



Apilamiento de genes de resistencia a tres enfermedades de soja mediante selección asistida por marcadores moleculares

Carla M. L. Rocha^{1*}; M. Amalia Chiesa²; M. Gabriela García^{1*}; Mario Devani^{1**}; Atilio P. Castagnaro^{1*}; Fernando Ledesma^{1**}; José R. Sánchez^{1**}; E. Mariano Pardo^{1*}.

¹ Instituto de tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino- Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (ITANOA-EEAOC).

² Instituto de Investigaciones en Ciencia Agrarias de Rosario (IICAR)

*Sección Biotecnología; **Sección Granos
Email: crocha@eeaoc.org.ar

■ Mejoramiento genético del cultivo de la soja

El mejoramiento genético está constituido por un conjunto de principios científicos, métodos, técnicas y estrategias dirigidas a la obtención de genotipos con características deseables y previamente definidas. Un programa de mejoramiento gestiona recursos genéticos mediante la selección y mejora de caracteres deseados, con la finalidad de incrementar niveles productivos y de adaptabilidad. Por otra parte, se encarga de asegurar la conservación de la variabilidad genética, a largo plazo, mediante la creación de bancos de germoplasma (BG).

En el caso del cultivo de la soja, el mejoramiento genético es la estrategia más valiosa para el aumento de la productividad de manera sostenible y ecológicamente equilibrada. El mejoramiento genético de soja consiste en proveer variedades adaptadas para todas las áreas cultivables, mantener una base genética diversa, generar germoplasma *elite*, aumentar el rendimiento e incrementar la resistencia a factores bióticos y abióticos, así como mejorar las características nutricionales, entre ellas la calidad de proteínas y aceites. El mejoramiento

genético convencional en el cultivo de la soja se sustenta en la aplicación de principios genéticos clásicos basados en el fenotipo y se fundamenta en seleccionar individuos que reúnen las características deseadas para someterlos posteriormente a ciclos de cruzamiento y selección. Este proceso es complejo y lento, ya que se necesitan entre siete y ocho años para la obtención de un nuevo cultivar *elite*.

■ Marcadores moleculares y mejoramiento genético

En las últimas décadas, con el avance de la investigación en el campo de la biología molecular surgió la posibilidad de utilizar herramientas basadas en el ADN, como los marcadores moleculares (MM), para asistir a los procesos de desarrollo de nuevas variedades. Los MM son segmentos de ADN con una ubicación específica en un cromosoma y constituyen puntos de referencia en el genoma; su herencia cumple con las leyes de segregación independiente descritas por Mendel. Los MM no son influenciados por el ambiente y brindan información sobre las diferencias, a nivel genotípico, entre individuos.

Los MM han permitido avances tecnológicos significativos en la agricultura mediante la intervención de estos en los programas de mejoramiento, ya que pueden ser aplicados en múltiples etapas del esquema de mejora. Además, proveen información útil para los mejoradores, sirven para identificar los individuos más adecuados entre las progenies segregantes y son útiles para proteger los derechos de propiedad intelectual, entre otros usos.

En soja se desarrollaron e implementaron numerosas técnicas de marcado molecular (Singh *et al.*, 2010). Entre los MM más utilizados podemos mencionar los marcadores microsatélites o SSR (por sus siglas en inglés: "Simple Sequence Repeats") (Cregan *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2010). Los marcadores SSR se usan comúnmente para estimar el grado de parentesco entre genotipos, y debido a su abundancia, sensibilidad y reproducibilidad, resultan de preferencia para estudiar la diversidad genética y para la identificación varietal (Song *et al.*, 2010).

Selección asistida por marcadores moleculares

Uno de los principales usos de los marcadores de ADN en la investigación agrícola ha sido la identificación de regiones cromosómicas que contienen genes, los cuales controlan rasgos simples (controlados por un solo gen) y rasgos cuantitativos o

QTLs (por sus siglas en inglés "Quantitative trait loci"). Una vez detectados los MM ligados a la característica de interés, estos pueden utilizarse como herramientas moleculares para la selección dentro de un esquema de mejoramiento, lo que se conoce como Selección Asistida por Marcadores o SAM. Luego de identificar los marcadores que están estrechamente ligados a genes o QTLs de interés, previa validación fenotípica, los mejoradores pueden usarlos como una herramienta de diagnóstico para identificar indirectamente la presencia de los genes/QTLs, transferirlos mediante cruzamientos y realizar un seguimiento a través de las sucesivas generaciones. De esta forma, se evita la realización de la caracterización fenotípica, descartando el efecto del ambiente sobre el fenotipo, con la consecuente reducción en los tiempos y costos requeridos para el desarrollo de nuevas variedades (Figura 1) (Swaminathan *et al.*, 2018).

Apilamiento de genes de resistencia a enfermedades

Los organismos patógenos ocasionan enfermedades que afectan a los cultivos y provocan pérdidas económicas millonarias. 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.

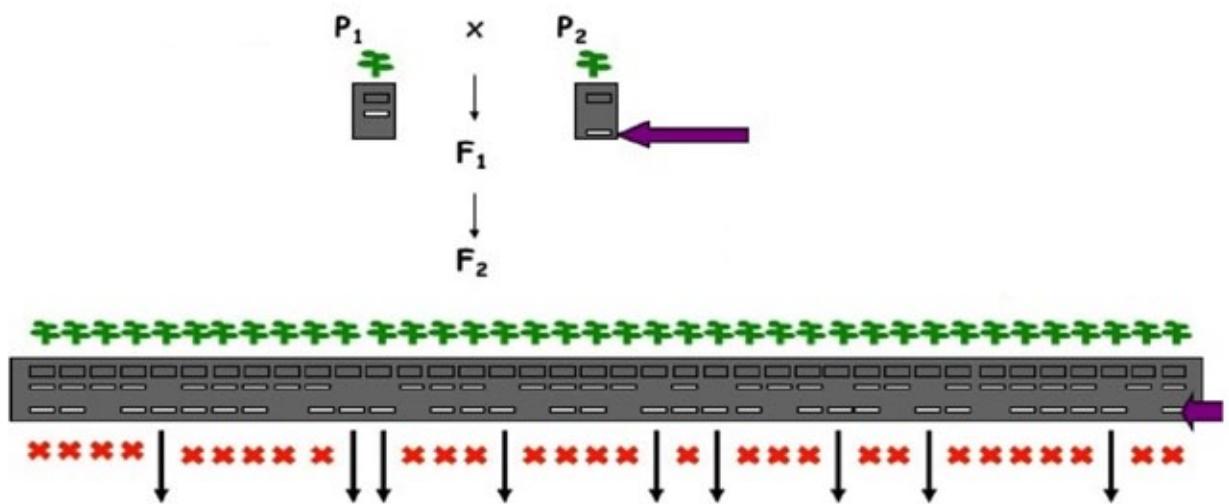


Figura 1. Esquema de Selección Asistida por Marcadores. A partir de un cruzamiento biparental entre un progenitor susceptible (P1) y un progenitor resistente (P2) portador del alelo de resistencia (flecha horizontal violeta) se obtienen numerosos individuos F1; y por autofecundación, la correspondiente F2. Se utiliza el marcador molecular ligado al gen de resistencia para seleccionar solo aquellas plantas de la progenie portadoras de ese gen (indicados por flechas verticales negras). Los individuos que no lo poseen (indicado por cruces naranjas) son eliminados del proceso. Tomado de Collard *et al.* (2005).

Una estrategia utilizada en el mejoramiento es la incorporación de múltiples resistencias mediante la piramidación o apilamiento de genes, proceso por el cual se combinan, en un único genotipo, varios genes de diversas fuentes genéticas. Para ello, puede emplearse el método de retrocruza (RC), que consiste en el cruzamiento repetido de la progenie híbrida, derivada de una cruce, con uno de sus parentales. El objetivo principal de la RC es mejorar una línea, cultivar o variedad ya existente con una o pocas características para la cual o las cuales es deficiente (Allard, 1999). En la RC participa una variedad con un gen de interés, denominada "padre donante" (PD); y una variedad generalmente de germoplasma *elite*, denominada "padre recurrente" (PR). Este proceso se repite hasta llegar a una generación en la cual se logran recuperar todas las características del PR y se ha integrado el nuevo gen o carácter de interés (aproximadamente seis generaciones) (Figura 2).

Se ha demostrado que los MM se pueden utilizar para asistir las RC, permitiendo la introgresión de genes/QTLs específicos en distintos cultivos (Singh *et al.*, 2012; Soto-Cerda *et al.*, 2013; Krishna *et al.*, 2017; Viganó *et al.*, 2018; Brzostowski *et al.*, 2018). De esta manera, el avance generacional se realiza solo con aquellos individuos portadores de los genes/QTLs específicos, con un mínimo de incorporación de genes provenientes del individuo dador, lo que aumenta la eficacia de la selección, así como también reduce los tiempos requeridos, evitando evaluaciones fenotípicas exhaustivas (Brzostowski *et al.*, 2018). Esta estrategia es útil para introgresar aquellas características que son difíciles o costosas de evaluar.

A partir de lo antes expuesto, bajo el marco del Programa Granos de la EEAOC se propuso apilar genes y QTLs que otorgan resistencia a tres enfermedades de origen fúngico, a través de RC asistida con MM del tipo SSR altamente ligados a QTLs de resistencia a Síndrome de la Muerte Súbita (SMS), los genes *Rdm4* de resistencia al Cancro del Tallo de la Soja (CTS) y *Rsc3* de resistencia a Mancha de Ojo de Rana (MOR).

Metodología y resultados

En una primera instancia se utilizaron MM-SSR ligados a los genes y QTLs responsables de la resistencia a las enfermedades SMS, CTS Y MOR para identificar genotipos del Banco de Germoplasma (BG) del Sub-Programa de

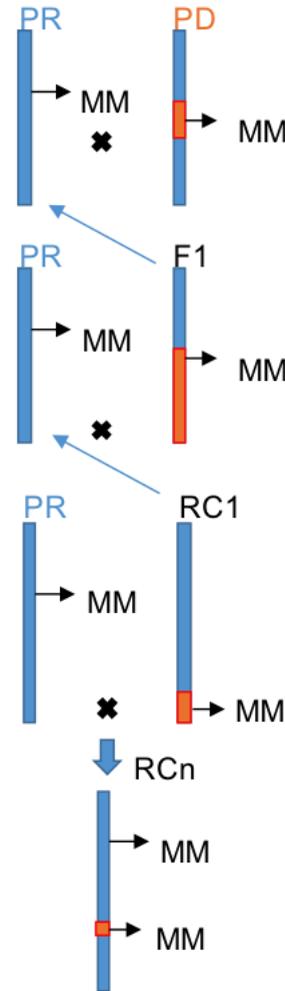


Figura 2. Esquema del método tradicional de retrocruza, donde se involucra un parental donante (PD), con alguna característica a introgresar; y un parental recurrente (PR), que posee muy buenas características agronómicas. La progenie obtenida (F1) vuelve a cruzarse con el PR y, de esta manera, se obtiene la RC1 y así sucesivamente, hasta obtener una línea con el carácter del donador incorporado.

Mejoramiento Genético de la Soja (SPMGS) de la EEAOC, portadores de los genes de resistencia.

La resistencia a MOR se identificó con el MM-SSR Satt244 ligado estrechamente a los genes de resistencia *Rcs3*, *RcsPeking* y *RcsMtRd*. Se evaluaron 56 genotipos del BG del SPMGS y se observaron 12 genotipos con el haplotipo del gen *Rsc3*, que resultó ser el de mayor frecuencia.

Por su parte, para evaluar la resistencia a CTS se utilizó el MM-SSR Sat_162 (*Rdm4*), previamente asociado con la resistencia a CTS. Con este MM se analizaron 56 genotipos, de los cuales 33 poseían el gen *Rdm4*.

En cuanto al genotipado para la resistencia a SMS, se utilizaron cuatro MM-SSR ligados a los QTLs que confieren resistencia a SMS. La variedad Forrest fue la única portadora de todos los MM-SSR ligados a la resistencia.

En base a estos resultados, se eligieron los parentales a ser utilizados para llevar a cabo la RC asistida por MM. Se utilizó el cultivar Forrest como PD de la resistencia a SMS y el cultivar A8100 como PR, dado que posee buenas características agronómicas adaptadas a la región del NOA y es portador de los genes *Rcs3* (MOR) y *Rdm4* (CTS).

Se realizaron las cruzas entre el PR y el PD y se obtuvieron semillas híbridas que dieron origen a plantas F₁, las cuales fueron analizadas en estadio vegetativo V2 mediante técnicas moleculares, utilizando MM-SSR polimórficos para determinar

la hibridez efectiva antes de la floración (Figura 3). Aquellas plantas que resultaron positivas fueron utilizadas para volver a cruzar con el PR A8100, etapa llamada RC1. Las semillas RC1F1 obtenidas se cosecharon, fueron sembradas y se tomaron muestras en estadio vegetativo para el análisis molecular. De esta manera se realizó una selección en primer plano de las plantas RC1F1 que poseían todos los MM ligados a los genes de interés. Las plantas positivas se utilizaron para volver a cruzar con el PR (RC2) y se obtuvieron semillas RC2F1 que dieron lugar a plantas RC2F1. Estas fueron analizadas con todos los SSR ligados a los genes *Rcs3*, *Rdm4* y a los QTLs de SMS. Luego se llevó a cabo el análisis del fondo genético del PR con 38 MM-SSR distribuidos en distintos GL y se seleccionó la progenie de la RC2F1, que presentó los MM ligados a los genes de interés y que a su vez tenía la mayor proporción del genoma del PR (Figura 4).



Figura 3. Verificación molecular de la hibridez de las plantas F₁. Perfiles de amplificación del marcador molecular Satt233 en plantas F₁ (A81FO). FO: Forrest (PD), A81: A8100 (PR). Los híbridos F1 efectivos se muestran en rojo.

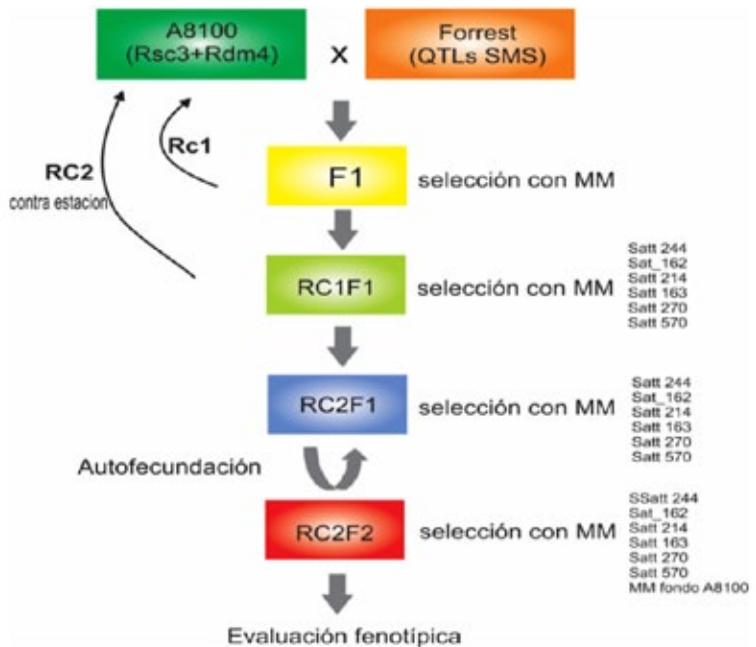


Figura 4. Esquema de apilamiento de los marcadores moleculares (MM) ligados a las regiones que confieren resistencia a las tres enfermedades bajo estudio, mediante retrocruzas. En cada paso todas las líneas obtenidas fueron analizadas con los MM ligados a los genes de resistencia en estudio para seleccionar las que avanzarían a la siguiente generación.

De este modo, se obtuvieron nueve líneas con distintas combinaciones de los MM asociados y distintos porcentajes de similitud con el PR. De ellas, solo dos líneas poseían todos los MM ligados a los genes de interés y mostraron un porcentaje de similitud de 70% con el PR. Estas plantas se multiplicaron por autofecundación y serán desafiadas con los tres patógenos para validar su resistencia.

■ Consideraciones finales

En este trabajo, mediante el uso de MM se identificaron los genotipos pertenecientes al BG de EEAOOC portadores de genes que confieren resistencia a tres enfermedades muy importantes en nuestra región: SMS, CTS y MOR. Esto permitió diseñar estrategias de cruzamientos y RC asistida por MM para apilar tres fuentes de resistencia a enfermedades fúngicas en un nuevo genotipo, con un fondo genético adaptado a la región del NOA en menos tiempo (tres años).

La utilización de los MM en cada etapa permitió reducir el número de plantas a analizar y determinar con exactitud con cuáles de ellas se debía avanzar en cada generación, llevando a cabo una selección molecular sin necesidad de la selección fenotípica.

Finalmente, se obtuvieron dos líneas con MM apilados que están asociados a las regiones que confieren resistencia a MOR, CTS y SMS con fondos

genéticos de alta similitud con el PR.

Con esta metodología se logró acelerar la obtención de líneas de soja que representan un material tecnológico de gran valor, el cual podrá ser empleado de manera directa en el SPMGS. Todos los genotipos obtenidos serán incorporados al BG de soja de la EEAOOC, para ser utilizados como progenitores “dadores” para incorporar resistencia múltiple en variedades comerciales de alto potencial de rendimiento.

Cabe destacar la importancia de la incorporación de los MM dentro del esquema de selección y de la metodología de RC asistida, ya que esta es la primera vez que se utiliza en nuestro Programa.

Finalmente, resulta de interés remarcar que no existen cultivares comerciales que presenten resistencia a las tres enfermedades evaluadas; además, estas tecnologías podrían ser transferidas al sector agrícola para incrementar la productividad de la región de manera sostenible, en el marco de una producción enfocada en prácticas agronómicas más amigables con el ambiente.

En síntesis, los resultados en este trabajo buscan contribuir tanto con el avance del conocimiento como con la implementación de mejoras tecnológicas destinadas a incrementar la productividad y sostenibilidad económica, ambiental y social del cultivo de soja en el noroeste argentino.

Bibliografía citada

Allard, R. W. 1999. Principles of plant breeding.

Cregan, P. B.; T. Jarvik; A. L. Bush; R. C. Shoemaker; K. G. Lark; A. L. Kahler and J. E. Specht. 1999. An Integrated Genetic Linkage Map of the Soybean Genome. *Crop Science* 39 (5), 1464. <http://doi.org/10.2135/cropsci1999.3951464x>

Collard, B. C. & D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363 (1491): 557-572. <http://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>

Brzostowski, L. F.; T. I. Pruski; G. L. Hartman; J. P. Bond; D. Wang; S. R. Cianzio & B. W. Diers. 2018. Field evaluation of three sources of genetic resistance to sudden death syndrome of soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 131 (7): 1541-1552. <http://doi.org/10.1007/s00122-018-3096-4>

Krishna, M. S. R.; M. Surender & S. S. Reddy. 2017. Marker assisted breeding for introgression of opaque-2 allele into elite maize inbred line BML-6. *Acta Ecologica Sinica* 37 (5): 340-345.

Singh, V. K.; A. Singh; S. P. Singh; R. K. Ellur; V. Choudhary; S. Sarkel and A. K. Singh. 2012. Incorporation of blast resistance into «PRR78», an elite Basmati rice restorer line, through marker assisted backcross breeding. *Field Crops Research* 128: 8-16. <http://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.12.003>

Song, Q.; G. Jia; Y. Zhu; D. Grant; R. T. Nelson; E. Y. Y. Hwang and P. B. Cregan. 2010. Abundance of SSR motifs and development of candidate polymorphic SSR markers (BARCSOYSSR_1.0) in soybean. *Crop Science* 50 (5): 1950-1960. <http://doi.org/10.2135/cropsci2009.10.0607>

Soto-Cerda, B. J.; E. H. Peñaloza; A. B. Montenegro; A. R. Rupayan; M. H. Gallardo & H. Salvo-Garrido.

2013. An efficient marker-assisted backcrossing strategy for enhancing barley (*Hordeum vulgare* L.) production under acidity and aluminium toxicity. *Molecular Breeding* 31 (4): 855-866. <http://doi.org/10.1007/s11032-013-9839-7>

Swaminathan, S.; N. S. Abeysekara; J. M. Knight; M. Liu; J. Dong; M. E. Hudson and S. R. Cianzio. 2018. Mapping of new quantitative trait loci for sudden death syndrome and soybean cyst nematode resistance in two soybean populations. *Theoretical and Applied Genetics* 131 (5): 1047-1062. <http://doi.org/10.1007/s00122-018-3057-y>

Viganó, J.; A. L. Braccini; I. Schuster & V. M. P. S. Menezes. 2018. Microsatellite molecular marker-assisted gene pyramiding for resistance to Asian soybean rust (ASR). *Acta Scientiarum. Agronomy* 40 (1) 39619. <http://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.39619>



PROAGRO

AGROQUÍMICOS · SEMILLAS · FERTILIZANTES

Parque Industrial Tucumán
+54 (0381) 4530669

info@proagrosrl.com.ar
www.proagrosrl.com.ar