



INFORME TECNICO FINAL

PROYECTO

*Desarrollo de una Estrategia para la Obtención de Resistencia Durable
a Pyricularia grisea en Arroz en el Cono Sur*
- PYRICULARIA -

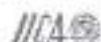
PROYECTO FONTAGRO - CONVENIO IICA-BID FTG/99-02-RG

Dr. Alberto B. Livore-INTA
Líder del Proyecto

Julio 2005

Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur

Argentina, Bolivia
Brasil, Chile
Paraguay, Uruguay


Instituto Interamericano
de Cooperación para
la Agricultura

CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
OBJETIVOS	2
SINTESIS DE PRODUCTOS Y RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PROYECTO	3
RECURSOS HUMANOS	3
INFORME DETALLADO DE TAREAS, MATERIALES Y METODOS	4
Extracción de DNA, hibridación y MGR-RFLP	4
Clasificación de Linajes	4
MGR-RFLP	4
AFLP	4
Introducción de genes de resistencia	5
Desarrollo de poblaciones	5
Ensayos de patogenicidad	5
RESULTADOS	6
Caracterización, linajes, distribución geográfica, frecuencia, y patogenicidad	6
Listado de linajes por MGR	6
Diversidad genómica detectada mediante marcadores AFLP y su asociación con MGR	8
Evolución del patosistema en Uruguay	10
Distribución Geográfica	10
Evaluación de Patogenicidad	11
Genes de resistencia	11
Identificación de marcadores de genes de resistencia	12
<i>Marcador para el alelo de resistencia del gen Pi-ta</i>	12
<i>Marcadores para Pi1, Pi2, Pi33</i>	13
Líneas Isogénicas portadoras de los genes de resistencia de interés	13
Desarrollo de poblaciones con genes de resistencia en germoplasma elite	13
Cursos de perfeccionamiento realizados	14
Alberto Blas Livore	15
Listado publicaciones y Congresos	15
ANEXO I: TABLAS y FIGURAS	17

RESUMEN

En el marco del PROYECTO FONTAGRO – PROCISUR sobre “Desarrollo de una estrategia para la obtención de resistencia durable a *Pyricularia grisea* en arroz en el Cono Sur” se obtuvieron importantes avances científicos en la caracterización de la estructura genética y patogénica de este hongo a nivel de la región arroceras del Cono Sur de América, lo cual es el paso ineludible para identificar los genes en el arroz que determinan incompatibilidad frente a las infecciones del patógeno. Con esa información disponible, los genes que confieren resistencia frente a los linajes prevalentes del patógeno podrán ser introducidos en los nuevos cultivares desarrollados en la región, confiriendo una resistencia de mayor espectro y consecuentemente más durable. De esta forma se impulsa la incorporación a los programas de mejoramiento genético de procedimientos biotecnológicos apropiados para la identificación de genes de resistencia y su incorporación en variedades ampliamente cultivadas, contribuyendo a una producción más sostenible del cultivo.

A partir de los resultados obtenidos, tales como determinación de la estructura y la diversidad genética de la población regional de *Pyricularia grisea*, identificación de las reacciones patogénicas de todos los aislamientos y familias del patógeno sobre líneas de arroz, establecimiento de la relación entre las variaciones patogénicas y moleculares en el patógeno, e identificación de “Hot Spots” (lugares de amplia variabilidad genética y alta presión de selección) para la selección de genes de resistencia durable y evaluación del origen de nuevas formas patogénicas del hongo, se pudo avanzar hacia la implementación de una estrategia regional para obtener resistencia durable utilizando la información genética y molecular sobre la relación huésped-patógeno entre *P. grisea* y arroz.

En forma inmediata estos resultados posibilitan que cada país mejore el conocimiento de la composición individual de aislamientos del patógeno, lo cual permite la identificación temprana de los linajes (familias genéticas del hongo) con mayor riesgo mediante marcadores genéticos moleculares así como estimar los futuros movimientos geográficos de los componentes de cada subpoblación. Asimismo se incorporó valiosa información a los programas de mejoramiento de la región acerca de que genes de resistencia permitirán excluir todos los aislamientos de los linajes detectados, acompañada por un conjunto de marcadores moleculares que apoyarán la introducción de estos genes mediante cruzamientos y selección asistida. Este aporte resulta especialmente destacable, dado que al contarse con amplia información genómica para el cultivo de arroz es posible evaluar múltiples marcadores asociados con la mayor parte de los genes y QTLs potencialmente funcionales, pero solamente a través del análisis funcional de la relación huésped-patógeno en los ambientes productivos es posible enfocarse en un número reducido de genes candidatos con alto impacto en la protección del cultivo, tales como los que fueron identificados a través de este proyecto.

En resumen, la intervención de un equipo internacional multidisciplinario integrado por fitopatólogos, biotecnólogos, genetistas y mejoradores representó un importante aporte para aumentar el conocimiento científico sobre uno de los principales enemigos de la productividad del cultivo en la región, permitiendo orientar los esfuerzos tecnológicos hacia la defensa de los cultivos a través de combinaciones más eficientes de genes de resistencia naturalmente disponibles en el germoplasma de arroz, satisfaciendo los requerimientos de calidad aplicados por los fitomejoradores y favoreciendo un sistema sostenible desde el punto de vista ambiental dentro del área del Cono Sur.

ANTECEDENTES

El Añublo o Quemado del Arroz (*Blast* en inglés) es considerado una de las principales enfermedades de este cereal en América Latina y el mundo, a causa de su alta incidencia bajo condiciones favorables y las pérdidas en el rendimiento que provoca, las que pueden superar el 50%, cuando se presenta como epidemia.

Existen en la región Latinoamericana variedades de arroz altamente susceptibles a la *Pyricularia* pero que por su alto rendimiento y calidad de grano siguen siendo ampliamente sembradas por los agricultores. En ataques severos de la enfermedad, los rendimientos son severamente afectados, o los agricultores tienen que recurrir a aplicaciones de fungicidas, incrementándose los costos de producción, contaminando el suelo y el agua, y afectando la salud humana. Se estima que más de 94 millones dólares son gastados en los países del Sur incluyendo Brasil para el control de la enfermedad. Este es el caso de la variedad de arroz El Paso 144 sembrada ampliamente en Uruguay y Argentina por su alto rendimiento y calidad de grano, pero que es susceptible a *Pyricularia grisea*.

La caracterización de las poblaciones del patógeno es el paso ineludible para identificar cual es la estructura genética y patogénica e identificar los genes en el arroz, que otorgan incompatibilidad a los mismos. Con esa información disponible, los alelos de resistencia pueden ser introducidos en los cultivares elite confiriendo una resistencia de mayor espectro y consecuentemente obteniendo una resistencia más durable. De esta forma la identificación de genes de resistencia y su incorporación en dichas variedades susceptibles contribuye a una producción más sostenible del cultivo.

OBJETIVOS

El objetivo general de este Proyecto fue desarrollar resistencia durable a la enfermedad más importante en el arroz causada por *Pyricularia grisea*, mediante la intervención de un equipo internacional multidisciplinario integrado por fitopatólogos, biotecnólogos, genetistas y mejoradores para contribuir al aumento de la productividad, satisfaciendo los requerimientos de calidad y favoreciendo un sistema sostenible desde el punto de vista ambiental dentro del área del Cono Sur. Este reporte presenta los resultados finales obtenidos en el desarrollo del Proyecto por los diferentes investigadores participantes en el Proyecto.

- Determinar la estructura y la diversidad genética de la población regional de *Pyricularia grisea*: (a) composición individual en cada país (b) estimación de los futuros movimientos geográficos de los componentes de cada subpoblación. Identificación de linajes (familias genéticas) mediante marcadores genéticos moleculares (MGR y/o *Poi2* PCR).
- Identificar las reacciones patogénicas de todos los aislamientos y familias, sobre los cultivares comerciales, NILs con genes de resistencia conocida y posibles dadores de resistencia.
- Establecer la relación entre las variaciones patogénicas y moleculares en el patógeno.
- Desarrollar la estrategia regional de "Hot Spots" (lugares de amplia variabilidad genética y alta presión de selección) para la selección de genes de resistencia durable y evaluación del origen de nuevas formas patogénicas del hongo.

- Implementar una estrategia regional para obtener resistencia durable utilizando la información genética y molecular sobre la relación huésped – patógeno entre *Piricularia grisea* y arroz.
- Identificar los genes de resistencia en arroz que excluyan todos los aislamientos de *Piricularia* integrantes de los linajes detectados.
- Desarrollar una estrategia de selección asistida por marcadores moleculares (basados en el uso de PCR) utilizando los genes de resistencia conocidos en los programas de mejoramiento de cada país.

SINTESIS DE PRODUCTOS Y RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PROYECTO

Se realizó la caracterización molecular MGR
Se definió la variabilidad existente en el patógeno
Se identificaron los linajes presentes en cada país
Se definió la frecuencia y distribución geográfica de los linajes
Se identificaron linajes no patogénicos sobre otras gramíneas
Se caracterizaron por patogenicidad aislamientos representativos de los linajes
Se identificaron las posibles fuentes de incompatibilidad (genes de resistencia)
Se introdujeron las fuentes de resistencia elegidas en material elite común a todos los países.
Se identificaron los marcadores moleculares ligados a las fuentes de resistencia elegidas para su uso en el proceso de selección .
Se desarrollaron líneas NIL (near isogenic lines) con los diferentes genes de resistencia (CIAT)
Se utilizaron marcadores AFLP para establecer modelos de predicción de la población del patógeno en ROU
Se capacitaron profesionales en las distintas áreas
Se presentaron trabajos en congresos
Se realizaron publicaciones de difusión técnica

Durante el desarrollo del proyecto se realizaron actividades según lo programado generando los productos y resultados mencionados anteriormente que contribuyen a cumplir con el objetivo principal de obtener una resistencia durable a *Piricularia grisea* en la región.

RECURSOS HUMANOS

F. CORREA, M. LEVY, M. M. LEVY, S. AVILA, P. BLANCO, F. CAPDEVIELLE, L. BONELL, V. CASTROAGUDIN, S. GUTIERREZ, V. PEDRAZA, M. I. PLATA, V. NONNECARRERE, G. BELDARRAIN, L. CASALES, F. ESCOBAR, C. A. DEZAR, LIVORE, A. B.

INFORME DETALLADO DE TAREAS, MATERIALES Y METODOS

El área de recolección del material de análisis comprende cultivos comerciales del NE de Argentina (las provincias de Entre Ríos, Corrientes, Chaco y Formosa), República Oriental del Uruguay, gentilmente provistos por Stella Ávila (INIA-ROU). y Sur de Brasil. En estas zonas el cultivo de arroz se realiza bajo riego. Asimismo, se recolectó material con lesiones características de añublo de nurseries para selección de líneas experimentales. Se analizaron un total de 230 aislamientos monoconidios.

Los aislamientos monospóricos fueron obtenidos a partir de lesiones en cuello, hoja y panoja, y conservado hasta su procesamiento según CIAT.

Extracción de DNA, hibridación y MGR-RFLP. El DNA genómico fue extraído de micelio crecido en medio líquido, proveniente de aislamientos monospóricos siguiendo el método de CTAB, según protocolos sugeridos por el CIAT con algunas modificaciones hechas en cada laboratorio, para eliminar el exceso de proteínas y maximizar los rendimientos. La calidad y cantidad del ADN se determinaron mediante electroforesis y fluorometría, previo a la digestión total con EcoRI. La digestión, electroforesis y shouthern blot se realizaron según procedimientos de CIAT, en los pasos de marcaje de la sonda, hibridación y detección respetaron las indicaciones del kit ECL (Amersham). Los tiempos de exposición de las placas radiográficas fueron de 30, 60 y 90 min. Las mismas fueron reveladas en un revelador clínico.

La sonda utilizada en la hibridación, MGR 586 (Magnaporte Grisea Repeats, subclone 586) -Levy et al (4), clonada en el plásmido pUC18, se amplificó por PCR con los iniciadores universales M13 en condiciones estándares de reacción. Se determinó el coeficiente de similitud entre linajes según el Índice de Nei y Li (5) (SAS). La relación fenética se estableció utilizando nuestro por remplazamiento y el algoritmo UPGMA (programas SAS y NTSYS).

Clasificación de Linajes

MGR-RFLP

Los aislamientos miembros de un linaje definido por el método MGR-DNA se agrupan por una similaridad igual o mayor al 90%. Los aislamientos pertenecientes a diferentes linajes se identifican por una disimilitud igual o mayor al 20 %. En el laboratorio de Morris Levy, Purdue University se ha utilizado adicionalmente un marcador RFLP que se ubica con la sonda para el locus *Avr-Pw12*, presente en todos los aislamientos que atacan arroz . Este locus caracteriza solamente a patotipos de arroz y los distingue con polimorfismos de RFLP diferenciales.

AFLP

Considerando que el genoma haploide de *M. grisea* tiene un tamaño aproximado de 38 Mbp, se utilizaron oligonucleótidos no selectivos (EcoRI+0 y MseI+0) para amplificar secuencias a partir del ADN cortado con las enzimas EcoRI y MseI, seguido por una etapa de amplificación selectiva con oligonucleótidos marcados (EcoRI+2 y MseI +2, en diferentes combinaciones), lo que permitió identificar más de 160 fragmentos polimórficos en el genoma de los aislamientos analizados. En base a la información molecular obtenida se ajustó un procedimiento de análisis discriminante basado en métodos no paramétricos ("K-Nearest Neighbor") como herramienta para construir modelos predictivos de pertenencia a grupos de referencia (linajes, etc.), utilizando algoritmos de validación cruzada ("leave-one-out crossvalidation" proc discrim, SAS Institute) para evaluar la efectividad de la clasificación a partir de

diferentes muestras de observaciones para las cuales la asignación de linajes es conocida.

Introducción de genes de resistencia Desarrollo de poblaciones

En CIAT

Para el desarrollo de retrocruzamientos y poblaciones segregantes, cada uno de los cultivares de arroz El Paso 144, Epagri 108, Epagri 109, Fedearroz 50 y Oryzica Llanos 5 fueron cruzados con la línea CT 13432-107 portadora de los tres genes de resistencia (Pi-1, Pi-2 y Pi-33) para el desarrollo de la población F₁; cada F₁ fue cruzada con el cultivar comercial para producir el primer retrocruzamiento y desarrollar la población RC₁F₁ la cual fue evaluada por su resistencia al patógeno y corroboración de la presencia de los genes mediante el uso de marcadores moleculares. Aquellas plantas resistentes con la presencia de los genes de resistencia y con características fenotípicas similares al progenitor recurrente o cultivar comercial, fueron cruzadas nuevamente con el mismo progenitor recurrente para desarrollar los subsiguientes retrocruces. De esta manera se repitió el procedimiento hasta el tercer retrocruzamiento. En cada retrocruzamiento, se seleccionaron plantas que dieron origen a generaciones más avanzadas dentro de cada retrocruzamiento para su evaluación y selección.

En INTA

El cultivar El Paso 144 fue cruzado con el cultivar Yashiro Mochi y con K1 portadores del alelo de resistencia del gen *Pi-ta* para generar individuos F₁; la F₁ fue cruzada con el cultivar recurrente El Paso 144 para generar la población segregante sobre la cual se seleccionaron por resistencia al linaje A individuos para volver a retrocruzar. Así se avanzó hasta retrocruza 3.

Ensayos de patogenicidad

Patogenicidad de linajes:

Se inocularon 8 cultivares del conjunto de Diferenciales Internacionales, 20 cultivares de USA y los cultivares susceptibles CO39 y M-201 con alta presión de inóculo y bajo condiciones altamente favorables de humedad y temperatura para la infección por *Pyricularia grisea*.

Compatibilidad de Linaje – gen de resistencia

Se inocularon 38 líneas y cultivares con gen de resistencia o combinaciones de genes de resistencia conocida. Se utilizó alta presión de inóculo bajo condiciones altamente favorables de humedad y temperatura para la infección por *Pyricularia grisea*.

Lecturas de lesiones:

S: totalmente susceptible con lesión tipo 4 (IRRI) y 30 % de área de hoja afectada respecto al control.

IS: moderadamente susceptible con lesión tipo 3 (IRRI) +- lesiones tipo 4 y área de hoja afectada menor al 30 % del control.

IR: moderadamente resistente con lesión tipo 2 (IRRI) alguna lesión tipo 3 y área de hoja afectada menor al 30 % del control.

R: totalmente resistente, con lesión tipo 1 o 0 (IRRI)

Inoculaciones en invernadero:

Para las inoculaciones y evaluaciones en invernadero de las poblaciones segregantes y plantas resistentes seleccionadas, diez plantas de 21 días de edad en tres

replicaciones fueron asperjadas con una suspensión de esporas de cada aislamiento de *Pyricularia grisea* en una concentración de 5×10^5 esporas por mililitro e incubadas por 15 días en jaulas plásticas bajo una humedad mayor al 80% y temperatura promedio de 27°C. Para corroborar la presencia de los genes de resistencia Pi-1, Pi-2 y Pi-33 en inoculaciones controladas, se utilizaron aislamientos individuales que contienen los correspondientes genes de avirulencia. Cada planta fue evaluada de acuerdo al porcentaje de área foliar afectada, determinándose como resistentes aquellas que no presentan tipo de lesiones susceptibles, o lesiones menores de 1mm de diámetro y baja o nula esporulación.

RESULTADOS

- Se estableció un equipo de trabajo internacional e interdisciplinario que desarrollo las actividades propuestas en el proyecto, complementando capacidades y optimizando el uso de los recursos.
Los grupos de trabajo recibieron los aportes correspondientes de las instituciones respectivas y se logró la participación de las entidades representativas de las cadenas agroalimentarias de arroz en cada país. Se destaca el apoyo financiero y de recursos humanos de la Asoc. de Plantadores de Arroz del Uruguay y la Fundación PROARROZ de Argentina. Las instituciones oficiales participantes fueron INIA, Uruguay, INTA, Argentina, Purdue University y CIAT.

F. CORREA, M. LEVY, M. M. LEVY, S. AVILA, P. BLANCO, F. CAPDEVIELLE, L. BONELL, V. CASTROAGUDIN, S. GUTIERREZ, V. PEDRAZA, M. I. PLATA, V. NONNECARRERE, G. BELDARRAIN, L. CASALES, F. ESCOBAR, C. A. DEZAR, LIVORE, A. B.

- productos, tecnologías, publicaciones

Caracterización, linajes, distribución geográfica, frecuencia, y patogenicidad.

Se identificaron los siguientes linajes en toda la región del Cono Sur.

Se han identificado 15 linajes distintos patogénicos sobre el arroz (denominados según M. Levy A, B, C, D/U3, E, F, H, I, J, K L, M, N, USA IG-1A y USA IG1B), y 6 linajes no patogénicos al arroz aislados sobre diferentes gramíneas (Grass # 1-6). Los linajes mas frecuentes son los A y F, los linajes B y C moderadamente frecuentes y le resto de los linajes se presenta en formas aisladas. Su distribución no es uniforme en todo el área del Cono Sur sino que se ubican en el siguiente orden: Argentina posee A, B, D/U3, E, F (1 aislamiento), e I; Uruguay posee A, C, D/U3, y US-IG-1A (1 aislamiento); y Brasil posee A, B, F, H, J, K, L, M, N y USA-IG-1B aislamientos.

Listado de linajes por MGR

Linaje A: es el más frecuente en la región, presente en todos los países y aislado preferentemente sobre arroces de tipo indica como el cultivar de mayor difusión El Paso 144. Los haplotipos que conforman este linaje, determinados por MGR-RFLP, tienen 90 % o mas de similitud. La caracterización utilizando la sonda avr-Pw12 identifica un solo patrón de dos bandas (4.8 y 18 Kb doble).

De acuerdo a la comparación realizada por Morris Levy de Purdue University este linaje presenta una alta similitud con los linajes SRL-1 y SRL-2 caracterizados en Colombia y al igual que ellos muestra incompatibilidad con los cultivares que poseen el alelo de resistencia del gen *Pi-ta*. Es importante señalar que linajes similares se han encontrado en México, Ecuador, Guatemala y El Salvador. Sin embargo no se ha detectado en USA probablemente, por que no se siembran cultivares susceptibles sino que se siembran cultivares con el alelo del gen de resistencia *Pi-ta*.

Linaje B: este linaje fue detectado en Argentina y Brasil con haplotipos 90 % o mas de similitud determinado por MGR-RFLP y con polimorfismo utilizando la sonda *avr-Pw12*. Es frecuentemente aislado sobre germoplasma japónica tropical o javanica similar al difundido en USA y otros introducidos de ese país. Se podría inferir que la fuente de origen de este linaje han sido los materiales procedentes de USA. M. Levy reporta un linaje similar en USA aislado por Marchetti durante el periodo 1990-94 en Texas.

Linaje C: se ha detectado exclusivamente en Uruguay especialmente sobre el cultivar de germoplasma japónica tropical INIA Tacuari. Sus haplotipos son 90% o mas de similares y es uniforme con una bandas de 6.3 Kb en la caracterización con la sonda *avr-Pw12*. De acuerdo a las comparaciones realizadas en la colección mundial de M. Levy, este linaje no se documenta en otro lugar.

Linaje D: es similar al Linaje B pero estadísticamente distinto. Se lo ha detectado en Argentina y Uruguay sobre germoplasma japónica tropical con índice de similitud en sus haplotipos mayor del 94% y monomórficos con una sola banda de 8 Kb en la caracterización con la sonda *avr-Pw12*. No se lo detecta en Brasil.

Linaje D: sub-linaje U3: dentro del linaje D se encuentran dos aislamientos de Uruguay que a pesar de tener un índice de similitud mayor del 95% en los haplotipos determinados por MGR-RFLP presentan un haplotipo caracterizado por *avr-Pw12* sensiblemente diferente al típico haplotipo encontrado para el resto de los aislamientos en el linaje D.

Es importante señalar que los linajes B, C, y D están estrechamente emparentados y coincidentemente sus aislamientos se realizaron sobre germoplasma japónica tropical.

Linaje E: es similar al Linaje F aunque se distingue estadísticamente en la caracterización por MGR-RFLP. Ha sido detectado solamente en Argentina y sobre germoplasma indica y japónica tropical. Se lo identifica con dos bandas claramente diferentes de 5.5 y 18 Kb usando la sonda *avr-Pw12*.

Linaje F: es el segundo en frecuencia en el Cono Sur y en el sur de Brasil. Un solo aislamiento ha sido identificado en la zona norte de Argentina donde se cultiva germoplasma proveniente de Santa Catalina, Brasil. Coincidentemente la mayor variabilidad de este linaje determinada con la sonda *avr-Pw12*, se ha encontrado en el Hot Spot de la localidad de Torres cercana a Santa Catalina. Este linaje también se encuentra en USA identificado como linaje IB-45. Los aislamientos de este linaje se han recolectado sobre germoplasma indica y japónica tropical.

Linaje H: si bien esta reportado en este informe, estos aislamientos provienen de la región norte del Brasil, del estado de Matogrosso y son claramente diferentes a los aislamientos identificados en el Sur de Brasil. Se caracterizan por haplotipos de tres

bandas (3.05, 5.8, y 6.3 kb) usando la sonda avr-Pw12; solamente un aislamiento produce una sola banda de 5.8 Kb, diferenciándose del resto

Linaje I: estos aislamientos han sido recolectados sobre el cultivar japónica Fortuna en Argentina. Tienen un único haplotipo de dos bandas de 5.5 y 8 K butilizando la sonda avr-Pw12

Linajes J, K, L, M y N : se han detectado en un aislamiento cada uno procedente de Brasil cuyos haplotipos MGR-RFLP son claramente distintos. Sin embargo utilizando la sonda avr-Pw12, los linajes J y N poseen las bandas 6.3 y 18 Kb, los linajes L y M una sola banda de 15 Kb y el linaje K una sola banda de 14 Kb.

Linaje USA IG-1A: este linaje reportado por (Levy et al., 1991, *The Plant Cell* 3:95-102), fue detectado en Uruguay en un aislamiento del Dr. M.A. Marchetti 1998 (URU 3302). Su caracterización por MGR-RFLP y su haplotipo avr-Pw12 son inequívocamente similares a los causantes de la epidemia de 1996 en California USA. Sin embargo estos haplotipos no han sido detectados en la región sur arroceras de USA (Texas, Arkansas, Louisiana). Se sugiere la hipótesis de que el origen de la epidemia en California podría ser una introducción de germoplasma del Cono Sur. Sus aislamientos han sido preferentemente aislados sobre germoplasma japónica.

Linaje USA IG-1B : es un aislamiento procedente de una colección de Brasil que coincide con el perfil de los haplotipos MGR-RFLP y avr-Pw12 del linaje de USA.

Linajes no patogénicos en arroz

Grass # 1: fue aislado sobre el cultivar Drew sin embargo su perfil MGR-RFLP es de un reducido número de bandas y nulo para la sonda avr-Pw12, como los aislamientos sobre otros hospedantes y no ha infectado a ninguno de los 30 cultivares, incluyendo a Drew en los ensayos de patogenicidad. Se puede suponer que este genotipo ha infectado plantas dañadas o fisiológicamente comprometidas como patógeno oportunista.

Grass # 2: aislamiento recolectado sobre *Echinochloa* sp ; 21 bandas MGR-RFLP y un haplotipo avr-Pw12 de un banda de 2.8 kb

Grass # 3: aislamiento sobre pasto Elefante y *Pennisetum purpureum* tiene 3 bandas MGR-RFLP y ninguna banda avr-Pw12

Grass # 4: aislamiento sobre *Digitaria sanguinalis*; tiene 8 bandas MGR-RFLP y un haplotipo avr-Pw12 de dos bandas de 7.3 y 18 kb

Grass # 5: aislamiento sobre *Bromus* sp. ; tiene 6 bandas MGR-RFLP y ninguna banda avr-Pw12

Grass # 6: aislamiento sobre *Setaria sphacellata*; tiene 1 banda MGR-RFLP y ninguna banda avr-Pw12

Diversidad genómica detectada mediante marcadores AFLP y su asociación con MGR

Los marcadores AFLP representan un sistema de muestreo de la diversidad genómica de *M. grisea* que podría utilizarse para inferir patrones con valor predictivo respecto a diferentes subconjuntos dentro de la estructura poblacional del patógeno en una determinada región. Sobre la base de la información molecular obtenida en las muestras de Uruguay, se ajustó un procedimiento de análisis discriminante basado en

métodos no paramétricos ("K-Nearest Neighbour") como herramienta para construir modelos predictivos de pertenencia a grupos de referencia (linajes, etc.), utilizando algoritmos de validación cruzada ("leave-one-out crossvalidation" proc discrim, SAS Institute) y así evaluar la efectividad de la clasificación a partir de diferentes muestras de observaciones para las cuales la asignación de linajes es conocida.

Utilizando una matriz de datos definida para presencia / ausencia de marcadores AFLP se agruparon los aislamientos en 6 grupos (procedimiento K-means-Statistica, variables = 168 loci AFLP), donde las distancias relativas entre aislamientos respecto al "centro" de cada grupo son minimizadas en comparación con las distancias relativas entre grupos. Los grupos identificados en este estudio presentan las siguientes características en cuanto a sus componentes:

Grupo 1, incluye aislamientos colectados sobre hojas de diferentes líneas en 1999 (L2882, L3128, CT13063-CA).

Grupo 2, incluye aislamientos colectados sobre hojas en Bluebelle (1995) y diferentes líneas en 1999 (L3006, L3019, L3070), así como aislamientos colectados sobre cuello de panoja y hojas en INIA Tacuarí (1995, 1998, y 1999).

Grupo 3, incluye aislamientos colectados sobre hojas en Bluebelle (1995) y sobre tallos en INIA Tacuarí (2001), y mayoritariamente aislamientos colectados sobre lesiones del cuello de la panoja en EP144 (2002) e INIA Tacuarí (1 aislamiento en 2002 y 4 aislamientos en 2003).

Grupo 4, incluye aislamientos colectados sobre lesiones del cuello de la panoja en Bluebelle (1995) e INIA Tacuarí (2002).

Grupo 5, incluye tres aislamientos colectados en 1999 sobre lesiones en hojas de diferentes líneas (L 2998, L3014, L3194), y 1 aislamiento colectado sobre lesiones del cuello de la panoja en EP144 (2002).

Grupo 6, incluye aislamientos colectados sobre lesiones del cuello de la panoja en Bluebelle (1995), EP144 (1995 y 2001), INIA Zapata (2001), INIA Tacuarí (2002 y 2003), e INIA Olimar (2003).

Se exploró el uso de algoritmos bioinformáticos que permitan analizar la información de marcadores AFLP e inferir patrones aplicables a la clasificación de aislamientos en sus correspondientes linajes. A efectos de establecer el valor informativo de los marcadores AFLP respecto a la asignación de aislamientos a grupos previamente identificados con metodologías de referencia, se estableció un modelo de clasificación (proc discrim - algoritmo k-NN, SAS Institute) que permite clasificar los aislamientos en cada uno de los linajes predefinidos, tomando como referencia un conjunto de aislamientos para los que se dispone de información sobre perfiles de AFLPs y sus correspondientes linajes establecidos mediante MGR.

La precisión del algoritmo de clasificación utilizado (k-NN. K-Nearest Neighbour) fué evaluada mediante una validación cruzada total del set de datos (n aislamientos), con respecto a la probabilidad de error en la ubicación de cada uno de los n aislamientos en linajes predefinidos ("misclassification") utilizando un set de $n-1$ aislamientos para predecir la ubicación de cada uno de los restantes aislamientos ("leave-one-out crossvalidation"). Los aislamientos utilizados como referencia (pertenecientes a los linajes A, C, D y U3) fueron correctamente clasificados en la totalidad de los casos, por lo que se plantea en forma hipotética la asignación de los restantes aislamientos a los

linajes A (15 aislamientos sobre líneas experimentales y cultivares), C (12 aislamientos sobre líneas experimentales y cultivares, con predominio de INIA Tacuarí), D (2 aislamientos sobre INIA Zapata e INIA Tacuarí), y U3 (1 aislamiento sobre Bluebelle).

La clasificación basada en 11 marcadores AFLP permitiría asignar correctamente todos los aislamientos en sus respectivos linajes, dado que se dispone de un número suficiente de aislamientos con información de linajes (MGR_obs) que serán utilizables como referencia para ajustar un modelo k-NN aplicable a cada colección de aislamientos analizada mediante la técnica AFLP.

Evolución del patosistema en Uruguay

En las dos últimas zafas INIA Tacuarí ha pasado a ser el cultivar más afectado por este patógeno, lo cual pone de manifiesto una importante diferencia respecto de zafas anteriores en las cuales el cultivar más afectado era El Paso 144. Estas observaciones pueden interpretarse en función de los cambios ocurridos en el comportamiento de la población del hongo causante del "bruzzone" (*M. grisea*) durante el período de muestreo considerado. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, INIA Tacuarí sería susceptible a aislamientos de los grupos 2, 3, 4 y 6, mientras EP 144 sería susceptible a aislamientos de los grupos 3, 5 y 6. Los aislamientos comprendidos en los grupos 3 y 6 son relativamente escasos antes de 2001, aumentando rápidamente su proporción en los últimos años. Los orígenes de estos grupos se podrían identificar en aislamientos que se encontraban presentes desde 1995 (grupo 6) y desde 1999 (grupo 3), y que representaron una pequeña proporción (5%-10%) del total de aislamientos realizados antes del año 2001.

A partir de 2001 los aislamientos que afectaron a INIA Tacuarí corresponderían mayoritariamente al grupo 3, lo cual coincide con una expansión del área afectada por la enfermedad que se presentaría casi endémica en algunas regiones y extendiendo su presencia más al sur de la zona Este del país, donde anteriormente era prácticamente inexistente. Durante 2003 la mayoría de los aislamientos de *M. grisea* fueron colectados sobre INIA Tacuarí, distribuidos entre el grupo 3 (60 %) y el grupo 6 (40%). Como hipótesis a considerar para las orientaciones futuras del programa de mejoramiento genético podemos suponer que los aislamientos relacionados con el grupo 6 representarían un mayor riesgo desde el punto de vista de la propagación del patógeno a diferentes áreas de cultivo, debido a que aparentemente tienen el potencial de afectar a la mayoría de los cultivares (Bluebelle, EP144, INIA Tacuarí, INIA Zapata, INIA Olimar).

El grupo 6 determinado por AFLP coincide con los aislamientos A y C clasificados por MGR-RFLP para los muestreos provenientes de Uruguay.

Distribución Geográfica

Sur de Brasil: los aislamientos provenientes del muestreo realizado por Joao Maciel en el estado de Rio Grande do Sul y muestras provistas por Dieter Kempf muestran una subpoblación del hongo con la mayor variabilidad de la región. Sus linajes presentes son: A, B, F, J, K, L, M, N Y USA IG-IB. Sin embargo puede identificarse a los linajes A y F como los predominantes.

Argentina: es la subregión con mayores aislamientos recolectados y una variabilidad menor a la del Sur del Brasil. Los linajes presentes identificados sobre cultivos comerciales y viveros de líneas experimentales son: A, B, D, E, F, e I. De los mencionados se destacan por su frecuencia los linajes A y B asociados normalmente

a hospedantes con germoplasma indica y japónica respectivamente. Solo el linaje I es único para esta subregión.

Uruguay: es la subregión con la menor variabilidad y con la presencia de los siguientes linajes: A, C, D, y USA IG-1A. Este último con un único aislamiento exclusivo en esta subregión.

Evaluación de Patogenicidad

La identificación de la variabilidad en patogenicidad presente caracterizada por los Cultivares Diferenciales Internacionales es una de las formas de comparación entre diferentes latitudes. Según la caracterización realizada en el laboratorio de M. Levy las razas IA o IC son las prominentes en la región de estudio (Tabla 1 Anexo I). A pesar de que esta clasificación no es un estimador confiable de la vulnerabilidad de los cultivares nos permite identificar un patrón de incompatibilidad importante al comparar el comportamiento de los aislamientos sobre el material de USA. Los cultivares que muestran incompatibilidad con la mayoría de los aislamientos son Katy, Kaybonnet y en menor medida Drew y Madison. Los cuatro cultivares se distinguen por ser portadores del alelo de resistencia del gen *Pi-ta*, y por lo tanto permiten sugerir esta fuente de resistencia como la indicada para lograr incompatibilidad con estos aislamientos en el cultivar El Paso 144.

La evaluación de compatibilidad de los aislamientos representativos de los linajes mas importantes y las diferentes fuentes de resistencia y sus combinaciones permite una mejor comprensión de la estructura genética necesaria para reducir la vulnerabilidad de los cultivares de alto rendimiento (Tabla 2 Anexo I).

Esta evaluación reitera la validez del alelo de resistencia del gen *Pi-ta*, con una excepción en el linaje F. Este linaje (F) ha presentado algunos aislamientos provenientes de Brasil que son capaces de infectar la fuente de resistencia *Pi-ta*. Otra fuente de resistencia como la combinación de alelos *Pi 1*, *Pi 2* y *Pi 33* del CIAT, ha sido incluida para ampliar el espectro de incompatibilidad y generar materiales élite, como El Paso 144, con resistencia durable.

Los análisis de patogenicidad realizados en Uruguay (Tabla 4 Anexo I) y Argentina presentan menor eficacia de las infecciones reportando falta de síntomas que no necesariamente indican incompatibilidad. Sin embargo, las lecturas que indican compatibilidad son coincidentes con las reportadas por M. Levy en su laboratorio. La fuente del alelo de resistencia del gen *Pi-ta* (Yashiro mochi) registra reacciones de incompatibilidad con los aislamientos del linaje A y F de Argentina.

Solo la combinación de los genes *Pi 1*, *Pi 2* y *Pi 33* otorgan una resistencia completa a todos los linajes presentes en la región.

Genes de resistencia

Sobre la base de los resultados de la caracterización de las poblaciones y considerando que el linaje de mayor frecuencia es el linaje A se exploró el germoplasma disponible que presentase algún gen de incompatibilidad con este linaje. Se determinó que el alelo de resistencia del gen *Pi-ta* presente en los cultivares Yashiro mochi y K1 demostraba incompatibilidad con el linaje A.

Los Linajes B,C, y D nunca estan presentes en el cultivar El Paso 144 a pesar de encontrarse en ubicaciones simpátricas a otros cultivares que presentaban la infección de los linajes mencionados. Es posible suponer que el cultivar El Paso 144 posea

genes de resistencia a esos linajes que atacan germoplasma japónica tropical a los cuales reemplazó, como resistente, en su lanzamiento en 1985.

La introducción del alelo del gen de resistencia *Pi-ta* en el cultivar El Paso 144 aumentaría significativamente su espectro de incompatibilidad y consecuentemente la durabilidad de su resistencia.

El único aislamiento recolectado en Argentina del linaje F también presenta incompatibilidad con la fuente de resistencia *Pi-ta*. Sin embargo en los últimos aislamientos analizados provenientes del Hot Spot de Brasil se han detectado aislamientos del linaje F que vencen la resistencia del gen *Pi-ta*. Esta nueva realidad obliga a ampliar el número de genes que den cobertura de incompatibilidad a la totalidad de los linajes presentes.

Estudios realizados en CIAT han demostrado que la combinación de los genes de resistencia *Pi-1* (cromosoma 11), *Pi-2* (cromosoma 6), y el gen *Pi-33* (cromosoma 8) confieren resistencia a muchas poblaciones de *Pyricularia* en América Latina. Dichos genes están siendo incorporados mediante un programa de retrocruzamientos asistido por marcadores moleculares en diferentes variedades de la región. Varias poblaciones de mejoramiento (RC_1F_1 , RC_1F_2 , RC_1F_3 , RC_1F_4 , RC_2F_1 , RC_2F_2 , RC_3F_1 , RC_3F_2 , y RC_3F_3) derivadas de los retrocruzamientos entre varias variedades de arroz de América Latina (El Paso 144, Epagri 108, Epagri 109, Fedearroz 50, Oryzica 1) y una línea de arroz usada como fuente de los tres genes (CT 13432-107) han sido desarrolladas para la identificación de líneas heterocigotas que contengan los tres genes. Inoculaciones en invernadero con aislamientos del hongo que contienen genes de avirulencia correspondientes a los tres genes de resistencia fueron realizadas para la selección de plantas resistentes utilizadas en los retrocruzamientos. Adicionalmente, las poblaciones fueron evaluadas en campo (estación experimental de Santa Rosa en Colombia) bajo alta presión de la enfermedad para la selección también de plantas resistentes a *Pyricularia* y fenotípicamente similares a los padres recurrentes y desarrollo de otro retrocruzamiento otra vez con los correspondientes padres recurrentes. La presencia de los tres genes de resistencia en las plantas seleccionadas que serían usadas en los retrocruzamientos fue corroborada mediante el uso de marcadores moleculares. Con el objetivo de disminuir el número de plantas resistentes, solo aquellas plantas resistentes cuyo fenotipo fuera similar al padre recurrente fueron analizadas con los marcadores microsatélites asociados a los genes *Pi-1*, *Pi-2*, y *Pi-33*.

Identificación de marcadores de genes de resistencia

Marcador para el alelo de resistencia del gen *Pi-ta*

El alelo de resistencia del gen ha demostrado incompatibilidad con el linaje A caracterizado en este estudio. Un marcador molecular de este alelo basado en un sistema rápido y de bajo costo como el de PCR permitiría avanzar rápidamente en el proceso de selección por resistencia en cualquier programa de introgresión del alelo. En el año 2002 Jia Y. et al. Informan sobre el desarrollo de un par de "primers" específicos e internos del gen que permiten distinguir el alelo dominante del gen del alelo recesivo.

Los primers denominados YL155/YL87 amplifican el segmento dentro del gen que identifica al alelo dominante y que difiere del alelo recesivo en un solo nucleótido. Se han utilizado estos "primers o iniciadores" para identificar las líneas que portan el alelo de resistencia del gen *Pi-ta* dentro de las poblaciones de retrocruza realizadas con el cultivar recurrente El Paso 144.

Marcadores para *Pi1*, *Pi2*, *Pi33*

Con el objetivo de Pyramidar estos tres genes de resistencia en una variedad comercial como El Paso 144, fue necesario identificar marcadores moleculares asociados a ellos. Dentro del presente proyecto, se probaron en el 2003 un total de 56 marcadores microsatélites seleccionados de bases de datos públicas, basados en su proximidad a los tres genes de interés. Se encontró un total de 7 marcadores asociados al gen *Pi-1*, tres asociados al gen *Pi-33* mas otro en el 2004, y dos al gen *Pi-2*, incluyendo el SCAR B-10 desarrollado en la unidad de Biotecnología del CIAT. Estos marcadores se probaron en un total de 120 líneas isogénicas que contienen cada gen de resistencia o combinaciones de ellos, para corroborar la asociación del marcador con el gen y determinar la distancia relativa entre el marcador y el gen.

Los marcadores microsatélites más útiles para corroborar la incorporación de los tres genes de resistencia en el proceso de retrocruzamiento fueron RM 1233*1, RM 5926, y RM 224 para el gen de resistencia *Pi-1*, y el RM 527 y SCAR B-10 para el gen *Pi-2*. Los marcadores moleculares identificados y reportados en el 2003 para el gen *Pi-33* no fueron suficientemente discriminantes para determinar la presencia o ausencia del gen *Pi-33* en variedades resistentes y susceptibles. Análisis de marcadores adicionales permitió identificar al marcador microsatélite RM 310 (forward primer: CCAAACATTAAATATCATG; reverse primer: GCTTGTTGGTCATTACCATTC) más cercano al gen *Pi-33*, y por lo tanto está siendo usado para corroborar la presencia del gen en las líneas seleccionadas.

Líneas Isogénicas portadoras de los genes de resistencia de interés

Incremento y envío a Argentina y Uruguay de 46 líneas diferenciales con diferentes genes de resistencia para determinar el uso potencial de dichos genes realizando inoculaciones controladas de dichas líneas con los diferentes haplotipos del hongo encontrados en los estudios sobre la caracterización de la estructura genética del patógeno dentro del proyecto. (Tabla 6 Anexo I).

En la campaña 2004-05 se instalaron tres de estos viveros consistentes en tres macetas por cultivar, en chacras de productores, en las diferentes regiones arroceras, donde se consideró posible su aparición. En cada uno, se incluyó el set de 46 Diferenciales, más los nueve cultivares sembrados actualmente. Varias líneas de dos de los tres viveros instalados entre ellas el testigo susceptible Fanny, presentaron síntomas provocados por *Piricularia*, en las hojas. Las macetas fueron retiradas de la chacra con la aparición de síntomas, realizándose los aislamientos correspondientes. Dichos aislamientos no están incluidos en el presente estudio, pero se determinó la eficacia de esta estrategia, ya que aunque no hubo presencia de la enfermedad a nivel de chacras, se detectó la presencia del patógeno y pudo obtenerse información del año.

Desarrollo de poblaciones con genes de resistencia en germoplasma elite

En CIAT

Para el desarrollo de retrocruzamientos y poblaciones segregantes, cada uno de los cultivares de arroz El Paso 144, Epagri 108, Epagri 109, Fedearroz 50 y Oryzica Llanos 5 fueron cruzados con la línea CT 13432-107 portadora de los tres genes de resistencia (*Pi-1*, *Pi-2* y *Pi-33*) para el desarrollo de la población F_1 ; cada F_1 fue cruzada con el cultivar comercial para producir el primer retrocruzamiento y desarrollar la población RC_1F_1 la cual fue evaluada por su resistencia al patógeno y corroboración de la presencia de los genes mediante el uso de marcadores moleculares. Aquellas plantas resistentes con la presencia de los genes de resistencia y con características

fenotípicas similares al progenitor recurrente o cultivar comercial, fueron cruzadas nuevamente con el mismo progenitor recurrente para desarrollar los subsiguientes retrocruces. De esta manera se repitió el procedimiento hasta el tercer retrocruzamiento. En cada retrocruzamiento, se seleccionaron plantas que dieron origen a generaciones más avanzadas dentro de cada retrocruzamiento para su evaluación y selección.

Con el objetivo de disminuir el número de plantas resistentes, solo aquellas plantas resistentes cuyo fenotipo fuera similar al padre recurrente fueron analizadas con los marcadores microsatélites asociados a los genes *Pi-1*, *Pi-2*, y *Pi-33*.

Diferentes generaciones de cada retrocruzamiento (BC1F1, BC1F2, BC1F3, BC1F4, BC2F1, BC2F2, BC3F1) fueron evaluadas durante el 2004 para la selección de plantas resistentes a *Pyricularia* con características agronómicas deseadas y fenotípicamente tan parecidas a los padres recurrentes como fue posible. Un total de 1033 F2-F3 líneas del primer y segundo retrocruzamiento realizado en el 2003 fueron evaluadas en campo y plantas resistentes con la presencia de los genes *Pi-1*, *Pi-2* y *Pi-33* seleccionadas para su multiplicación. Dichas selecciones serán multiplicadas en CIAT en el primer semestre de 2005 y las líneas seleccionadas serán enviadas a Argentina y Uruguay para su posterior evaluación y selección en campo como resultado de este Proyecto. Plantas seleccionadas exhiben no solo resistencia a *Pyricularia* en hoja y cuello sino también tallos fuertes, hojas verdes con senescencia tardía, panículas grandes con un alto número de granos, y alta fertilidad. Adicionalmente la calidad de grano está siendo evaluada en las líneas seleccionadas.

En INTA

Para el desarrollo de retrocruzamientos y poblaciones segregantes, el cultivar El Paso 144, fue cruzado con el donante del alelo de resistencia *Pi-ta*, Kiyosawa (K1) y con el cultivar Yashiro mochi. La población F₁ fue cruzada con el cultivar comercial para producir el primer retrocruzamiento y desarrollar la población RC₁F₁ la cual fue evaluada por su resistencia al patógeno con aislamientos del linaje A. Aquellas plantas resistentes y con características fenotípicas similares al cultivar comercial, fueron cruzadas nuevamente con el mismo progenitor recurrente para desarrollar los subsiguientes retrocruces. Se seleccionaron plantas que dieron origen a generaciones más avanzadas dentro de cada retrocruzamiento para su evaluación y selección.

Se obtuvieron 17 poblaciones BC2F2 del cruzamiento (Kiyosawa) K1 x El Paso 144 que fueron evaluadas por sus características agrofitofenológicas y seleccionadas por su semejanza con el padre recurrente. Actualmente son evaluadas por la presencia del marcador del alelo de resistencia del gen *Pi-ta* y se han verificado 7 individuos con resultado positivo del marcador de PCR YL 155/YL 87.

Se generaron 95 poblaciones BC1F2 del cruzamiento Yashiro mochi x El Paso 144 y son actualmente seleccionadas por el marcador *Pi-ta*.

Cursos de perfeccionamiento realizados

1. Identificación morfológica y molecular de especies de *Straminipiles* y hongos importantes en la agricultura: *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Colletotrichum*.

Dra. Gloria Abad, Dr. Jorge Abad, Plant Pathogen Identification Laboratory, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA

INTA- IFFIVE. Ciudad de Córdoba- 18 y 19 de Abril de 2005.

Curso pre-congreso. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología.

Participante del proyecto: Vanina Castroagudín

2. Caracterização de microrganismos presentes no ambiente: métodos moleculares e agrupamiento filogenéticos para prospecção da biodiversidade.

Director del curso: Dra. Katia Texeira Dos Santos.

EMBRAPA Agrobiología - Centro Argentino Brasileño de Biotecnología (CABBIO)
Serópedica - Rio de Janeiro, Rep. Federativa del Brasil. Del 2 al 13 de Agosto de 2004.

**Participantes del proyecto Vanina Castroagudín
Virginia Pedraza**

3. Capacitación durante 15 días en CIAT, de la Lic. Gisela Beldarrain, que permitió una puesta al día en metodologías varias, referidas al manejo de las muestras de plantas con síntomas, obtención de aislamientos monospóricos a partir de las mismas, incremento de inóculo, inoculación y evaluación.

Participante del proyecto: Lic. Gisela Beldarrain

4. EXPERIMENTOS AGRÍCOLAS: DISEÑO, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN. Curso teórico práctico, de 24 horas de duración dictado en la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino - INTA, del 29 de junio al 1 de julio del 2004.

Participante del proyecto: Martha Lucrecia Bonell

5. BUENOS AIRES PLANT BIOLOGY LECTURES, SERIES 2004 organizadas por International Society of Plant Molecular Biology (ISPMB), the European Molecular Biology Organization (EMBO), la Universidad de Buenos Aires (UBA) y CONICET y llevadas a cabo en Buenos Aires el 25, 26 y 27 de octubre en la Biblioteca Nacional de la Ciudad de Buenos Aires

**Participantes del proyecto: Martha Lucrecia Bonell
Alberto Blas Livore**

Listado publicaciones y Congresos

LIVORE, A.B.,C. DEZAR, M. I. PLATA; S. AVILA and M. LEVY. 1999 "Molecular characterization of *Pyricularia grisea* population in the irrigated rice region of the Southern Cone of Latin America", 2º Temperate Rice Conference, Sacramento California USA.

BONELL, M. L.; LIVORE, A. B.; DEZAR, C. A.; PLATA, M. I.; GUTIERREZ, S. Caracterización molecular de aislamientos de *Pyricularia grisea*. XXXI Congreso Argentino de Genética organizado por la Sociedad Argentina de Genética llevadas a cabo en La Plata del 17 al 20 de septiembre de 2002. Basic & Applied Genetics, 15: 110/144.

BONELL, M. L.; LIVORE, A. B.; DEZAR, C. A.; PLATA, M. I.; GUTIERREZ, S. AVANCES EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ARROZ POR RESISTENCIA A PYRICULARIA GRISEA... III Temperate Rice Conference, Punta del Este, ROU, 10-13 de Marzo 2003.

BONELL MARTHA L., LIVORE ALBERTO B. 2003. Empleo de la secuencia repetitiva *Pot2* en la obtención de patrones mediante amplificación por PCR para la caracterización molecular de poblaciones de *Pyricularia grisea*. 32 Congreso Argentino de Genética, Huerta Grande Córdoba ARG. 21-24 de septiembre 2003.

LIVORE, A. B. F. CORREA, M. LEVY, S. AVILA, P. BLANCO, F. CAPDEVIELLE, L. BONELL, V. CASTROAGUDIN, S. GUTIERREZ, M.M. MAYA, V. PEDRAZA, M.I. PLATA, V. NONNECARRERE, G. BELDARRAIN, L. CASALES, F. ESCOBAR. 2004 Desarrollo de una estrategia para la obtención de resistencia durable a *Pyricularia*

grisea de arroz en el cono sur. En : ARROZ Resultados Experimentales 2003-04 INIA Treinta Tres EE del Este, Actividades de difusión 373: pp. 23-26.

CASTROAGUDÍN,V.L.; DEZAR C.A.; PLATA M.I.; BONELL M.L.; GUTIÉRREZ S.; ÁVILA M.S; LIVORE A. B.; CORREA F; LEVY M. Diversidad poblacional de *Pyricularia grisea* en Argentina, Uruguay y Brasil según análisis RFLP- DNA *Fingerprinting*. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Carlos Paz, Provincia de Córdoba. Del 19 al 22 de 2005. ALF-AAF. Libro de Resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología p 516.