

# 9

## Biología molecular de la soja

**9a.** Uso de Marcadores  
Moleculares como  
herramientas para incorporar  
genes de resistencia a  
enfermedades en soja



# Uso de Marcadores Moleculares como herramientas para incorporar genes de resistencia a enfermedades en soja

Rocha, Carla M. L. \*, María A. Chiesa\*\*\*\*, Esteban M. Pardo\*, María G. García\*, Victoria González\*\*, Mario Devani\*\*, Fernando Ledesma\*\*\*, Daniel L. Ploper\*\*, Eligio N. Morandi\*\*\*\* y Atilio P. Castagnaro\*.

\*Sección Biotecnología, \*\*Sección Fitopatología y \*\*\*Sección Granos, EEAOC. \*\*\*\* Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR, CONICET-UNR). E-mail: atiliocastagnaro@gmail.com

## Introducción

La biotecnología y la ingeniería molecular han desarrollado herramientas durante los últimos años que prometen aumentar significativamente la eficiencia de los programas de mejoramiento genético. Con la utilización de técnicas moleculares apropiadas es posible identificar genes de interés, o indirectamente a través de marcadores moleculares, y transferirlos entre variedades mediante cruzamientos tradicionales. Una de las técnicas más utilizadas es la de Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM), que permite elegir los genes candidatos a introducir por cruzamientos

clásicos en variedades elites (Khan *et al.*, 2017).

Un marcador molecular (MM) es una secuencia específica de ADN que puede ser identificada y localizada en el genoma de una planta, y si este MM se encuentra ligado a un gen de interés, como por ejemplo un gen que otorga resistencia a una enfermedad pero cuya secuencia no se conoce, es posible identificar la presencia de ese gen en una planta por medio del marcador. Por lo tanto, si se cruzan dos genotipos, uno que lleva un gen de resistencia y un MM ligado a ese gen con otro genotipo al cual se desea incorporar el gen de resistencia, es posible analizar la descendencia del cruzamiento e

identificar a los hijos que hayan recibido por herencia simple el MM, y por lo tanto el gen de interés ligado. Posteriormente, mediante retro - cruza con el parental recurrente y el análisis molecular de la presencia del MM, se puede recuperar el fondo genético de la variedad elite con el gen de resistencia incorporado (Mohan *et al.*, 1997). La Sección Biotecnología de la EEAOC cuenta con personal capacitado y con los equipamientos apropiados para llevar adelante este tipo de estrategias y apoyar al Sub - Programa de Mejoramiento Genético de la Soja (SPMGS) del Programa Granos. En este sentido, bajo el marco del Programa Granos y mediante una colaboración con el Laboratorio



Figura 1. Síntomas de las tres enfermedades en soja. A) Mancha Ojo de Rana; B) Síndrome de la Muerte Súbita; y C) Cancro del Tallo de la soja.

de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario e Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario (IICAR, Conicet - UNR), se está llevando adelante un proceso de SAM con el objetivo de incorporar genes de resistencia a tres enfermedades (Figura 1) en un solo genotipo de soja. Si se logra esto, se obtendría un genotipo portador de un paquete de genes que podrá ser utilizado como parental dador de resistencias a otras líneas promisorias, lo que resultaría en un ahorro de tiempo y recursos.

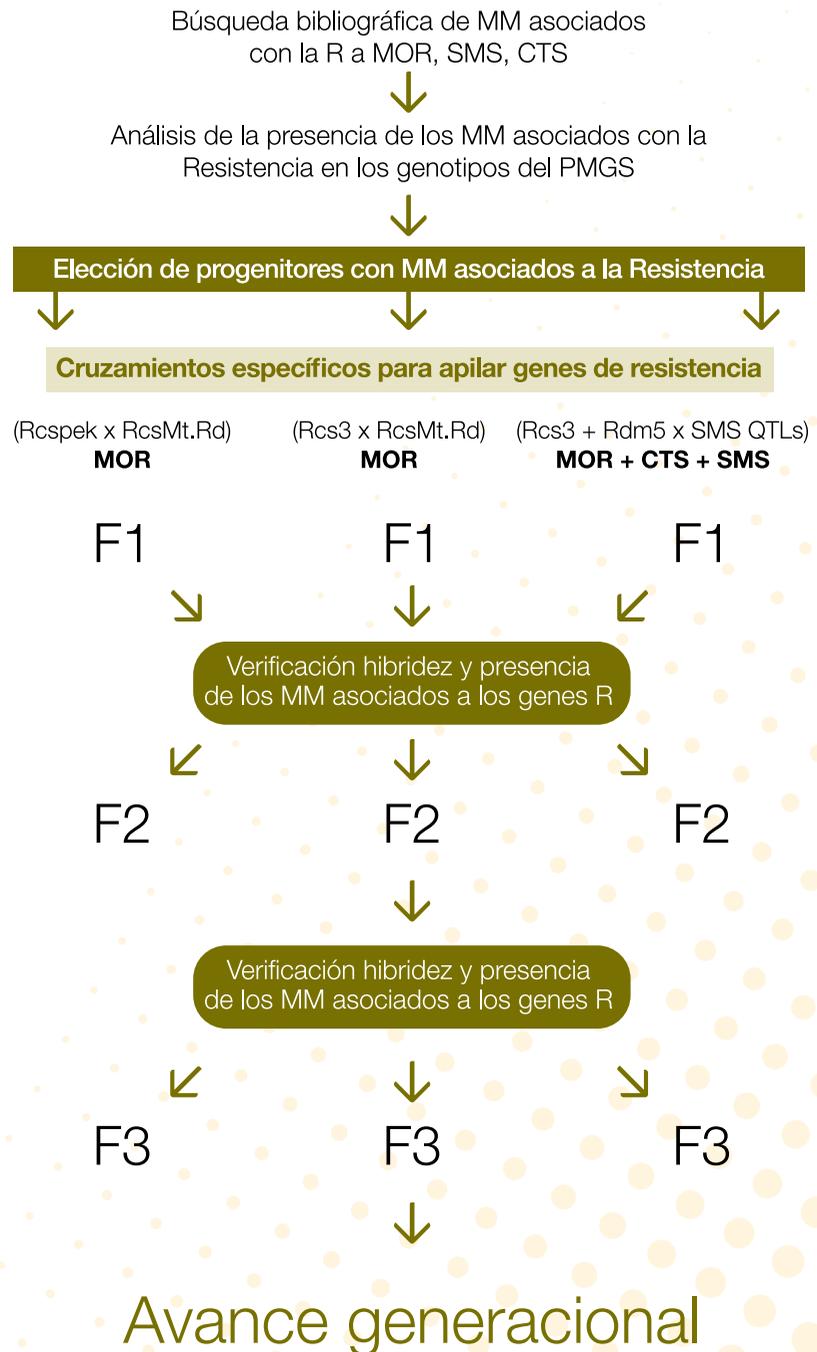
El objetivo de este trabajo fue analizar en los genotipos del banco de germoplasma del Sub Programa de Mejoramiento Genético de la Soja (SPMGS) de la EEAOC la presencia de MM microsatélites (SSR) ligados a genes de resistencia a las enfermedades Macha Ojo de Rana (MOR), Síndrome de la Muerte Súbita (SMS) y Cancro del Tallo de la Soja (CTS), para utilizarlos en futuras estrategias de mejoramiento asistido.

### ■ Materiales y métodos

Se seleccionaron 64 genotipos del Banco de Germoplasma del SPMGS de la EEAOC en base a recomendaciones del Jefe del Programa Granos y se analizó la presencia de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a las tres enfermedades de interés. Los genotipos que se seleccionaron como candidatos para realizar cruzamientos dirigidos fueron los que presentaron el mayor número de MM ligados a tres genes de

resistencia a la mancha de ojo de rana llamados *Rcs3*, *Rcs<sub>Peking</sub>* y *Rcs<sub>Mte.Red</sub>* (Mian *et al.*, 2008), dos genes de resistencia al cancro del tallo conocidos como *Rdm5* y *Rdm4* (Chiesa *et al.*, 2017) y los marcadores moleculares

microsatélites (SSR) *Satt163*, *Satt371* y *Satt354* ligados a QTLs\* de resistencia al síndrome de la muerte súbita (Yamanaka *et al.*, 2006). En la Figura 2 se muestra el esquema de trabajo que se está llevando a cabo.



**Figura 2.** Etapas propuestas para incorporar resistencia a MOR, CTS, SMS en un solo genotipo mediante una aproximación de selección asistida con marcadores moleculares.

\*QTL: en genética un **QTL** (acrónimo del inglés "quantitative trait locus", «locus de un carácter cuantitativo») es un locus cuya variación alélica está asociada con la variación de un carácter cuantitativo, es decir, con aquellos caracteres cuantificables que varían de forma continua.

## Resultados

En la primera etapa de nuestro análisis se observó que el 25% de los genotipos analizados del Banco de Germoplasma del SPMGS de la EEAOC presentaron el marcador ligado al gen *Rcs3*, mientras que sólo el 3% tienen el MM ligado al gen *Rcs<sub>Mte.Red</sub>* pero en ninguno de los genotipos se observó la presencia del gen *Rcs<sub>Peking</sub>* (Figura 3).

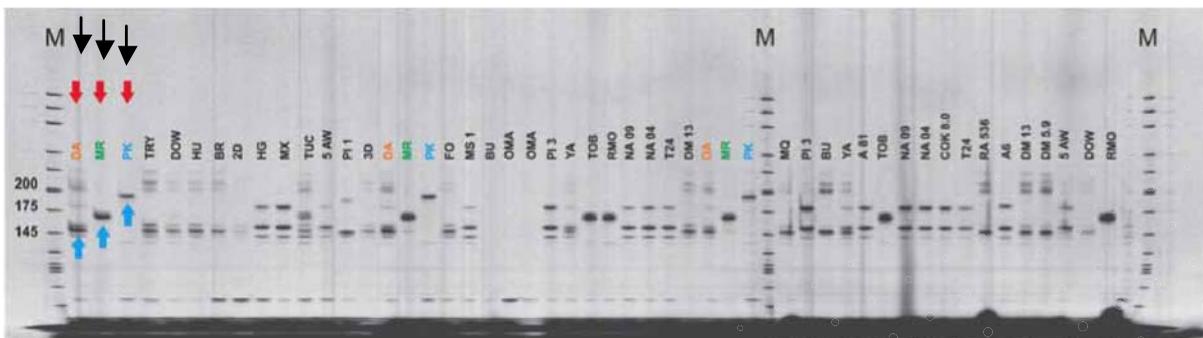
Teniendo en cuenta estos resultados se planificaron y realizaron cruzamientos para incorporar el gen *Rcs<sub>Peking</sub>* (presente en el genotipo Peking) y apilar las distintas fuentes de resistencia para MOR en otros genotipos del SPMGS. Los individuos que mostraron la presencia de MM ligados a los

genes de Resistencia a MOR de al menos dos fuentes distintas fueron autofecundados y avanzados generacionalmente hasta la generación F3. Se obtuvieron dos tipos de cruzamientos efectivos con apilamientos distintos: por un lado se apilaron los genes *Rcs3* + *Rcs<sub>Mte.Red</sub>* y por otro lado los genes *Rcs<sub>Peking</sub>* + *Rcs<sub>Mte.Red</sub>* (Figura 4).

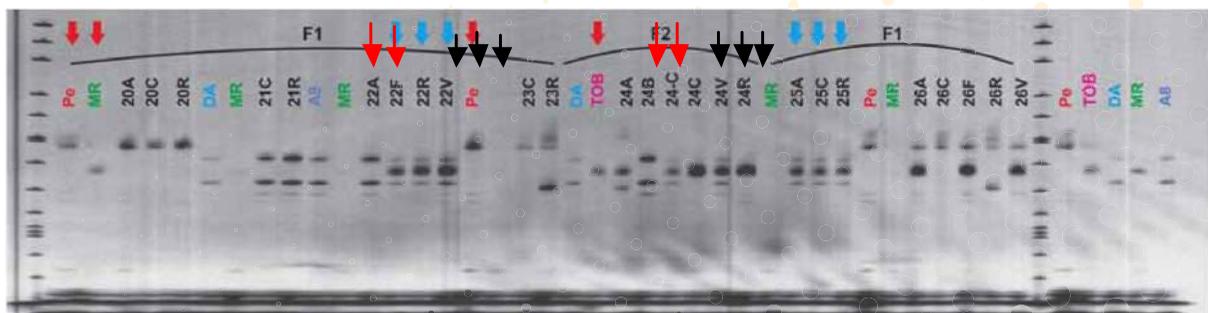
Cuando se analizó la presencia o ausencia de MM ligados a los genes de resistencia a CTS se observó que el 7% de los genotipos de Banco de Germoplasma del SPMGS presentaron MM ligados al gen *Rdm5* (Figura 5), mientras que el 55% de los genotipos presentaron MM ligados al gen *Rdm4*. Además, en ningún genotipo susceptible se observó la presencia de estos MM, lo que fortalece la propuesta de

utilización de estos MM como indicadores de resistencia a CTS.

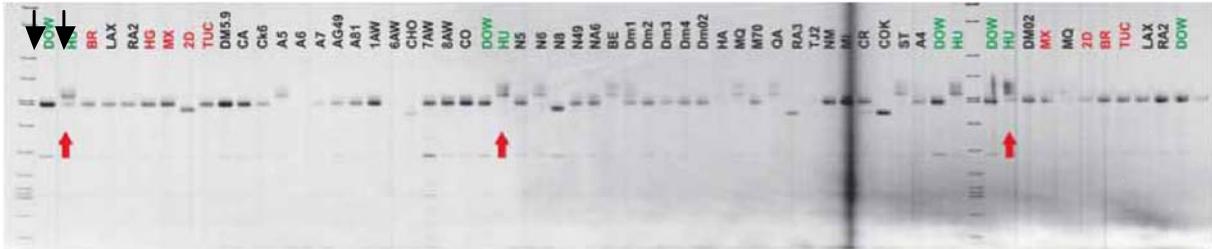
Los MM asociados a los QTLs de resistencia para SMS se encontraron en el 10% de los genotipos analizados. Los genotipos obtenidos con MM apilados ligados a la resistencia a MOR y CTS se seleccionaron y se realizaron dos cruzamientos para apilar además los MM ligados a QTLs de resistencia al SMS. Las cruza obtenidas se analizaron para identificar las cruza efectivas, o sea los descendientes híbridos. El 53% y el 73% de los individuos de cada familia resultaron híbridos efectivos (Figura 6). Los híbridos efectivos identificados se autofecundaron y se obtuvieron líneas F2 que serán avanzadas generacionalmente para estabilizar el carácter según el esquema de la Figura 2.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de poliacrilamida para la presencia de los distintos alelos de los MM ligados a genes de R a MOR en los genotipos de Banco de Germoplasma de la EEAOC. Las flechas rojas indican los genotipos portadores de los genes de resistencia: Da (Davis), MR (Monte Redondo) y PK (Peking); las flechas azules indican las bandas correspondientes a los fragmentos de amplificación del MM para cada genotipo portador de la resistencia.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de poliacrilamida mostrando los cruzamientos efectivos y obtención de híbridos para MM ligados a genes de R a MOR en los genotipos de Banco de Germoplasma de la EEAOC. Las flechas rojas indican los parentales con distintas fuentes de resistencia y las flechas negras indican híbridos exitosos obtenidos.



**Figura 5.** Electroforesis en gel de poliacrilamida para la presencia de los distintos alelos de los MM ligados al gen Rdm5 de resistencia a CTS en los genotipos de Banco de Germoplasma de la EEAOC. La flecha roja indica la banda correspondiente a la amplificación del MM Satt233 ligado al gen de resistencia en el genotipo Hutchenson (HU).



**Figura 6.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de los parentales y F1 obtenidos por cruzamientos para apilar MM ligados a genes de MOR, CTS y QTLs de SMS. Las flechas rojas indican las fuentes de resistencia parentales y las flechas negras indican algunos híbridos efectivos obtenidos, a modo de ejemplo.

### Conclusiones

En el Banco de Germoplasma del SPMGS de la EEAOC existen fuentes de resistencia a las

enfermedades Macha Ojo de Rana (MOR), Cancro del Tallo de la Soja (CTS) y Síndrome de la Muerte Súbita (SMS). Los MM utilizados permitieron identificar con certeza, y en generaciones tempranas,

a genotipos portadores de los genes de interés y permitieron diseñar cruzamientos para apilar las distintas fuentes de resistencia a las tres enfermedades bajo estudio.

---

### Bibliografía citada

**Chiesa, M.; M. Cambursano; R. Pioli and E. Morandi. 2017.** Molecular mapping of the genomic region conferring resistance to soybean stem canker in Hutcheson soybean. *Molecular Breeding* 37: 65.

**Khan, M.; U. Kiran; A. Ali; M. Z. Abdin; M. Zargar; S. Ahmad; P. A. Sofi and S. Gulzar. 2017.** Molecular Markers and Marker-Assisted Selection in Crop Plants. Pages 295-328 in: *Plant Biotechnology: Principles and*

*Applications.* Springer.

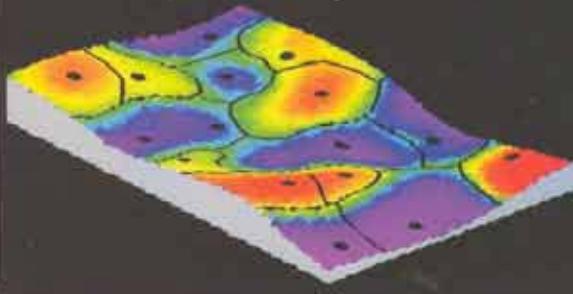
**Mian, M. A. R.; A. M. Missaoui; D. R. Walker; D. V. Phillips and H. R. Boerma. 2008.** Frogeye Leaf Spot of Soybean: A Review and Proposed Race Designations for Isolates of Hara. *Crop Science* 48:14.

**Mohan, M.; S. Nair, S; A. Bhagwat; T. Krishna; M. Yano; C. Bhatia and T. Sasaki. 1997.** Genome mapping, molecular markers and marker-assisted

selection in crop plants. *Molecular breeding* 3: 87-103.

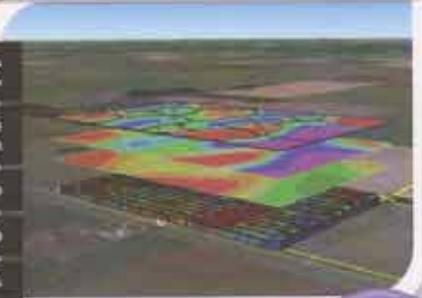
**Yamanaka, N.; F. H. Fuentes; J. R. Gilli; S. Watanabe; K. Harada; T. Ban; R. V. Abdelnoor; A. L. Nepomuceno and Y. Homma. 2006.** Identification of quantitative trait loci for resistance against soybean sudden death syndrome caused by *Fusarium tucumaniae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:1385-1391.

Mapeo de variabilidad



Integración de mapas

- Puntos Muestreo
- Zonas de manejo
- Tipo Suelo
- Topografía
- Vari



Mapeo de los nutrientes

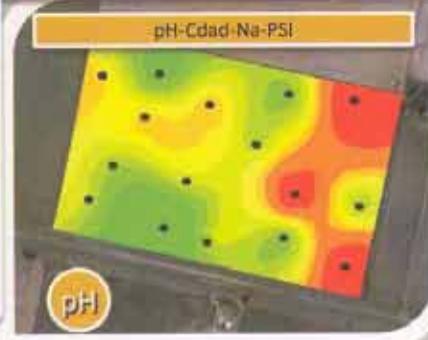
Limitantes

Calidad

Deficiencias

4 años

pH-Cdad-Na-PSI



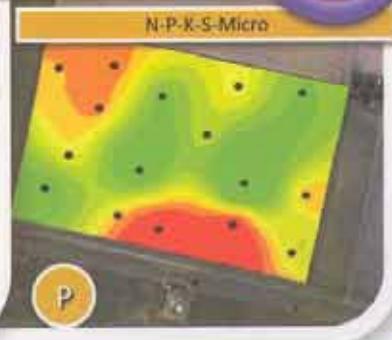
pH

MO-CIC-SB-Ca-Mg



SB

N-P-K-S-Micro



P

Análisis – Asesoramiento – Recomendaciones – Diseño de cultivos por ambientes – Rotación según potencial.

Asesoramiento y plan de cultivo



Variedad de Soja x Ambiente



Prescripción Semilla Maíz



SFT

Objetivo 18 ppm

Prescripciones para Aplicaciones Variables de Fertilizantes con equipos propios o de AGD.

Tecnología aplicada



Variedad según potencial



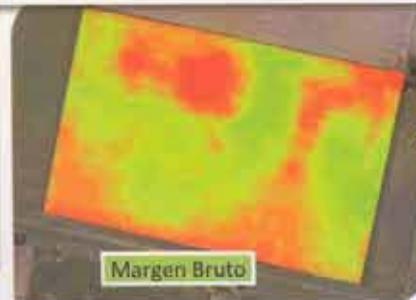
Dosis Variable semilla



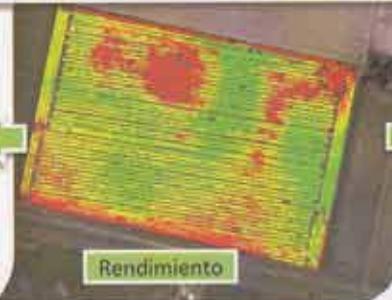
Mapa de Cobertura

Análisis de mapas de rendimiento. Calculo de pérdidas y ganancia \$. Extracción de nutrientes.

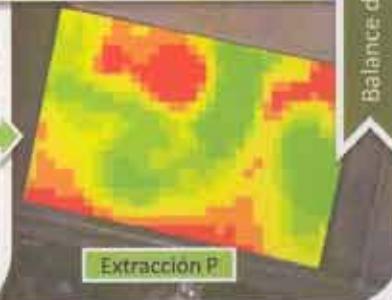
Cosecha y análisis de resultados



Margen Bruto



Rendimiento



Extracción P

Balace de Nutriente para Mantener niveles del suelo.