CAMPAÑA 2018/2019

Biología molecular de la soja

H

El cultivo de la SOJA en el noroeste argentino

1. Genética de la resistencia a la Roya asiática de la soja (*Phakopsora pachyrhizi*) para el desarrollo de estrategias de manejo

Genética de la resistencia a la Roya asiática de la soja (*Phakopsora pachyrhizi*) para el desarrollo de estrategias de manejo de la enfermedad

Rocha, Carla M. L.*, E. Mariano Pardo, M. Gabriela García, Gabriel R. Vellicce, Mario R. Devani, Fernando Ledesma, Daniel L. Ploper y Atilio P. Castagnaro.

* Instituto de tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino-Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (ITANOA-EEAOC). E-mail: crocha@eeaoc.org.ar

La soja [*Glycine max* (L.) Merrill] es uno de los cultivos agrícolas más importantes y los países que integran el MERCOSUR representan la principal región productora mundial. En Argentina es el principal cultivo con más de 20 millones de ha sembradas cada año y constituye el sector productivo que más contribuye con el desarrollo económico y el ingreso de divisas al país.

Las enfermedades causadas por distintos organismos patógenos afectan negativamente al cultivo y producen pérdidas económicas millonarias. La Roya Asiática de la soja (RAS) es considerada una de las más destructivas, porque afecta tanto el rendimiento como la calidad de la semilla (Miles *et al.*, 2011; Hartman *et al.*, 2015).

El agente causal de la RAS, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. y P. Syd, fue descripto por primera vez en el año 1902 en Japón. Desde entonces este patógeno se ha diseminado en las principales regiones productoras de soja del mundo. En Sudamérica fue identificado por primera vez en el 2001 en Paraguay y Brasil, donde causó pérdidas de alrededor del 75% de la producción (Yorinori *et al.*, 2005). Durante la campaña 2002/2003 se expandió a la Argentina (Rossi, 2003) y en la campaña siguiente la enfermedad fue detectada en las provincias del norte de Argentina (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas, https://www.sinavimo.gov.ar/). Durante las campañas 2004/2005 y 2006/2007 se informó su presencia en algunas provincias argentinas, mientras que en la campaña 2008/2009 se presentó en la mayoría de éstas causando severas epifitias (Ploper, 2009). Además de Brasil y Argentina, la RAS se extendió a todas las regiones productoras de soja en Colombia, Bolivia, 20 estados de los Estados Unidos y Ontario, Canadá (Sikora *et al.*, 2014).

Agente causal de la RAS

P. pachyrhizi es un organismo biótrofo (necesita de un hospedante vivo para desarrollar su ciclo de vida) que posee un amplio rango de hospedantes, y por este motivo puede sobrevivir infectando otras especies de plantas como el kudzu (Ono *et al.*, 1992). Este hospedante alternativo se considera la principal fuente de inóculo de *P. pachyrhizi* durante el invierno (Jordan *et al.*, 2010; Sikora *et al.*, 2014).

La RAS es una enfermedad policíclica, es decir que ocasiona repetidas infecciones durante un mismo ciclo de cultivo, las que son iniciadas por las urediniosporas (esporas asexuales). La germinación de las urediniosporas requiere temperaturas moderadas de entre 10 y 28,5°C, con una temperatura óptima alrededor de 23°C (Bromfield, 1984).

Actualmente, la principal forma de control de la RAS es a través del uso de fungicidas; sin embargo existen muchos factores que reducen la eficiencia de esta práctica, como el monocultivo, el aumento de la superficie sembrada con soja, o la presencia de hospedantes alternativos

(plantas guachas), que permiten la supervivencia del patógeno. Bajo un marco de manejo integrado y sustentable de enfermedades se considera que la resistencia genética constituye la herramienta más efectiva y económica para el control de las enfermedades en cualquier cultivo.

Resistencia genética a la RAS

Se han identificado cultivares de soja resistentes a la RAS, pero hasta el momento ningún cultivar comercial de soja es resistente a todos los aislamientos de *P. pachyhrizi*, debido a las interacciones planta-patógeno específicas (Hartman *et al.*, 2005). Los genes de Resistencia a *P. pachyrhizi* (genes *Rpp*) son genes mayores, dominantes y de herencia simple que confieren resistencia a razas especificas del patógeno. Hasta el momento se conocen siete genes y al menos cinco alelos (variantes) de los mismos (Childs, Buck & Li, 2018).

Ninguno de los genes *Rpp* confiere resistencia a todos los aislamientos conocidos del patógeno (Pham *et al.*, 2009). Además, numerosos aislamientos de *P. pachyrhizi* han quebrado a los genes de resistencia (Hartman *et al.*, 2005; Paul *et al.*, 2015). La capacidad del patógeno para superar los genes de *Rpp* individuales se informó primero para el gen *Rpp1* (Bromfield, 1984) y luego para el *Rpp2* (Hartman *et al.*, 2005). Los genes *Rpp1* a *Rpp4* fueron inicialmente efectivos en Brasil pero luego fueron quebrados por el patógeno en pocos años (Akamatsu *et al.*, 2013). Durante años *Rpp1* y *Rpp6* fueron efectivos contra las poblaciones en el sur de Estados Unidos, sin embargo en 2012 estos genes se volvieron ineficaces para las poblaciones del centro-norte de Florida (Paul *et al.*, 2015). En 2002 una raza altamente virulenta de *P. pachyrhizi* de Brasil superó la resistencia de los genes *Rpp1* y *Rpp3* (Yorinori *et al.*, 2005). Además, se conoce que los aislamientos de *P. pachyrhizi* en América del Sur han quebrado parcialmente la resistencia conferida por *Rpp2* y *Rpp4* (Yamanaka *et al.*, 2010). Esto se debe a la existencia de una gran variabilidad patogénica (Twizeyimana & Hartman, 2012; Paul *et al.*, 2015). Asimismo, estudios moleculares llevados a cabo con aislamientos provenientes de Sudáfrica utilizando marcadores moleculares (MM) del tipo SSR demostraron la existencia de una alta diversidad genética molecular.

Tomando estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo llevó a cabo un estudio orientado a caracterizar la diversidad genética y la estructura poblacional de aislamientos de *P. pachyrhizi* provenientes de distintas ubicaciones agroecológicas de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, mediante marcadores moleculares AFLP, con el propósito de entender la variabilidad patogénica observada y la capacidad del patógeno para vencer la resistencia otorgada por genes mayores presentes hasta el momento en las variedades comerciales de soja del MERCOSUR. Este estudio surgió como una demanda del Programa de Mejoramiento Genético de la Soja (PMGS) de la EEAOC, ya que durante las campañas comprendidas entre los años 2004 y 2009 la RAS produjo grandes daños y pérdidas económicas en la región. Debido a la gran importancia regional que cobró la enfermedad, este estudio se abordó de manera multidisciplinaria bajo el marco del consorcio internacional "BIOTECSOJASUR", conformado por instituciones públicas y privadas de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. Un conocimiento más profundo de estos aspectos permitirá diseñar estrategias de manejo sustentables de la enfermedad y más estables en el tiempo.

Diversidad genética de *P. pachyrhizi* en países del Mercosur

Para llevar a cabo este estudio, se recolectó una mezcla de urediniosporas tomadas de plantas naturalmente infectadas con RAS elegidas al azar de campos comerciales de producción. Las muestras fueron recolectadas en Argentina y Paraguay durante el año 2008; mientras que en 2009 se recolectaron muestras en Brasil, Paraguay y Uruguay, contabilizando un total de 23 muestras (Figura 1). Se extrajo ADN de cada muestra y se llevó a cabo su amplificación utilizando la técnica de marcadores moleculares (MM) de tipo AFLP, la cual permite estudiar varias regiones genómicas en simultáneo.

Para estimar la variabilidad genética entre muestras de diferentes países y años de muestreo del patógeno se calculó el porcentaje de polimorfismo, el índice de diversidad genética de Nei y se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA). Los patrones moleculares obtenidos en este análisis mostraron que el patógeno posee una elevada variabilidad genética y que la

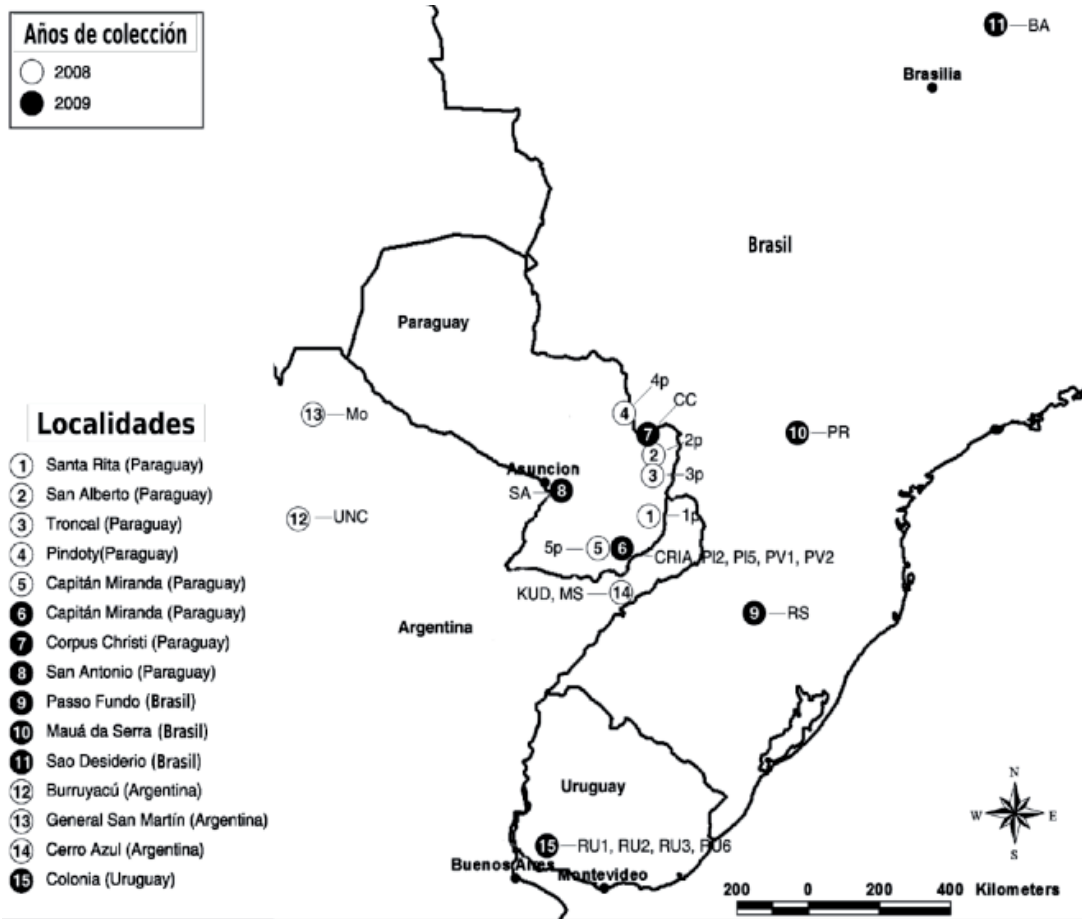

Figura 1. Ubicación geográfica de los diferentes puntos de muestreo donde *P. pachyrhizi* fue colectado entre los años 2008 y 2009. Los nombres en el mapa pertenecen a las 23 muestras recolectadas. Tomado de Rocha *et al.*, 2014.

variación genética dentro de cada país es mayor que entre países, así como que no hay estructuración genética para las muestras recolectadas en ambos años. El análisis de agrupamiento mostró que los aislamientos se agruparon principalmente por año de recolección y luego por país de procedencia (Figura 2).

Estos resultados sugieren posibles cambios genéticos entre años consecutivos dentro de la misma región, lo que podría explicarse por la alta capacidad de diseminación de las urediniosporas, generando una introducción anual recurrente de nuevos genotipos de patógenos de regiones cercanas. Asimismo, se observó una baja estructuración genética entre las muestras de diferentes países que podría ser explicada por la difusión de *P. pachyrhizi* a través de largas distancias, ayudado por corrientes de aire, como se documentó previamente (Isard *et al.*; 2005). El inóculo sería ampliamente dispersado entre las regiones por el viento. Esta hipótesis se refuerza con la asociación que se encontró entre urediniosporas de *P. pachyrhizi* capturadas en trampas y el estudio de patrones atmosféricos, que muestran que inóculos provenientes de Paraguay y el sur de Brasil, vectorizados por el viento, podrían ser los causantes de las epifitias en Argentina (De Ruyver *et al.;* 2011).

Los resultados obtenidos ofrecen una visión interesante de la diversidad genética de *P. pachyrhizi* en el MERCOSUR, la que podría explicar la gran capacidad de este patógeno para superar los genes de resistencia individuales.

Estrategias de manejo de la enfermedad

Considerando la importancia de la enfermedad y el desconocimiento de la reacción de los cultivares

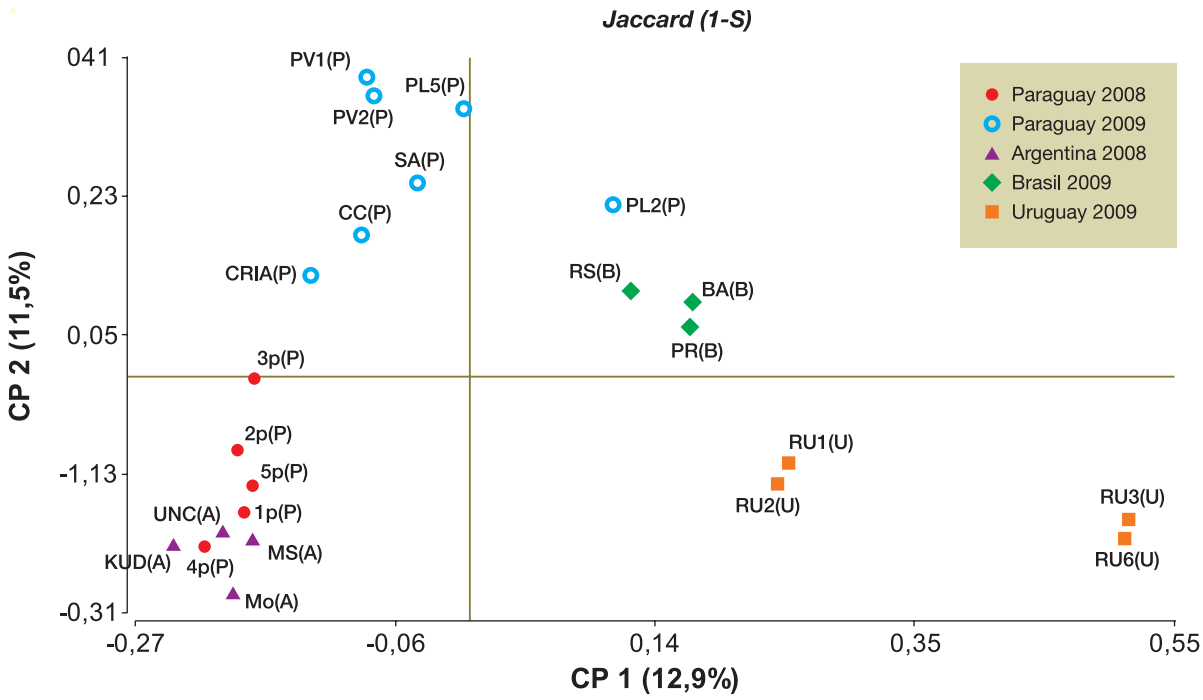

Figura 2. Diagrama de análisis de coordenadas principales de las muestras de *P. pachyrhizi* analizadas en este estudio. CP1 y CP2 corresponden a la primera y la segunda coordenada principal. En el cuadrante inferior izquierdo se agruparon las muestras recolectadas en 2008, mientras que las muestras recolectadas en 2009 se agruparon en el cuadrante superior izquierdo y derecho, además se observa que las muestras se agruparon por país de procedencia. Tomado de Rocha *et al.*, 2014.

comerciales de soja disponibles frente a la variabilidad que presenta el patógeno, resulta prioritario profundizar en los conocimientos de las poblaciones del patógeno y las interacciones específicas con genotipos de soja para minimizar los posibles efectos negativos de la roya en el futuro. El conocimiento del comportamiento poblacional y la diversidad genética de *P. pachyrhizi* han permitido inferir y sugerir estrategias para mejorar el manejo de la enfermedad en nuestra región con el propósito de incorporar una resistencia efectiva a los cultivares de soja en los programas de mejoramiento.

Un enfoque podría ser generar variedades con una combinación de varios genes mayores, a lo cual se le ha llamado piramidación de genes o apilamiento (Figura 3), que puede proporcionar una resistencia

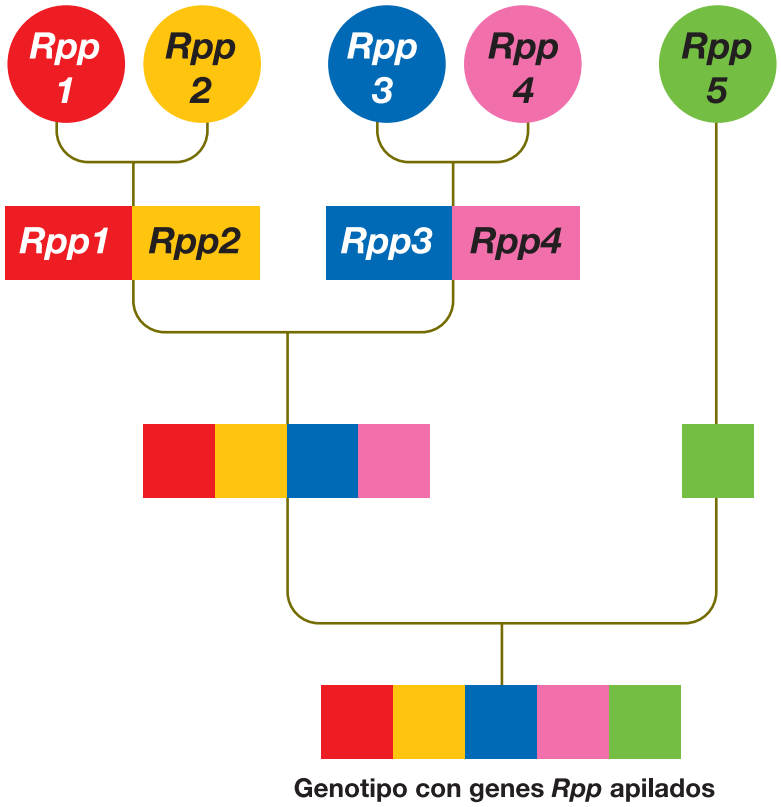

Figura 3. Representación de apilamiento de genes ***Rpp***, el cual consiste en agrupar en un único genotipo un conjunto de genes útiles, provenientes de uno o distintos germoplasmas (mediante cruzamientos y/o retrocruzamientos).

más amplia y duradera que ayude a prevenir o demorar el quiebre de la resistencia por el patógeno. Esta estrategia se lleva a cabo realizando cruzamientos dirigidos entre los genotipos de soja portadores de los distintos genes de resistencia a apilar con la asistencia de MM ligados a dichos genes, lo que se conoce como selección asistida por marcadores moleculares o SAM. Han sido descriptos algunos casos en los cuales se realizó el apilamiento de tres genes *Rpp2*, *Rpp4* y *Rpp5* en un cultivar susceptible (Yamanaka *et al.*; 2013) y se observó que los genes *Rpp* piramidados pueden conferir un mayor nivel de resistencia que el proporcionado por los genes por separado, incluso cuando uno de los genes *Rpp* piramidados es superado individualmente por poblaciones de *P. pachyrhizi*.

Otra estrategia podría ser la búsqueda de resistencia cuantitativa, horizontal o poligénica dada por varios genes menores de resistencia, que permitiría obtener genotipos con alto nivel de resistencia y más duradera en el tiempo. Cada uno de estos genes proporciona un cierto nivel de resistencia pero juntos podrían presentar resistencia a todas las razas del patógeno. En general, la resistencia horizontal no evita que las plantas sean infectadas, sino que retarda el desarrollo de la enfermedad, o la reduce a niveles aceptables de severidad y por lo tanto retrasa la propagación de la enfermedad en el campo. Contrario a lo que sucede con los genes mayores de resistencia *Rpp*, donde estos se pueden romper fácil y rápidamente a medida que surgen nuevos patotipos debido a mutaciones espontáneas que ocurren en las poblaciones de *P. pachyrhizi*, ya que la resistencia raza-específica genera una gran presión de selección sobre el patógeno y permite la proliferación de los patotipos “nuevos” (Figura 4).

Consideraciones finales

La resistencia genética constituye la herramienta más sustentable, efectiva y económica para el control de las enfermedades en cualquier cultivo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo ofrecen una visión interesante acerca de la diversidad genética de *P. pachyrhizi* en la región, que podría explicar la gran capacidad de este patógeno para superar los genes de resistencia individuales. Teniendo en cuenta la variabilidad genética y la raza-especificidad del agente causal de las RAS, nuestros esfuerzos deberían estar dirigidos a la creación de nuevos cultivares con resistencia amplia, adaptados a las condiciones agroecológicas de la región. Mediante el apilamiento de distintos genes de resistencia en un mismo genotipo se puede contar con resistencia genética eficiente contra las razas locales para lograr un manejo integral de la enfermedad.

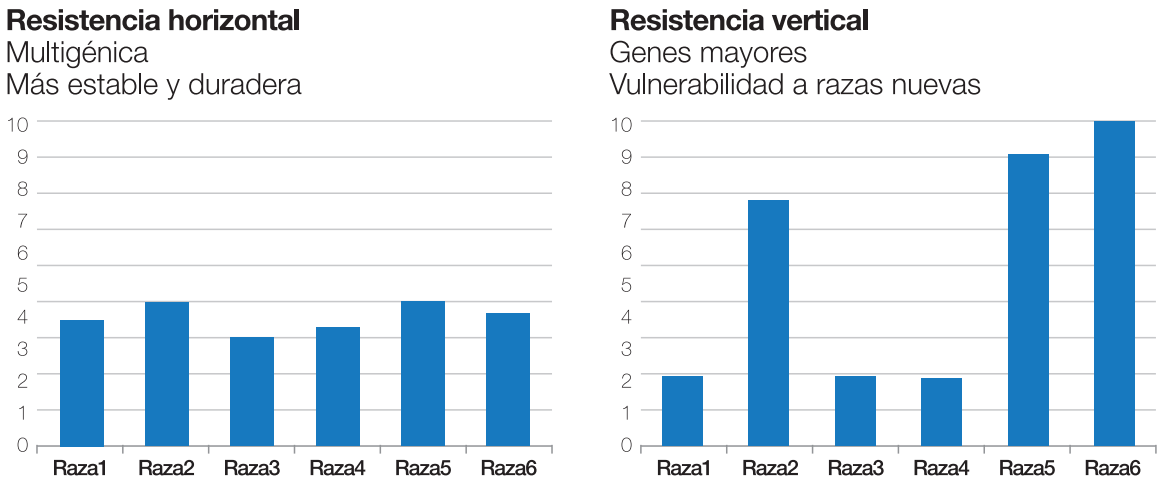

Figura 4. Comparación de la resistencia horizontal, conferida por genes menores que puede controlar un gran espectro de razas, *vs* resistencia vertical mediada por genes mayores, la cual es más fácil de vencer debido a la raza-especificidad del patógeno.

Bibliografía citada

Akamatsu, H.; N. Yamanaka; Y. Yamaoka; R. M. Soares; W. Morel; A. J. G. Ivancovich and K. Suenaga. 2013. Phatogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. Journal of General Plant Pathology, 79 (1): 28-40. https://doi.org/10.1007/s10327-012-0421-7

Bromfield, K. R. 1984. Soybean rust. *Monograph, American Phytopathological Society*, (11).

Childs, S. P.; J. W. Buck & Z. Li. 2018. Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*), Plant Breeding. https://doi.org/10.1111/pbr.12595

De Ruyver, R., de Souza, J., Bischoff, S. A., Formento, N. 2011. Circulación atmosférica asociada a los casos de aparición de esporas de Roya de la soja en Paraná, Argentina. *Meteorológicadel* CAM, 36(1).

Hartman, G. L.; H. X. Chang & L. F. Leandro. 2015. Research advances and management of soybean sudden death syndrome. *CropProtection*, 73, 60–66. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.01.017

Hartman, G. L.; M. R. Milies& R. D. Frederick. 2005. Breeding for resistance to soybean rust. Plant Disease, 89 (6): 322–328. https://doi.org/10.1111/jcpp.12286

Isard, S. A.; S. H. Gage; P. Comtois& J. M. Russo. 2005. Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. BioScience55(10): 851–861.

Jordan, S. A.; D. J. Mailhot; A. J. Gevens; J. J. Marois; D. L. Wright; C. L. Harmon & P. F. Harmon. 2010. Characterization of kudzu (Pueraria spp.) resistance to *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of soybean rust. Phytopathology, 100 (9): 941–948. https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-9-0941

Miles, M. R; M. R., Bonde; S. E. Nester; D. K. Berner; R. D. Frederick & G. L. Hartman. 2011. Characterizing Resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in Soybean. PlantDisease, 95(5): 577–581. [En línea] Disponible en https://doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0450

Ono, Y.; P. Buriticá& J. F. Hennen. 1992. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. MycologicalResearch96 (10): 825–850. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81029-0

Paul, C.; R. D. Frederick; C. B. Hill; G. L. Hartman & D. R. Walker. 2015. Comparison of Pathogenic Variation among *Phakopsora pachyrhizi* Isolates collected from the United States and International Locations, and Identification of Soybean Genotypes Resistant to the U.S. Isolates. PlantDisease99 (8): 1059–1069. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0989-RE

Pham, T. A.; M. R. Miles; R. D. Frederick; C. B. Hill & G. L. Hartman. 2009. Differential Responses of Resistant Soybean Entries to Isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. PlantDisease93 (3): 224–228. https://doi.org/10.1094/pdis-93-3-0224

Ploper, L. D. 2009. Presencia de la roya de la soja en la región del noroeste argentino y propuestas para su manejo. https://www.agro.uba.ar/sites/default/files/catedras/ploper.pdf

Rossi, R. L. 2003. First Report of *Phakopsora pachyrhizi*, the Causal Organism of Soybean Rust in the Province of Misiones, Argentina. PlantDisease87 (1): 102–102. [https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.102A

Sikora, E. J.; T. W. Allen; K. A. Wise; G. Bergstrom; C. A. Bradley; J. Bond and J. Zidek. 2014. A Coordinated Effort to Manage Soybean Rust in North America: A Success Story in Soybean Disease Monitoring. Plant Disease98 (7): 864–875. https: //doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0121-FE

Twizeyimana, M. & G. L. Hartman. 2012. Pathogenic Variation of *Phakopsora pachyrhizi* Isolates on Soybean in the United States from 2006 to 2009. PlantDisease96 (1): 75–81. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0379

Yamanaka, N.; N. G. Lemos; M. Uno; H. Akamatsu; Y. Yamaoka& R. V. Abdelnoor. 2013. Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three Rpp genes: 75–82.

Yamanaka, N.; Y. Yamaoka; M. Kato; N. G. Lemos; A. L. de L. Passianotto; J. V. M. dos S. and K. Suenaga. 2010. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. Tropical Plant Pathology35 (3): 153–162. https: //doi.org/10.1590/S1982-56762010000300003

Yorinori, J. T.; E. Soja; W. M. Paiva; C. Miranda; R. D. Frederick; U. and G. E. Hartman. 2005. Symposium Epidemics of Soybean Rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003.

Consideraciones finales

El cultivo de la SOJA en el noroeste argentino