

NOTAS TÉCNICAS

AVANCES EN LA IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS A UN POSIBLE GEN DE RESISTENCIA A *Pyricularia grisea* EN LA VARIEDAD DE ARROZ FONAIAP 1

Advances in the identification of molecular markers associated to a possible gene for resistance to *Pyricularia grisea* in the rice variety FONAIAP 1

Erika Arnao¹, Alex González¹, Yorman Jayaro¹, Orangel Borges², Catalina Ramis² e Iván Galindo³

¹Fundación para la Investigación Agrícola DANAC, San Javier, estado Yaracuy; ²UCV, Facultad de Agronomía, Maracay;

³Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Caracas, Venezuela.

Fitopatol. Venez. 20:39-41, 2006.

Recibido: 15 de septiembre de 2006

Aceptado: 15 de diciembre de 2006

La enfermedad conocida como añublo o piricularia del arroz (*Oryza sativa* L.), causada por el hongo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc., es una de las enfermedades más devastadora del cultivo del arroz en el mundo. Muestra una amplia distribución, tanto en los agrosistemas tropicales como en las zonas templadas donde se cultiva el arroz comercialmente, causando pérdidas cercanas a un 50% de la producción en campos moderadamente infectados por el patógeno. Se ha estimado que cada año, el hongo destruye plantaciones de arroz en el mundo suficientes para alimentar un estimado de 60 millones de personas (10) y en Estados Unidos, los agricultores de arroz han sufrido pérdidas cercanas a los 5 billones de dólares por año (9).

La resistencia genética ha sido la práctica más adecuada para controlar la enfermedad. Sin embargo, se ha observado el rompimiento de la misma al poco tiempo (dos a tres años) del lanzamiento de las variedades resistentes, principalmente por la aparente adaptación del patógeno a los genes de resistencia liberados (3, 4). El uso de genes simples impone una alta presión de selección por variantes del hongo con genes de virulencia capaces de vencer la resistencia. Esta relación ha dificultado el mejoramiento para resistencia, ya que el patógeno tiene la capacidad de evolucionar más rápidamente, en relación con el tiempo necesario para producir una nueva variedad de arroz. Por ello, la obtención de cultivares con durabilidad de la resistencia a *P. grisea* es uno de los principales objetivos en los programas de mejoramiento de arroz, siendo, la obtención de nuevas fuentes de resistencia, un requisito básico. Recientemente se ha propuesto como una vía para mejorar la durabilidad de la resistencia a piricularia, la "piramidación" de genes de resistencia, consistente en la combinación de dos o más genes de resistencia en un solo cultivar para proporcionarle resistencia multigénica a un amplio espectro de razas del patógeno (2).

Muchos cultivares de arroz han mostrado resistencia duradera a *P. grisea*, los cuales son usados como donantes de resistencia en diversos programas de mejoramiento a nivel mundial. En Venezuela, generalmente los programas de mejoramiento genético de arroz cuentan con fuentes de resistencia a *P. grisea*, cuyos factores genéticos no han sido identificados. Ello dificulta su efectiva incorporación en la constitución genética de las variedades mejoradas, caso contrario sucede en Japón, donde al menos 20 genes de resistencia a *P. grisea*, incluyendo genes mayores y loci de

caracteres cuantitativos o QTLs, por sus siglas en Inglés, han sido localizados en los cromosomas y algunos clonados (6). Ello plantea la necesidad de impulsar investigaciones dirigidas a lograr la ubicación precisa de los genes que controlan la resistencia, con el fin de hacer más rápido y eficiente el desarrollo de nuevas variedades de arroz resistentes a piricularia mediante el uso de selección asistida por marcadores.

La variedad venezolana de arroz 'Fonaiap 1' ha mostrado desde su liberación, hace más de 10 años, resistencia a la mayoría de razas de *P. grisea* presentes en Venezuela y ha sido usada como donante de la resistencia en los programas de mejoramiento. En 1998 se inició un programa de retrocruzas para incorporar resistencia a la variedad comercial Cimarrón, usando a "Fonaiap 1" como progenitor donante (Borges, comunicación personal). Mediante el uso de marcadores moleculares para la selección de genotipos de arroz similares al padre recurrente (Selección por background), en la actualidad se cuenta con líneas homocigotas (RC₃F₃) muy similares a Cimarrón con la ventaja adicional de ser resistentes a *P. grisea* (1).

La identificación de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia posibilitaría la obtención de combinaciones de genes de resistencia diferentes. En tal sentido, se planteó en este estudio identificar marcadores microsatélites (SSRs) asociados al posible gen de resistencia presente en "Fonaiap1", con el fin de facilitar su manipulación en los Programas de mejoramiento de arroz a través de esquemas de Selección Asistida por Marcadores (SAM).

Para ello se realizó un cruzamiento usando a 'Cimarrón' y a 'Fonaiap1' como progenitores. En 200 plantas F₂ provenientes de dicho cruzamiento se evaluó el modo de herencia de la resistencia a *P. grisea*, inoculándolas a los 15 días después de la siembra con el aislamiento monospórico de amplio espectro de virulencia denominado 39003. Ocho días después de la inoculación se evaluó la reacción de las plantas frente al patógeno utilizando la escala del Sistema de Evaluación Estándar de arroz (7), modificada en el CIAT para uso en evaluaciones de invernadero (Cuadro 1). Las proporciones entre plantas resistentes y susceptibles fueron evaluadas con el fin de determinar el número de genes que controlan la característica. El número de plantas resistentes y susceptibles observadas en la generación F₂ fue de 148 y 52, respectivamente, lo cual se ajustó a una proporción 3:1 según la prueba de Chi-cuadrado, indicando la presencia de un gen simple dominante para la resistencia.

susceptibles) fueron evaluados con los 76 SSRs polimórficos, para determinar el polimorfismo entre los grupos.

Utilizando la metodología BSA no se encontró asociación de los SSRs evaluados y el gen de resistencia detectado en el análisis de segregación fenotípica de la generación F₂. Ningún marcador presentó polimorfismo entre los grupos resistentes y los grupos susceptibles. Por este motivo se tomó una muestra de 94 plantas F₂ para realizar un análisis de ligamiento entre el posible gen de resistencia y 27 SSRs polimórficos, 11 de los cuales se ubican en los cromosomas 4 y 7. A partir de los datos moleculares se realizó una prueba de Chi-cuadrado para seleccionar aquellos SSRs que cumplieran con la hipótesis de segregación 1:2:1, de modo que sirvieran de referencia para generar luego el mapa de ligamiento.

El análisis de ligamiento entre los marcadores SSRs y la resistencia se determinó con el Programa Linkem (versión 1.2). Sólo 12 de los SSRs evaluados se ajustaron a la proporción esperada y el análisis de ligamiento arrojó valores de LOD score (logaritmo del cociente de verosimilitud de ligamiento) menores a 3.0, por lo que se rechaza la hipótesis de ligamiento. Sin embargo, el mayor valor de LOD fue para el marcador RM346 (LOD 0.73 y un r=0.38) ubicado en el cromosoma 7, coincidiendo con un estudio previo, el cual arrojó evidencias de la posible ubicación del gen en ese cromosoma (1). Por tal motivo, se prevé continuar evaluando un mayor número de SSRs ubicados en ambos brazos del cromosoma 7, a fin de realizar un mapeo más preciso del origen de la resistencia observada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan especial agradecimiento al Proyecto BID-FONACIT II (Subproyecto N° 2004000657) por su apoyo financiero parcial en esta investigación.

LITERATURA CITADA

1. Arnao, E., Borges, O., Ramis, C., Díaz, A. y Galindo, I. 2006. Recuperación del genoma del padre recurrente en un programa de retrocruzas asistido por marcadores en arroz. *Interciencia* 31: 431-436
2. Conaway-Bormans, C.A., Marchetti, M. A., Johnson, C.W., McClung, A.M. and Park, W.D. 2003. Molecular markers linked to the blast resistance gene *Pi-z* in rice for use marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1014-1020
3. Correa-Victoria, F. J. and Zeigler, R. S.. 1993. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot Spot" breeding site in Eastern Colombia. *Plant Disease* 67:1029-1035
4. Correa-Victoria, F., Zeigler, R.S. and Levis, M. 1994. Virulence characteristics of genetic family of *Pyricularia grisea* in Colombia. In: R.S. Zeigler, S.A. Leong and P.S. Teng (eds.). *Rice Blast Disease*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. p.211-229.
5. Dellaporta, S., Wood, T. and Hicks, T. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol Biol Reporter* 1: 19-21
6. Donald, P.C. 1997. The molecular basis of disease resistance in rice. *Plant molecular Biology* 35: 179-186
7. International Rice Research Institute (IRRI). 2002. Standard Evaluation System.
8. Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
9. Moffat, A.S. 1994. Plant genetics - Mapping the sequence of disease resistance. *Science* 265: 1804-1805
10. Roy-Barman, S. and Chatto, B.B. 2005. Rice blast fungus sequence. *Current Science* 6:930-931.