

SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES MOLECULARES PARA LA INTROGRESIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A *Pyricularia oryzae* EN ARROZ *Oryza sativa* L.

Colazo J.L.¹, Livore A.², Cattaneo F.³

Palabras claves: Pyricularia, mejoramiento, genes de Resistencia, selección asistida, marcadores moleculares

INTRODUCCION

La enfermedad del quemado de arroz (*Pyricularia oryzae*) es una de las limitantes mas importante en la producción de este cereal en América Latina. Es causada por el hongo filamentos *Magnaporthe oryzae*, atacando todas las partes de la planta. La generación de materiales resistentes a esta enfermedad es la forma más económica de control y con menos impacto ambiental. La resistencia genética a *P. oryzae* en arroz se comporta según el modelo gen a gen donde genes mayores (genes R) son efectivos en controlar infecciones de linajes del patógeno que poseen un correspondiente gen de avirulencia (AVR). La estrategia planteada en nuestro programa de mejoramiento para obtener resistencia durable en el tiempo es la introgresión de los genes mayores *Pi1*, *Pi2/Pi9*, *Pi33* y *Pita* en un solo genotipo mediante marcadores moleculares. Las técnicas moleculares tienen como ventaja que nos permiten analizar un número grande de individuos e identificar cada gen R individualmente. Entre estos genes, el locus *Pi2/9* a sido extensivamente usado por conferir resistencia efectiva en programas de mejoramiento de arroz por mucho tiempo (Zhou and Wang, 2009). Los mismos codifican proteínas NBS-LRR (proteína de unión a nucleótidos con dominios enriquecidos en Leucina) y son considerados genes de amplio espectro. El gen *Pita* ha sido usado efectivamente para prevenir brotes de *P. oryzae* en el sur de Estados Unidos desde 1990. Este gen codifica una metaloproteína y es efectivo en prevenir infecciones de razas del patógeno que contienen el correspondiente gen de avirulencia AVR (Jia et al., 2009). El gen *Pi33* también es un gen de amplio espectro y es uno de los cinco genes que posee la megavariedad IR64 que ha mostrado resistencia durable en los últimos 20 años. Este gen presenta incompatibilidad con razas que poseen el gen de avirulencia ACE1. Su combinación con los genes *Pi1* y *Pi2* otorgaría protección contra la mayoría de los linajes de *P. oryzae* existentes en el Mercosur

En el siguiente trabajo se presenta el avance en el desarrollo de líneas con 4 genes de resistencia a *P. oryzae* utilizando selección asistida con marcadores moleculares.

MATERIALES Y METODOS

La selección asistida de individuos portando genes R se realizo usando marcadores microsatélites (SSR), un marcador SCAR (regiones amplificadas caracterizas y secuenciadas) y un marcador basado en la amplificación de secuencias indicadoras de un sitio específico (STS). Para los genes *Pi1*, *Pi2* y *Pi33* se usaron los marcadores SSR RM 224, RM 527, RM 72 respectivamente. Los genes *Pi9* y *Pita* se seleccionaron usando los marcadores SCAR pB-8 y STS YL155/87-YL183/87 respectivamente. Para introgresar los genes en un solo genotipo originalmente se crearon 3 poblaciones segregantes a partir del cruzamiento entre líneas y variedades donantes de los genes de interés.

1- Lic. en Biotecnología (MSc.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Ruta Prov. 39 Km. 143.5. Concepción del Uruguay, Entre Ríos. Argentina. CP (3260). jcolazo@concepcion.inta.gov.ar

2 -Ingeniero Agrónomo (PhD.) INTA. alivore@yahoo.com.ar

3- Ingeniero Agrónomo. INTA. fcattaneo@concepcion.inta.gov.ar

Los cruzamientos se orientaron para introgresar los genes R en un fondo genético similar a la variedad EPAGRI 108. Esta es una variedad de ciclo largo, alto rendimiento, buena calidad de grano. A pesar de poseer genes R, su resistencia fue vencida durante la campaña 1998/1999, un año después de su liberación en Brasil (Prabhu y Filippi, 1999).

Se crearon las poblaciones 41-3-7/EPAGRI 108, IR64/EPAGRI 108, 41-3-7/EPAGRI 108/309-5-12. Las mismas se mantuvieron en invernáculo. El tamaño mínimo de cada población para encontrar un genotipo deseado se calculo usando la formula:

$$N > \frac{\log(1-t)}{\log(1-p)}$$

Donde: p=probabilidad de encontrar un genotipo deseado si los genes segregan independientemente y t= probabilidad del 95% de encontrar ese determinado genotipo. Dentro de cada población se seleccionaron aquellos individuos con uno o varios genes R en estado homocigota. Estos individuos se cruzaron entre sí para poder generar un genotipo con los 5 genes de resistencia juntos.

RESULTADOS Y DISCUSION

El proceso de selección asistida comenzó con la elección de la línea 41-3-7 (*Pi1/Pi1*, *Pi2/Pi2*, *Pita/Pita*) de una población segregante (EPAGRI 108/CT 13432) creada en CIAT, Colombia. Esta línea se selecciono con marcadores moleculares por tener los genes de resistencia y un fondo genético 88% similar a EPAGRI 108 (Colazo et al.,2009). La misma se uso como padre en la creación de las poblaciones segregantes. A partir de estas poblaciones se seleccionaron las líneas 181/09-203 (*pi1/pi1*, *Pi2/Pi9*, *Pi33/pi33*, *Pita/pita*) y 174/09-12 (*Pi1/Pi1*, *Pi9/Pi9*, *pi33/pi33* *Pita/Pita*). En la campaña 2010/2011 una población proveniente de la autofecundación de la línea 174/09-12 fue evaluada en la provincia del Chaco, Argentina. Esta línea mostró resistencia a *P. oryzae* donde el testigo EPAGRI 108 presento susceptibilidad. A partir del cruzamiento de las líneas 181/09-203 x 174/09-12 se originaron dos poblaciones F1 denominadas 107/10 y 108/10. El análisis molecular de 17 individuos F₁ permitió seleccionar la planta F1 108/10-13 portando los 5 genes de resistencia en estado heterocigota. A partir de este individuo se genero una población segregante F₂ de 240 individuos los cuales se genotificaron con el set de marcadores moleculares (Fig 1 y 2). De esta población se seleccionaron 6 líneas con los genes *Pi1/Pi1*, *Pi9/Pi9*, *Pi33/Pi33*, *Pita/pita* y 1 líneas con la combinación *Pi1/Pi1*, *Pi2/Pi2*, *Pi33/Pi33* y *Pita/pita*

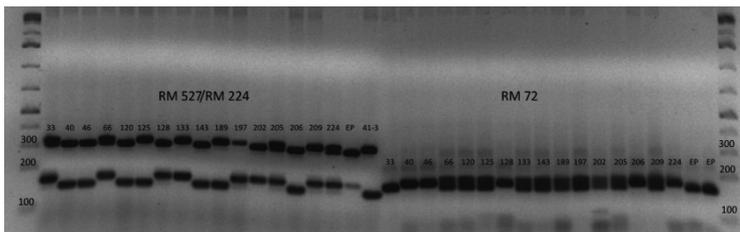


Figura 1. Población segregante 108/10-13. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. Del lado izquierdo del gel sobre la parte superior se muestra el microsatélite RM 527 ligado al gen *Pi2*, sobre la parte inferior el microsatélite RM 224 ligado al gen *Pi1*. Del lado izquierdo se muestra el microsatélite RM 72 ligado al gen *Pi-33*. Se pueden identificar individuos homocigotas y heterocigotas para cada marcador. También se muestra el individuo 46 que es una de líneas seleccionadas portando los genes *Pi1/Pi1*, *Pi9/Pi9*, *Pi33/Pi33*, *Pita/pita*. Se utilizo como control positivo la línea 41-3-7 (*Pi1/Pi1*, *Pi2/Pi2*) y como control negativo la variedad EPAGRI 108 (*pi1/pi1*, *pi2/pi2*).

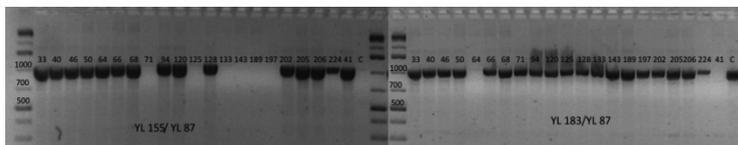


Figura 2. Población segregante 108/10-13. Gel de agarosa al 3%. El marcador YL 155/87 es un marcador dominante donde se produce amplificación cuando el individuo porta una o dos copias del alelo resistente PITA. El marcador YL 183/87 también es dominante y la amplificación se produce cuando el individuo porta una o dos copias del alelo susceptible pita

Los genes *Pi2* y *Pi9* forman parte del mismo cluster génico y están estrechamente ligados en repulsión por lo tanto se seleccionaron líneas con combinaciones de 4 genes porque es poco probable encontrar individuos con los genes *Pi2* y *Pi9* juntos.

Próximamente se iniciarán los ensayos de patogenicidad con la colección de aislamientos representativos de los linajes de *P. oryzae* encontradas para evaluar la acción conjunta de las dos combinaciones obtenidas de los 4 genes: *Pi1/Pi1*, *Pi9/Pi9*, *Pi33/Pi33*, *Pita/pita* y *Pi1/Pi1*, *Pi2/Pi2*, *Pi33/Pi33*, *Pita/pita*. Estas líneas se utilizarán para introgresar estos genes en variedades elites susceptibles al quemado de arroz. Estos materiales además serán probados en ambientes específicos para evaluar sus fondos genéticos.

CONCLUSION

Se lograron obtener líneas con dos combinaciones de cuatros genes R mediante selección asistida con marcadores moleculares. La selección con marcadores moleculares es una herramienta eficiente para seleccionar individuos portadores de genes R en poblaciones segregantes.

REFERENCIAS

- Colazo J.L.; Cattaneo F., Livore A.B. Selección asistida con marcadores microsatélites para la introgresión de genes de resistencia a Pyricularia grisea en arroz (*Oryza sativa*). In:XXXVIII CONGRESO ARGENTINO DE GENÉTICA. 2009. San Miguel de Tucumán.
- Jia Y. et al. Understanding the Co-evolution of Rice Blast Resistance Gene PI-TA and Mangnaporthe *oryzae* Avirulence Gene AVR-PITA. *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer 2009 137
- Prabhu A.S. y Filippi M.C. Padrão de virulência dos isolados de *Pyricularia grisea* provenientes da cultivar Epagri 108, de lavouras de arroz. *Fitopatologia Brasileira* 24:319. 1999.
- Zhou B. y G.L. Wang. Funtional and Evolutionary Analysis of the *Pi2/9* Locus in Rice. *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer 2009 127pp.