

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Aníbal L. Tapiero¹,
Diego Aristizábal¹
y Morris Levy²

ABSTRACT

Title: Lineaje-exclusion, a strategy for breeding rice with durable resistance to *Pyricularia grisea* Sacc. in Colombia

Rice blast has challenged plant breeders when they were searching for durable resistance in Colombia. Rapid resistance breakdowns were commonly observed in newly bred cultivars and they are attributed to frequent appearance of new pathotypes. Recent population studies of the rice blast pathosystem have shown that *Pyricularia grisea* in a given region, typically expresses a phylogenetic organization of distinct lineages ('genetic families' as defined by MGR-DNA fingerprinting). Each lineage exhibits a definable virulence spectrum, and the potential for developing new pathotypes appears to be constrained by lineage-specific avirulences. Lineage-exclusion is a breeding strategy aimed to enlighten the choosing of genes to obtain more durable resistance in the field.

Combining genes that complementary exclude fragments of virulence, will provide complete resistance to known lineages. The resistance of pyramids bearing the major resistance genes *Pi-1 (t)* and *Pi-2 (t)* was determined at three sites in a primary rice growing region in Colombia, from 1996 to 1998. The chosen R-genes are individually defeated by common lineages in Colombia, but combined, provide resistance to the complementary spectra of virulence. The pyramids were selected by screening the progeny of a cross of near-isogenic lines with the representative. The presence and homozygosity of both genes were confirmed through molecular markers. Neither single Colombian isolate, nor mixture of isolates infected the pyramids. The pyramids proved to be highly resistant in the field, and no major changes in lineage composition or virulence spectrum were observed. However, some moderately compatible isolates of lineage SRL-6 were transiently observed in the area of Santa Rosa. Resistance breakdown (vulnerability) may depend on within lineage rather than between lineage distributions of virulence.

Key words: rice, lineage-exclusion, *Pyricularia grisea*, resistance, virulence.

1. C.I. La Libertad, CORPOICA, km 17 vía Puerto López, Villavicencio, Colombia; e-mail: atapiero@col1.telecom.com.co; 2. Purdue University, West Lafayette (IN), USA.

Exclusión de linajes como estrategia para la obtención de resistencia durable en el arroz a *Pyricularia grisea* Sacc. en Colombia

RESUMEN

La durabilidad de la resistencia genética del arroz a *Pyricularia grisea* Sacc. había estado comprometida en Colombia, por una rápida adaptación aparente del patógeno a los genes dispuestos para contrarrestar su incidencia. Las variedades mejoradas se veían afectadas por la enfermedad en el curso de pocos años y, en ocasiones, a sólo meses de haber sido liberadas. La exclusión de linajes es una estrategia de mejoramiento que propone la identificación y posterior 'piramidación' de genes con habilidad para reconocer de manera complementaria las avirulencias de las familias genéticas (linajes) del patógeno. Poblaciones ecológicamente distintitas, caracterizadas molecularmente mediante la sonda MGR-586, exhiben una estructura clonal en la que cada aislamiento del linaje comparte históricamente el mismo espectro de virulencia. La resistencia obtenida con la piramidación de genes complementarios funciona como factor de exclusión hacia la totalidad de la virulencia en la población del patógeno en un ecosistema determinado. Así, en Colombia, los genes *Pi-1 (t)* y *Pi-2 (t)* son diferencial y complementariamente excluyentes de la virulencia de las poblaciones de *P. grisea*. Fueron obtenidas líneas con estos genes piramidados mediante el cruzamiento de dos líneas isogénicas; la presencia y condición homocigota de los genes de resistencia en las nuevas líneas fue establecida a través de marcadores moleculares. El comportamiento de las pirámides fue evaluado en el laboratorio, en cámaras de crecimiento con aislamientos representativos de los linajes colombianos y, en el campo, en una región dedicada tradicionalmente a la producción de arroz donde las epidemias de piricularia son frecuentes. Tanto en las inoculaciones artificiales, como en las áreas de cultivo, las pirámides conservaron la resistencia. La estructura de virulencia entre la población del patógeno en el campo permaneció estable durante tres años, aunque estacional y transitoriamente se identificaron algunos aislamientos virulentos a las pirámides en la estación experimental.

Palabras claves: arroz, exclusión de linajes, *Pyricularia grisea*, resistencia, virulencia.

INTRODUCCIÓN

LA PIRICULARIA, enfermedad del arroz (*Oryza sativa*) causada por el hongo filamentoso *Pyricularia grisea* Sacc. –forma imperfecta del ascomyceto *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. – (Rossman *et al.*, 1990), había confundido por décadas a los programas de mejoramiento que procuraban resistencia genética durable, pues las variedades mejoradas perdían usualmente su resistencia a la enfermedad corto tiempo después de haber sido liberadas, ocasionando cuantiosas pérdidas. La causa de la reducción del tiempo efectivo de resistencia se había atribuido a una variación constante de la virulencia del patógeno, con un patrón de aparición regular y

posterior adaptación de nuevos patotipos.

El patógeno infecta hojas, nudos e inflorescencias del arroz. Las lesiones en la hoja adquieren típicamente la forma de huso, con centro de color gris y márgenes de color café. Al expandirse y coalescer, dependiendo del ambiente y del manejo del cultivo, las lesiones provocan el secamiento de los tejidos y ocasionan la muerte de las plantas. En tallos e inflorescencias, el patógeno afecta los nudos y el raquis, lo que restringe el movimiento de fluidos y nutrientes. Períodos prolongados de rocío, intermitencia en el riego y excesos de fertilización nitrogenada favorecen el desarrollo de la enfermedad, que se presenta prácticamente en cualquier región donde se cul-

tiva arroz y particularmente en suelos pobres.

Aunque la utilización de resistencia genética ha sido la práctica más adecuada para el control de la enfermedad en tiempos modernos (Correa-Victoria *et al.*, 1994), su pérdida recurrente había conducido a un importante incremento en el uso de fungicidas. La duración de la resistencia parecía limitada por la constante aparición de nuevos patotipos en el campo. Sin embargo, caracterizaciones moleculares de diferentes poblaciones del patógeno alrededor del mundo han permitido establecer que la variabilidad en la virulencia se restringe a tasas de variabilidad típicas esperadas por mutación. La creencia difundida en el pasado sobre una rápida emergencia de nuevas razas, incluso a partir de cultivos monospóricos (Ou, 1985), quedaba así sin argumento.

Con base en el análisis estadístico de la estructura de asociación (agrupamiento o *cluster analysis*) de los fragmentos resultantes (*fingerprints*), al hibridar el ADN citoplasmático del hongo con una sonda molecular neutral (denominada 'MGR' por *Magnaporthe grisea* repeat) fue posible discernir la estructura poblacional de *P. grisea* en el campo (Levy *et al.*, 1991). En general, la población del patógeno se caracteriza por un conjunto de asociaciones discretas separables (familias genéticas o linajes), cada una de ellas con un espectro de virulencia definido. La ausencia (u ocurrencia limitada) de la reproducción sexual en la naturaleza contribuye a la conservación de las avirulencias (incompatibilidades específicas) inherentes a todos los aislamientos pertenecientes a un mismo linaje. El conjunto de virulencias por linaje define a su vez el espectro total de virulencia de la población, cuya diversidad parece restringida a fenómenos de mutación o migración en un área ecológica determinada. De esta manera, el origen, el nivel de adaptación y los patrones de dispersión de los patotipos en el campo, pueden establecerse con base en el grado de conservación de los linajes entre la población.

La piricularia del arroz ha sido propuesta como sistema modelo para hongos fitopatógenos filamentosos. Aunque la especie *M. grisea* es patógena para diversos pastos y cereales, en aislamientos individuales se mantiene un rango limitado de hospederos (Valent, 1990). Adicionalmente, los individuos patogénicos al arroz pueden agruparse por patotipos o razas fisiológicas, de acuerdo con los mecanismos sugeridos por los modelos clási-

cos de "gen-por-gen" en la relación hospedero-patógeno (Silue *et al.*, 1992).

La práctica convencional de combinar genes mayores de resistencia en una variedad individual (llamada 'pirámide') (Agrios, 1997) es efectiva en tanto exista la presunción de una fuerte selección por especificidad sobre ciertos genes, poca posibilidad de sobrevivencia de patotipos con amplio rango de virulencia y migración mínima de nuevas virulencias. Estas presunciones asumen limitaciones en la recombinación (sexual o asexual) entre individuos diferenciables patogénicamente. Bajo estos parámetros, la estructura de la población y la jerarquía organizacional que determina la diversidad del patógeno serían el fundamento para determinar eficientemente los genes de resistencia para el mejoramiento.

La definición de límites de virulencia (patogenicidad específica) por linaje hace posible la identificación de genes de resistencia eficientes contra la totalidad de individuos pertenecientes al linaje (Zeigler *et al.*, 1995). Aquellos genes que, aunque susceptibles individualmente a la virulencia de ciertos linajes, al combinarse condujeran a la exclusión completa del espectro de virulencia serían los apropiados para un programa de mejoramiento por resistencia. Esta estrategia, denominada 'exclusión de linajes', extendería la durabilidad de la resistencia en una variedad piramidada con dicha combinación de genes, teniendo en cuenta la limitada posibilidad de recombinación genética del patógeno en el campo.

Levy *et al.* (1991) desarrollaron una técnica basada en el polimorfismo por tamaño de los fragmentos de restricción del ADN (RFLP) para analizar la diversidad genética del patógeno en el campo utilizando una sonda que identifica secuencias repetitivas en *P. grisea* (MGR-586) y que funciona como un marcador molecular 'multi-locus' genéticamente neutral en virtud de su inespecificidad (Hamer *et al.*, 1989). Mediante análisis estadístico de asociación (agrupamiento o *cluster analysis*) de los MGR-586 *fingerprints*, obtenidos a través de la hibridación del ADN, es posible caracterizar las poblaciones del patógeno por región ecológica. Éstas aparecen típicamente organizadas en grupos filogenéticos discretos, linajes o familias genéticas, mantenidas en el tiempo por la predominancia o exclusiva asexualidad del patógeno cuya estabilidad temporal ha sido comprobada en Estados Unidos de América (Levy *et al.*, 1991), Colombia

(Levy *et al.*, 1993); (Correa-Victoria *et al.*, 1994), Filipinas (Zeigler *et al.*, 1995), Europa (Romao and Hamer, 1992), el sudeste de China (Shen *et al.*, 1998), el sudeste de India (Sivaraj *et al.*, 2000) y Tailandia (Mekwatanarkarn *et al.*, 2000).

El análisis de una muestra extensa de aislamientos conformada durante varios años en Santa Rosa (Villavicencio, Meta), sitio comparativamente rico en patotipos de Colombia, permitió caracterizar una población compuesta por sólo seis linajes (Levy *et al.*, 1993). Cada uno de estos linajes es virulento a subgrupos específicos de variedades colombianas y diferenciales de piricularia del arroz, como una red de subgrupos de patotipos no entrelazados. La totalidad de los aislamientos en cada linaje conservan una virulencia semejante con cambios en patogenicidad históricamente restringidos a ciertos rangos, lo cual sugiere un ancestro común (Correa-Victoria and Zeigler, 1993). Las variedades susceptibles a los aislamientos de un determinado linaje pueden resultar resistentes a los de otros, cuyas avirulencias se identificarían por sus respectivos genes de resistencia en la totalidad de los miembros del linaje correspondiente (Zeigler *et al.*, 1994).

La caracterización de un numeroso grupo de aislamientos en Filipinas permitió identificar genes mayores de resistencia a linajes específicos (Zeigler *et al.*, 1995). Para el efecto, se utilizaron líneas isogénicas (NIL) obtenidas mediante retrocruzamiento de donantes con genes mayores usando la variedad de arroz tipo Índica (CO39) ampliamente susceptible (Mackill and Bonman, 1992). Cada linaje (es decir, todos los aislamientos pertenecientes a un mismo linaje) fue incompatible con una o más NI, mientras que la línea NIL C101A51 (con el gen *Pi-2(t)*) fue la más resistente. Sin embargo, todas las NIL fueron susceptibles a por lo menos un linaje y cada una fue susceptible a por lo menos un aislamiento. Individualmente, ningún gen de resistencia tuvo la capacidad para excluir la totalidad de la virulencia evaluada.

Tal especificidad en las relaciones hospedero-patógeno entre variedades de arroz y linajes de *P. grisea* determinados por MGR-586 *fingerprinting*, conjuntamente con la distribución de virulencia/avirulencia entre la población del patógeno, llevó a formular la estrategia de mejoramiento denominada "exclusión de linajes" (Zeigler *et al.*, 1994). Asumiendo que el potencial para desarrollar un nuevo patotipo estaría restringido por

límites de virulencia específicos a cada linaje, posiblemente por necesidades de conservación de funciones indispensables inherentes a los genes de avirulencia, y que la composición de linajes en un área ecológica es estable, aquella combinación de genes que complementariamente confieran resistencia a la virulencia de los linajes excluiría a la totalidad de la población.

En Colombia, se cultivan más de 400.000 ha de arroz cada año; de éstas, alrededor de 100.000 se siembran en los Llanos Orientales, donde se distinguen dos paisajes predominantes: el piedemonte y la altillanura (sabanas). La altillanura esta básicamente conformada por grandes extensiones de sabanas planas, con vegetación escasa, suelos arenosos poco evolucionados, altos contenidos de Fe^{3+} y Al^{4+} , rodeadas por una intrincada red de bosques de galería. Por su parte, el piedemonte, también plano, se caracteriza por suelos más ricos en materia orgánica y otros nutrientes, remanentes de bosques tropicales talados para el cultivo de pastos y cereales. La mayoría de los cultivos en la región se localizan en el piedemonte. El 70% del arroz cultivado es irrigado mientras que el resto depende de la lluvia (secano). Esparcidos en la altillanura, se encuentran cultivos pequeños establecidos ancestralmente, básicamente para autoconsumo. La producción promedio de arroz paddy, por sistema de cultivo, oscila entre 5.800 kg/ha en riego y 4.800 kg/ha en secano.

La región se caracteriza por una estación seca de diciembre a marzo y una estación lluviosa (más de 200 mm de precipitación por mes en promedio) de abril a noviembre, con un corto descenso en la precipitación desde mediados de julio a mediados de agosto. Durante los meses de mayor precipitación (abril, mayo, junio y octubre) se registran hasta 400 mm de lluvia por mes. La temperatura promedio anual es 26°C con diferencias entre máxima y mínima de 14°C en promedio, y aún mayores durante la estación seca. El brillo solar promedio se mantiene usualmente por debajo de 5 h, particularmente durante la estación húmeda. La humedad relativa es de 65% en promedio y alcanza 85% durante la estación lluviosa; además, extensos períodos de rocío que favorecen la germinación de *P. grisea* son comunes durante todo el año (Tapiero-Ortiz, 1991).

Se ha realizado considerables esfuerzos para reducir las pérdidas causadas por la piricularia del arroz en Colombia.

A tal fin, se ha implementado con poco éxito técnicas de mejoramiento, tales como la piramidación de genes mayores de resistencia, el uso de multilíneas y la rotación de genes con base en sistemas de prevención. Hasta 1990, 11 de las 20 variedades liberadas por los programas de mejoramiento habrían resultado susceptibles a piricularia en el curso de pocos años y las últimas cuatro, en menos de un año. La utilización de fungicidas, que puede alcanzar hasta 12% del total de los costos de producción, se había mantenido como la estrategia más popular de control (Tapiero-Ortiz, 1991).

En 1985 fue acondicionada la estación experimental Santa Rosa para el mejoramiento de arroz, en el piedemonte llanero. Allí, con el objeto de incrementar la presión de selección durante el proceso de mejoramiento y favorecer la expresión de patotipos con baja frecuencia entre la población, periódicamente se han inoculado variedades comerciales y diferenciales a piricularia, las cuales fueron fertilizadas con altos niveles de nitrógeno (Zeigler *et al.*, 1994). Una red de dispersores, compuesta por los mismos materiales y ubicada alrededor de las parcelas con las selecciones a evaluar, ayuda a incrementar la presión de inóculo. El sitio conserva la más diversa representación de patotipos de *P. grisea* disponible en Colombia y ha demostrado ser eficiente para evaluar la resistencia a piricularia del arroz en América Latina. En Santa Rosa se seleccionó la variedad Oryzica Llanos 5, utilizada desde 1989 como referencia de resistencia a piricularia en los más diversos ambientes alrededor del mundo y

que sirvió para dilucidar nuevas pautas fundamentales para la búsqueda de estrategias de mejoramiento. En dicha estación experimental también se seleccionó Fedearroz 50, una variedad comercial de arroz que, adoptando los criterios de selección por "exclusión de linajes", mostró y aún conserva resistencia a *P. grisea* desde su lanzamiento en 1998 (Corredor y Holguín, 1997).

La investigación que aquí se reporta evalúa la capacidad de adaptación de *P. grisea* ante la introducción de genes con resistencia complementaria para excluir la virulencia de los linajes de piricularia del arroz predominantes en Colombia, buscando establecer la eficacia de una nueva metodología para aumentar la durabilidad de la resistencia.

Materiales y métodos

La patogenicidad de aislamientos representativos de los linajes predominantes de *P. grisea* en Colombia (Levy *et al.*, 1993) a los genes de resistencia tentativos (t) identificados por Mackill y Bonman (1992), fue establecida mediante inoculaciones artificiales en cámaras de crecimiento en la Universidad de Purdue (West Lafayette, Indiana, EUA). Para la evaluación se utilizó una progenie derivada del cruzamiento realizado por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) entre las líneas C101A51 X C101LAC, que portaban los genes *Pi-2(t)* y *Pi-1(t)*, respectivamente. Los genes identificados actuaron complementariamente en la exclusión del espectro de virulencia de piricularia en Colombia (Tabla 1).

Tabla 1. Reacción de dos líneas isogénicas a aislamientos de *Pyricularia* grisea organizados según los linajes comúnmente identificados en Colombia

Línea	Gen ²	Linaje ¹											
		1	2	3	4	5	6a	6b	6c	7	9	10	13
C101A51	Pi-2(t)	S ³	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
C101LAC	Pi-1(t)	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S
Aislamientos/linaje		11	11	5	19	30	22	5	8	17	7	13	2

¹ Linajes determinados mediante la sonda MGR-586 fingerprinting.

² Gen tentativo (Mackill and Bonman, 1992).

³ Reacción basada en 8 plantas/variedad. S = susceptible (lesiones típicas en forma de huso con al menos 2% del área foliar afectada), R = resistente.

Tabla 2. Aislamientos utilizados para seleccionar la progenie del cruce C101A51 X C101LAC en el invernadero

Linaje	Aislamiento	No. de serie ¹	Linaje	Aislamiento	No. de serie ¹
SRL 1		SR 13018	SRL 6c	I 3-12-2	R 29005
SRL 2	CICA9-37-1²	AL13014		I 3-2-2	SR 29004
	CICA9-38-1	AL13015		I 3-4-1	SR 29050
	CICA9-36-1	AL13013		I 5-3-1	SR 29008
	Línea2-15	SR38005		I 5-5-3	SR 29057
	Línea2-20	SR38007		FN-28-2-1	AL 18027
	OLL5-25	SR55014		I1 -2-1	SR 29046
	Línea23-9-1	AL44021		I5-10-2	SR 29009
	PAPERU2-1	SR195001			
	MTU9-1-2	SR191000			
SRL 5	FN-47-1	SR 18036	SRL 6b	DULAR16-1	AL 16006
	I 6-5-2	SR 29010		FN-26-5	AL 18023
	I 9-1-1	SR 29016		FN-45-1	AL 18034
	I 9-9-2	SR 29017		CICA8-104-1	SR 12002
	I 14-6-2	SR 29080		CEYSV27-1	SR 6068
	I 16-4-1	SR 29084		CEYSV27-2	SR 6038
	I 18-1-2	SR 29088		ORY2-19-2	SR 52001
	I 20-3-2	SR 29038	ALL 9b	TSU2-1	AL 70001
	IR42-4-4	SR 26009			
	IR42-5-2	SR 26011	ALL 10	CT-80000	AL 150000
				K1-18-1	LL 30008
			ALL 13	K51-9-1	AL 33002
SRL4		SR 29029	ALL 7		AL 71002

¹ Identificación de archivo en Purdue University, laboratorio de M. Levy.

² Los resaltados en negrilla señalan los aislamientos utilizados para las mezclas de aislamientos con virulencia complementaria.

Tabla 3. Resistencia de la progenie de la planta No. 12 del cruzamiento C101A51 X C101LAC a aislamientos representativos de *Pyricularia grisea* en linajes colombianos¹

Progenie	Linaje	Resistente	Susceptible ²	Total	
		Plantas			
F ₂	2 + 5 en mezcla ³	73	60	133	$\chi^2 = 1.7$ ($P > 0.2$)
	2 + 5 en serie	65	67	132	
F ₃	En mezcla ³	Descendientes por planta ⁴			
	2 + 5	52	109	161	
	5 + 6b + 6c + 9	4	13	17	
	6c + 9 + 10 + 13	8	1	9	
F ₄	6c + 9 + 10 + 13	9	0	9	

¹ Linajes determinados mediante la sonda MGR-586 *fingerprinting*.

² Plantas con lesiones típicas en forma de huso y más de 2% del área foliar afectada.

³ En mezcla: inoculaciones con aislamientos combinados. En serie: con aislamientos individuales (cada 5 días). La prueba de χ^2 compara los resultados entre estas dos técnicas.

⁴ Todas las pruebas fueron realizadas en 16 plantas/progenie.

Las plantas de la F₁-F₃ de esta progenie fueron subsecuentemente evaluadas en el invernadero con aislamientos representativos de los linajes colombianos (Tabla 2). Una vez identificadas en el invernadero, las progenies aparentemente no segregantes (Tabla 3), fueron plantadas en tres sitios representativos

(Granada, Santa Rosa y Puerto López) de los dos ecosistemas predominantes para el cultivo del arroz en los Llanos Orientales (sabana y piedemonte), durante tres años y hasta por cuatro épocas por año. Los sitios están ubicados en un área localizada entre las coordenadas 04:8°N, 72:50°W – 03:35°N, 73:44°W; y a

una altitud entre 300 y 400 metros sobre el nivel del mar y separados 150 km entre sí. Los vientos prevaletentes soplan con dirección ENE-WSW y ESE-WNW, desde la altillanura hacia el piedemonte. La precipitación total durante el proceso fue 3.1 m en 1996 y 2.44 m en 1997, con aproximadamente 2/3 del total anual acumulado entre abril y agosto. La temperatura promedio fue 26°C durante estos dos años, con máximas de 31°C (1996) y 34°C (1997) y mínimas de 21°C y 20°C, respectivamente (Edgar Almanza, C.I. La Libertad, CORPOICA, comunicación personal).

Variedades diferenciales a *pyricularia* fueron sembradas junto con la selección de las líneas piramidadas (pirámides) en el campo (Tabla 4). Éstas funcionaron como indicadores de cambios en la virulencia y/o agresividad del patógeno en un ambiente natural, en tanto que las diferenciales se utilizaron para estimar la amplitud del espectro de virulencia del patógeno en la región, a la vez que servían de trampas receptoras y dispersadoras de inóculo.

El tipo de lesión y el área foliar afectada (AFA) fueron determinados a intervalos entre el estado final de la plántula y el inicio del macollamiento, utilizando la escala de 0-9 del sistema estándar de evaluación para *pyricularia* elaborada por el Instituto Internacional de Investigación en Arroz (IRRI). Los grados entre 0 y 4 de esta escala diferencian el tipo de lesión (desde ausencia de lesiones hasta presencia de lesiones típicas que cubren el 2% del área foliar), mientras que los grados entre 5 y 9 determinan la severidad con base en incrementos de AFA (2%-100%). En esta escala, hasta el grado 3 se asimila con resistencia, 4 es resistencia moderada, 5 significa susceptibilidad moderada y arriba de 5, susceptibilidad. Con el objeto de establecer la formación de nuevas virulencias, de las lesiones formadas en las pirámides en el campo, se aislaron cultivos monospóricos cuya patogenicidad fue evaluada en sus respectivas fuentes de origen y las NIL. También fueron reinoculados cultivos monospóricos de lesiones atípicas observadas en las pirámides durante las pruebas de patogenicidad

Los MGR-586 *fingerprints* de cultivos monospóricos provenientes de lesiones del campo y el invernadero fueron comparados con haplotipos de los linajes establecidos previamente en Colombia (Levy *et al.*, 1993). Para la obtención de los fingerprints se procedió así: 2 µg de

ADN del micelio del hongo cultivado en medio líquido (extracto de levadura-agar) fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* y separados mediante electroforesis en geles de agarosa (0.8%) por 48 h a 44 V, después de lo cual se transfirieron a membranas de nylon (Hybond N⁺) para ser expuestos subsecuentemente a una sonda (MGR-586) con cargas de fósforo radioactivo (P³²) y revelado en filmes para rayos X.

Los marcadores *RG-64* y *RZ-536* (este último obsequio de The Cornell Research Foundation, Inc.), fuertemente ligados con los locus de los genes *Pi-2(t)* y *Pi-1(t)* respectivamente, fueron utilizados para el análisis de homocigidad por polimorfismo del tamaño en los fragmentos de restricción (RFLP). Para el efecto de *Pi-2(t)*, el producto fue amplificado por un par de cebadores específicos para *RG-64* (5'gtgtttgagctctc-caatgctgttc3' y 5'ctgcagtgc-aatgtacggc-cagg3') mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN citoplasmático de las pirámides, fue digerido con la enzima de restricción *HaeIII* (Hittalmani *et al.*, 1995). Por su parte, para el efecto del gen *Pi-1(t)* se realizaron hibridaciones (Southern blot) con *RZ-536* al ADN total de las pirámides digerido con *DraI* y *EcoRI*. La extracción del ADN citoplasmático se realizó siguiendo un protocolo de extracción con buffer CTAB utilizado en *Musa e Ipomoea* (Gawel and Jarret, 1991), en hojas sanas y frescas de plantas en el estado de plántula con 5 hojas.

Tabla 4. Variedades comerciales, diferenciales y progenie (planta No. 12) del cruzamiento C101A51 X C101LAC utilizadas en los experimentos de campo

Variedades y diferenciales	Progenie		
	Purdue F ₃ - F ₄ (C101A51 x C101LAC-12-)		CIAT F ₆ (CT13432-) ¹
5685	F ₃	F ₄	1.PL2-1-1-M-M-M
A5173	P100	P100-01 a 08	2.PL2-4-2-M-M-M
Blue Bonnet	P101	P101-01 a 07	3.PL2-11-1-M-M-M
Caribe 8	P106	P101-18	4.PL4-2-1-1-M-M-M
Ceysvony	P119	P266-01 a 08	5.PL4-2-2-M-M-M
CICA4	P266	P281-01 a 16	6.PL4-14-1-M-M-M
CICA8	P278		7.PL5-1-1-M-M-M
CICA9	P281		8.PL5-1-2-M-M-M
CO39			9.PL7-5-2-M-M-M
Fukunishiki			10.PL7-7-1-M-M-M
IR8			11.PL7-10-1-M-M-M
IRAT13			12.PL8-7-2-M-M-M
LAC23			13.PL8-9-1-M-M-M
Línea 2			14.PL8-10-2-M-M-M
Metica1			15.PL8-15-3-M-M-M
Oryzica 1			
Oryzica 3			
Oryzica Llanos 5			
PETA			
Sabana 6			

¹ Variedades piramidadas de una colección separada obtenida del mismo cruce de C101A51 X C101LAC y seleccionadas con base en resistencia de campo por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Santa Rosa.

Resultados y discusión

La presencia de *Pi-2(t)* en la progenie de las líneas piramidadas fue confirmada mediante digestiones del producto de ADN amplificado mediante *RG-64* en el PCR con la enzima de restricción *HaeIII*. La visualización reveló un frag-

mento de aproximadamente 0.75 Kb para la sonda misma (control positivo), que migra junto a fragmentos de peso similar en C101A51 y las pirámides en P101, P266, P281. Los productos amplificados de la progenie derivada de éstas (P101-04, P101-07, P266-06, P266-07, P281-10 y P281-10-M) revelaron una banda similar. Las diferencias entre el donante C101A51 con el gen de resistencia *Pi-2(t)* y la variedad susceptible sin el mismo, fueron reveladas por una banda de 0.65 Kb aproximadamente, en CO39 y en C101LAC (Figura 1).

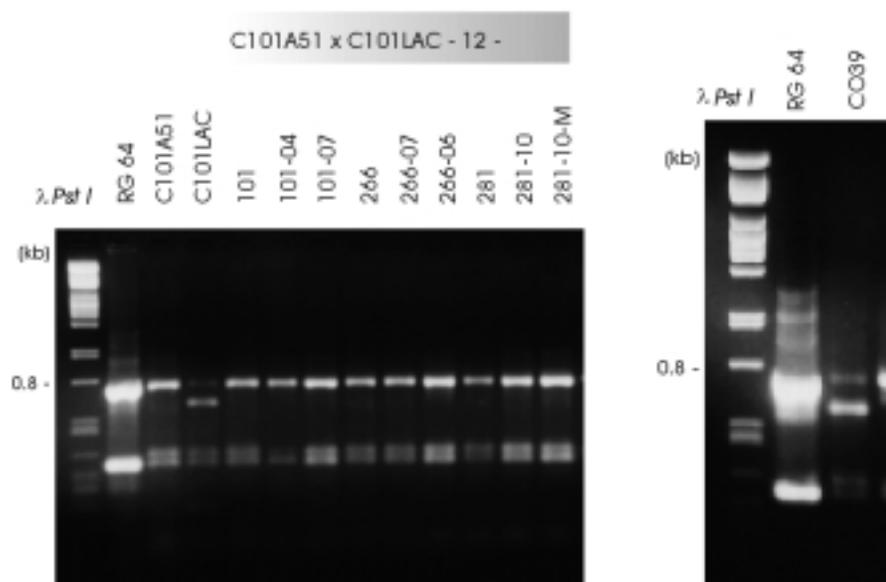


Figura 1. Digestión con *HaeIII* del ADN producto de la amplificación mediante PCR con cebadores para *RG-64*, marcador ligado a *Pi-2(t)*, de las líneas isogénicas C101LAC (*Pi-1(t)*) y C101A51 (*Pi-2(t)*), las progenies de la planta 12 del cruzamiento (C101A51 X C101LAC) y la variedad susceptible CO39. Un fragmento de aproximadamente 0.75 Kb indica la presencia, en condición homocigota, del locus *RG-64* en el donante y las pirámides.

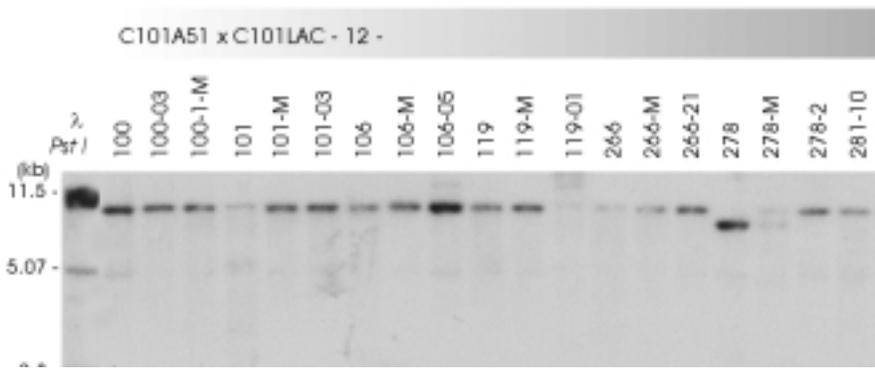


Figura 2. RFLPs de la digestión con la enzima *DraI* del ADN citoplasmático de las líneas isogénicas C101LAC y C101A51 con *Pi-1(t)* y *Pi-2(t)* respectivamente, una progenie de su cruzamiento y la variedad susceptible CO39, hibridadas con la sonda RZ-536. La presencia y condición homocigota de RZ-536 es marcada por un elemento de aproximadamente 11 Kb en C101LAC, en LAC23 (inserto de la derecha) y las pirámides.

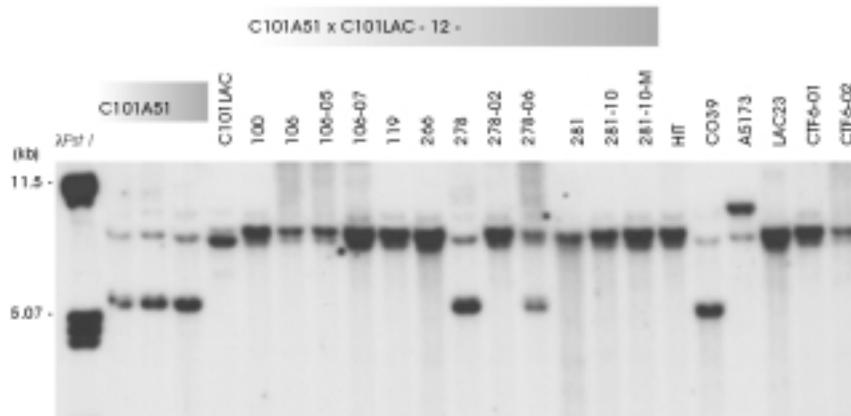


Figura 3. RFLPs de la digestión con la enzima *EcoRI* de ADN de las líneas isogénicas C101LAC y C101A51 con *Pi-1(t)* y *Pi-2(t)* respectivamente, progenies de su cruzamiento seleccionadas en Santa Rosa (CTF6-), en Purdue (C101A51 X 101LAC-12-) y por S. Hittalmani (HIT) hibridadas con RZ-536. El fragmento de aproximadamente 9.0 Kb indica la presencia y condición homocigota del locus ligado a *Pi-1(t)* en las pirámides, en contraste con la otra banda de aproximadamente 6.0 kb en C101A51 y CO39.

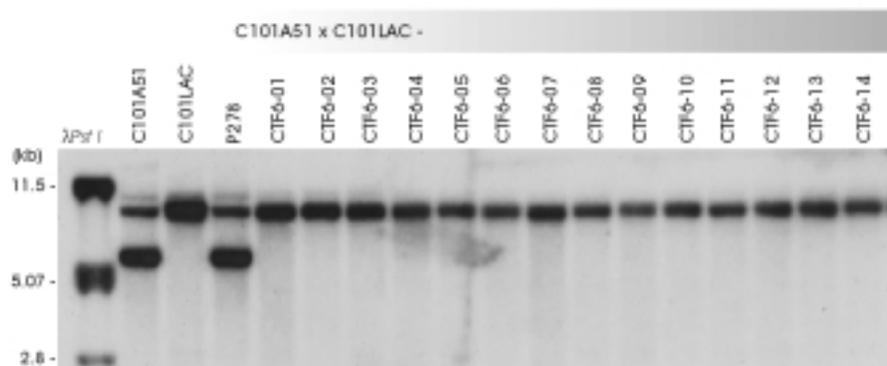


Figura 4. RFLPs de hibridaciones con RZ-536 de digestiones con *EcoRI* del ADN de las líneas isogénicas C101LAC (*Pi-1(t)*) y C101A51 (*Pi-2(t)*), las pirámides de su cruzamiento seleccionadas en Santa Rosa y la variedad CO39. La presencia en condición homocigota del locus asociado al gen *Pi-1(t)* es marcada por un fragmento de aproximadamente 9.0 Kb en C101LAC, HIT y las pirámides seleccionadas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT (CTF6-15).

Hibridaciones con la sonda RZ-536 del ADN de las plántulas de arroz digerido con *DraI*, indicaron la presencia de *Pi-1(t)* con un elemento de 11 Kb aproximadamente en C101LAC y LAC23 (Figura 2). Las pirámides P100, P101, P106, P119, P266 y P281, y sus respectivas progenies (P100-03, P100-01-M, P101-03, P101-M, P-106-05, P106-M, P119-01 y P-119-M), junto con el control HIT (homocigota para *Pi-1(t)*) en pruebas con RZ-424, comunicación personal de la Dra. S. Hittalmani), presentaron también el mismo fragmento. En contraste, tanto la variedad susceptible CO39 como la progenie de P278, mostraron un fragmento de 10 Kb aproximadamente.

El ADN digerido con la enzima de restricción *EcoRI* se hibridizó también con la sonda RZ-536 (Figura 3). Las diferencias entre el donante de *Pi-1(t)*, C101LAC, LAC23, las pirámides P100, P106, P119, P266, P281 y sus descendientes P106-05, P106-07, P281-10 y P281-10-M frente al control susceptible CO39, fueron indicadas por la presencia de un fragmento de 9 Kb aproximadamente, en contraste con otro de 6 Kb en CO39 y algunas introducciones de C101A51. La presencia de ambas bandas en P278 y P278-06 sugiere que esta progenie puede ser heterocigota para los dos genes. Un grupo de la F₆ (CTF6) del cruzamiento C101A51 X C101LAC evaluado y comprobado resistente por el CIAT (Dr. F. Correa, comunicación personal) en Santa Rosa, fue incluido en estas pruebas. Las pirámides CTF6-01, CTF6-02, CTF6-04, CTF6-07 y CTF6-14 también resultaron homocigotas para *Pi-1(t)*, según el mismo marcador. De forma similar, la condición homocigota de todas las 15 pirámides seleccionadas por el CIAT –junto con algunas introducciones de C101LAC y HIT–, fue confirmada según lo indica la presencia de un fragmento con un peso aproximado a 9Kb en el ADN digerido con *EcoRI* e hibridado con RZ-536, en contraste con otro fragmento de 6 Kb en CO39 (Figura 4).

La confirmación *in vivo* de la capacidad adquirida por las pirámides para excluir la virulencia complementaria de los aislamientos de la población colombiana de *P. grisea* se obtuvo mediante análisis de la reacción comparativa de ambas fuentes de resistencia y el testigo susceptible (CO39), junto con la de algunos miembros de la progenie (P101, P101-04, P101-07, P266-02, P266-06, P266-07, P281-10 y P281-10-M). Las inoculaciones con diferentes números (n) de aislamien-

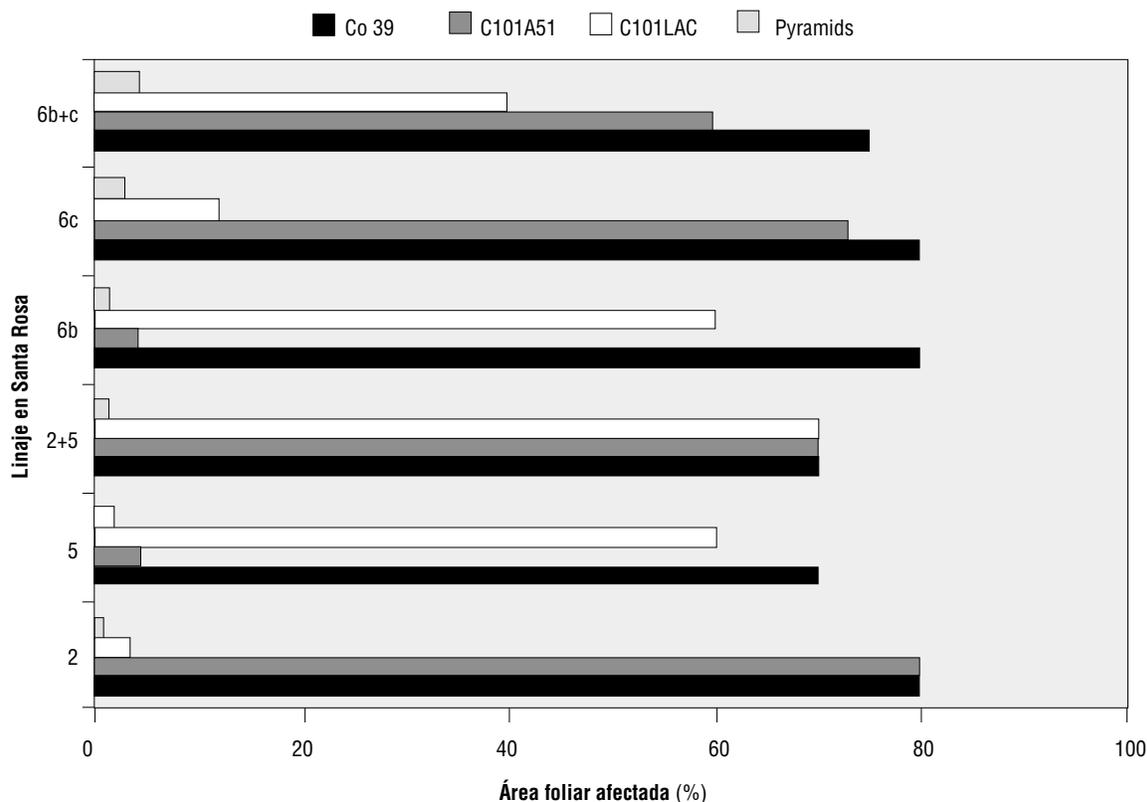


Figura 5. Reacción de las líneas isogénicas C101LAC (*Pi-1(t)*) y C101A51 (*Pi-2(t)*), la progenie producto de su cruzamiento y la variedad susceptible CO39 a inoculaciones con aislamientos representativos de los linajes colombianos SRL-2, SRL-5 y SRL-6 de *Pyricularia grisea*.

tos de los linajes colombianos SRL-2 (n= 8), SRL-5 (n= 13), SRL-6b (n= 8) y SRL-6c (n= 8) y con las mezclas SRL-2+5 (n= 3) y SRL-6b+6c (n= 4), indicaron la capacidad de la complementariedad genética de *Pi-1(t)* + *Pi-2(t)* para excluir la totalidad de la virulencia de *P. grisea* en Colombia (Figura 5). Mientras que, individualmente, los dos donantes de resistencia a las pirámides fueron severamente afectados por aislamientos de los linajes correspondientes, ningún aislamiento, solo o en mezcla con otro aislamiento de virulencia complementaria, tuvo capacidad para infectar a las pirámides. Adicionalmente, tampoco se observaron indicios que sugirieran eventos de recombinación parasexual en los platos Petri donde se sembraron las mezclas de cultivos de aislamientos complementarios.

Los aislamientos del linaje SRL-2 infectaron severamente (80% AFA) a la variedad susceptible CO39 y al donante de *Pi-2(t)* (C101A51), produjeron pequeñas lesiones en C101LAC (3%

AFA) y no infectaron las pirámides. Los aislamientos del linaje SRL-5 infectaron a CO39 y C101LAC (70% y 60% AFA, respectivamente), no indujeron reacciones de tipo susceptible en el donante de *Pi-2(t)*, C101A51 (4% AFA), ni infectaron a las pirámides. La combinación de aislamientos de los linajes SRL-2+5 infectaron a C101A51 y C101LAC, al igual que a la variedad CO39 (70% AFA), pero no infectaron las pirámides. Ningún aislamiento de los linajes SRL-2 y SRL-5, individualmente o en combinación, produjeron lesiones en grado susceptible a las pirámides, en las que se observaron reacciones de tipo moderadamente resistente (menos de 4% del AFA) cuando máximo.

Los aislamientos del linaje SRL-6b infectaron severamente a la variedad CO39 (80% AFA) y a C101LAC (60% AFA), pero no provocaron reacciones de tipo susceptible en C101A51, ni en las pirámides (4% y 1% AFA, respectivamente). En contraste, los aislamientos del linaje SRL-6c infectaron a C101A51

(70% AFA) y a CO39 (80% AFA) y causaron lesiones atípicas en C101LAC en 12% de su área foliar, aunque no infectaron a las pirámides (3% AFA). Las combinaciones de aislamientos de los linajes SRL-6b+c infectaron severamente a CO39, C101A51 y C101LAC (75%, 60% y 40% AFA, respectivamente). Estas combinaciones produjeron también pequeñas lesiones en las pirámides (4% AFA en promedio y hasta 9% AFA en P266 y 8% AFA en P281-10-M).

Los aislamientos del linaje SRL-6c, que causaron reacciones del tipo moderadamente resistente en algunas de las pirámides, fueron utilizados de nuevo, esta vez con resultados negativos en C101LAC y en las pirámides. Las inoculaciones con aislamientos de los linajes SRL1, SRL4, ALL7, ALL10 y ALL13, aunque infectaron a CO39, produjeron solamente resultados negativos, tanto en las NIL como en las pirámides.

Las inoculaciones con aislamientos de lesiones atípicas en las pirámides, reinoculados hasta en tres ocasiones con

el fin de recuperar cualquier indicio de mutación, no indicaron cambios significativos en su patogenicidad distintos a los de pérdida de la virulencia (Tabla 5). Ninguno de los re-aislamientos de lesiones en las pirámides inoculadas con aislamientos de los linajes SRL-2, SRL-5, SRL-6b y SRL-2+5 ganó en virulencia o mostró síntomas de compatibilidad con la combinación de genes evaluada. La formación de lesiones atípicas e inusuales causadas por aislamientos avirulentos en las pirámides no indujeron cambios de virulencia, aunque sí indicaron la capacidad del patógeno para sobrevivir y reproducirse en algunos tejidos (collar y aurícula) de los hospederos resistentes.

Las pruebas para evaluar las tasas de mutación en los genes de avirulencia entre los linajes predominantes en Colombia, con base en reacciones fenotípicas de las pirámides, no indicaron tampoco mayores diferencias entre la virulencia original del aislamiento inoculado y los reaislamientos subsecuentes. Los haplotipos de aislamientos de lesiones atípicas en variedades resistentes fueron idénticos a los de los aislamientos utilizados inicialmente. La retención de haplotipos en los reaislamientos, luego de inoculaciones con mezclas de virulencia complementaria, indicó una ausencia marcada de eventos parasexuales en el patógeno, al menos en la limitada extensión de los experimentos realizados.

Los ensayos de campo con las F_3 y F_4 de las pirámides seleccionadas fueron conducidos por primera vez en Santa Rosa en julio de 1996, aunque otra progenie del mismo cruce había sido evaluada en el mismo sitio por el CIAT desde 1995. Durante la siembra más temprana, la enfermedad afectó severamente más de 75% del área foliar de C101A51 (grado 9), seguida por el testigo susceptible CO39 con AFA entre 25-50% (Figura 6). LAC23, Llanos 5 y C101LAC fueron infectados con apenas 2% AFA (grado 4), mientras que las pirámides P101 y P266 estuvieron comprometidas severamente por el patógeno (grado 6). Durante la segunda siembra en Santa Rosa (noviembre 1996), la expresión de la infección en todas las NIL y las pirámides estuvo por debajo de los niveles considerados susceptibles, aunque fue moderadamente susceptible en CO39 (grado 5). El único experimento de campo conducido en el área de Granada en 1996 mostró que las pirámides, C101LAC, Llanos 5 y CO39 sufrieron infecciones bajo del umbral de resistencia (grado 4). Niveles de severidad moderadamente susceptible (grado 5) fueron registrados solamente en C101A51 en este sitio.

Se condujeron cuatro ensayos de campo entre abril-julio de 1997 con un mes de intervalo en los tres sitios. En este año, el más caluroso y seco de los tres

en que se realizaron los experimentos, la precipitación disminuyó notablemente (más de 600 mm). Así mismo, las diferencias entre temperatura máxima y mínima fueron mayores que las de 1996 (14°C comparado con 10°C). En conjunto, estas condiciones se consideran favorables para el desarrollo de epidemias de *pyricularia* y en tal sentido se manifestó la infección.

Durante 1997, la resistencia de las pirámides no fue comprometida en ningún otro sitio ni época de siembra más que en Santa Rosa, durante las segunda y tercera siembras, donde se observó una severidad de la infección hasta de grado 6 (Figura 7). La epidemia de *pyricularia* eliminó las plantas de CO39 (grado 9) durante la primera y segunda siembras y las de C101A51 en la segunda siembra. Estas mismas variedades se vieron afectadas severamente durante las otras dos épocas de siembra. La severidad en las NIL, Llanos 5 y las pirámides fue baja en Santa Rosa (por debajo del grado 5 y solamente en grado 4 en las pirámides), durante las primera y cuarta siembras en 1997. En Puerto López, la severidad en C101LAC llegó hasta grado 5 en 1997, pero disminuyó notablemente en la cuarta siembra. La severidad en Llanos 5 y en las pirámides estuvo siempre por debajo del grado 4 durante este año. En Granada, la enfermedad alcanzó niveles susceptibles a la cuarta siembra pero solamente en CO39, las NIL y Llanos 5, el testigo resistente. En este sitio no se observó infección en las pirámides (todas con nivel inferior a grado 2).

Tabla 5. Patogenicidad de *Pyricularia* grisácea aislada de lesiones atípicas entre la progenie del cruce C101A51 X C101LAC (P No.) y C101A51, en inoculaciones con aislamientos de linajes colombianos

Linaje	Aislamiento	Aislado de	Reacción ¹		
			C101A51	C101LAC	Pirámides
SRL2	(MTU9-1-2)	P281-10-M ²	0.4	-	-
			0.8	-	-
			0.1	-	-
SRL5	(I 6-5-2)	P281/281-10-M ³	0.2	-	-
		P266-06	0.1	0.7	-
			-	-	-
SRL6b+c	(ORY2-19-2) + (FN-28-2-1)	C101A51	0.1	-	-
SRL2 + SRL5	(CICA9-37-1) + (I6-5-2)	P101-07	-	0.7	-
			-	-	-
			-	0.3	-
		P266-06	-	0.4	-
			-	-	-
		P266-07	0.2	-	-
		P281-10	0.6	-	-

¹ Proporción de área foliar afectada en 16 plantas/variedad o negativa (-) cuando la afección fue menor a 0.05.

² M = masal.

³ Aislado después de una segunda inoculación con un aislamiento obtenido en P281.

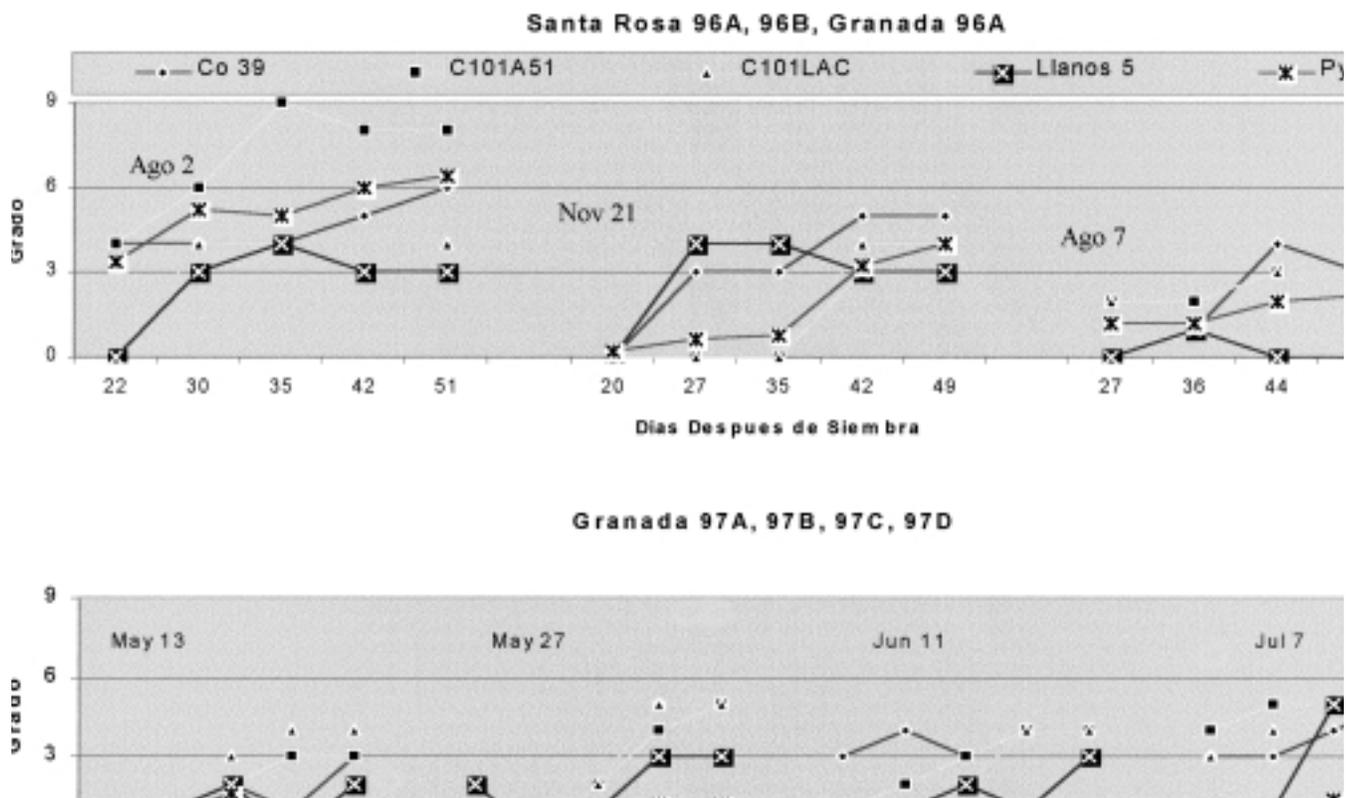


Figura 6. Resistencia de campo de las líneas isogénicas C101A51 (Pi-2(t)) y C101LAC (Pi-2(t)), las pirámides seleccionadas, la variedad susceptible CO39 y la variedad resistente Llanos 5, en Santa Rosa y Granada, 1996 y Granada, 1997. Severidad determinada con base en la escala de 0-9 del Sistema Estándar de Evaluación para piricularia del IRRI donde los grados de 0-4 indican resistencia a moderada resistencia, 5 moderada susceptibilidad y 6 o más, susceptibilidad.

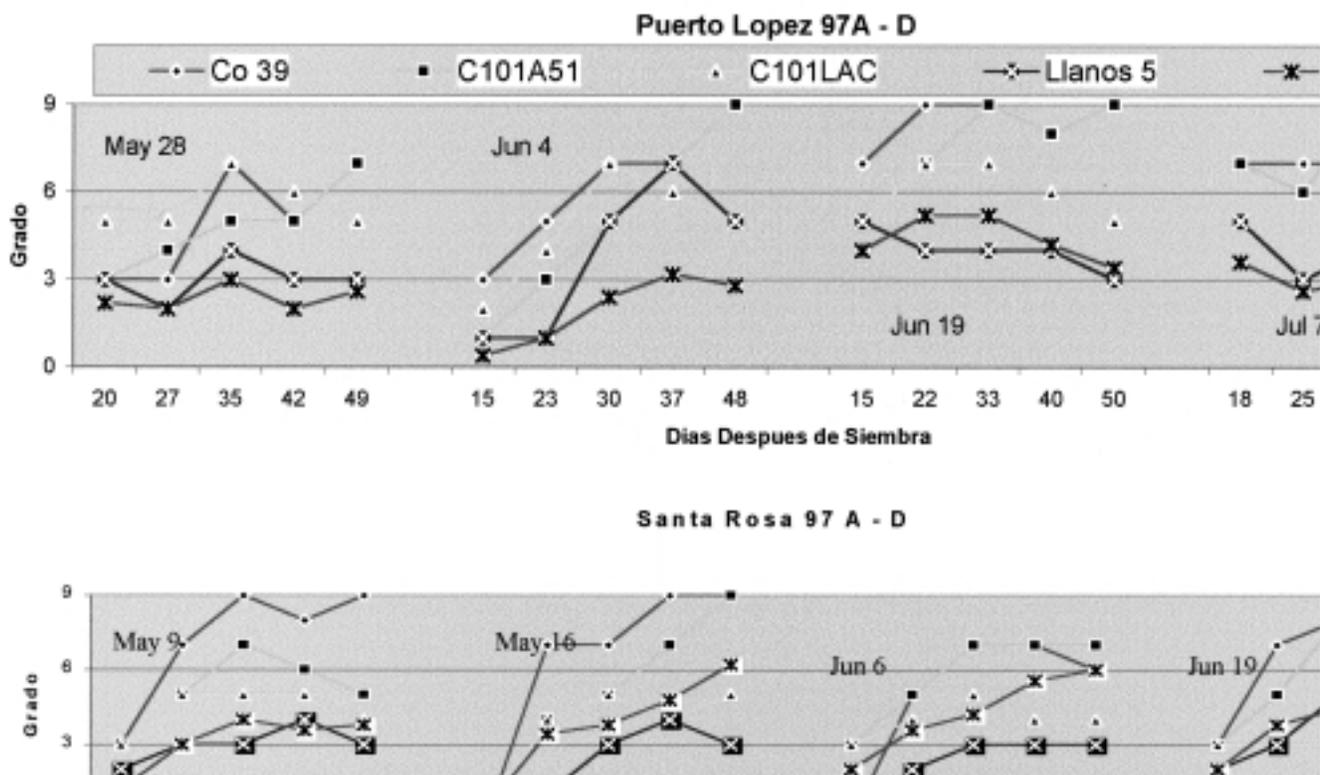


Figura 7. Resistencia de campo de las líneas isogénicas C101A51 (Pi-2(t)) y C101LAC (Pi-1(t)), las pirámides seleccionadas, la variedad susceptible CO39 y la variedad resistente Llanos 5, en Santa Rosa y Puerto López, 1997. Severidad determinada con base en la escala de 0-9 del Sistema Estándar de Evaluación para piricularia del IRRI, donde los grados de 0-4 indican resistencia a moderada resistencia, 5 moderada susceptibilidad y 6 o más, indican susceptibilidad.

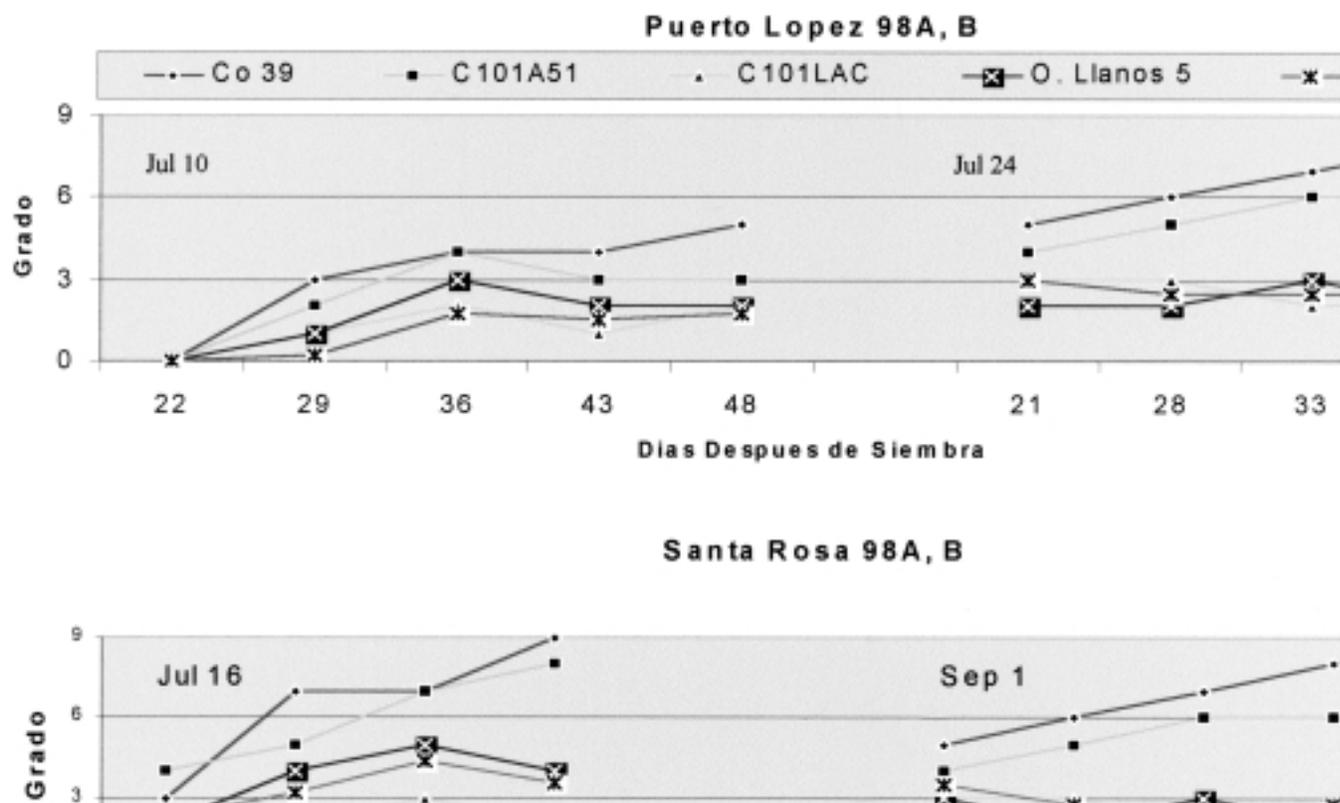


Figura 8. Resistencia de campo de las líneas isogénicas C101A51 (Pi-2(t)) y C101LAC (Pi-1(t)), las pirámides seleccionadas, la variedad susceptible CO39 y la variedad resistente Llanos 5, en Santa Rosa y Puerto López, 1998. Severidad determinada con base en la escala de 0-9 del Sistema Estándar de Evaluación para piricularia del IRRI donde los grados de 0-4 indican: resistencia a moderada resistencia, 5 moderada susceptibilidad y 6 o más susceptibilidad.

La enfermedad alcanzó de nuevo niveles considerables de susceptibilidad en CO39 y C101A51 en Santa Rosa (julio y septiembre) y en Puerto López (julio) en 1998 (Figura 8). En C101LAC, Llanos 5 y las pirámides, sólo se observaron infecciones por debajo del nivel de susceptibilidad durante este mismo año. A su vez, en Santa Rosa el nivel máximo de infección observado en las pirámides estuvo por debajo del grado 4 (siembra de julio).

Un total de 376 aislamientos, 165 obtenidos de lesiones en las pirámides, fue caracterizado mediante MGR-586 fingerprinting (Tabla 6). El análisis indicó que los aislamientos colectados de los experimentos de campo en Colombia eran miembros de los linajes SRL-2, SRL-4 y SRL-6 de Santa Rosa, previamente caracterizados. La gran mayoría de los aislamientos (241, de los cuales 134 fueron colectados de lesiones en las pirámides), pertenecieron al linaje SRL-6. El segundo linaje más abundante en la muestra fue SRL-4 (104 aislamientos), pero solamente 27 de ellos fueron obtenidos de lesiones en las pirámides. De los 26 aislamientos pertenecientes al linaje SRL-2, colectados en el curso de los

experimentos de campo, únicamente dos de ellos provenían de las pirámides.

La gran mayoría de los aislamientos colectados en Granada durante 1997 correspondieron al linaje SRL-4 (Figura 9), con muy baja participación de los otros dos linajes. En contraste, este mismo año en Puerto López predominaron los aislamientos del linaje SRL-6 y sola-

mente una tercera parte de la muestra correspondió al linaje SRL-4; estos últimos fueron colectados únicamente durante una fecha de siembra. Los aislamientos del linaje SRL-2 observados allí tuvieron una frecuencia diez veces menor que la del linaje SRL-6. Una distribución más equitativa entre aislamientos de los linajes SRL-4 y SRL-6 fue co-

Tabla 6. Linajes de los aislamientos de *Pyricularia* grisca de lesiones en variedades comerciales y la progenie del cruce C101A51 X C101LAC en los ensayos de campo en tres sitios de los Llanos Orientales de Colombia, 1996-1998

Localización	Año	Linaje en Santa Rosa ¹			
		2	4	6	Indeterminadas
Santa Rosa	1996	9 (2) ³	4 (1)	8 (6)	3
	1997 [4] ²	5	9 (4)	99 (62)	2
	1998 [2]	1 (1)	27 (12)	45 (22)	0
Puerto López	1997 [3]	8	18 (2)	66 (40)	0
	1998 [2]	1	19 (8)	21 (3)	0
Granada	1997 [2]	2	27 (1)	2 (1)	0
TOTAL:	376 (165)	26 (3)	104 (28)	241 (134)	5

¹ Linajes establecidos mediante MGR-586 fingerprinting según (Levy et al., 1993).

² Entre corchetes []: número de pruebas por año en cada sitio.

³ Número total de aislamientos y (número) de aislamientos de las pirámides por linaje.

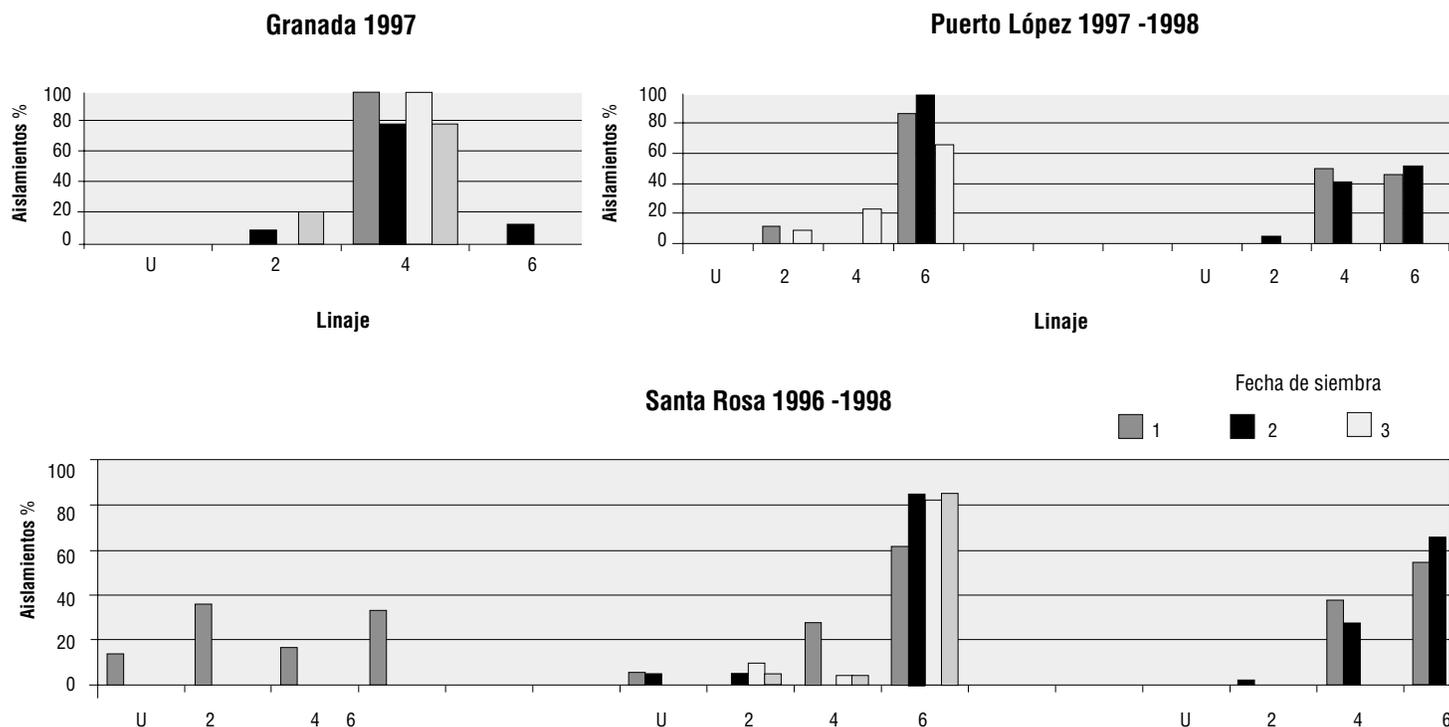


Figura 9. Porcentaje de aislamientos por linaje (U: indeterminados, 2: SRL2, 4: SRL4, 6: SRL6) caracterizados mediante la sonda MGR-586 fingerprinting, por año y época de siembra, colectados durante los experimentos de campo en Granada, Santa Rosa y Puerto López de 1996-1998.

lectada en este sitio durante 1998, en tanto que el linaje SRL-2 se mantuvo escaso.

La mayor diversidad de linajes durante el curso de la investigación fue colectada en Santa Rosa, si bien se conservó la predominancia de SRL-6 observada en Puerto López. La mayoría de los aislamientos colectados en 1997 en este sitio fueron miembros del linaje SRL-6, con una presencia limitada de aislamientos pertenecientes al linaje SRL-4. Como en Puerto López, durante 1998 se observó en Santa Rosa un balance más equitativo entre aislamientos de los linajes SRL-6 y SRL-4.

De los cuatro haplotipos observados, la mayoría de los aislamientos del linaje SRL-6 de la muestra colectada en 1996 en Santa Rosa se agruparon solamente en dos haplotipos que agruparon la totalidad de aislamientos de los años subsiguientes. Con el número de fragmentos revelados por MGR-586 en *P. grisea* es aceptable esperar pequeñas variaciones entre haplotipos de un mismo linaje, como se observa en el caso de GUY-11 (*wild-type*), aislamientos de referencia presumiblemente uniformes. La presencia o ausencia de algunos fragmentos en GUY-11 de laboratorios en África, India y Francia, fueron comparables a las diferencias entre haplotipos de aislamientos del linaje SRL-6 en Santa Rosa (Figura 10). En todos los casos se observó una

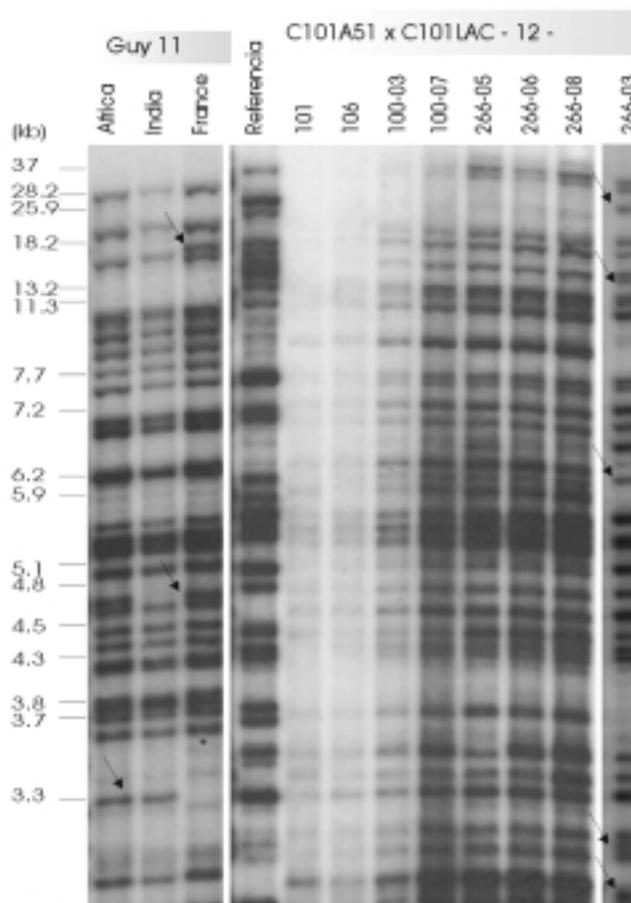


Figura 10. MGR-586 fingerprints de aislamientos de la cepa de laboratorio GUY-11 (*wild-type*) con diferentes procedencias y del linaje colombiano SRL-6 aislado de lesiones en la progenie del cruce C101A51 X C101LAC durante los experimentos de campo. Las flechas indican las diferencias por presencia/ausencia de fragmentos de hibridación entre los haplotipos.

notoria correspondencia entre la virulencia de los aislamientos y el haplotipo.

Como la infección observada durante los experimentos de campo sugiere la probable emergencia de nuevas virulencias con la capacidad de infectar aquellos materiales que poseen la combinación de genes piramidados, así como la penetrancia limitada de estos genes en la progenie seleccionada, se llevaron a cabo varios ensayos de patogenicidad para evaluar aislamientos de estas lesiones. Las inoculaciones confirmaron que solamente aislamientos del linaje SRL-6 conservan la virulencia necesaria para infectar su pirámide de origen (Tabla 7). Los dos aislamientos del linaje SRL-2 colectados en Santa Rosa (1996) no fueron patógenos a los materiales de origen ni a C101LAC, como era de esperarse. Las infecciones oportunistas o derivadas de plantas contaminantes (voluntarias) que crecieron en las parcelas pudieron ser el origen de estos aislamientos. El aislamiento del linaje SRL-4 fue parcialmente patógeno para P-278, su hospedero de origen y fue virulento en C101A51. Ésta constituiría una nueva característica de virulencia entre aislamientos del linaje SRL-4, también observada recientemente en Colombia (Fernando Correa, comunicación personal). Sin embargo, la ausencia de patogenicidad en C101LAC incrementó la sospecha de que P278 podría estar aún segregando para *Pi-1(t)*.

Conclusiones

Según lo determinado por el análisis de asociación de los MGR-586 *fingerprints* de aislamientos provenientes del campo, la estructura genética de *P. grisea* en los Llanos Orientales de Colombia conservó características semejantes a las determinadas previamente por Levy *et al.* (1993). La población de *P. grisea* conservó su filogenia y virulencia histórica, mostrando estabilidad patogénica en el transcurso de estos tres años de muestreo.

Las curvas de progreso de la enfermedad indicaron que la variedad, el área ecológica y la época de siembra, en su orden, son los elementos más relevantes que se deben tener en cuenta para elaborar modelos de manejo basados en la epidemiología de la enfermedad. La identificación de la capacidad de exclusión complementaria con la combinación de genes de resistencia utilizados, se destacó como el elemento más importante a considerar en el diseño de estrategias para el mejoramiento genético del arroz en Colombia.

Tabla 7. Relación entre el número de plantas susceptibles y el número de plantas total en pruebas de patogenicidad con aislamientos de *Pyricularia grisea* en lesiones de la pirámide (Santa Rosa, 1996)

	Aislado de C101A51 X ⁺ C101LAC-12-							
	100	101	106	119	266	278	100-01	101-3
Linaje ¹	6	6	6	6	6	4	2	2
Pirámide de origen	1.0 ²	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	0.2	0.1
C101A51	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.3
C101LAC	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	0.3	0.3	0.2
CO39	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8	1.0

¹ Linajes colombianos determinados mediante MGR-586 fingerprinting, según Levy *et al.*, 1993.

² Reacciones basadas en la presencia de lesiones esporulantes que cubren al menos 5% del área foliar en 16 plantas/variedad.

La composición filogenética del patógeno conservó su unidad estructural por área ecológica, con variaciones en la agresividad determinadas por factores de tiempo (atmosférico) y elementos predisponentes a la expresión de resistencia genética, como son la disponibilidad de agua y el tipo de suelo. Sin embargo, la escasa disponibilidad de información meteorológica por sitio y la complejidad de los procesos de causa-efecto limitarían sustancialmente la elaboración de modelos epidemiológicos basados en estos elementos.

Una ampliación probable del espectro de virulencia entre aislamientos del linaje SRL-6 fue observada en Santa Rosa, pero su expresión en las áreas comerciales de cultivo de las dos regiones ecológicas analizadas no fue detectada. El incremento en la agresividad se limitó al único linaje en Colombia con una capacidad predecible de virulencia tal que le permite adaptarse a la resistencia determinada por genes complementariamente excluyentes de virulencia en el campo. Sin embargo, su confinación a la estación experimental (Santa Rosa) y la restricción de su expresión a épocas definidas es indicativa de su especificidad por tiempo (estación) y ambiente. Ante la ausencia de clones con la secuencia de los genes de virulencia y resistencia involucrados para confirmar su presencia, podría especularse que la supuesta ampliación de la agresividad sea más bien el resultado de una penetrancia limitada de los genes de resistencia en algunas de las progenies de los materiales piramidados, de silenciamiento ocasionado por otros genes o de factores predisponentes involucrados con factores ambientales no identificados plenamente.

Las barreras de incompatibilidad vegetativa, características de los linajes de

P. grisea identificados por MGR-586 *fingerprinting*, podrían explicar la ausencia de recombinación observada entre aislamientos de linajes diferentes. El análisis reciente de una extensa muestra colectada entre 1991-1997 en Estados Unidos de América reveló una estructura típicamente clonal de los cuatro linajes predominantes, resultado aparente de una reproducción estrictamente asexual entre la población del patógeno. La completa correspondencia entre linajes, grupos de compatibilidad vegetativa y tipo de apareamiento entre los aislamientos así lo sugieren (Correll *et al.*, 2000). Sin embargo, en la misma investigación se reporta la existencia de aislamientos que sugerían cierta incongruencia con una asexualidad estricta. Dos aislamientos de archivo colectados entre 1970 y 1980, agrupados en linajes diferentes y con diferente tipo de apareamiento indicaron compatibilidad vegetativa en el laboratorio. Los autores sugieren que esta compatibilidad sería indicio de remanentes de recombinación sexual o parasexual en el pasado, pero una revisión sobre estos mismos dos linajes indicó que sus *fingerprints* han sido claramente diferenciables por más de 20 años (Levy *et al.*, 1991). Con ello se colige que la compatibilidad reportada en el laboratorio no pudo haber tenido lugar en el campo. De otra forma hubiese sido imposible distinguir entre los dos linajes por la similitud entre los recombinantes. De igual manera no ha sido reportada evidencia alguna de recombinación entre linajes en Colombia por lo menos durante los pasados 20 años (Correa-Victoria *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 1993).

Sin embargo, con el estudio de Correll *et al.* (2000) se vislumbra un potencial de intercambio genético entre aislamientos de un linaje con mismo grupo

vegetativo. Tal parasexualismo, en caso de que ocurriese en el campo, tendría un efecto positivo en la conservación de avirulencias específicas por linaje, en tanto que prevendría el decaimiento genético de los individuos del linaje por acumulación de mutaciones; este escenario contribuye a reforzar los potenciales de la especificidad de la virulencia por linajes para el diseño de estrategias de mejoramiento, como la de exclusión de linajes.

La conclusión de que la resistencia de las pirámides en F_3 hubiese estado comprometida por fenómenos de segregación en ciertos miembros de la progenie, pareciera ser la más adecuada, y es afín con observaciones mejor documentadas sobre la segregación de *Pi-1(t)* en C101LAC en otras áreas ecológicas (P. Mekwatanarkarn, comunicación personal). Pero teniendo en cuenta la respuesta fenotípica de las generaciones subsiguientes de las pirámides, la compatibilidad estacional entre ciertos haplotipos del linaje SRL-6 y variedades a las que se les comprobó su condición piramidal, indicaría que en el ambiente persiste una subpoblación de este linaje con habilidad para infectar materiales con la combinación *Pi-1(t)* y *Pi-2(t)*. La capacidad de adaptación de esta subpoblación estaría comprometida por factores ambientales o de manejo predisponentes.

Cualquier mutación que afecte un gen de avirulencia no necesariamente conduce a variaciones en la patogenicidad. De esta manera, de las 'hasta siete' sustituciones específicas de amino-ácidos identificadas en las secuencias de varios alelos del gen AVR-Pita, que codifica por un polipéptido funcional relacionado con la avirulencia en aislamientos de los linajes SRL-3 y ALL-7, patógenas para el arroz en Colombia, sólo una de ellas ha indicado intervenir en alguna transición a la virulencia. Tanto los alelos virulentos como los avirulentos en la población evaluada difieren por las mismas sustituciones de bases (mutaciones puntuales) de la secuencia codificadora. Claramente, estas sustituciones puntuales se acumularon por alguna razón diferente del azar en el tiempo y sugieren la conservación de la función del gen de avirulencia, independientemente de la conservación del fenotipo relacionado con la virulencia (Bryan *et al.*, 2000).

La evolución hacia la aparición de nuevas virulencias ocasionadas por la piricularia del arroz en Colombia aparece históricamente limitada por la interacción entre la selección de hospederos y la

estructura clonal que resulta de la asexualidad predominante del patógeno. No todos los cambios en virulencia son posibles en el telón de fondo que definen los linajes residentes, al menos en el corto plazo. Los efectos de adaptación inherentes a genes específicos de avirulencia parecen constreñir los cambios por azar. Pero, el número, la diversidad alélica y la distribución filo-geográfica de los genes AVR (como la de los genes R) en el patosistema piricularia del arroz continúan aún por develarse completamente. Saber con exactitud cuáles tipos nuevos altamente adaptados son posibles, depende del conocimiento sobre la estructura local del patosistema.

Es muy interesante que el gen *Pi-2(t)* sea resistente a una extensa diversidad de linajes de piricularia del arroz alrededor del mundo (Shen *et al.*, 1998; Sivaraj *et al.*, 2000; Zeigler *et al.*, 1995), y sea simultáneamente susceptible a los tres linajes con mayor prevalencia en Colombia. En este escenario sería razonable esperar que pirámides con el gen *Pi-2(t)* fuesen especialmente vulnerables a una pérdida de resistencia rápida y multi-linaje en Colombia, lo cual no ha sido observado aún. Quizá los genes de avirulencia que condicionan la incompatibilidad con *Pi-2(t)* y *Pi-1(t)* tengan funciones mutuamente excluyentes. Ello implicaría que las mutaciones sincrónicas en los alelos de ambos genes serían de ocurrencia extremadamente difícil en virtud de su poca habilidad de adaptación.

Además de la experiencia histórica de resistencia comprobada por más de 10 años de cultivo comercial de la variedad Llanos 5, y más recientemente con Fedarroz 50, esta investigación demostró la validez de una estrategia de mejoramiento basada en la utilización de genes mayores de resistencia complementarios que, combinados en variedades individuales (pirámides), excluyan el espectro de virulencia observado entre las familias genéticas (linajes) del patógeno, para extender la durabilidad de la resistencia a la piricularia del arroz en Colombia.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este proyecto fue posible gracias a la generosa contribución de la Fundación Rockefeller al adjudicar una beca al investigador principal para adelantar estudios de doctorado en la Universidad de Purdue; a una contribución del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José de Caldas (Colciencias) por el aporte de los fondos para el desarrollo operativo del proyecto, y a la colaboración del Botany and Plant Pathology Department de la Universidad de Purdue por la adjudicación de un *teaching assistantship* al investigador principal durante un semestre, para la culminación del proyecto.

Los autores también agradecen a los colegas del Programa de Arroz del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y del Fondo Latinoamericano de Arroz Riego (FLAR) por su colaboración técnica en la provisión de semillas y aislamientos. También dan un agradecimiento especial a The Cornell Research Foundation, Inc. y a The Japanese Rice Genome Research Program of the National Institute of Agrobiological Resources por el obsequio de las sondas moleculares *RZ-536* y *G-181*, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1997.** Plant Pathology. 4th edition, Academic Press Limited, San Diego (USA), 635 pp.
- Bryan, G. T.; Wu, K.S.; Farrall, I.; Jia, L.; Hershey, H.P.; McAdams, S.A.; Donalson, G.K.; Tarchini, R.; and Valent, B. 2000.** tA single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. Plant Cell 12:2033-2045.
- Correa-Victoria, F.; Zeigler, R.S. and Levy, M. 1994.** Virulence characteristics of genetic families of *Pyricularia grisea* in Colombia. p. 211-229. In: R. S. Zeigler, S. A. Leong, and P. S. Teng (eds.). *Rice Blast Disease*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Correa-Victoria, F. J.; Escobar, F.; Prado, G. and Aricada, G. 2000.** Population dynamics of the rice blast pathogen in a screening site in Colombia and characterization of resistance. p. 214-220. In: D. Tharreau, M. H. Lebrun, N. J. Talbot, and J. L. Nottoghem (eds.), *Advances in Rice Blast Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- 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* 77:1029-1035.
- Corredor S., E. y Holguín V., J. 1997.** "Fe-dearroz 50" la semilla del cambio. *Arroz* 46 (411): 6-10.
- Correll, J. C.; Harp, T.L.; Guerber, J.C.; Zeigler, R.S.; B., Cartwright, R.D. and Lee, F.N. 2000.** Characterization of *Pyricularia grisea* in the United States using independent genetic and molecular markers. *Phytopathology* 90:1396-1404.
- Gawel, N. J. and Jarret, R.L. 1991.** A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Molecular Biology Reporter* 9:262-266.
- Hamer, J. E.; Farrall, R.; Orbach, M.J.; Val-lent, B. and Chumley, F. 1989.** Host species-specific conservation of a family of repeated DNA sequences in the genome of a fungal plant pathogen. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 86:9981-9985.
- Hittalmani, S.; Foolad, M.R.; Mew, T.; Ro-dríguez, R.L. and Huang, N. 1995.** Development of a PCR-based marker to identify rice blast resistance gene *Pi-2(t)*, in a segregating population. *Theoretical & Applied Genetics* 91:9-12.
- Levy, M.; Correa-Victoria, F.J.; Zeigler, R.S.; Xu, S. and Hamer, J.E. 1993.** Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology* 83:1427-1433.
- Levy, M.; Romao, J.; Marchetti, M.A. and 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. and Bonman, J.M. 1992.** Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology* 82:746-749.
- Mekwatanarkarn, P.; Kositratana, W.; Levy, M. and Zeigler, R.S. 2000.** Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice lines near-isogenic for major resistance genes. *Plant Disease* 84:60-70.
- Ou, S. H. 1985.** *Rice Diseases*. 2nd edition, Commonwealth Mycological Institute, Kew (UK), 380 pp.
- Romao, J. and Hamer, J.E. 1992.** Genetic organization of a repeated DNA sequence family in the rice blast fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:5316-5320.
- Rossman, A. Y.; Howard, R.J. and Valent, B. 1990.** *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia* 82:509-512.
- Shen, Y.; Zhu, P.; Yuan, X.; Zhao, X. and Levy, M. 1998.** Genetic diversity and geographic distribution of *Magnaporthe grisea* in China. *Journal of Zhejiang Agricultural University* 493-501.
- Silue, D.; Nottoghem, J. L. and Tharreau, D. 1992.** Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathology* 82:577-580.
- Sivaraj, R.; Gnanamanickam, S. S. and Levy, M. 2000.** Lineage-exclusion tests for blast resistance in Southern India, p. 154-161. In: D. Tharreau, M. H. Lebrun, N. J. Talbot, and J. L. Nottoghem (eds.), *Advances in Rice Blast Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Tapiero-Ortiz, A. L. 1991.** Resistance of rice to blast disease caused by strains of *Pyricularia oryzae* Cav. from Colombia. Thesis/Dissertation, 97 pp.
- Valent, B. 1990.** Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology* 80:33-36.
- Zeigler, R. S.; Couc, L.X.; Scott, R.P.; Bernardo, M. A.; Chen, D.H.; Valent, B. and Nelson, R. J. 1995.** The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology* 85:443-451.
- Zeigler, R. S.; Tohme, J.; Nelson, R.; Levy, M. and Correa-Victoria, F.J. 1994.** Lineage exclusion: a proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. p. 267-292. In: R. S. Zeigler, S. A. Leong, and P. S. Teng (eds.), *Rice Blast Disease*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.