a genes mayores y basada en la reacción de hipersensibilidad, sea rota poco tiempo después del lanzamiento y la siembra comercial de la variedad. La simple acumulación de varios genes mayores se ha probado como ineficiente para conferir durabilidad (Kiyosawa et al., 1984).

El uso de genes mayores complementarios en arroz, que sean eficientes contra un rango de linajes del patógeno presente en un determinado sitio, fue sugerido como una posible alternativa para resolver el problema de la durabilidad (Zeigler et al., 1994). Con el desarrollo de herramientas en el área de la biología molecular, como la dactiloscopia del DNA, la estructura filogenética de la población de piricularia es ahora mejor entendida (Levy et al., 1991).

Se han identificado grupos discretos de 'linajes' específicos para determinada región geográfica. Un linaje es un grupo de aislamientos reunidos según la similitud de sus dactiloscopias del DNA. Los aislamientos de un determinado linaje comparten un espectro de virulencia similar. La estrategia de la exclusión de los linajes tiene como objetivo crear variedades que tengan genes de resistencia complementarios, asociados de tal manera que las protejan contra todos los linajes de una determinada área. Esa estrategia está basada en el supuesto de que los aislamientos de un linaje tendrán dificultades para sobrepasar cierta incompatibilidad. El laboratorio de fitopatología del IRRI está desarrollando ensayos para determinar la validez de esa hipótesis.

Otra estrategia que vale la pena explorar es la utilización de la resistencia parcial a piricularia, la cual reduce la capacidad de reproducción del patógeno (Parlevliet, 1988). Con frecuencia, esta resistencia se considera como más duradera que la resistencia completa, ya que ella parece estar más controlada por razas no específicas o tener una baja interacción genotipo/aislamiento (Roumen, 1993). Esta característica es de gran importancia cuando se está trabajando con variaciones en la población del patógeno de un año a otro y entre ambientes. En arroz, la resistencia parcial actúa básicamente de manera cuantitativa, limitando el número y el área de la lesión de la enfermedad, sin afectar el periodo de latencia (Roumen, 1993). En general, ella es poligénica y presenta una heredabilidad relativamente baja (Wang et al., 1994; Wang et al., 1989; Notteghem, 1985).

Intentos para mejorar el nivel de resistencia parcial al mildew polvoso y a la roya de la cebada, utilizando poblaciones mejoradas mediante la selección recurrente, han mostrado que la estrategia es válida (Parlevliet y Ommeren, 1988). Debido a la variabilidad del patógeno, el patosistema arroz-piricularia también es un buen modelo para la utilización de esa estrategia. Notteghem (1993) y Vales (comunicación personal) en Costa de Marfil, y Veillet (1993) en Brasil, han informado de estimulantes progresos en la selección.

Sin embargo, esa forma de resistencia puede ser insuficiente para proteger totalmente el cultivo de las pérdidas de rendimiento causadas por la piricularia, cuando las condiciones son altamente favorables para el desarrollo de la enfermedad (Bonman et al., 1991). En realidad, analizando diferentes puntos de vista, la mejor estrategia de mejoramiento

parece ser la combinación de un buen nivel de resistencia parcial con varios genes mayores.

Cultivares conocidos como poseedores de resistencia durable presentan ese tipo de combinación de genes mayores y menores (Wang et al., 1994). Pero, debido al efecto que los genes mayores presentan al enmascarar el producto de los menores, resulta imposible conocer el nivel de resistencia parcial de un cultivar en ausencia de razas virulentas efectivas contra los genes mayores que producen la resistencia presentada por la variedad. En una estrategia de mejoramiento poblacional se debe utilizar un aislamiento único, virulento a todos los progenitores (Parlevliet, 1983).

Para la mayoría de las líneas élite de arroz de secano no ha sido posible encontrar, en la colección de aislamientos de Filipinas que posee el IRRI, un aislamiento compatible. En su lugar se utilizó un aislamiento compatible con el mayor número posible de progenitores, para romper el mayor número posible de genes mayores; por lo tanto, la población se depura para los genes mayores que condicionan la resistencia a ese aislamiento. Con esto, la combinación aislamiento/acervo genético está determinada para toda la duración del proyecto. Por lo tanto, una vez creada la población, se podrán seleccionar fácilmente líneas con infección del tipo susceptible, pero con una reducida eficiencia relativa de infección después de la inoculación con el aislamiento compatible.

Es necesario hacer énfasis en que solamente se descartan los genes mayores que son eficientes contra el aislamiento escogido. Muchos otros genes mayores para otros aislamientos se mantienen, como lo indicó la amplia resistencia de los progenitores que son susceptibles al aislamiento escogido. Cuando se hizo

la inoculación de los 12 progenitores susceptibles al V85-0256, con 30 aislamientos virulentos representantes de cuatro linajes, solamente 11 dentro de las 335 combinaciones huésped/ aislamiento fueron claramente compatibles (menos del 1%).

Cuando algunos de los genes mayores descartados se consideren de particular interés, ellos se pueden reintroducir en las líneas derivadas de la población por medio de retrocruces, al final del proceso. La estrategia de utilizar marcadores moleculares puede ayudar sobremedida a la eficiencia de los retrocruzamientos, como lo demostraron Young y Tanksley (1989).

En el caso de que se conozca la estructura de la población del patógeno en el área para la cual se está trabajando, y existan donantes mejorados para la resistencia parcial, se puede intentar aplicar la estrategia de la exclusión de los linajes. Los genes eficientes contra el linaje patogénico que no estén presentes en el donante, podrían ser introducidos mediante retrocruzamientos.

Creación del Acervo Genético

Elección del aislamiento

Se evaluaron, en 50 progenitores potenciales, ocho aislamientos monoconidiales identificados entre aquellos más utilizados por el laboratorio de patología del IRRI. Estos aislamientos pertenecen a por lo menos dos linajes con diferentes patrones de virulencia. Como testigo se usó CO39, una variedad indica conocida por tener muy pocos genes mayores y baja resistencia parcial a piricularia. Se efectuaron pruebas de inoculación monocíclica, bajo condiciones de invernadero. Las plantas se desarrollaron en bandejas bien drenadas que contenían una

mezcla de suelos y fertilizantes (2.5 gramos de 14-14-14, un fertilizante completo, por 6.0 kg de suelo); el sulfato de amonio (4.0 gramos por bandeja) se aplicó 2 semanas después de la siembra. La densidad de siembra fue de 72 plantas por bandeja de 0.3 x 0.4 m.

Para la inoculación se utilizó una suspensión de 5×10^4 conidias/ml, mezcladas con 1% de gelatina; la solución se asperjó sobre plántulas de 21 días (4 a 5 hojas) hasta el punto de escurrimiento. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron por 24 horas en la cámara de incubación, con alta humedad relativa; enseguida se transfirieron al cuarto de incubación, también con alta humedad relativa.

Una semana después de la inoculación se evaluó la reacción a la enfermedad en cada línea, utilizando la escala de 0 a 5 para el tipo de infección, donde los grados 4 y 5 son considerados como compatibles. Para el aislamiento de mayor interés, la evaluación se repitió dos veces con un intervalo de 2 meses, con pequeños cambios en la lista de los cultivares. El resultado combinado de las inoculaciones se presenta en el Cuadro 1. El aislamiento V85-0256, que presenta el espectro de virulencia más amplio en los progenitores, se escogió como el aislamiento referencia.

El número de progenitores encontrados como compatibles con los aislamientos evaluados fue bajo, pero ese dato no es raro. Notteghem (1988) evaluó 98 aislamientos en 41 variedades, e indicó que el porcentaje promedio de virulencia fue de un 24% con gran variación, según el origen genético del aislamiento. Las variedades susceptibles eran, en su mayoría, las originarias de las Filipinas o las que tienen variedades de las Filipinas en su árbol genealógico. Las variedades restantes, originarias de África y de América

Latina, nunca se sembraron a gran escala en las Filipinas y, por lo tanto, la presión de esas variedades sobre la población local del hongo fue probablemente muy baja y no condujo a la aparición o al aislamiento de razas virulentas.

Elección de los progenitores

La composición del acervo genético se determinó cuidadosamente. Se preparó un listado de variedades de secano bien adaptadas a las condiciones asiáticas, variedades que se escogieron procurando representar una amplia diversidad en términos de origen geográfico, grupo varietal y reacción a la enfermedad. El número de variedades incluidas en el listado

fue mayor que el número necesario para la composición final, con el fin de permitir una selección entre variedades según sus compatibilidades o incompatibilidades con el aislamiento seleccionado, V85-0256. Para ajustarse al esquema de hibridación propuesto, se utilizó el mismo número de progenitores susceptibles y resistentes.

Se hicieron análisis isoenzimáticos en 12 loci, según el procedimiento descrito por Glaszmann et al. (1988); sobre la base de los resultados de estos análisis y de los coeficientes de parentesco se establecieron dos matrices de distancia. Para maximizar la distancia entre variedades, se escogió un conjunto final de 24 variedades (Cuadro 2).

Cuadro 1. Listado de los aislamientos evaluados.

Aislamiento	Ca 34	Ca 36	Ca 50	BN 98	Po6-6	E89011	V85-0254	V85-0256
Linaje	1	1	1	4	4	?	?	?
Número de líneas evaluadas	49	49	58	55	58	49	49	70
Número de líneas con reacción compatible	6	3	5	1	9	3	3	20
Líneas con reacción compatible (%)	12.2	6.1	8.6	1.9	15.5	6.1	6.1	28.6

Cuadro 2. Variedades escogidas como progenitores para el proyecto de selección recurrente.

Reacción compatible con el aislamiento	Grupo varietal	Reacción incompatible con el aislamiento	Grupo varietal
Azucena	6	62667	6
Arias	6	Araguaia	6
B 2997C-TB-60-3-3	1	Diwani	1
CT6510-24-1-2	1	IR58662-04	6
IR53236-280	1	IR60080-46A	6
IR55419-04	1	IR63380-08	6
IR55435-05	1	IRAT 104	6
IRAT 169 F10/6	1	IRAT 212	6
Lubang red	1	IRAT 216	6
Palawan	6	Ketan Menah	6
Speaker	6	P 5589-1-1-3P	6
Vandana	1	Med Noi	6

Esquema de la hibridación

El esquema de la hibridación se presenta en la Figura 1. Para preservar los diferentes citoplasmas, el esquema de hibridación es circular; como hay 24 variedades, en cada ronda se hicieron 24 cruces. Todos los cruces se hicieron a mano, y no se utilizó la androesterilidad.

Cada progenitor susceptible se cruzó con uno resistente. Se espera que todas las F_1 resultantes sean resistentes, ya que la resistencia debida a genes mayores es, en general, dominante. La segunda ronda de cruces envolvió intercruzamientos entre los F_1 . Los híbridos dobles resultantes están segregando para resistencia/susceptibilidad al aislamiento. La proporción de plantas susceptibles cambia según el número de genes mayores que controlan la resistencia al aislamiento y la distribución de esos genes entre los progenitores, como se muestra en el Cuadro 3.

Es muy probable que haya uno o dos genes que controlen la resistencia (Mackill et al., 1985); por lo tanto, se espera que una proporción razonable de plantas muestren reacción de compatibilidad con el aislamiento. En el presente caso, solamente esas plantas se trasplantaron al bloque de cruzamientos para la tercera ronda de cruces. La población final se creó con igual representación de cada uno de los híbridos de ocho progenitores, mezclando igual cantidad de semillas de cada cruce.

Este trabajo comenzó en 1994, y la primera ronda de cruces se hizo durante la estación invernal de ese año; la segunda ronda se hizo durante la estación seca de 1995. Simultáneamente se realizaron cruzamientos de prueba entre Maratelli, un genotipo altamente susceptible, y los progenitores resistentes, para identificar el número y la naturaleza de los genes mayores presentes en esos progenitores. La etapa de eliminación de los genes

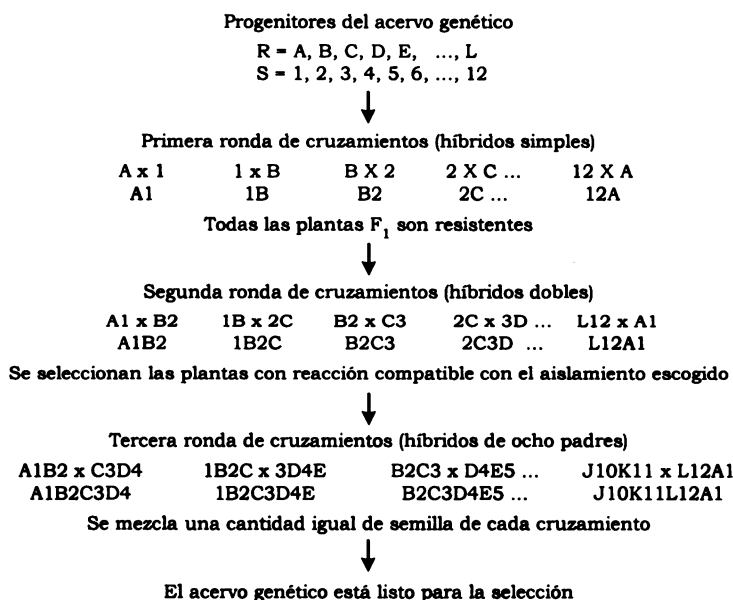


Figura 1. Creación del acervo genético mediante hibridación circular.

Cuadro 3. Proporción esperada de híbridos con reacción compatible con el aislamiento después de la segunda ronda de cruzamientos, según la constitución genética de los progenitores.

Constitución genética de los progenitores ^a					Híbridos A/1//B/2
Genotipo A (resist. al aislamiento)	Genotipo 1 (suscept. al aislamiento)	Genotipo B (resist. al aislamiento)	Genotipo 2 (suscept. al aislamiento)	Genes comunes A y B	Proporción esperada de plantas con reacción compatible
1 gen:					
R1	r1	R1	r1	1	1/4
2 genes:					
R1r2	r1r2	r1R2	r1r2	0	1/4
R1R2	r1r2	R1r2	r1r2	1	1/8
R1R2	r1r2	R1R2	r1r2	2	1/16
3 genes:					
R1R2r3	r1r2r3	r1r2R3	r1r2r3	0	1/8
R1R2R3	r1r2r3	r1r2R3	r1r2r3	1	1/16
R1R2R3	r1r2r3	R1r2R3	r1r2r3	2	1/32
R1R2R3	r1r2r3	R1R2R3	r1r2r3	3	1/64

a. R = alelo resistente; r = alelo susceptible.

mayores se cumplió durante la estación invernal de 1995, seguida inmediatamente por la tercera y última rondas de hibridación. El acervo genético con su aislamiento compatible estarán disponibles al final de ese año.

La extracción de líneas de la población comenzó enseguida, en cuanto se completó la última revisión de la naturaleza de la compatibilidad de todas las plantas de la población. Para crear el acervo genético se necesitan 2 años, que incluyen el período necesario para evaluar la reacción a piricularia de los progenitores potenciales.

Utilización del Acervo Genético

Esquema de mejoramiento

La selección recurrente es un proceso de dos etapas que combina la selección de las mejores unidades y el intercruzamiento de las mismas. Aquí se utilizará la técnica de la descendencia única de doble

haploides, propuesta por Gallais (1988) y que involucra el cultivo de anteras (Figura 2). En este esquema, los doble haploides se utilizan como una manera de fijar las líneas antes de la evaluación, y constituyen también las unidades de recombinación.

La elección de ese método de mejoramiento presenta varias ventajas. En primer lugar, es el esquema más eficiente en términos de progreso genético, cuando las características presentan baja heredabilidad en el sentido estricto (Gallais, 1993). Otra ventaja es que la evaluación de características como resistencia duradera a la piricularia, resistencia a la sequía y rendimiento de grano será considerablemente más fácil y eficiente en líneas fijas que en generaciones segregantes (S_1 y S_2 se utilizan, en general, en esquemas de selección recurrente, lo cual significa materiales heterocigóticos). Por otra parte, las líneas de doble haploides, mejorados, que se pueden utilizar directamente como variedades, son subproductos del proceso de selección recurrente.

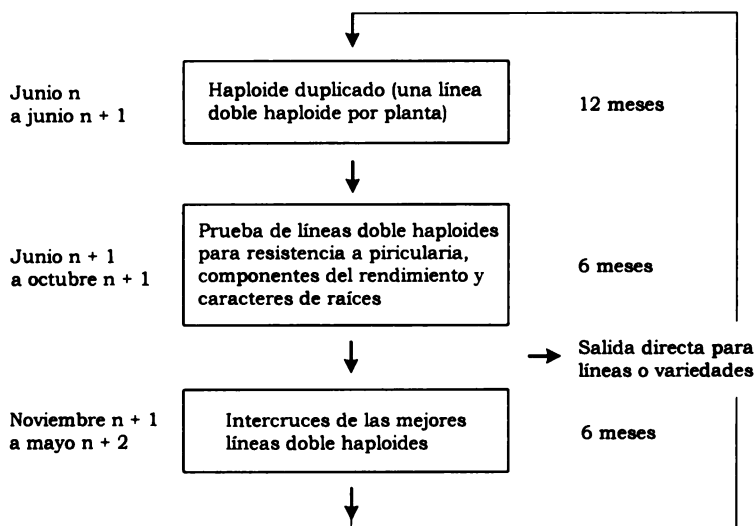


Figura 2. Descendencia única de doble haploides (Gallais, 1988).

Con ese esquema, por lo tanto, no se puede utilizar el gen de androesterilidad de la IR36, el cual podría facilitar el proceso de cruzamiento. Dicho gen se perdería después de la primera ronda del cultivo de anteras, la cual daría como resultado un 50% de plantas androfértiles y un 50% de plantas androestériles homocigotas. Por lo tanto, los cruzamientos se deben hacer a mano.

Ese esquema también supone que el cultivo de anteras es posible para todos los genotipos del estudio. Una baja respuesta al cultivo de anteras es generalmente la norma para las indicas, en tanto que las japónicas tropicales producen entre 1% y 10% (Guiderdoni et al., 1990; Courtois, resultados no publicados). Sin embargo, este problema puede estar limitado solamente a la primera generación, ya que la respuesta al cultivo de anteras es altamente heredable en arroz (Chen y Chen, 1993; Quimio y Zapata, 1990; Miah et al., 1985). Se está suponiendo que la extracción de líneas de la primera población (selección indirecta para la

respuesta al cultivo de anteras) facilite el proceso en los ciclos siguientes.

Para limitar las sorpresas ligadas con la errática respuesta al cultivo de anteras, se realiza simultáneamente la extracción de líneas S_2 del acervo genético, por lo menos en el primer ciclo.

Técnica de selección basada en el fenotipo

Cuando las líneas con doble haploides, obtenidas de las poblaciones, se seleccionan en el campo sobre la base de sus valores agronómicos mediante métodos clásicos, la selección para resistencia parcial a piricularia presenta algunas restricciones, según lo menciona Roumen (1994). Para limitar el riesgo de contaminación por diferentes aislamientos, la selección para resistencia parcial a piricularia se tiene que hacer en el invernadero, por medio de pruebas policíclicas, con inoculación artificial con el aislamiento seleccionado V85-0256.

La resistencia parcial se puede evaluar estimando el número relativo de lesiones en las hojas, en comparación con el testigo susceptible (CO39), y/o por medio de la proporción de hojas con reacción compatible. El segundo parámetro ha sido mostrado como muy bien correlacionado con el primero, y tiene la ventaja de ser más rápido para evaluar (Roumen, 1993).

Sabiendo que la interacción entre aislamiento y genotipo es supuestamente baja en el caso de la resistencia parcial (Roumen, 1993), para minimizar el riesgo asociado con un comportamiento atípico del aislamiento escogido, el CIRAD-CA realizará una evaluación paralela con varios aislamientos no originarios de las Filipinas, en Montpellier, Francia, donde existe una gran colección de aislamientos originarios de arroz de secano de diferentes regiones del mundo. Esta colección tiene algunos aislamientos altamente virulentos como CM28 o CL5 (Notteghem, 1988). El nivel de resistencia parcial de las líneas a ese aislamiento será determinado y comparado con los resultados obtenidos con V85-0256. Eso permitirá evaluar el riesgo de trabajar con solamente un aislamiento. Sin embargo, es probable que una pequeña parte de las líneas utilizadas no presente compatibilidad con ninguno de los aislamientos. Esas líneas serán eliminadas de los análisis de la interacción genotipo x ambiente.

La etapa de selección en el campo para características agronómicas también permite revisar, en condiciones de infestación natural, los resultados obtenidos en el invernadero. Se propiciará el uso esparcidores y de condiciones ambientales apropiadas, para incrementar y uniformizar la presión de piricularia, pero no hasta el punto de enmascarar las evaluaciones para otros caracteres.

Uso de marcadores genéticos

En varios puntos de este proyecto se utilizarán marcadores genéticos. Como se pudo observar anteriormente, en la selección de progenitores con diversidad para el esquema de selección recurrente, se usaron datos de análisis con isoenzimas. Para cada uno de los loci se identificaron dos alelos. Los dos principales agrupamientos de las variedades reflejan las diferencias entre indica y japónica. No se han observado correlaciones entre la matriz de distancias basada en los coeficientes de parentesco y la matriz basada en el análisis de isoenzimas para el grupo final de las variedades ($r = 0.11$). Eso tal vez se deba a que varios de los progenitores son materiales nativos, los cuales se supone que no presentan correlaciones entre ellos para los cálculos de los coeficientes de parentesco.

Los progenitores seleccionados ahora se están sometiendo a análisis con los marcadores de DNA, con el objetivo de conocer la diversidad alélica presente en las regiones de los cromosomas conocidos como responsables por tener genes con efectos mayores o menores para resistencia a piricularia. Con ese trabajo se espera generar informaciones sobre los genes de resistencia que tienen los progenitores. Finalmente, se espera poder utilizar los marcadores moleculares como herramientas de ayuda para el proceso de selección.

Con el desarrollo de la técnica de los marcadores moleculares, el conocimiento disponible sobre el control de la resistencia parcial está mejorando. En el IRRI está en marcha el mapeo de los bloques de genes favorables específicos (QTL) que afectan la resistencia a piricularia,

usando tres poblaciones y mediante la técnica del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN (RFLP).

En uno de esos estudios se utilizaron poblaciones homocigotas recombinantes ('recombinant inbred population'), derivadas de cruces entre Moroberekan y CO39, y se identificaron y localizaron en varios cromosomas los QTL que controlan la resistencia parcial a piricularia (Wang et al., 1994). Por lo menos en algunos casos, ellos parecen estar ligados a genes que confieren resistencia completa a piricularia, lo cual genera dudas sobre su verdadera naturaleza (McCouch et al., 1994).

En el presente se están haciendo análisis de QTL, utilizando una población homocigota recombinante derivada del cruce IAC 165/CO39 y una población de doble haploides derivada del cruce Azucena/IR64. Cuando se concluya el estudio, los resultados darán una idea clara de la estabilidad de los QTL en los ambientes y en las bases genéticas. Los resultados preliminares sugieren que algunos loci muestran significantes efectos según las poblaciones, las localidades y los años.

En la actualidad también se está evaluando la diversidad alélica de los progenitores seleccionados para el proyecto de selección recurrente, por medio de marcadores moleculares asociados con los más promisorios efectos de resistencia a piricularia. La estrategia inicial del proyecto engloba el uso de RFLP basado en evaluaciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Algunos de los marcadores de RFLP mapeados por McCouch et al. (1988) y Causse et al. (1994) han sido secuenciados en el IRRI por Bennett et al. (comunicación personal) y algunos de los marcadores mapeados en el proyecto japonés del genoma de arroz han sido

secuenciados por Inoue et al. (1994). Se están usando pares de precursores correspondientes a sitios de secuencias marcadas ('sequenced-tagged sites') localizados en vecindades de genes mayores y/o menores para ampliar loci marcados de los progenitores del acervo genético del proyecto de selección recurrente.

Los resultados preliminares han llevado a reconsiderar la estrategia propuesta. Se ha detectado muy bajo polimorfismo utilizando marcadores PCR de fragmentos amplificados ('PCR-amplified marker fragments'), y tampoco se ha detectado más después de la digestión de los productos del PCR con ocho enzimas de restricción. Entre los 16 loci analizados hasta ahora solamente dos mostraron polimorfismo entre los progenitores después de la amplificación de los fragmentos marcadores de DNA. Para nueve de los loci, los fragmentos amplificados fueron digeridos con seis y ocho enzimas de restricción que reconocen cuatro secuencias de base de DNA (Williams et al., 1991). Para dos de los loci se detectaron cuatro alelos, un locus presentó dos alelos después de la digestión con restricción y seis de los loci permanecieron monomórficos.

Se continúa la caracterización de los progenitores de la población con marcadores de RFLP, porque esta técnica permite evaluar una larga región genómica con cada prueba y, por lo tanto, se podrá observar un gran nivel de polimorfismo.

Mediante la combinación de los datos de los análisis que utilizan marcadores de DNA (PCR y RFLP), se espera identificar un grupo de haplotipos (un grupo compuesto de alelos de todos los marcadores probados) para cada segmento de cromosoma analizado. Para determinar la asociación entre los haplotipos y los fenotipos resistentes a piricularia, se hará la prueba de los

alelos marcados para las líneas de doble haploides que representan los grupos fenotípicos extremos (las líneas más resistentes y las más susceptibles).

Con la identificación de los alelos que mejoran la resistencia dentro del grupo de las líneas más resistentes (con los testigos adecuados) se espera determinar cuáles alelos probablemente están asociados con la reducción en el nivel de piricularia. Esas asociaciones se pueden confirmar utilizando poblaciones derivadas de los cruzamientos de prueba mencionados anteriormente. Los alelos más efectivos serán utilizados en la selección basada en marcadores ('marker-aided selection') en etapas futuras del proyecto.

El mapeo detallado, ya bastante adelantado en el caso de algunos genes mayores (Hittalmani, comunicación personal), se está haciendo también en la actualidad para algunos genes menores escogidos para este trabajo. En cuanto a los QTL que son consistentes entre genotipos y ambientes, el uso de 'flanking molecular markers' fuertemente ligados a los QTL de interés puede mejorar la precisión en la identificación de los genotipos. La situación ideal sería desarrollar un índice que tuviera en consideración tanto el aspecto fenotípico como los datos de los marcadores, para utilizarlos en el mejoramiento varietal.

Conclusión

La meta inicial, de crear un acervo genético de interés para la región sureste de Asia, está cerca de ser alcanzada. Luego se realizarán los trabajos para mejorar la resistencia parcial de la población y se harán estudios básicos para entender mejor la constitución genética de los progenitores de la población. El objetivo final de este proyecto es

mejorar la durabilidad de la resistencia a la piricularia, al mismo tiempo que desarrollar buenos materiales de arroz de secano. Los resultados anteriores han mostrado que, aunque es una tarea compleja, es posible mejorar el nivel de resistencia parcial a piricularia en poblaciones de arroz (Veillet, 1993; Roumen, 1993).

Referencias

- Bonman J. M.; Estrada, B. A.; Kim, C. K.; Ra, D. S.; y Lee, E. J. 1991. Assessment of blast disease and yield loss in susceptible and partially resistant rice cultivars in two irrigated lowland environments. *Plant Dis.* 75:767-769.
- Causse, M.; Fulton, T. M.; Cho, Y. G.; Ahn, S. N.; Chunwongse, J.; Wu, K. S.; Xiao, J. H.; Ronald, P. C.; Harrington, S. E.; Second, G.; McCouch, S. R.; y Tanksley, S. D. 1994. Saturated molecular map of rice genome based on an interspecific back-cross population. *Genetics* 138(4): 1251-1274.
- Chen, Z. y Chen, Q. 1993. Genetic studies of rice (*Oryza sativa* L.) anther culture response. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 34:177-182.
- Gallais, A. 1988. A method of line development using doubled haploids: The single doubled haploid descent recurrent selection. *Theor. Appl. Genet.* 75:330-332.
- _____. 1993. Efficiency of recurrent selection methods to improve the line value of a population. *Plant Breeding* 111:31-41.
- Glaszmann, J. C. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* 74:21-30.
- _____; De Los Reyes, B. G.; y Khush, G. S. 1988. Electrophoretic variation of isozymes in plumules of rice (*Oryza sativa* L.): A key to identification of 76 alleles at 24 loci. Documento de investigación IRRI no. 134. International Rice Research Institute (IRRI), Filipinas. 14 p.

- Goldringer, I. y Brabant, P. 1993. Sélection récurrente chez les autogames pour l'amélioration des variétés lignées pures: une revue bibliographique. *Agronomie* 13:561-577.
- Guiderdoni, E.; Courtois, B.; Boissot, N.; y Valdez, M. 1990. Rice somatic tissue and anther culture: current status in France. En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 14: Rice. Springer-Verlag, Berlin. p. 591-618.
- Inoue, T.; Zhong, H. S.; Miyao, A.; Ashikawa, I.; Monna, L.; Fukuoka, S.; Miyadera, N.; Nagamura, Y.; Kurata, N.; Sasaki, T.; y Minobe, Y. 1994. Sequence-tagged sites (STSs) as standard landmarks in the rice genome. *Theor. Appl. Genet.* 89:728-734.
- Kiyosawa, S.; Shimada, K.; y Ohta, K. 1984. Tests for pathogenicity of blast fungus isolates collected from the rice variety Hama Asahi, in Aomori Prefecture. *Jpn. J. Breed.* 34:485-489.
- Levy, M.; Romao, J.; Marchetti, M. A.; y Hamer, J. E. 1991. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. *Plant Cell* 3:95-102.
- Mackill, D. J.; Bonman, J. M.; Suh, H. S.; y Sriligam, R. 1985. Genes for resistance to the Philippine isolates of the rice blast pathogen. *Rice Genet. News.* 2:80-81.
- McCouch, S. R.; Kochert, G.; Yu, Z. H.; Wang, Z. Y.; Coffman, R.; Khush, G. S.; y Tanksley, S. D. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815-829.
- _____; Nelson, R. J.; Thome, J.; y Zeigler, R. S. 1994. Mapping of blast resistance genes in rice. En: Zeigler, R. S.; Leong, S. A.; y Teng, P. (eds.). *Rice blast disease*. Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI) e International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Filipinas. p. 167-186.
- Miah, M. A. A.; Earle, E. D.; y Khush, G. S. 1985. Inheritance of callus formation ability in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 70:113-116.
- Notteghem, J. L. 1985. Définition d'une stratégie d'utilisation de la résistance par analyse génétique des relations hôte-parasite. Cas du couple riz-*Pyricularia oryzae*. *Agron. Trop.* 40(2):129-147.
- _____. 1988. Variabilité de *Pyricularia oryzae* Cav., agent de la pyriculariose du riz. Informe final. EEC project TSD A 242 F (S). 38 p.
- _____. 1993. Durable resistance to rice blast disease. En: Jacobs, T. y Parlevliet, J. E. (eds.). *Durability of disease resistance*. Kluwer Academics Publishers, Holanda. p. 119-128.
- Parlevliet, J. E. 1983. Can horizontal resistance be recognized in the presence of vertical resistance in plants exposed to a mixture of pathogen races? *Phytopathology* 73(3):379.
- _____. 1988. Identification and evaluation of quantitative resistance. En: Leonard, K. J. y Fry, W. E. (eds.). *Plant disease epidemiology, genetics, resistance and management*, vol 2. McGraw-Hill, Nueva York. 377 p.
- _____. y Ommeren, A. van. 1988. Accumulation of partial resistance in barley to barley leaf rust and powdery mildew through recurrent selection against susceptibility. *Euphytica* 37:261-274.
- Quimio, C. A. y Zapata, F. J. 1990. Diallel analysis of callus induction and green plant regeneration in rice anther culture. *Crop Sci.* 30:188-192.
- Roumen, E. 1992. Small differential interactions for partial resistance in rice cultivars to virulent isolates of the blast pathogen. *Euphytica* 64:143-148.
- _____. 1993. Partial resistance in rice to blast and how to select for it. Tesis, Ph.D. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Holanda. 108 p.
- _____. 1994. A strategy for accumulating genes for partial resistance to blast disease in rice within a conventional breeding program. En: Zeigler, R. S.; Leong, S. A.; y Teng, P. (eds.). *Rice blast disease*. Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI) e International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Filipinas. p. 245-267.

- Veillet, S. 1993. Organization of the genetic variability and recurrent selection in rice (*Oryza sativa* L.). Tesis, Ph.D. Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris. 132 p.
- Wang, G. L.; Mackill, D. J.; Bonman, J. M.; McCouch, S.; Champoux, M. C.; y Nelson, R. J. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant cultivar. *Genetics* 136:1421-1434.
- Wang, Z.; Mackill, D. J.; y Bonman, J. M. 1989. Inheritance of partial resistance to blast in indica rice cultivars. *Crop Sci.* 29:848-853.
- Williams, M. N. V.; Pande, N.; Nair, S.; Mohan, M.; y Bennett, J. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products analyzed from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theor. Appl. Genet.* 82: 489-498.
- Young, N. D. y Tanksley, S. D. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the Tm-2 locus of tomato during back-cross breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77:353-359.
- Zeigler, R. S.; Thome, J.; Nelson, R.; Levy, M.; y Correa-Victoria F. J. 1994. Lineage exclusion: A proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. En: Zeigler, R. S.; Leong, S. A.; y Teng, P. (eds.). *Rice blast disease*. Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI) e International Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Filipinas. p. 267-292.