



## Mejoramiento genético para la resistencia a la mancha ojo de rana en el programa de mejoramiento genético de soja de la EEAOC

H2

Carla Rocha<sup>1</sup>, Amalia Chiesa<sup>2</sup>, Gabriela García<sup>1</sup>,  
Mario Devani<sup>1</sup>, Mariano Pardo<sup>1</sup> y Atilio Pedro  
Castagnaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC)-Instituto de tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Tucumán, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones en Ciencia Agrarias de Rosario (IICAR), Santa Fe, Argentina  
E-mail: crocha@eeoac.org.ar

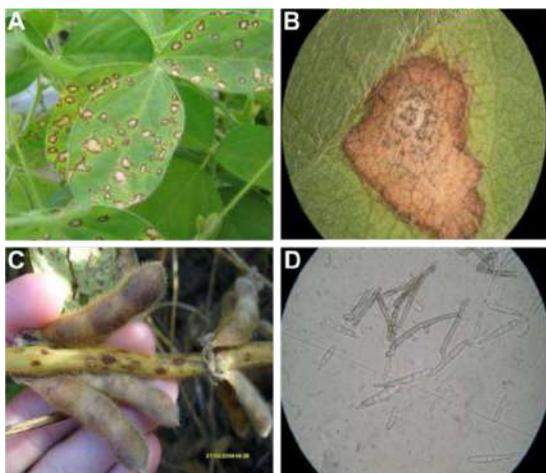
### Introducción

La soja [*Glycine max* (L.) Merrill] es un cultivo leguminoso de gran relevancia nutricional y económica y Argentina se destaca como el tercer productor mundial en superficie, volumen de producción y exportación de ese producto. El cultivo de soja se encuentra arraigado en el Noroeste Argentino (NOA), siendo vital para la economía y agroindustria regional. No obstante, el cultivo enfrenta desafíos climáticos, plagas y enfermedades fúngicas, como la mancha ojo de rana (MOR) causada por el hongo *Cercospora sojina* K. Hara (*C. sojina*). Esta enfermedad constituye uno de los grandes desafíos para el mejoramiento genético y desarrollo de variedades, ya que afecta significativamente el rendimiento del cultivo. Las pérdidas pueden oscilar entre 10 y 60% debido principalmente a la reducción del área fotosintética y/o defoliación prematura (Akem & Dashiell 1994). En

Argentina, durante la campaña 1998/1999 la enfermedad se presentó con intensidad severa en el NOA, principalmente en Tucumán y Salta, donde se registraron pérdidas de rendimiento de 25 a 48% en cultivares susceptibles (Ploper *et al.*, 2001). Esta patología se presenta en la región especialmente en condiciones cálidas y húmedas, las cuales son predisponentes para la infección en conjunto con la susceptibilidad del cultivar. Esta enfermedad aún mantiene su impacto en la región y durante la campaña 2021/2022 alcanzó una incidencia del 40% (Claps *et al.*, 2022). Este dato resalta la presencia y relevancia de la enfermedad, subrayando la necesidad continua de abordar sus efectos perjudiciales en la producción agrícola de la región.

## Epidemiología y manejo de la mancha ojo de rana

Las lesiones en las hojas presentan formas circulares o angulares, con diámetros que oscilan entre 1 mm y 5 mm. Estas manchas inicialmente se originan como áreas oscuras que evolucionan hacia centros claros con bordes oscuros (Figura 1). Los síntomas emergen hacia el final del ciclo del cultivo, durante los estadios reproductivos, induciendo la marchitez foliar y la defoliación temprana. *C. sojina* es un hongo necrotrófico, capaz de subsistir en tejidos muertos y de naturaleza policíclica, presentando múltiples generaciones a lo largo del ciclo de cultivo. Su micelio sobrevive de una campaña a otra en el rastrojo, dispersándose por la acción de la lluvia o el viento.



**Figura 1.** Síntomas de la mancha ojo de rana. A, Síntomas foliares: manchas marrones rodeadas por márgenes de color marrón rojizo oscuro. B, Conidióforos sobre la lesión. C, Síntomas en vainas y tallo. D, Conidióforos y conidios de *C. sojina*. Tomado de Luque, 2009

Para el manejo de la enfermedad se recomiendan diversas medidas como la utilización de semillas libres del patógeno, la rotación de cultivos y la aplicación de fungicidas foliares. A pesar de ser esta última la estrategia más efectiva, el uso excesivo de fungicidas conlleva el riesgo de seleccionar patógenos resistentes, como sucedió en 2010 en Estados Unidos, donde el uso repetido de fungicidas resultó en la aparición de poblaciones de *C. sojina* resistentes al grupo de las estrobirulinas (Qol) debido a mutaciones en el gen citocromo b (G143A mutation) del patógeno (Zhang *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2020).

La emergencia de estas variantes ha resaltado la importancia de los cultivares con resistencia genética. Por ende, una estrategia más sólida y sostenible para el control de la mancha ojo de rana es el empleo de cultivares resistentes.

## Razas de *C. sojina* y resistencia genética

*C. sojina* posee una gran diversidad de razas desde el punto de vista fitopatológico. Actualmente hay al menos 11 razas reconocidas en EE.UU. (Mian *et al.*, 2008), 22 en Brasil y 14 en China (Grau *et al.*, 2004). Mediante análisis moleculares se evidenció la alta variabilidad genética en las poblaciones de *C. sojina* (Bradley *et al.*, 2012). También se ha demostrado que posee reproducción sexual (Kim *et al.*, 2013), lo que explicaría la gran diversidad de *C. sojina*.

Los cultivares pueden presentar genes de resistencia vertical, horizontal o ambas. En el caso de MOR, la resistencia es vertical y mediada por genes de resistencia mayores (genes R), llamados *Rcs* (Resistencia a *C. sojina*). Los genes R son raza-específico y confieren resistencia a algunos patotipos del patógeno mientras que pueden ser susceptibles a otros. Se debe tener en cuenta que debido a la variabilidad patogénica, la resistencia de un cultivar puede llegar a ser superada por la aparición de nuevas variantes del patógeno.

Se han identificado genes que condicionan la resistencia a una, varias o todas las razas fisiológicas conocidas de *C. sojina*. Ellos son el gen *Rcs<sub>1</sub>* presente en el cultivar Lincoln, el cual fue el primer gen identificado y condicionó la resistencia a la raza 1 (Athow & Probst, 1952). El gen *Rcs<sub>2</sub>*, identificado en el cultivar Kent, confiere resistencia a la raza 2 (Athow *et al.*, 1962); y el gen *Rcs<sub>3</sub>* en el cultivar Davis, este gen confiere resistencia a todas las razas conocidas de *C. sojina* incluyendo la raza 5 que es la más virulenta (Boerma & Phillips, 1983; Mian *et al.*, 2008). Luego se identificó otro gen dominante simple, no alélico al *Rcs<sub>3</sub>* en el cultivar Peking (PI17852B), llamado *RCS<sub>Peking</sub>*. Este gen proporcionó resistencia contra la raza 5 y otros 10 aislamientos de *C. sojina* pertenecientes a EE.UU. Posteriormente se encontró otro cultivar resistente a MOR, Monte Redondo (Bulos *et al.*, 2004), que podría ser portador de una nueva fuente de resistencia para MOR (*Rsc<sub>Mt Rdo</sub>*).

## Marcadores moleculares y resistencia a MOR

El proceso de obtención de cultivos resistentes es lento pero la biotecnología ha acelerado este proceso. La biología molecular ha permitido secuenciar el genoma de la soja y desarrollar diversos marcadores moleculares (MM). Entre ellos, los del tipo Microsatélites (MM-SSR) se utilizan ampliamente en el cultivo de soja y han ayudado a generar mapas de ligamiento que establecen relaciones entre los MM y genes R específicos. Además, con estos MM es posible la identificación de genotipos resistentes y llevar a cabo la Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM), que permite el seguimiento eficaz de genes mayores en un genotipo. Gracias a la construcción de poblaciones de mapeo se logró posicionar de manera precisa los genes *Rcs3*, *RcsPeking*, *RscMt Rdo*, los que se mostraron estrechamente ligados al MM-SSR Satt244 (Mian *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; Bulos *et al.*, 2004). Se trataría de un grupo de genes localizados en una región acotada del genoma que presentan una relación no alélica entre sí (Yang *et al.*, 2001). La co-segregación de los genes con el MM Satt244 ha permitido la identificación precisa de fuentes de resistencia, además de facilitar el seguimiento de su herencia en diversas poblaciones derivadas.

La SAM para los genes *Rcs3*, *RcsPeking* y *RscMt Rdo* es una alternativa interesante porque reduce la necesidad de ensayos de fenotipado exhaustivo durante las primeras etapas para la obtención de nuevas variedades de soja con resistencia a MOR.

De los genes mencionados, el gen *Rcs3*, caracterizado por conferir resistencia a todas a las razas conocidas de *C. sojina*, se ha utilizado de manera efectiva y extensa para incorporar resistencia a

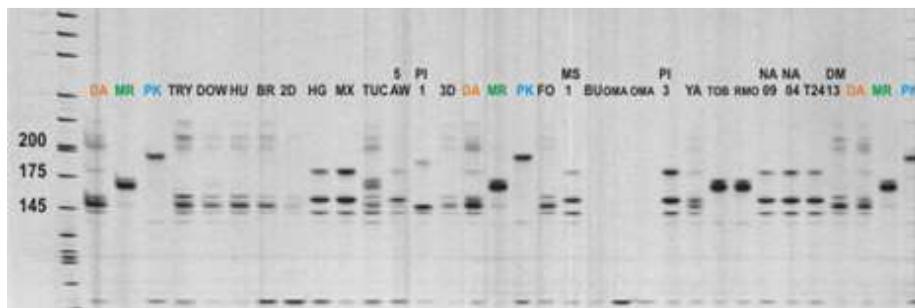
MOR en programas de mejoramiento de soja (Mian *et al.*, 2009; Mengistu *et al.*, 2011). Sin embargo, la complejidad de las razas y el antecedente de quiebre de algunos de los genes de resistencia a MOR han aumentado la necesidad de identificar genes de resistencia adicionales y/o piramidar algunos de ellos en germoplasmas élite. El objetivo de este trabajo fue identificar en el Banco de Germoplasma de soja (BG) de la EEAOC genotipos portadores de los MM ligados a genes de resistencia a MOR y diseñar cruza-mientos específicos para apilar los MM ligados a los genes mencionados con el fin de obtener genotipos con amplio espectro de resistencia.

## Análisis de presencia de los genes de resistencia a MOR en el BG

### Genotipado de progenitores.

Se seleccionaron 56 cultivares de soja utilizados frecuentemente como progenitores del BG de la EEAOC en base a su comportamiento fenotípico frente a MOR. A partir de material vegetal se llevó a cabo la extracción de ADN para el análisis molecular, usando un protocolo estandarizado para soja. La amplificación de los MM-SSR se realizó de acuerdo con el protocolo publicado por Cregan *et al.* (1999) y la visualización los fragmentos amplificados se realizaron en el secuenciador LI-COR IRDye (LICOR Biosciences).

El MM Satt244 fue utilizado para detectar la presencia de los genes *Rcs3*, *RcsPeking* y *RscMt Rdo*. A partir de los perfiles de amplificación con Satt244 en los 56 genotipos de soja se analizó la distribución de los alelos del MM. Se utilizaron como referencia para la presencia del MM asociado a los genes de resistencia los fragmentos de amplificación obtenidos a partir del ADN del cv. Davis (*Rcs3*), el cv. Peking (*RcsPeking*) y el cv. Monte Redondo (*RscMt Rdo*) (Figura 2).



**Figura 2.** Electroforesis visualizado en un secuenciador Licor DNA analyser 4300 mostrando las bandas de ADN amplificadas del marcador molecular Satt244 ligado a los genes de resistencia a MOR: *Rcs3*, *RscMt Rdo* y *RcsPeking*. En color se puede observar el polimorfismo en el tamaño de producto de amplificación presentado por los genotipos de referencia **Davis** (DA; 156/182pb), **Monte Redondo** (MR; 170pb), **Peking** (PK; 195pb).

Los resultados se analizaron como la frecuencia de los haplotipos de los genes *Rcs3*, *RCSMt.Rdo* y *RCSpeking* en los genotipos seleccionados. El haplotipo del gen *Rcs3* se presentó con mayor frecuencia en los genotipos evaluados, seguido por el haplotipo del gen *RCSMt.Rdo*, mientras que el haplotipo de *RCSpeking* no se presentó en ninguno de los genotipos analizados. En 11 genotipos de fenotipo resistente no se detectaron los alelos de referencia *Rcs3*, *RCSMt.Rdo* y *RCSpeking*. Esto podría indicar que la resistencia observada no estaría asociada con la presencia de estos tres genes y podría deberse a alguno de los restantes genes conocidos (*Rcs1* y *Rcs2*), para los cuales no se conocen MM asociados, o podría tratarse de nuevas fuentes de resistencia a MOR.

### ■ Apilamiento de genes de resistencia a MOR

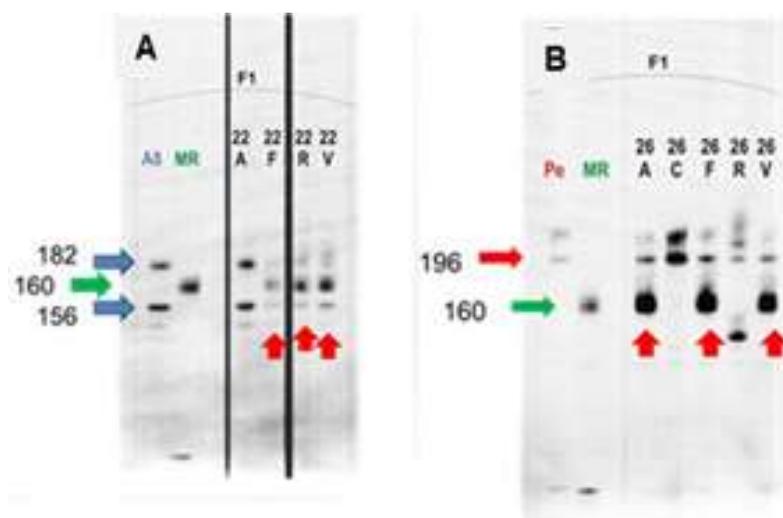
#### Cruzamientos y selección molecular

**P**ara realizar los cruzamientos dirigidos para apilar las distintas fuentes de resistencia a MOR se seleccionaron como parentales los genotipos A 8000 RG,

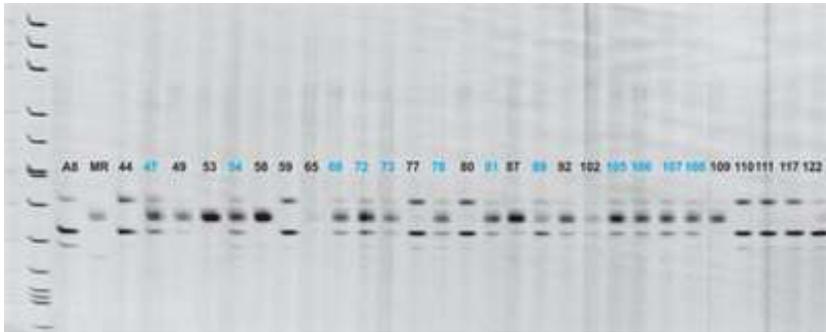
Monte Redondo y Peking, que presentaron los tres genes de *Rcs3*, *RCSMt.Rdo* y *RCSpeking* respectivamente. Los híbridos efectivos se detectaron en base a los polimorfismos entre los parentales. Se seleccionaron molecularmente dos familias híbridas efectivas: AM (A 8000 RG x Mt.Rdo.; genes *RCS3/RCSMt.Rdo*) y PM (Peking x Mt.Rdo.; genes *RCSpeking/RCSMt.Rdo.*) (Figura 3).

#### Avance generacional

Durante las siguientes campañas 2016/2017, 2017/2018, 2018/2019, 2019/2020, 2020/2021 y 2021/2022 se seleccionaron solo las plantas que mostraron la presencia de los dos genes de resistencia para realizar los avances generacionales a F2, F3, F4, F5, F6 y F7, respectivamente. Finalmente se seleccionó una familia AM y una PM, que contenían la mayor cantidad de individuos homocigotas para ambos genes respectivamente (Figura 4). Es importante destacar que en cada generación la selección genotípica mediante el MM Satt244 permitió disminuir a casi la mitad en número de líneas portadoras de los MM de resistencia a MOR apilados, que se avanzarán a la siguiente etapa.



**Figura 3.** Genotipado de las plantas F1 obtenidas con el Satt244 que muestra la presencia de los alelos del MM ligado a los genes R. La flecha roja vertical indica los cruzamientos efectivos. Además se colocaron los genotipos parentales de cada cruzamiento. A. cruzamiento A 8000 RG x Mt. Rdo.; B. Peking x Mt. Rdo.



**Figura 4.** Genotipado y selección mediante el MM Satt244 de las plantas con los genes apilados. En azul se muestran las plantas F2 que llevan los haplotipos de *Rcs3/RcsMt.Rdo* de la familia AM.

### Consideraciones finales

Existen diversos motivos por los cuales es importante el desarrollo de variedades de soja resistentes a MOR. Entre ellos se encuentran la aparición y propagación de cepas de *C. sojina* con tolerancia a algunos fungicidas de uso común y la aparición de nuevas razas debido a la existencia de etapas sexuales en el patógeno.

Existen antecedentes que la elevada diversidad, junto a la complejidad de razas conocidas, ha llevado a la evolución de nuevas razas virulentas que superaron algunos genes únicos de resistencia (genes *Rcs1* y *2*) (Athow *et al.*, 1962; Ross, 1968; Phillips & Boerma, 1981; Mian *et al.*, 2008).

Aunque el gen *Rcs3* es eficaz para controlar la enfermedad, existe la posibilidad de que este gen sea también quebrado o pierda eficiencia en el futuro. Por todo lo mencionado se hace evidente la necesidad de identificar nuevos genes o alelos; o bien piramidar en germoplasma élite aquellos ya conocidos para incrementar la resistencia y hacer que sea más duradera.

El empleo de un MM estrechamente vinculado a los genes *Rcs3*, *RCS<sub>Peking</sub>* y *RCS<sub>Mt.Rdo</sub>* fue útil en el análisis de los progenitores pertenecientes al BG, ya que se pudo determinar cuáles fueron los haplotipos más frecuentes (*Rcs3*), así como el que se encontró en menor frecuencia (*RCS<sub>Peking</sub>*) y permitió seleccionar cuáles serían los genotipos utilizados en los cruzamientos dirigidos a apilar dichos genes. De esta forma fue posible incorporar la fuente de resistencia *RCS<sub>Peking</sub>* y se pudo combinar con otras dos fuentes de resistencia como estrategia para incrementar la efectividad y durabilidad de la misma, lo que podría ser de gran utilidad para el mejoramiento genético de la soja. Estas nuevas líneas permitirán contar con una fuente de resistencia que no se encontraba en ningún otro genotipo.

Las líneas que se obtuvieron con los MM asociados a la resistencia a MOR apilados podrán ser utilizadas en el Programa de Mejoramiento Genético de la Soja de la EEAOC como progenitores dadores de resistencia. Esto permitirá al mismo tiempo ampliar la base genética de la resistencia y poder mejorar el manejo de la enfermedad.

Bibliografía citada

- Akem, C. N. & K. E. Dashiell. 1994.** Effect of Planting Date on Severity of Frogeye Leaf-Spot and Grain-Yield of Soybeans. *Crop Protection* 13 (8): 607-610. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(94\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0261-2194(94)90006-X)
- Athow, K. L. & A. H. Probst. 1952.** The inheritance of resistance to frog-eye leaf spot on Soybeans. *Phytopathology* 42: 660-662. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19531101967>
- Athow, K. L.; A. H. Probst; F. A. Laviolette & C. P. Kurtzman. 1962.** Newly Identified Physiological Race of *Cercospora-Sojina* on Soybean. *Phytopathology* 52 (7): 712-. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19631100721>
- Bradley, C. A.; A. Wood; G. R. Zhang; J. E. Murray; D. V. Phillips & R. Ming. 2012.** Genetic diversity of *Cercospora sojina* revealed by amplified fragment length polymorphism markers. *Canadian Journal of Plant Pathology* 34 (3): 410-416. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.711775>
- Bulos, M.; E. Altieri; M. L. Ramos y C. Sala. 2004.** Genómica de la resistencia a mancha ojo de rana. Simposio Nacional de Mancha ojo de Rana.
- Claps, P.; J. Bleckwedel; C. Aguayso; F. Scalora; V. González; L. D. Ploper y S. Reznikov. 2022.** Panorama sanitario del cultivo de la soja en el noroeste argentino durante la campaña 2021/2022. Publicación especial de soja 67.
- 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>
- Grau, C. R; A. E. Dorrance; J. Bond & J. S. Russin. 2004.** Fungal Diseases. In *Soybeans: Improvement, Production and Uses: Vol. agronomy-monogra* (Issue soybeansimprove, pp. 679-763). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr16.3ed.c14>
- Kim, H.; A. D. Newell; R. G. Cota-Sieckmeyer; J. C. Rupe; A. M. Fakhoury & B. H. Bluhm. 2013.** Mating-type distribution and genetic diversity of *Cercospora sojina* populations on soybean from Arkansas: evidence for potential sexual reproduction. *Phytopathology* 103 (10): 1045-1051. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-12-0229-R>
- Mengistu, A.; J. Bond; R. Mian; R. Nelson; G. Shannon & A. Wrather. 2011.** Identification of soybean accessions resistant to *Cercospora sojina* by field screening, molecular markers, and phenotyping. *Crop Science*, 51 (3): 1101-1109. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.09.0529>
- Mian, M. A. R.; A. M. Missaoui; D. R. Walker; D. V. Phillips & H. R. Boerma. 2008.** Frogeye leaf spot of soybean: A review and proposed race designations for isolates of *Cercospora sojina* Hara. In *Crop Science* 48 (1):14-24. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.08.0432>
- Mian, M. A. R.; T. Wang; D. V. Phillips; J. Alvernaz & H. R. Boerma. 1999.** Molecular Mapping of the 3 Gene for Resistance to Frogeye Leaf Spot in Soybean. *Crop Science* 39 (6): 1687. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.3961687x>
- Mian, R.; A. Mengistu; W. Wiebold; G. Shannon & A. Wrather. 2009.** Identification of Soybean Genotypes Resistant to *Cercospora sojina* by Field Screening and Molecular Markers. *Plant Disease* 93 (4). <https://doi.org/Doi.10.1094/Pdis-93-4-0408>
- Neves, D. L.; M. I. Chilvers; T. A. Jackson-Ziems; D. K. Malvick and C. A. Bradley. 2020.** Resistance to quinone outside inhibitor fungicides conferred by the G143A mutation in *Cercospora sojina* (causal agent of frogeye leaf spot) isolates from Michigan, Minnesota, and Nebraska soybean fields. *Plant Health Progress* 21: 230-231. <https://doi.org/10.1094/PHP-06-20-0052-BR>
- Phillips, D. & H. Boerma. 1981.** *Cercospora sojina* Race 5: A Threat to Soybeans in the Southeastern United States. *Phytopathology* 71: 334-336. <https://doi.org/10.1094/Phyto-71-334>
- Ploper, L. D.; V. González; M. R. Gálvez; M. R. Devani; F. Ledesma & M. A. Zamorano. 2001.** Frogeye Leaf Spot of Soybean Caused by *Cercospora sojina* in Northwestern Argentina. *Plant Disease* 85 (7): 801-801. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.7.801B>
- Ross, J. P. 1968.** Additional Physiological Races of *Cercospora Sojina* on Soybeans in North Carolina. *Phytopathology* 58 (5): 708.
- Yang, W.; D. B. Weaver; B. L. Nielsen & J. Qiu. 2001.** Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in "Peking." *Plant Breeding* 120 (1): 73-78. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00563.x>
- Zhang, G.; D. K. Pedersen; D. V. Phillips & C. A. Bradley. 2012.** Sensitivity of *Cercospora sojina* isolates to quinone outside inhibitor fungicides. *Crop Protection* (40): 63-68. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.04.025>