



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

CARACTERIZACIÓN DE RAZAS E INTROGRESIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ROYA ASIÁTICA DE LA SOJA

Jhon Cristian LARZÁBAL PÉREZ

Magíster en Ciencias Agrarias opción Ciencias
Vegetales

Diciembre 2020

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. Ph.D. Silvia Germán, Ing. Agr. Ph.D. Fernanda Gamba, e Ing. Agr. Ph.D. Guillermo Galván, el 18 de diciembre de 2020. Autor: Ing. Agr. Jhon Larzábal. Directora Lic. Biol. Ph.D. Silvina Stewart.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a INIA y a JIRCAS que hicieron posible materialmente la realización de este proyecto.

A Silvina Stewart que confió en mí para este trabajo y además siempre estuvo presente para escuchar, intercambiar y aportar.

A mis padres, que me enseñaron a soñar y a esforzarme para alcanzar los objetivos.

A Pamela, que con su compañía y constante apoyo me impulsó a superar momentos difíciles.

A Marcelo Rodríguez, quien siempre estuvo presente para intercambiar y discutir ideas, con voluntad incansable cuando teníamos miles de hojas por evaluar.

A Monika Kavanová por poner a disposición su conocimiento cada vez que algo no resultaba en el laboratorio.

A todo el equipo de protección vegetal de INIA La Estanzuela, (Dahiana Bentos, William Álvarez, Samuel Rabaza, Pablo Calistro, Mabel Pessio, Alicia González, Vanessa Domeniguini, Richard García, Fernando Pereira, Noelia Pérez) y al equipo de mejoramiento de soja (Sergio Ceretta, Mauricio Sastre, Glenda Vergara, Mauro Montaña, Abel López, Cynthia Amaral) que con enorme disposición y voluntad siempre acudieron cada vez que necesité ayuda.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. SOJA	1
1.2. ENFERMEDADES	3
1.2.1. <u>Roya asiática de la soja (RAS)</u>	6
1.2.1.1. Importancia y daños	8
1.2.1.2. Síntomas	9
1.2.1.3. Epidemiología	10
1.2.1.4. Control químico	11
1.2.1.5. Control cultural	12
1.2.1.6. Sistema de alertas	13
1.2.1.7. Control genético	14
1.3. BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA	15
1.4. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE AUTÓGAMAS	19
1.4.1. <u>Características de órganos reproductivos en soja</u>	19
1.4.2. <u>Métodos de mejoramiento y selección</u>	19
1.4.2.1. Hibridación	19
1.4.2.2. Selección por pedigrí	20
1.4.2.3. Método de población masal	21
1.4.2.4. Método de descendencia de semilla única	21
1.4.2.5. Método de dobles haploides	22
1.4.3. <u>Mejoramiento genético por retrocruzamiento</u>	23
1.4.4. <u>Mejoramiento genético multilínea</u>	24
1.4.5. <u>Herramientas de biología molecular</u>	24
1.4.5.1. Marcadores moleculares	24

1.4.5.2. Selección asistida por marcadores moleculares	25
1.4.5.3. Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)	25
1.4.5.4. Marcadores de secuencia simple repetida (SSR)	25
1.5. MEJORAMIENTO GENÉTICO POR RESISTENCIA	27
1.5.1. <u>Resistencia vertical</u>	28
1.5.2. <u>Resistencia horizontal</u>	28
1.5.3. <u>Resistencia general o adquirida</u>	28
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	31
2.1. INTROGRESIÓN DE LA RESISTENCIA	31
2.2. COMPORTAMIENTO DE LAS NUEVAS LÍNEAS	38
2.2.1. <u>Material vegetal</u>	38
2.2.2. <u>Inóculo del patógeno</u>	39
2.2.3. <u>Evaluación de las líneas obtenidas</u>	40
2.3. ANÁLISIS DE DATOS	42
3. <u>RESULTADOS</u>	43
4. <u>DISCUSIÓN</u>	51
5. <u>CONCLUSIONES</u>	55
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	56

RESUMEN

La soja es el principal cultivo agrícola de Uruguay. Una de las enfermedades con mayor potencial de daño es la roya asiática de la soja, un hongo biótrofo de origen asiático, que se dispersa en las corrientes de aire. Ha causado pérdidas de rendimiento de grano de hasta 60 y 80% en Paraguay y Brasil respectivamente. Los objetivos de este trabajo fueron: introducir genes de resistencia a roya en líneas elite de INIA, caracterizar a nivel de raza las poblaciones de roya presentes en Uruguay en las zafas 2017-2018 y 2018-2019, y evaluar el comportamiento de las líneas obtenidas con dos genes apilados. El trabajo de introducción se realizó en invernáculo, mediante tres retrocruzas a partir de la F₁, obtenida del cruzamiento entre el donador de la resistencia (poseedor de dos genes, por un lado *Rpp1b* + *Rpp5* y por otro *Rpp4* + *Rpp5*) y tres líneas elite de INIA. Luego de cada retro cruza se eligieron las plantas portadoras de ambos genes mediante selección asistida por marcadores moleculares. Para cada combinación se autofecundó la tercer retrocruza y se obtuvo una línea que comparte promedialmente 93,75% del genoma con la línea original del programa, y es portadora de dos genes de resistencia. Se observaron patrones de segregación distorsionados, 13:3 para el cruzamiento Py x 040 y 3:1 para los cruzamientos Py x 039 y No x 072, en concordancia con lo descrito por otros autores. Para el trabajo de caracterización de razas, se colectaron cinco muestras de roya en cultivos comerciales a partir de las cuales se obtuvieron 58 aislamientos monouredinia. Cada uno de estos aislamientos se inoculó sobre un set diferencial, compuesto por 12 genotipos, cada uno de los cuales posee un gen de resistencia: *Rpp1* a *Rpp6*, *Rpp1b*, *Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*, y BRS 154 (susceptible). Se identificaron 30 patotipos diferentes, de los que 19 fueron únicos. Existe gran diversidad del patógeno, 79% intra chacras y 52% entre chacras, el gen *Rpp1b* resultó inmune a todos los patotipos. Los genes *Rpp5* y *Rpp6* presentaron comportamiento contrastante entre años. Se registró un aumento de resistencia de más de 40% en las nuevas líneas evaluadas frente a los parentales recurrentes.

Palabras clave: mejoramiento, enfermedades, Uruguay, hongo, biotrófico.

RACE CHARACTERIZATION AND INTROGRESSION OF ASIAN SOYBEAN RUST RESISTANT GENES

SUMMARY

Soybean is the main agricultural crop in Uruguay. One of the most damaging diseases is asian soybean rust (RAS), a biotrophic fungus of Asian origin, which is dispersed in air currents. It has caused yield losses of 60 and 80% in Paraguay and Brazil respectively. The objectives of the work were: to introduce rust resistance genes in elite lines of the INIA soybean breeding program; to characterize the rust populations present in Uruguay in 2017-2018 and 2018-2019 at the race level, and evaluate the behavior of the lines obtained with two stacked genes. The introgression work was carried out in a greenhouse, by means of three back crosses from the F1 generation, obtained from the crossing between the resistance donor (carrying two genes, *Rpp1b* + *Rpp5* and *Rpp4* + *Rpp5*) and three elite lines of the INIA program. After each backcross, plants carrying both genes were chosen by markers assisted selection. The third backcross was self-pollination and the line obtained shares approximately 93.75% of the genome of the original line from the program, and carries two resistance genes. Distorted segregation patterns were observed, 13:3 for Py x 040 cross and 3:1 for Py x 039 and No x 072 crosses, in agreement with previous results from other authors. For the race characterization, five rust samples were collected in commercial fields and 58 mono-uredinia isolates were obtained. Each isolate was inoculated on a differential set, composed of 12 genotypes each with a single resistant genes: *Rpp1* to *Rpp6*, *Rpp1b*, *Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5* and BRS 154 (susceptible). Thirty different pathotypes were obtained, and 19 of them resulted unique. Diversity of the pathogen was high, 79% intra-field and 52% between fields, while *Rpp1b* gene resulted immune to all pathotypes. Genes *Rpp5* and *Rpp6* showed contrasting behavior between years. An increase of more than 40% in resistance was registered in the progeny lines evaluated.

Keywords: breeding, diseases, Uruguay, fungus, biotrophic

1. INTRODUCCIÓN

El siguiente trabajo atiende la necesidad del Programa de Mejoramiento de Soja de INIA de contar con germoplasma resistente a roya asiática de la soja (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow). La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) es el principal cultivo agrícola de Uruguay y por consiguiente es de gran importancia la incorporación de resistencia a las diferentes plagas y enfermedades que aquejan el cultivo de forma de contribuir a su rentabilidad y sustentabilidad.

1.1. SOJA

La soja (*Glycine max* (L.) Merr.) es una leguminosa originaria del este de Asia. Comenzó a domesticarse en el noreste de China en el período 1550-1027 A.C (Hartman *et al.* 1999). Es una especie estival de día corto con respuesta cuantitativa al fotoperiodo. Existe diversidad varietal con distintos requerimientos de fotoperiodo que se adaptan a un rango amplio de latitudes, aunque según Hymowitz (1970), se observó que las áreas con mayor producción de soja en China y EEUU se encuentran entre los 35° y 45° de latitud Norte. Los cultivares pueden clasificarse según grupo de madurez (GM) (Baigorri y Croatto 2000, Pedersen 2004). Los grupos de madurez disponibles actualmente van del GM 000 adaptados a las latitudes más altas, hasta el GM X adaptados a las latitudes más bajas, estas últimas ubicadas entre los trópicos y el Ecuador (Baigorri, 2004). Grupos de madurez mayores requieren menor fotoperíodo para florecer, alcanzando la etapa reproductiva más cerca del otoño

Dado su origen, los usos de la soja están muy ligados a las culturas orientales. Laufer, citado por Hymowitz (1970), observó que los habitantes del lejano oriente, a pesar de poseer animales productores de leche no la consumían, en su lugar utilizaban productos hechos con soja, como pasta de soja fermentada, salsa de soja, cuajada de soja (tofu), queso de soja fermentado (tempeh) y leche de soja. También se consumían en grandes cantidades las semillas verdes inmaduras y los brotes porque eran considerados altamente nutritivos. Sin embargo, el consumo humano de los productos de la soja no ha tenido gran éxito en América y Europa principalmente por la competencia con los productos lácteos (Rackis *et al.* 1967 citado por

Hymowitz 1970). En los países Asiáticos la soja para consumo humano no es transgénica y se procesa para obtener productos tradicionales que incluyen fermentados como el tempeh indonesio, miso japonés y productos no fermentados como tofu, salsa, cuajada, bebida y polvo. Por el contrario, la soja transgénica que importan principalmente de América la procesan para producir aceite y harina de soja, esta última con destino a la alimentación animal (Baohui, 2006).

Durante las primeras tres décadas del siglo XX la producción de soja estuvo mayoritariamente concentrada en Asia, especialmente China, Japón, Indonesia y Corea. Sin embargo, para principios de los 50' EEUU ya había superado a China en producción y para finales de los 60' se sembraban 28 millones de ha en 25 países.

A continuación se muestran datos que permitirán dimensionar lo que significa la soja en el mundo, la región y Uruguay. Según la FAO (2020) en el 2018-19 en todo el mundo se produjeron 366 millones de toneladas, los tres principales países productores fueron: Brasil con 120,75 millones de toneladas, EEUU con 120,5 millones de toneladas, y Argentina con 55 millones de toneladas, el cuarto puesto fue para China con 16 millones de toneladas, que a su vez coincide con el primer importador a nivel mundial, importando en 2019, 82,5 millones de toneladas. Finalmente para la zafra 2018-2019 se logró un stock mundial de 563,75 millones de toneladas. En el 2005, los mayores consumidores de soja eran EEUU con 51 millones de toneladas, mientras que China ocupaba el segundo lugar con 45 millones de toneladas y en tercer y cuarto lugar estaban Argentina y Brazil con 31 millones de toneladas (Baohui, 2006).

En Uruguay durante la zafra 2018-2019 se sembraron aprox. 966000 ha con un rendimiento promedio de 2,93 toneladas/ha, (MGAP, 2019). Si bien la producción de Uruguay no es importante para el mundo, la soja es nuestro principal cultivo agrícola. Según el Instituto Uruguay XXI (2020), el cultivo generó para el país sólo por concepto de exportaciones en el año agrícola 2019/2020, U\$S 991 millones. En el Mercosur se obtiene el 50% de la producción mundial de soja. Son razones más que relevantes para apuntalar el desarrollo del cultivo con generación de conocimiento y tecnología adaptable a nuestras condiciones que permita mejorar la

competitividad y sostenibilidad del negocio, sin perder de vista el cuidado del medio ambiente.

En relación a las enfermedades del cultivo, en un relevamiento nacional realizado en la zafra 2013-2014, por Barrios *et al.* (2014), se detectó la presencia de al menos una enfermedad en el 99% de los cultivos muestreadas. Las enfermedades foliares fueron observadas en el 90% de los cultivos muestreados, las de tallo en el 25% y las de raíz en el 59% de los mismos. A nivel foliar, el tizón de la hoja, las bacteriosis, el oídio, y el mildiu fueron encontrados en un número muy bajo de chacras (menos de 10 chacras), la mancha marrón en un 20%, pero la de mayor prevalencia fue la roya que se presentó en 81 de las 101 chacras muestreadas.

En la actualidad la roya asiática de la soja es sin lugar a dudas una de las enfermedades con mayor potencial de daño debido a su alta agresividad y velocidad de dispersión (Andrade y Andrade 2002). Provoca defoliación prematura, aborto y caída de vainas (Yorinori *et al.* 2003), sus daños se relacionan con disminución del número de vainas y peso de mil semillas (Balardin *et al.* 2011).

1.2. ENFERMEDADES

El aspecto más visible de una enfermedad es la pérdida de órganos o superficie fotosintéticamente activa, de allí el patógeno extrae los nutrientes para su desarrollo y con ello afecta el desarrollo y reproducción de la planta. Existe un efecto aún mayor, y es el provocado por sustancias que secreta el patógeno o que produce la planta huésped como respuesta a estímulos que produce el parásito. Los tejidos afectados de esta manera pueden presentar aumento de su nivel respiratorio, desintegración de sus células, marchitamiento, abscisión, elongación y división anormal y degeneración de componentes específicos como la clorofila. La patogenicidad puede definirse como la alteración que es capaz de provocar el parásito sobre una o varias funciones esenciales de la planta (Agrios, 2005).

Los parásitos obligados y los no obligados se diferencian entre sí por la forma en que atacan y obtienen sus nutrientes. Muchos parásitos no obligados producen

enzimas que degradan los componentes celulares de las plantas y toxinas que propician su muerte y desintegración, y luego utiliza el contenido de las células de su hospedante para su crecimiento. Los parásitos obligados no destruyen las células de sus hospedante sino que obtienen sus nutrientes al ponerse en contacto con las células vivas, de esta manera se produce la desviación o absorción constante de los nutrientes del hospedante por parte del patógeno (Agrios, 2005).

Una enfermedad ocurre cuando el huésped susceptible entra en contacto con el patógeno virulento bajo determinadas condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad. Entonces la magnitud de la enfermedad será resultado de la interacción de estos tres factores, huésped, patógeno y ambiente; lo que se denomina triángulo de la enfermedad. Por ejemplo, si la temperatura se aproxima al valor óptimo de desarrollo para una determinada enfermedad, el vértice correspondiente al ambiente aumenta su tamaño, como consecuencia el área del triángulo aumenta y entonces podemos extrapolarlo a un aumento en el grado de severidad de la enfermedad (Agrios, 2005).

Las etapas en el desarrollo de una enfermedad están dadas por una serie de eventos que denominamos ciclo de la enfermedad. Las principales etapas del ciclo de una enfermedad son:

Inoculación: Es el proceso en cual el patógeno y el hospedante entran en contacto. El inóculo es cualquier estructura del patógeno capaz de producir la infección. Antes de penetrar, el patógeno debe unirse a la superficie del hospedante. Algunas veces éstos tienen en su cubierta compuestos mucilaginosos que consisten en mezclas de polisacáridos, glucoproteínas, polímeros de hexosaminas y materiales fibrilares. Si la señal de crecimiento inicial es percibida por el patógeno, favorece su crecimiento y desarrollo induciendo la enfermedad, si esta señal suprime el crecimiento del patógeno la enfermedad no progresa. Si la señal percibida por la planta desencadena una reacción de defensa, el crecimiento o la actividad del patógeno disminuyen y es posible que la enfermedad no progrese. Por el contrario, si dicha señal suprime o anula la reacción de defensa del hospedante se desarrolla la enfermedad. El siguiente paso luego de la inoculación es la germinación, que suele

ser favorecida por los nutrientes que se difunden en la superficie de la planta. Una vez que las esporas germinan, el tubo germinativo o las zoosporas buscan el lugar adecuado para la penetración.

Penetración: se han observado diferentes vías, en forma directa a través de la cutícula, a través de aberturas naturales o a través de heridas.

Infección: es el proceso por el cual los patógenos entran en contacto con los tejidos susceptibles del hospedante donde se producen nutrientes para ambos. Las infecciones efectivas provocan los síntomas, que comprenden el conjunto de cambios que se manifiestan en la apariencia de las plantas. En la mayoría de las enfermedades de las plantas los síntomas aparecen unos cuantos días o semanas después de la inoculación. El tiempo transcurrido entre la inoculación y la aparición de síntomas se denomina período de incubación.

Colonización: en general el desarrollo de los patógenos continúa más allá de las lesiones o manchas que produjo la infección y pueden llegar a colonizar toda la planta. El desarrollo de la infección está afectado por el tipo de reproducción del patógeno, por ejemplo: los hongos se reproducen por esporas sexuales y/o asexuales, las bacterias, micoplasmas y protozoarios se reproducen por fisión que implica la división de un individuo maduro en un par de individuos más pequeños e iguales. Los virus y viroides son replicados por las células del huésped, y los nemátodos se reproducen por huevos.

Diseminación: algunos nemátodos, oomicetes y bacterias se desplazan por sí mismos, pudiendo pasar de un hospedante a otro. En cambio los hongos pueden extenderse mediante sus hifas, pero los principales agentes de dispersión son el aire, el agua, los insectos, otros animales y el hombre. En el caso de las royas, el viento es el factor de dispersión de mayor importancia. Frecuentemente las esporas pueden ser transportadas hasta cientos de kilómetros y cuando el clima es favorable pueden ocasionar epifitias de gran importancia.

Supervivencia: en las plantas perennes los hongos invernan como micelio en los tejidos infectados, como esporas en la superficie de una planta infectada, o sobre

una yema en el caso de hongos que infectan hojas o frutos de árboles de hoja caduca. Los hongos que infectan plantas anuales suelen sobrevivir como micelio en los residuos vegetales infectados. Otros hongos como por ejemplo *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*, son habitantes del suelo por lo que tienen capacidad para sobrevivir durante algunos períodos en forma de esporas de resistencia o como saprófitos. Algunas royas que invernan en cultivos de invierno de clima cálido son desplazadas a los mismos hospederos que se cultivan en primaveras de climas fríos.

Las royas, son patógenos policíclicos o sea presentan más de un ciclo de infección por ciclo del cultivo. Los patógenos de este tipo son responsables de causar las mayores epifitias explosivas, así como otras enfermedades como los mildius, tizones, manchas foliares y virus transmitidos por áfidos (Agrios, 2005).

1.2.1. Roya asiática de la soja (RAS)

El agente causal de la roya de la soja, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. es un hongo biótrofo de origen asiático (Cuadro 1). Fue reportado por primera vez en Japón en 1902 (Hennings, 1903), en América se reportó por primera vez en Hawaii (Killgore y Heu, 1994 citados por Godoy y Del Ponte 2011). En América del Sur fue encontrada por primera vez en Paraguay y Brasil en 2001 (Yorinori *et al.* 2005), en Argentina en 2002 (Rossi, 2003), actualmente se encuentra en todo lugar donde se cultiva soja (Formento, 2005). En Uruguay fue reportada por primera vez en 2004 por Stewart *et al.* (2005), y en el mismo año se reportó en Colombia y Estados Unidos (Schneider *et al.* 2005).

Cuadro 1. Taxonomía de *Phakopsora pachyrhizi*.

Taxonomía	
<i>Phakopsora pachyrhizi</i> Syd. & P. Syd.	
Estado anamorfo:	<i>Malupa sojae</i>
Dominio:	<i>Eukariota</i>
Reino:	<i>Fungi</i>
Pylum:	<i>Basidiomycota</i>
Orden:	<i>Uredinales</i>
Clase:	<i>Urediniomycete</i>
Familia:	<i>Phakosporaceae</i>
Género:	<i>Phakopsora</i>
Fuente: Goellner <i>et al.</i> 2010	

La roya asiática es microcíclica (fases II y III) y autóica. Es un parásito obligado, el inóculo primario está constituido por las urediniosporas producidas en plantas de soja u otras especies hospedantes vivas e infectadas. Las esporas necesitan ser liberadas de los uredinios y ser extraídas del canopeo por acción del viento que puede llevarlas por grandes distancias, transportándolas a través de las corrientes de aire. Después de la deposición sobre un hospedero susceptibles y bajo condiciones predisponentes, las esporas viables iniciarán la fase parasítica por el contacto con los tejidos susceptibles (Godoy y Del Ponte, 2011).

A partir de la urediniospora surge el tubo germinativo que crece sobre la superficie de la hoja hasta formar un apresorio que facilitará la penetración a través de las células de la epidermis (no necesitan penetrar a través de los estomas) alcanzando el interior de la célula. El punto de penetración presentará una necrosis luego de algunos días, en ese sitio, pero en la cara inferior se formarán los uredinios continuamente durante tres a siete semanas. Las uredosporas se producen en cada uredio durante aproximadamente tres semanas (Godoy y Del Ponte, 2011)

La supervivencia de las esporas en el aire dependerá de la temperatura, humedad relativa, radiación solar directa y luz ultravioleta (Isard *et al.* 2005). La precipitación cumple dos funciones importantes, durante el transporte es el factor que ocasiona la deposición de las esporas y promueve condiciones de mojado foliar para permitir la infección. Por ejemplo, se necesitan más de dieciséis horas de mojado foliar para que se produzca la infección cuando las temperaturas están próximas a valores extremos como 10 °C. La duración del período latente (aparición de síntomas) puede variar desde 6 días a 26 °C hasta 12-16 días con temperaturas de 15 °C (Kitani e Inove 1960 citados por Godoy y Del Ponte 2011). Existen diversos reportes sobre el papel de las lluvias en la determinación del grado de severidad de la enfermedad, en los cuales se vinculan daños menores en estaciones secas y altos porcentajes de pérdidas en estaciones lluviosas.

Un trabajo realizado en Brasil mostró una fuerte correlación entre los niveles de severidad de la enfermedad observados próximos al final del ciclo del cultivo y la frecuencia y cantidad de lluvia en el período 30 días posterior al establecimiento de la enfermedad (Del Ponte *et al.* 2006a). Cuando las temperaturas de verano no presentan limitantes para el desarrollo de la enfermedad, las precipitaciones parecen ser el factor clave que define la severidad de las epidemias (Godoy y Del Ponte, 2011)

1.2.1.1. Importancia y daños

Actualmente la roya asiática de la soja es una de las enfermedades con mayor potencial de daño, debido a su alta agresividad y velocidad de difusión (Andrade y Andrade, 2002). Provoca defoliación prematura, aborto y caída de vainas, sus daños se relacionan principalmente con reducción del número de vainas y peso de mil semillas por planta (Yorinori *et al.* 2003 citado por Balardin *et al.* 2011). Las pérdidas potenciales van a depender del estado fenológico en el que comienzan los síntomas y la severidad de los mismos (Ivancovich y Bota, 2003).

La roya asiática es la enfermedad que causa mayores pérdidas en Bolivia, Brasil, China y Paraguay y es la que provoca mayores pérdidas en el mundo llegando a 13,24 millones de toneladas en el año 2006 (Wrather y Koenning, 2009). Según

Godoy y Del Ponte (2011) es considerada una de las enfermedades más agresivas del cultivo, con porcentajes de pérdida de rendimiento que van del 10 al 90% en países asiáticos como India y Taiwán (Sinclair y Hartman 1999). Pérdidas de 80% se observaron en Brasil en ensayos de fungicidas (Godoy *et al.* 2009a), pero la mayor pérdida a nivel comercial fue en la zafra 2000-2001, cuando se reportó la roya, donde las mermas en el rendimiento llegaron al 70% y se estimó una pérdida anual de alrededor de U\$S 2 billones, entre pérdidas directas y costo de aplicaciones (Henning y Godoy, 2006, Soarez, 2007 citados por Godoy y Del Ponte 2011).

1.2.1.2. Síntomas

Aunque los síntomas pueden observarse en cualquier etapa del desarrollo del cultivo en los lugares donde se dan infecciones tempranas, en general se hacen más evidentes a medida que las plantas se aproximan a floración. Las lesiones consisten en ligeras protuberancias, restringidas por las nervaduras, amarillentas que pasan a marrón y marrón rojizas posteriormente, dependiendo de la reacción de resistencia del cultivar. Se visualizan mejor en el envés de las hojas y progresa de las hojas inferiores hacia las superiores. Sobre estas lesiones se forman estructuras globosas denominadas uredinios (comúnmente los llamamos pústulas) que liberan uredinosporas a través de un poro central. Durante los últimos estadios se forman estructuras de color pardo oscuro denominadas telios que producen teliosporas (Godoy y Del Ponte, 2011). Según Bromfield (1984), esta fase del hongo podría desarrollarse bajo condiciones ambientales particulares.

El tipo y color de lesión dependen de la edad y del tipo de interacción entre el genotipo de la planta y la raza infectante. Podemos encontrarlas de color castaño (TAN) sin necrosis extensiva y con abundante esporulación indicando susceptibilidad. Cuando la lesión es marrón rojiza (RB, reddish brown) con extensa necrosis, menor número de uredinios y poca esporulación, nos indica que el cultivar tiene cierta resistencia a la raza infectante (Bromfield y Hartwig, 1980; Bromfield, 1984).

Las hojas que presentan alta densidad de lesiones se tornan amarillas y caen precozmente (Yang *et al.* 1991). Síntomas producidos por enfermedades bacterianas

podrían ser confundidos en primera instancia, pero la presencia de múltiples uredinosporas saliendo del poro central del uredinio permiten una identificación clara.

1.2.1.3. Epidemiología

Phakopsora pachyrhizi puede infectar 80 especies de la subfamilia Papilionidae (Slaminko *et al.* 2008), el hospedante más importante es *Pueraria lobata* (kudzu). Otras fuentes reportan que es capaz de infectar a más de 150 especies de 53 géneros (Hartman *et al.* 2011 citado por Kim *et al.* 2012). Este amplio rango de hospedantes es inusual entre las royas y puede ser el resultado de genes que intervienen en un patrón de virulencia diverso y complejo (Hartman *et al.* 2005, citado por Kim *et al.* 2012).

El desarrollo de la enfermedad depende, entre otros factores, de las condiciones ambientales. La germinación de las esporas ocurre con un mínimo de 6 horas de rocío y temperatura de entre 8 y 36 °C, con un óptimo entre 12 y 24 °C. La infección también requiere de al menos 6 horas de rocío y temperaturas entre 11 y 28 °C. Las uredinias maduran seis a siete días después de la infección y cada 10-11 días se produce una nueva generación de uredinosporas. Bajo condiciones de tiempo fresco y húmedo la severidad de la enfermedad puede pasar de trazas a 90% en tres semanas. Las uredinosporas pueden sobrevivir hasta 50 días y son fácilmente dispersadas por el viento (Balardin *et al.* 2011).

Cuando las condiciones son óptimas en cada etapa, los ciclos secundarios de esta roya se producen en pocos días y la eficiencia del control se ve comprometida aún si este se realiza junto a la aparición de los primeros síntomas. Para lograr un buen resultado es necesario contar con un programa eficiente de control, que tenga en cuenta el gradiente de dispersión del patógeno, asociado a un programa de control químico preventivo, considerando que la enfermedad generalmente ocurre a inicio de floración aumentando su severidad durante el llenado de grano (Balardin *et al.* 2011).

1.2.1.4. Control químico

El uso de fungicidas ha sido la principal medida de control de la enfermedad. A partir de la difusión de la roya hacia África y América del Sur se evaluaron diversos fungicidas triazoles y estrobilurinas por separado o en mezcla y se encontraron varios productos con buenos niveles de control. Las mezclas de triazoles y estrobilurinas presentan mayor espectro de acción y mejores resultados en el control de la enfermedad. Otra ventaja de la mezclas es la menor presión de selección de poblaciones resistentes al patógeno (Miles *et al.* 2003, 2007, Schem *et al.* 2009, citados por Godoy y Del Ponte, 2011).

A partir de la zafra 2009-2010 en Brasil, donde se observó menor eficiencia de algunos triazoles en las principales regiones productoras, comenzaron a recomendarse solo las mezclas para el control de la enfermedad (Godoy *et al.* 2009b) (Fig. 1).

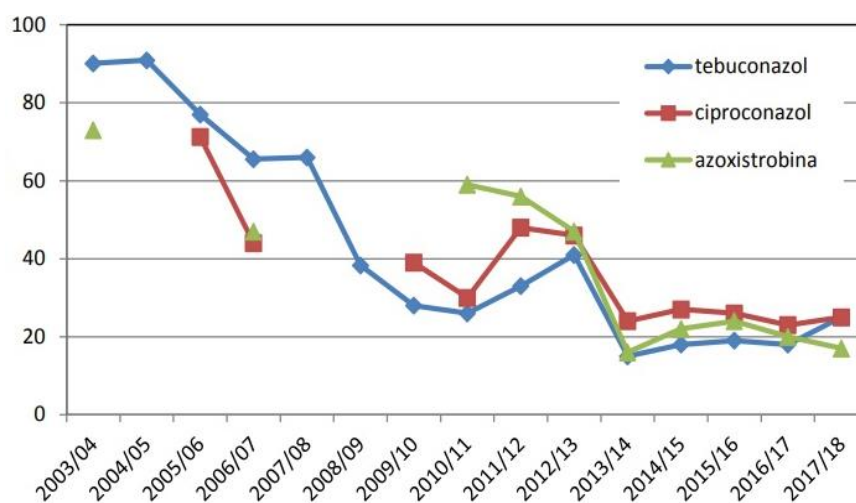
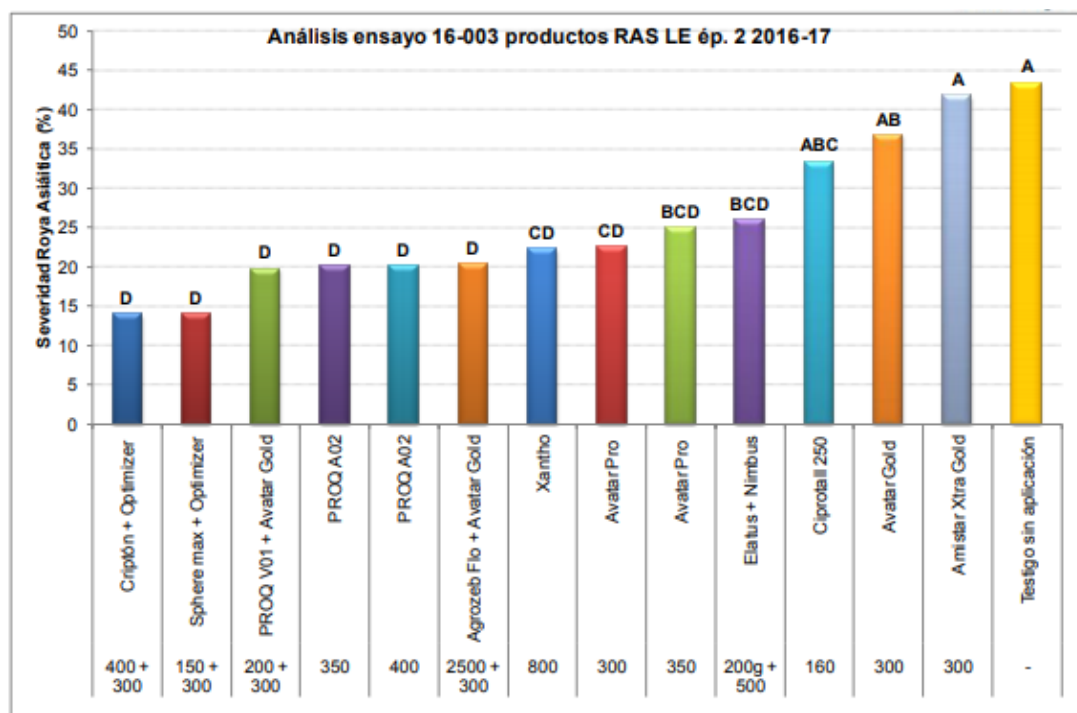


Figura 1. Eficiencia de control de dos triazoles y una estrobilurina entre 2003 y 2018. Porcentaje de control de roya en ensayos cooperativos en las zafras 2003/04 (11 ensayos), 2004/05 (20 ensayos), 2005/2006 (15 ensayos), 2006/07 (10 ensayos), 2007/08 (7 ensayos), 2008/09 (15 ensayos), 2010/11 (11 ensayos), 2012/13 (21 ensayos), 2013/14 (16 ensayos), 2014/15 (21 ensayos), 2015/16 (23 ensayos), 2016/17 (32 ensayos), 2017/18 (28 ensayos) en las diferentes regiones productoras de Brasil. Fuente: Godoy *et al.* (2018).

Varios autores han estudiado la eficiencia de fungicidas para el control de roya y sus resultados han confirmado la menor sensibilidad o resistencia de la roya frente a fungicidas de los grupos: inhibidores de la desmetilación, inhibidores de la quinona externa, inhibidores de la succinato deshidrogenasa (Schmitz *et al.* 2014, Klosowski *et al.* 2016, Simões *et al.* 2018). Existen diferencias de control a campo, y en el Uruguay existen productos comerciales que funcionan para el control de la roya (Fig. 2).



*PROQ V01 experimental; PROQ A02 = nombre comercial ARCAS OD

Figura 2. Efectividad de catorce fungicidas comerciales en Uruguay, zafra 2016-2017 (Stewart et al. 2018).

1.2.1.5. Control cultural

Una de las principales medidas es el vacío sanitario, que consiste en la eliminación de los cultivos de soja en “zafriña” en países de inviernos benignos, donde el patógeno sobrevive de una zafra a otra. Estas áreas se extienden desde el sur de Brasil hasta el sur de Texas y Florida. Aun así la roya podría mantenerse viva en

otros huéspedes como el kudzu, presente en países claves como Brasil, Paraguay y EEUU (Godoy y Del Ponte, 2011), además de otras 80 o más especies de leguminosas (Mc Lean 1979; Slaminko *et al.* 2008, citados por Childs *et al.* 2018b). Otros autores también han concluido que la siembra a distancias de entresurco mayores favorece la llegada del fungicida hasta los estratos inferiores del follaje. Otra medida, es la siembra temprana de cultivares precoces para que la llegada del patógeno coincida con estados avanzados del cultivo minimizando de esta manera las mermas potenciales de rendimiento.

1.2.1.6. Sistema de alertas

Con el objetivo de mejorar el resultado del control químico y evitar pérdidas de rendimiento se han creado sistemas de alerta que tienen en cuenta la información climática como lluvia, temperatura y duración del mojado foliar para predecir el riesgo de ocurrencia de infección o desarrollo de la epidemia (Del Ponte *et al.* 2006b).

En Uruguay, similar a lo realizado en EEUU, Brasil y Argentina, también se creó a partir de la zafra 2016-2017 el sistema de alerta a roya asiática de la soja (SARAS). Es una herramienta desarrollada por INIA y que integra toda la información disponible sobre la roya asiática. Se encuentra disponible en: (http://shiny.inia.org.uy/modelos_inia/SARAS/). Cuenta con:

- Un mapa de dispersión que muestra la localización y número de focos reportados por los laboratorios que colaboran.
- Una opción de registro que avisará al usuario cuando se reporte un foco a menos de 100 km de su cultivo.
- Información útil al momento de decidir la realización o no del control químico.
- Mapa de riesgo de infección tomando en cuenta condiciones ambientales pronosticadas.

1.2.1.7. Control genético

La resistencia de soja a *P. pachyrhizi* está condicionada por la presencia de genes denominados *Rpp*. Hasta el momento al menos 10 genes y/o alelos *Rpp* han sido mapeados en siete locus del genoma de soja. Se han identificado genes al estado dominante y recesivo (Cuadro 2). Aun así es necesaria la identificación de más genes de resistencia para facilitar el desarrollo de cultivares con resistencia durable en el tiempo (Childs *et al.* 2018a).

Cuadro 2. Genes de resistencia frente a *Phakopsora pachyrhizi*, autores y ubicación.

Gen	Genotipo	Cromosoma	Autor
<i>Rpp1</i>	PI 200492	18	Mc Lean y Byth 1976; Hartwig y Bromfield 1983
<i>Rpp1b</i>	PI 594538A	18	Chakraborty <i>et al.</i> 2009
<i>Rpp2</i>	PI 230970	16	Bromfield y Hartwig 1980
<i>Rpp3</i>	PI 462312	6	Bromfield y Melching 1982; Hartwig y Bromfield 1983
<i>Rpp4</i>	PI 459025	18	Hartwig 1986
<i>Rpp5</i>	PI 200526/471904	3	Garcia <i>et al.</i> 2008
<i>Rpp5</i>	PI 200456	3	Garcia <i>et al.</i> 2008
<i>Rpp6</i>	PI 567102B	18	Li <i>et al.</i> 2012
<i>Rpp6</i> alelic locus	PI 567068A	18	King <i>et al.</i> 2016
<i>Rpp 6907</i>	SX 6907	18	Chen H <i>et al.</i> 2015
<i>Rpp7</i>	PI 605823	19	Childs <i>et al.</i> 2018b
<i>rpp X</i>	BR01-18437	N/D	Pierozzi <i>et al.</i> 2008
<i>Rpp</i> Hyuuga	Hyuuga	6	Silva <i>et al.</i> 2008

En Brasil en 2009 se liberaron tres cultivares con genes mayores de resistencia a roya (TMG 801, TMG 803 y BRS 607560). Cuando se constató la presencia de aislados virulentos, capaces de provocar enfermedad en estos cultivares se recomendó su utilización asociado a la aplicación de fungicidas (Bonde *et al.* 2006;

Miles *et al.* 2006). Según la empresa TMG de Brasil, se han liberado nueve cultivares más hasta el 2019, pero la misma no informa que genes poseen.

Otra forma de control genético es el uso de resistencia horizontal que es conferida por un gran número de genes de efecto menor. Este tipo de resistencia se considera efectivo para todas las cepas de un patógeno. Pero es más difícil de incorporar y al permitir la expresión de la enfermedad puede implicar cierta pérdida de rendimiento (Godoy y Del Ponte, 2011). Este tipo de resistencia podría ser una solución frente a la alta variabilidad patogénica descrita por Yamanaka *et al.* (2010).

1.3. BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA

Las defensas de la planta disminuyen a medida que avanza el estado fenológico, pero aun así se activan cuando la planta reconoce al patógeno, poniendo en funcionamiento factores de transcripción que activan genes de defensa (Suzuki *et al.* 2004, citado por Balardin *et al.* 2011). Los genes sintetizan proteínas que inhiben el desarrollo del patógeno a través de la digestión de las paredes celulares del hongo, fortificación de las paredes celulares de la planta y/o la biosíntesis de compuestos antimicrobianos (fitoalexinas). Según Yang *et al.* (1991) esta defensa puede insumir mucha energía.

Según Jones y Dangl (2006) el sistema de defensa de las plantas podría dividirse en cuatro fases. En la primer etapa los patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMP o MAMP por sus siglas en inglés) son reconocidos por los receptores (PRR, del inglés pattern recognition receptor), en general presentes en la membrana plasmática del hospedante y dan como resultado la denominada inmunidad activada por PAMP (PTI PAMP triggered immunity) que puede detener la colonización. Los PAMP se han definido como epítomos invariantes dentro de moléculas conservadas, indispensables para los microorganismos y que no se restringen solo a los patógenos. Los PAMP fúngicos más conocidos derivan de la membrana celular, y pueden ser beta-glucanos, ergosterol o quitina, mientras que en las bacterias, se destaca la flagelina. Los receptores de los PAMP (PRR) son proteínas transmembrana compuestas por un ectodominio de repeticiones ricas en

leucina, un dominio transmembrana unido a proteínas quinasas (He *et al.* 2007). Las respuestas de la PTI están mediadas por la difusión de iones a través de la membrana plasmática, la activación de la cascada de proteínas kinasas (MAPK), la producción de especies reactivas del oxígeno, cambios en la expresión de genes y reforzamiento de la pared celular (He *et al.* 2007).

En la segunda fase, los patógenos que lograron evadir la PTI secretan efectores que contribuyen a la virulencia, incluyendo fitotoxinas, polisacáridos extracelulares y efectores proteicos (He *et al.* 2007). Otros tipos de efectores afectan los procesos que están por debajo de la cascada de señalización y traen otras consecuencias. Entonces se desencadena una susceptibilidad activada por efectores que se denomina ETS (effector triggered susceptibility). Algunos efectores de hongos y oomicetes pueden actuar también en el interior de las células, aunque aún no se sabe cómo son liberados allí. Una vez en el interior de las células, los efectores son reconocidos por las proteínas NB-LRR (Nucleotide-binding leucine-reach repeat) (Jones y Dangl 2006).

La fase 3 comienza cuando alguno de estos efectores es reconocido por alguna de las proteínas NB-LRR, lo que se denomina inmunidad activada por un efector (ETI effector triggered immunity). Las proteínas NB-LRR son sintetizadas a partir de los genes de resistencia y forman parte de la respuesta descrita por la ley “gen por gen” de Flor (1971). De acuerdo a esta ley, los genes R de la planta, confieren resistencia al patógeno que contiene los genes correspondientes y complementarios de avirulencia (Avr). Esta respuesta en general resulta en resistencia a la enfermedad, asociada a una reacción de hipersensibilidad en el sitio de infección. La mayor parte de los genes de resistencia codifican para proteínas NB-LRR, por ejemplo, en el genoma de *Arabidopsis thaliana* son aproximadamente 125 los genes R que codifican para estas proteínas (Jones y Dangl 2006). La mayoría de los patógenos producen efectores que se confunden con las hormonas de defensa de las plantas, en general son el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno. Por ejemplo, las *Pseudomonas*, producen coronatina que funciona como un imitador molecular del ácido jasmónico que es antagónico al ácido salicílico, de esta manera el patógeno

suprime las defensas mediadas por el ácido salicílico, lo que contribuye a la virulencia del patógeno (Jones y Dangl, 2006).

En la fase 4 mediante la selección natural, los patógenos desarrollan nuevos efectores que logran evadir o suprimir la ETI, hasta que las plantas, también por selección natural logran variantes de los genes resistencia para que la ETI pueda activarse.

Estudios de las proteínas NB-LRR han mostrado que los residuos de lámina apolares expuestos son hipervariables y sujetos a presión selectiva para su diversificación, entonces la especificidad de reconocimiento está en los LRR (Jones y Takemoto 2004). Según Chisholm *et al.* (2006) la región N-terminal es la encargada de encender la cascada de señalización, mientras que el extremo LRR parece estar involucrado en la interacción proteína-proteína y en el reconocimiento específico del efector (Takken *et al.* 2006). Algunas proteínas NB-LRR son capaces de reconocer efectores a través de la detección de sus metabolitos en las células blanco. Lo que plantean Jones y Dangl (2006) es la “hipótesis de guardia”, primero, un efector actúa como factor de virulencia cuando tiene un blanco en el hospedante, luego este efector provoca la infección, alterando así las células blanco del hospedante. Finalmente, la perturbación provocada por ese efector genera una modificación del patrón molecular vegetal, modificación que activa las proteínas NB-LRR correspondientes. Uno de los mecanismos para vencer esta defensa es la generación de múltiples efectores para manipular el mismo blanco en el huésped.

Cuando la planta logra reconocer el efector, el patógeno evoluciona desechando este gen. En línea con esto, se ha observado que los genes efectores se asocian a elementos genéticos móviles y se observan comúnmente como presencia/ausencia de polimorfismo a través de cepas bacterianas o fúngicas. La presencia de determinado gen efector en una población de patógeno podrá ser aumentada según su capacidad de promover virulencia y reducida mediante el reconocimiento del hospedante.

Algunos autores han estudiado las interacciones genético-moleculares entre la roya asiática de la soja y su hospedero. Pedley *et al.* (2019) estudiaron el control de

la inmunidad a *P. pachyrhizi* en soja mediada por los genes *Rpp1* y *Rpp4* en Estados Unidos donde estos genes son efectivos. Al secuenciar la región del gen *Rpp4* en el genotipo susceptible Williams 82 encontraron la presencia de tres CC-NB-LRR, un tipo de NB-LRR llamados “coiled-coil”(CC), similares a los RGC2 en la familia de la lechuga. Cuando silenciaron el gen en el genotipo resistente (PI 459025B) se perdió la resistencia, indicando que *Rpp4* es un gen que codifica un CC-NB-LRR. En el mismo estudio, con un enfoque similar se trató de identificar la fuente de resistencia en *Rpp1* en PI 200492, y encontraron que es una proteína NB-LRR con una nueva ubiquitina proteasa específica (ULP1 del inglés, ubiquitin-like-specific protease 1).

La pérdida de los intrones en el dominio de la ULP1 hace pensar que probablemente fue insertado en un gen de resistencia ancestral en el locus *Rpp1* por un evento de retrotransposición. A su vez el silenciamiento de *Rpp1* resultó en plantas con lesiones intermedias (RB) y limitada formación de uredinias. Sin embargo, la inoculación de PI 200492 resultó en plantas susceptibles (TAN) (Miles *et al.* 2011), que sugiere que el silenciamiento de *Rpp1* compromete la inmunidad pero no la resistencia (Pedley *et al.* 2019).

Una vez reconocido el patógeno se desencadenan otros mecanismos de defensa que incluyen la artillería de uso corriente en las plantas para detener una amplia variedad de patógenos. Para comprobar cuáles eran los genes involucrados en la cascada de defensa frente a la roya asiática de la soja se han hecho varios estudios. Por ejemplo, Pandey *et al.* (2011) mediante silenciamiento de 140 genes relacionados a la maquinaria de defensa, encontró que 11 de ellos estaban vinculados a la resistencia mediada por *Rpp2*.

Posteriormente en un estudio similar Cooper *et al.* (2013) identificaron 10 genes cuya expresión se incrementaba en plantas con *Rpp1*, pero no todos eran similares a los involucrados en la defensa mediada por *Rpp2* estudiada por Pandey *et al.* (2011). Según sus resultados, la biosíntesis de fenilpropanoides y la formación de lignina son necesarias para la inmunidad mediada por *Rpp1* así como para la resistencia mediada por *Rpp2*. *Rpp1*, *Rpp2* y *Rpp3* regulan la expresión de cientos de

genes dentro de las primeras 24 horas luego de la inoculación, muchos de los cuales intervienen en la defensa a través del ácido salicílico, liderando el incremento del metabolismo de fenilpropanoides y a través de enzimas como GmO-MT. Estos autores sugirieron la señalización hormonal a través del ácido salicílico y el etileno podrían estar probablemente reguladas por *Rpp1* (Pandey *et al.* 2011).

1.4. MEJORAMIENTO GENÉTICO DE AUTÓGAMAS

1.4.1. Características de órganos reproductivos en soja

La soja puede permanecer en estado vegetativo indefinidamente si se encuentra bajo condiciones de día largo o puede florecer en 3-4 semanas si los días son cortos (Poehlman y Sleper 2003).

La fertilización se produce un día antes de que la flor abra, el mismo día o al día siguiente. En el momento de la polinización los estambres se elevan para que las anteras formen un anillo entorno al stigma. Durante el crecimiento del tubo polínico la célula generativa se divide y forma dos gametos masculinos que serán las células espermáticas. Finalmente el tubo polínico crece a través de la micrópila del óvulo, una de las células espermáticas se une con la célula huevo y forma el cigoto diploide (la primera célula del embrión), la otra se une al núcleo secundario y forma el endosperma. Desde la polinización hasta la fertilización transcurren aproximadamente ocho horas (Boerma y Specht, 2004).

1.4.2. Métodos de mejoramiento y selección

1.4.2.1. Hibridación

La hibridación es un método de mejoramiento que utiliza la polinización cruzada entre progenitores genéticamente distintos con la finalidad de obtener recombinación genética. Como producto de la hibridación se obtiene la generación F1 100% heterocigoto para los alelos en los que ambos progenitores se diferencian. Luego se cultivan las generaciones segregantes y una vez alcanzada la homocigocidad se seleccionan las líneas puras que combinen los genes deseados. Esta técnica no sólo permite combinar genes que determinan caracteres visibles sino también obtener progenies que se diferencian de ambos progenitores. Estos genotipos

se denominan segregados transgresivos, y presentan una combinación de genes superior a la de sus progenitores para alguna característica cuantitativa (Poehlman y Sleper, 2003).

1.4.2.2. Selección por pedigrí

En este método la selección comienza en la generación F_2 y continúa en las generaciones sucesivas.

- Consiste en generar el cruzamiento A x B
- Generación F_1 , antes de la cosecha, se descartan las plantas que se hayan originado por autopolinización.
- Generación F_2 , se cultivan entre 2000 y 3000 plantas F_2 suficientemente espaciadas para analizar si poseen la combinación de características deseadas. Se cosecha la semilla de cada planta por separado.
- Generaciones de F_3 a F_5 , la semilla de cada una de las plantas superiores seleccionadas en la generación anterior se siembra en surcos. La identidad de plantas y surcos se mantiene y se registran las características de las plantas seleccionadas.
- Generación F_6 , se establecen familias de surcos. Las familias uniformes emparentadas se cosechan juntas y la semilla se mezcla. Los lotes individuales de semilla se denominan líneas experimentales.
- Generación F_7 , se cultivan las líneas experimentales y su rendimiento se compara con el de los cultivares adaptados.
- Generaciones F_8 a F_{10} , se continúa con las pruebas de rendimiento de las líneas superiores en diferentes localidades con condiciones ambientales diferentes, en comparación con cultivares adaptados. Sólo se retienen las líneas de mayor rendimiento.
- A partir de F_{11} , se multiplica y distribuye.

La desventaja de este método es que demanda mucha mano de obra y requiere un muy fino trabajo de registro de datos. Tiene la ventaja que sólo avanzan de generación las líneas en las que se han identificado plantas que tienen los genes para los caracteres deseados.

1.4.2.3. Método de población masal

En este método la semilla cosechada de un cruzamiento se mezcla hasta llegar a la generación F_5 o F_6 donde teóricamente ha finalizado la segregación.

- Generación de cruzamiento AXB
- Generación F_1 , cultivar de 50 a 100 plantas, antes de la cosecha eliminar las que pudieran haber surgido por autopolinización, cosechar todo y mezclar la semilla.
- Generación F_2 , cultivar de 2000 a 3000 plantas de la F_2 cosechar todo y mezclar.
- Generaciones F_3 y F_4 , establecer parcelas con la semilla mezclada.
- Generación F_5 , sembrar de manera espaciada entre 3000 y 5000 semillas, cosechar entre 300 y 500 plantas superiores manteniendo la semilla separada por planta.
- Generación F_6 , cultivar surcos de progenie de las plantas seleccionadas, cosechar 30 a 50 progenies en las que las plantas presenten las características deseadas.
- Generación F_7 , hacer prueba de rendimiento preliminar.
- Generación F_8 a F_{10} , se continúa con las pruebas de rendimiento y se siembra en localidades con ambientes diferentes.
- Generaciones F_{11} y F_{12} incremento y distribución.

La desventaja de este método es que se necesita sembrar grandes poblaciones de plantas en la generación de selección.

1.4.2.4. Método de descendencia de semilla única

Las generaciones avanzan cosechando una sola semilla por planta.

Generación de cruzamiento AxB

Generación F_1 , cultivar de 50 a 100 plantas

Generación F_2 , cultivar de 2000 a 3000 plantas F_2 , cosechar una sola semilla de cada planta.

Generaciones F₃ y F₄, cosechar una sola semilla de las plantas de la generación anterior.

Generación F₅, sembrar de manera espaciada las semillas que se cosecharon en la generación anterior, seleccionar plantas superiores y cosechar sus semillas.

Generación F₆, cultivar surcos de progenie de las plantas seleccionadas en la generación anterior, cosechar los surcos superiores.

Generación F₇, establecer prueba de rendimiento a los surcos cosechados en la generación anterior.

Generaciones F₈ a F₁₀, continuar con pruebas de rendimiento en localidades con diferente ambiente.

Generaciones F₁₁ y F₁₂, multiplicar y distribuir.

El objetivo de este método es poder mantener descendientes del número máximo de plantas F₂, para tener menor pérdida de genotipos durante las generaciones segregantes. Como sólo necesita una semilla de F₂ a F₄ permite cultivar en períodos no favorables para la soja, por ejemplo contra estación y utilizar técnicas que favorezcan la floración temprana.

1.4.2.5. Método de dobles haploides

Se generan plantas haploides a partir de anteras de plantas F₁, y los cromosomas se duplican con colchicina para obtener plantas diploides.

Generación de cruzamiento AxB

Generación F₁, las anteras se cultivan para producir 2000 a 3000 plantas haploides.

Generación F₂, los cromosomas de las plantas haploides se duplican y cosechan las semillas.

Generación F₃, la progenie de las plantas haploides duplicadas se cultiva en surcos y se cosecha la semilla de los surcos superiores.

Generación F₄, la progenie se cultiva en surcos y se seleccionan las líneas superiores.

Generación F₅, se realiza la prueba de rendimiento

Generación F₆ a F₈, continúan las pruebas de rendimiento

Generaciones F₉ y F₁₀, se multiplica y distribuye.

Es innecesario cultivar generaciones segregantes, las primeras generaciones no se exponen a campo donde pueden sufrir condiciones de estrés.

1.4.3. Mejoramiento genético por retrocruzamiento

El retrocruzamiento consiste en cruzar un cultivar adaptado y productivo con el objetivo de incorporar uno o más alelos deseables que controlan un carácter superior, con una línea reproductora o cultivar en la que los alelos deseables están presentes. Comenzando en la F₁, las plantas híbridas que poseen el alelo dominante se seleccionan y retrocruzan sucesivamente con el cultivar progenitor adaptado al que denomina progenitor recurrente, mientras que el no adaptado se denomina progenitor donante. El propósito del retrocruzamiento es recuperar el genotipo del progenitor recurrente con los alelos del progenitor donante incorporados. En cada generación de retrocruza sólo se selecciona en favor del carácter aportado por el progenitor donante. El número de retrocruzamientos puede variar de dos a cinco o más, dependiendo de qué tanto el mejorador quiera conservar el genotipo del progenitor recurrente. Teóricamente en la retrocruza 5 ya se habrían recuperado el 98,4% de los genes del progenitor recurrente. Las plantas del último retrocruzamiento que tienen los genes para la característica deseada serán heterocigotos para los alelos correspondientes, razón por la cual habrá que efectuar sucesivas autofecundaciones al tiempo que se realiza selección fenotípica para obtener la homocigosis y también buenas características agronómicas. Una de las desventajas de este método es que si los genes que determinan características indeseables estuviesen estrechamente ligados al gen que confiere la característica de interés podrían ser heredados junto con este. Una ventaja es que es repetible, el fitomejorador puede recuperar la misma línea si se utilizan los mismos parentales. Si se desea incorporar más de una

característica al cultivar recurrente, pueden llevarse a cabo retrocruzamientos separados y finalmente combinar las líneas derivadas de cada retro cruzamiento.

1.4.4. Mejoramiento genético multilínea

Las líneas que son genéticamente idénticas excepto por un gen se denominan isolíneas. El procedimiento para obtener un cultivar multilínea consiste en producir isolíneas de un cultivar adaptado y productivo, cada una con un gen distinto para resistencia a alguna plaga en particular. Cada gen debe brindar protección frente a todas las razas, o a una raza fisiológica distinta o grupos de razas de la plaga. Al combinar las isolíneas se obtiene el cultivar multilínea. A medida que cambia la proporción de razas del patógeno presentes pueden obtenerse isolíneas con nuevos genes de resistencia e introducirlas al cultivar multilínea, modificando la mezcla de las isolíneas.

En resumen, la idea es producir una población uniforme en cuanto a características agronómicas, pero heterogénea en cuanto a genes de resistencia efectivos a las razas de determinado patógeno. Este tipo de cultivar tiene ciertas desventajas, presenta utilidad sólo en los casos en que un patógeno especializado provoque daños cuantiosos. A menos que el progenitor recurrente sea mejorado, la multilínea puede volverse obsoleta rápidamente. Requiere tiempo para multiplicar todas las isolíneas por separado (Poehlman y Sleper, 2003).

1.4.5. Herramientas de biología molecular

1.4.5.1. Marcadores moleculares

Son cualquier característica, proceso bioquímico o fragmento de ADN que permite la distinción de individuos genéticamente diferentes. Pueden ser morfológicos, citológicos, bioquímicos y moleculares.

Botstein *et al.* (1980) propusieron la utilización de fragmentos de ADN como marcadores genéticos para monitorear la segregación cromosómica. Los primeros marcadores moleculares fueron fragmentos de ADN obtenidos de la digestión del ADN con enzimas de restricción. La variación del tamaño de los fragmentos

obtenidos de diferentes individuos dio origen a los marcadores RFLP (Borem, *et al.* 2008).

1.4.5.2. Selección asistida por marcadores moleculares

En los casos en que la expresión génica que permite la selección ocurra en la fase final del ciclo de la especie, la posibilidad de selección indirecta por medio de marcadores se torna más atractiva, más aún si se trata de especies perennes con largos períodos juveniles permitiendo economizar tiempo y recursos. Puede ser también de gran utilidad en la selección de individuos que presentan dos o más genes cuya expresión produce fenotipos semejantes, como en los casos de piramidación de genes que confieren resistencia a un patógeno. En la selección indirecta por marcadores, los individuos pueden ser analizados sin la necesidad de pruebas de progenie (Borem, *et al.* 2008).

1.4.5.3. Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP)

El RFLP es utilizado para diferenciar individuos con alguna variación genética mediante la digestión del genoma con una enzima de restricción. El ADN de los diferentes genotipos cortados con la misma enzima nos van a producir fragmentos de ADN de diferentes longitudes, que luego se diferenciarán en un gel de electroforesis. Este tipo de secuencias ocurren naturalmente, presentan herencia mendeliana, codominancia y ausencia de efectos epistáticos (Borem *et al.* 2008).

1.4.5.4. Marcadores de secuencia simple repetida (SSR)

Las secuencias SSR son abundantes en el genoma de eucariotas, están constituidas por 1 a 6 pares de bases que se repiten en tándem muchas veces. Cada secuencia se define por la cantidad de nucleótidos repetidos y por la longitud del locus dada por el número de tándems..

Estas secuencias son altamente variables, entre y dentro de individuos, esta variabilidad se debe a la longitud de los distintos alelos del mismo locus dada la existencia de un número diferente de repeticiones de la secuencia de nucleótidos. Los microsatélites tienen una tasa de mutación muy alta 10^{-2} y 10^{-5} por generación

(Ellegren 2004 citado por Picó y Esteras, 2012). En cambio las regiones flanqueantes están más conservadas y se emplean para la amplificación específica de cada locus.

Para su detección se realiza amplificación por PCR de la región que los contiene, empleando cebadores complementarios a las regiones flanqueantes, y luego se diferencian por la diferencia de tamaño de los fragmentos amplificados. Algunas características de los SSR como su naturaleza codominante que permite distinguir heterocigotos de homocigotos, su amplia distribución en el genoma, su reproducibilidad y su elevada variabilidad han hecho de los SSR una herramienta muy utilizada.

Una vez detectado el SSR en la secuencia, el siguiente paso es el diseño de cebadores para amplificar la región que lo contiene. Tras la amplificación del fragmento que contiene el SSR, hay que proceder a la separación y visualización de estos fragmentos. Ciertos alelos SSR con suficiente diferencia de tamaño pueden ser visualizados mediante un simple gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio. Cuando es necesario tener mayor resolución para distinguir el polimorfismo, se pueden utilizar geles de poliacrilamida, para los cuales también existen diferentes métodos de tinción: sales de plata, P32 o fluoróforos. También se pueden emplear analizadores de fragmentos más sofisticados como secuenciadores automáticos, basados en electroforesis capilar con fluorescencia para la identificación. Otro método es la detección por HRM (High Resolution Melting), que implica la desnaturalización gradual de los segmentos amplificados y la detección de pequeñas variaciones en la fluorescencia emitida gracias al uso de fluoróforos de unión al ADN de doble cadena (Picó y Esteras, 2012).

Existen diferentes tipos de microsatélites:

- Perfectos: repeticiones en un número mínimo de bases y sin unidades adyacentes (CACACACACACA)
- Compuestos: dos o más repeticiones con un número mínimo de unidades repetidas ininterrumpidas (CACACACACACAGAGAGAGAGA)

- Interrumpidos: repeticiones ininterrumpidas con un número mínimo de repeticiones y separadas con un máximo de cuatro pares de bases (CACACACACACACATTTTCACACACACACA)

1.5. MEJORAMIENTO GENÉTICO POR RESISTENCIA

"La resistencia genética es la alternativa más económica y práctica para disminuir las pérdidas de rendimiento ocasionadas por las enfermedades, tiene la ventaja de no requerir acciones específicas por parte del productor durante la estación de cultivo, no contamina el ambiente, es compatible con otras estrategias de manejo de la enfermedad y en algunos casos resulta suficiente para mantenerla por debajo del umbral de daño económico" (Vallone y Giorda 1997).

Dentro de los antecedentes de mejoramiento genético para resistencia a enfermedades de soja se destacan los siguientes ejemplos:

- Podredumbre de raíz y base del tallo (*Phytophthora sojae*) en EEUU (Schmitthenner *et al.* 1994)
- Cancro del tallo (*Diaporthe asphalati* sin. *D. meridionalis*) en Brasil y en Argentina no se permite la inscripción de cultivares susceptibles a este patógeno (Baigorri *et al.* 2011).
- Mancha ojo de rana (*Cercospora sojina*) en Brasil no se permite la inscripción de cultivares susceptibles (Baigorri *et al.* 2011).

Una de las limitantes del mejoramiento para enfermedades es el/los métodos de selección, pues no siempre se puede reproducir una severidad de la enfermedad que permita diferenciar al menos cuatro categorías de respuesta; I, inmune; R, resistente; MR, moderadamente resistente; MS, moderadamente susceptible; S, susceptible. Existen diferentes tipos de reacciones entre plantas y patógenos. Primero podemos diferenciar la resistencia genética de la tolerancia y dentro de las resistencias encontramos las específicas (vertical) e inespecíficas (horizontal) (Baigorri *et al.* 2011).

1.5.1. Resistencia vertical

Según Vanderplank (1968) citado por Baigorri *et al.* (2011), la resistencia vertical se caracteriza por presentar interacciones diferenciales y cuantitativas entre genotipos del hospedante y razas del patógeno. La resistencia vertical está controlada por uno o pocos genes mayores, por lo que existe alta probabilidad de que esta resistencia sea quebrada.

Cualquier gen de resistencia puede actuar solamente si el patógeno es portador del correspondiente gen de avirulencia. Se vuelve necesario entonces obtener genotipos portadores de diferentes genes de resistencia para el mismo carácter conformando un cluster con genes apilados. Cuando no existe resistencia en la especie, es necesario buscarla a través de ancestros salvajes o incorporarla a través de transgénesis (Baigorri *et al.* 2011).

1.5.2. Resistencia horizontal

Está controlada por varios genes de efecto menor, lo que le otorga un efecto parcial de características cuantitativas. Este tipo de resistencia provee protección amplia, no es raza específica y es más duradera. Para el caso de resistencia horizontal a roya de la soja, se menciona que está íntimamente ligada a la resistencia vertical, y es consecuencia de la acumulación de genes de efecto mayor que dejaron de ser efectivos frente al patógeno (Li *et al.* 2006 citados por Baigorri *et al.* 2011).

En ambos tipos de resistencia es necesario definir el tipo de herencia, que puede ser de efecto dominante, recesivo, epistático, pleiotrópico, epigenético. De esta forma sabremos en qué momento del avance generacional debemos seleccionar por dicha característica.

1.5.3. Resistencia general o adquirida

La resistencia general o adquirida es originada por el aumento de sustancias de defensa generadas por el cultivo ante la presencia de alguna enfermedad que permiten reaccionar frente a un nuevo patógeno. La roya de la soja, el cancro del tallo (*Diaporthe caulivora*) y la podredumbre marrón del tallo (*Phialophora gregata*), son tres enfermedades de la soja que son minimizadas cuando las plantas

están infectadas con el virus del mosaico de la soja. Se ha reportado que esto se debe a una interferencia en el metabolismo normal por el virus y/o al aumento en los niveles de prolina (Baigorri *et al.* 2011; Dunleavy, 1973)

También podemos encontrar efecto de tolerancia o resistencia aparente, son los mecanismos que permiten al patógeno convivir con el hospedante, limitando la infección y la acción del patógeno sobre la fisiología de la planta. Los genotipos tolerantes, a igual severidad de enfermedad, presentan menor reducción del rendimiento que genotipos susceptibles (Baigorri *et al.* 2011)

Dentro de las reacciones de resistencia encontramos dos tipos, no ocurrencia de enfermedad y la reacción de hipersensibilidad. La ausencia de enfermedad tiene su origen en una barrera física o química que no permite la infección del hongo. En cambio, las reacciones de hipersensibilidad como la que ocurre en los cultivares resistentes a roya de la soja, la germinación de las esporas del hongo desencadena en la planta un proceso de muerte celular controlada. Esta respuesta frena el crecimiento del hongo biótrofo (Agrios, 2005).

La resistencia no solo se expresa mediante la muerte celular programada, sino también con defensas estructurales, bioquímicas y defensas inducidas por el patógeno (fitoalexinas). Las hormonas también juegan un papel muy importante en la defensa de la planta, entre ellas podemos encontrar los jasmonatos, el ácido abscísico, ácido salicílico, y también otras sustancias como calosa, taninos, isoflavonas, charconas y lignina. También colaboran ciertos microorganismos que en interacciones simbióticas producen compuestos que mejoran la defensa de la planta (resistencia sistémica adquirida) (Baigorri *et al.* 2011).

El objetivo general de este trabajo fue obtener por primera vez en Uruguay, líneas de soja resistentes a roya asiática causada por *P. pachyrhizi*, a través de la introgresión de genes de resistencia provenientes de materiales aportados por Japan International Research Center for Agricultural Science (JIRCAS) en líneas elite del Programa de Mejoramiento de Soja de INIA. Paralelamente se caracterizaron por primera vez a nivel de raza, las poblaciones de roya presentes en Uruguay en las dos zafas de cultivo comprendidas en el tiempo de la tesis (2017-2018 y 2018-2019). Se

finalizó el trabajo con un estudio de respuesta a una mezcla de aislados por parte de las líneas obtenidas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. INTROGRESIÓN DE LA RESISTENCIA

El trabajo de introgresión de genes de resistencia en líneas elite del Programa de Mejoramiento de Soja de INIA se llevó a cabo mediante un esquema de tres retrocruzas, a partir de la generación F1 obtenida del cruzamiento entre el padre donador de la resistencia y la madre proveniente de una línea elite del programa de INIA. Finalmente se realizó la autofecundación de la retrocruza tres y se obtuvo una línea de progenie que comparte gran parte del genoma (promedialmente 93,75%) con la línea original de programa que es portadora de dos genes de resistencia a roya asiática.

Los genes a introgresar se seleccionaron a partir de la efectividad de diferentes genes de resistencia (*Rpp*) disponibles en un set diferencial frente a poblaciones locales de roya (Yamanaka *et al.* 2016; Stewart *et al.* 2019) (Cuadro 3). Se seleccionaron dos combinaciones de dos genes de buen comportamiento a las razas presentes en Uruguay, *Rpp1b+Rpp5* y *Rpp4+Rpp5*, cada combinación presente en las líneas donadoras del Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Py-1-47 y No6-12-B, respectivamente. Estas dos líneas donadoras fueron cruzadas cada una con tres líneas elite del programa de mejoramiento de INIA (Cuadro 4). Se descartaron algunas de las combinaciones debido a diferencias de ciclo entre ambos padres y a características de los órganos florales que entorpecían la tarea de introgresión.

Cuadro 3. Líneas diferenciales de soja utilizadas, genes, origen y referencias.

ID	PI	Nombre	Genes	Origen	Referencias
RDV1	PI-200492	Komata	<i>Rpp1</i>	Japan	Hartwig y Bromfield 1983
RDV2	PI-587886	Bai Dou	<i>Rpp1</i>	China	Ray <i>et al.</i> 2009
RDV3	PI-230970	No.3	<i>Rpp2</i>	Japan	Hartwig y Bromfield 1983
RDV4	PI-462312	Ankur	<i>Rpp3</i>	India	Hartwig y Bromfield 1983
RDV5	PI-416764	Akasaya	<i>Rpp3</i>	Japan	Hossain <i>et al.</i> 2015
RDV6	PI-459025	Bing Nan	<i>Rpp4</i>	China	Hartwig 1986
RDV7	PI-200526	Shiranui	<i>Rpp5</i>	Japan	Garcia <i>et al.</i> 2008
RDV8	PI-567102B	MARIF 2767	<i>Rpp6</i>	Indonesia	Li <i>et al.</i> 2012
RDV9	PI-587880 ^a	Huang Dou	<i>Rpp1-b</i>	China	Ray <i>et al.</i> 2009
RDV10	PI-594767 ^a	Zhao Ping Hei Dopu	<i>Rpp1-b</i>	China	Hossain <i>et al.</i> 2015
RDV11	PI-BRS154		(none)	Brazil	Akamatsu <i>et al.</i> 2013
RDV12	PI-No6-12-1		<i>Rpp2+Rpp4+Rpp5</i>	Japan	Yamanaka <i>et al.</i> (2013, 2015)

ID: identificación del genotipo; PI en inglés “plant introduction” o genotipo introducido

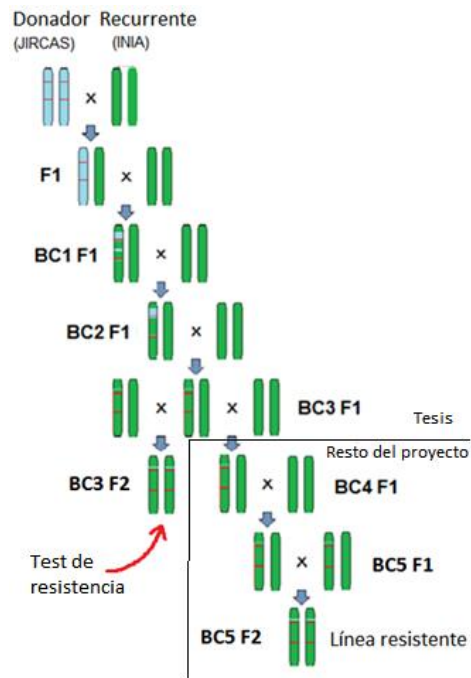
Cuadro 4. Ciclo, genes de resistencia y origen de los genotipos utilizados.

Líneas elite			
Materiales	Ciclo	Genes de resistencia	Origen
SJ10-173-072	6,2	N/C	INIA
SJ10-158-039	6,6	N/C	INIA
SJ10-122-040	5,3	N/C	INIA
Py7-1-47	N/D	Rpp1b y Rpp5	JIRCAS
No6-12-B	N/D	Rpp4 y Rpp5	JIRCAS

N/D no disponible, N/C no contiene

Para el cruzamiento, la flor femenina debe estar lo más desarrollada posible, pero sin que se observen los pétalos por encima de los sépalos. La flor masculina debe tener los pétalos próximos a su apertura o poco después de que ésta se produzca. Luego se siguen los siguientes pasos; la flor femenina se acondiciona utilizando una pinza fina de laboratorio y una lupa, se le quitan los sépalos para poder identificar el cruzamiento a la hora de la cosecha. Luego se quitan los pétalos y se procede a retirar las anteras, solamente si aún no alcanzaron al estigma y no hayan tocado el pistilo. Posteriormente se colectan las anteras de la flor masculina, cuidando para que el polen no se desprenda de las anteras. Para culminar colocamos las anteras en contacto con el pistilo de la flor madre asegurándonos de que el polen sea esparcido. Cada cruzamiento se identifica con una etiqueta que se colocan en el entrenudo previo al cruzamiento, registrando su número en la planilla de diseño de los cruzamientos.

Las tareas de cruzamiento comenzaron con la siembra de los progenitores en el campo en diciembre de 2017 para obtener las F₁ de cada combinación, luego se sembraron en invernáculo para la realización de las 3 retrocruzas durante invierno de 2018 y hasta el otoño 2019. El proceso finalizó con la obtención de una autofecundación de la retro cruza tres, filial uno (RC₃F₁) para obtener RC₃ F₂ que denominaremos línea de progenie (Figura 3).



*(BC) del inglés, back cross (retro cruza)

Figura 3. Esquema de cruzamientos.

El invernáculo donde se realizaron las retrocruzas (Imagen 1) tiene un sistema de calefacción/refrigeración, con un fotoperíodo ajustado de 12 a 14 hs con luz artificial utilizando lámparas de 150 W de tipo incandescente como suplemento. Las condiciones de temperatura se fueron ajustando sobre la marcha y se colocó un datalogger para monitorear la temperatura que osciló entre los 10 y los 35 °C según la época del año y la hora del día, con un promedio de 21 °C. La humedad relativa osciló entre 31 y 96% y en promedio fue de 71%.



Imagen 1. Invernáculo donde se realizó el trabajo de cruzamientos.

Los parentales recurrentes seleccionados se sembraron en macetas de 2 lt con tierra previamente solarizada y enriquecida con vermiculita y sustrato orgánico. Se dejaron tres plantas por maceta y luego se colocaron de a tres en bandejas de plástico para poder alargar el período de suministro de agua. Luego de la primera retrocruza se colocó un sistema de riego de goteo automático. Previo a la siembra se curó la semilla con fungicida comercial Fludiox Forte (fludioxinil 25 g/lt+ metalaxil 100 g/lt), se sembraron 6 semillas por maceta a una profundidad de aproximadamente 5 mm, luego se regaron suavemente con una solución de inoculante líquido. Una vez emergidas las plantas y raleadas, la nutrición se realizó mediante el agregado de micronutrientes y urea en el agua quincenalmente. De la misma forma se procedió con los materiales masculinos (donantes de la resistencia), salvo que estos se sembraron individualmente en macetas de 1,5 litros. Las líneas madres se sembraron 8 veces con 3 días de separación a partir de la siembra de la semilla proveniente de los cruzamientos. De esta forma se aseguró un período de cruzamientos suficientemente largo.

En cada generación, se chequearon individualmente las F₁, los padres y las madres correspondientes utilizando marcadores SSR ya disponibles para tal fin en el “Manual de laboratorio para estudios sobre la resistencia a roya de la soja” (Yamanaka *et al.* 2016). Las plantas que poseían dos genes de resistencia fueron seleccionadas con la ayuda de marcadores moleculares (Cuadro 5), estas aportaron el polen para producir la siguiente generación.

Cuadro 5. Marcadores moleculares utilizados y secuencia inicial y final.

Marcadores			
Gen	Marcador	Secuencia inicial	Secuencia final
Rpp1b	SSR 66	AGA TTG GGT GAG AAC ATA AG	GGA GAG CGT AAA AGA AAT TC
	SSR 18-1864	TGA ATG ATA TAT GTT TTG CGA AGA	CAA TAG AGC CGG ATG GAT GT
Rpp4	SATT 288	GCG GGG TGA TTT AGT GTT TGA CAC CT	GCG CTT ATA ATT AAG AGC AAA AGA AG
	SSR18-1576	TTT TGC ACT CCC TGA TGG AT	AAC AGG GAA TAC ATG CCA AA
Rpp5	SAT 275	GCG CGC TGG CAA TTA TTC AAA ACT TAA CGA T	GCG AAG GCT ACG GTG AAT AGA AAG GAC
	SAT 280	GGC GGT GGA TAT GAA ACT ATA ACT ACA A	GGC GGG CTT CAA ATA ATT ACT ATA AAA CTA CGG
Fuente: Yamanaka <i>et al.</i> 2016			

El trabajo de laboratorio comenzó con la extracción de una muestra de hoja de cada planta. A cada hoja se le extrajo el ADN utilizando método de CTAB modificado disponible en “Manual de laboratorio para estudios sobre la resistencia a roya de la soja” (Yamanaka *et al.* 2016). Para la PCR se utilizaron los marcadores correspondientes (Cuadro 5), el programa (Cuadro 6), y los reactivos (Cuadro 7) propuestos por Yamanaka *et al.* (2016).

Cuadro 6. Condiciones térmicas para PCR.

Pasos	Temperatura	Tiempo
Pre calentamiento, desnaturalización	96 °C	2 minutos
Desnaturalización	94 °C	1 minuto
Hibridación	48 °C	1 minuto
Extensión	68 °C	1 minuto
Repetición 32 veces los pasos 2 al 4		
Conservación	10 a 4 °C	Indefinido

Cuadro 7. Composición de los reactivos para PCR.

Reactivos de PCR	Volumen para una reacción
H2O destilada	3 µL
Quick Taq® HS DyeMix 2x	5 µL
Primers 5 µM (forward + reverse)	1 µL
ADN 50 ng/µL	1 µL
Total	10 µL

Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de acrilamida a 50 Volts durante 15 horas o a 300 volts durante 4 horas. Se seleccionaron las plantas que poseen el patrón de bandas correspondientes a híbridos (entre los dadores de la resistencia y las madres recurrentes) con los dos genes de resistencia incorporados. Las técnicas de laboratorio utilizadas para la selección asistida por marcadores moleculares fueron desarrolladas por JIRCAS en 2016 y compiladas en el "Manual de laboratorio para estudios sobre la resistencia a roya de la soja" (Yamanaka *et al.* 2016).

2.2. COMPORTAMIENTO DE LAS NUEVAS LÍNEAS

Como etapa final de este trabajo se realizó el fenotipado de las líneas portadoras de genes de resistencia a roya asiática obtenidas a partir del trabajo de introgresión.

2.2.1. Material vegetal

Una vez realizada la RC_3F_1 , se cosecharon las semillas (RC_3F_1 autofecundada = RC_3F_2) de las plantas que habían sido seleccionadas en el laboratorio mediante selección asistida por marcadores por poseer los dos genes de resistencia de cada una de las combinaciones. Se realizó el fenotipado a tres de las combinaciones de cruzamientos; Py x 039, Py x 040 y No x 072. Las semillas correspondientes a la RC_3F_2 , se sembraron en cajones plásticos de 80 x 45 x 15 cm conteniendo una mezcla de tierra, arena y sustrato orgánico. En cada cajón se sembró una familia (semillas hijas de cada planta BC_3F_1) compuesta por siete surcos de nueve semillas que provenían de una planta seleccionada en la RC_3F_1 . Además se sembró un surco con nueve semillas de la línea madre (INIA) como testigo susceptible, un surco con nueve semillas de la línea padre (JIRCAS) como testigo resistente y tres semillas del material Huang Dou (RDV 9) que posee el gen *Rpp1b* (inmune frente a las poblaciones de roya estudiadas).

En la generación RC_3F_1 se seleccionaron 11 plantas, siete contenían la combinación *Rpp1b* + *Rpp5* y cuatro contenían la combinación *Rpp4* + *Rpp5*. A su vez y con el objetivo de evaluar diferencias frente al comportamiento de genes apilados, se cosecharon algunas de las plantas que solo poseían uno de los genes de interés. Estas fueron; una planta con el gen *Rpp1b*, dos plantas con el gen *Rpp4* y dos plantas con el gen *Rpp5*.

En total se analizaron 16 familias, correspondientes a seis poblaciones (conjunto de familias de una misma retrocruza), tres con dos genes introgresados y tres con un solo gen (Cuadro 8). Una población comprende al conjunto de familias de una misma retrocruza.

Cuadro 8. Número de plantas RC₃F₂, parentales recurrentes y donadores, evaluadas en cada familia con sus genes de resistencia.

Familia	Genes Rpp	Cruzamiento	Totales			
			Plantas RC ₃ F ₂	Parentales recurrentes	Parentales donadores	RDV9
10	4	No x 072	30	5	3	2
16	4	No x 072	26	4	3	1
2	5	No x 072	43	6	4	1
7	5	No x 072	44	6	4	0
5	4+5	No x 072	44	4	3	2
8	4+5	No x 072	41	5	3	1
12	4+5	No x 072	40	8	1	2
14	4+5	No x 072	38	6	4	3
4	1b	Py x 039	31	3	3	2
3	1b+5	Py x 039	45	7	4	2
9	1b+5	Py x 039	41	5	4	1
11	1b+5	Py x 039	25	7	2	1
15	1b+5	Py x 039	23	5	3	2
1	1b+5	Py x 040	46	8	1	1
6	1b+5	Py x 040	32	5	2	1
13	1b+5	Py x 040	40	5	3	1

2.2.2. Inóculo del patógeno

El inóculo utilizado fue recolectado en un cultivo comercial en Young, Uruguay, en el año 2019. Se colectaron las urediniosporas de los diferenciales RDV 1 y RDV 2 con una microaspiradora y se inocularon sobre plantas BRS 154 (susceptibles). Las plantas BRS 154 fueron sembradas 20 días antes de la inoculación en macetas de 1000 cc conteniendo tierra enriquecida con vermiculita y sustrato orgánico. Una vez inoculadas con la suspensión de urediniosporas en Soltrol 170, mediante un atomizador con aire comprimido, fueron llevadas a cámara húmeda por 18 hs, en oscuridad, a una temperatura entre 20 y 30 °C. Luego fueron llevadas a fitotrón a una temperatura de 24°, fotoperíodo de 12 hs y humedad 50%. Transcurridos 15 días se colectaron las urediniosporas de las plantas BRS 154 y se almacenaron de 1 a 4 días en tubos de vidrio al vacío a 4 °C.

Cuadro 9. Aislados monolesión que conformaron la mezcla de inóculo utilizada para la evaluación de la resistencia de las nuevas líneas.

Aislamiento o Mono-lesión N°	Bing Nan (Rpp4)	Shiranui (Rpp5)	Huang Dou (Rpp1-b)	Zhao Ping Hei Dou (Rpp1-b)	BRS 154 (Susceptible)
2	S	R	R	R	S
4	S	R	R	R	S
5	S	R	R	R	S
8	R	R	R	R	S
10	S	R	R	R	S
11	S	R	R	R	S
13	S	R	R	R	S
15	S	R	R	R	S
16	S	R	R	R	S
22	R	N/A	R	R	S
16B	S	R	R	R	S

La inoculación se realizó a razón de cuatro familias por día. Se utilizó 1 mL de una solución a base de Soltrol 170 con una concentración de $2,5 \times 10^7$ urediniosporas, con germinación de 10%. Al segundo día se inocularon las familias 5 a la 8, al tercer día se inocularon las familias 9 a la 12 y al cuarto día se inocularon las familias 13 a la 16, todas con 1 ml a la misma concentración. A medida que se inocularon, las familias se llevaron a cámara húmeda oscura, por 18 hs a una temperatura entre 20 y 25 °C. Luego fueron trasladados a fitotrón donde se colocaron a temperatura de 24 °C, con un fotoperíodo de 12 hs y humedad relativa de 50%. El fenotipo de infección se evaluó 14 días post-inoculación. La interacción con los genes de interés fue analizada mediante inoculación sobre un set de líneas diferenciales de soja desarrolladas por Yamanaka *et al.* (2016) (Cuadro 3).

2.2.3. Evaluación de las líneas obtenidas

Cada familia fue evaluada según la metodología descrita en el “Manual de laboratorio para estudios sobre la resistencia a roya de la soja” versión 22 publicado por Yamanaka *et al.* (2016).

Los criterios de clasificación para evaluar fenotipos resistentes o susceptibles para los siguientes tres caracteres de resistencia fueron: % de lesiones con uredinias

(LU), nivel de esporulación (SL) en categorías del 1 al 3 (Fig. 4) y número de uredinias por lesión (NoU) (Fig. 5). Se determinaron los fenotipos resistentes y susceptibles en base criterios definidos en los Cuadros 10 y 11, para un promedio de 10 lesiones.

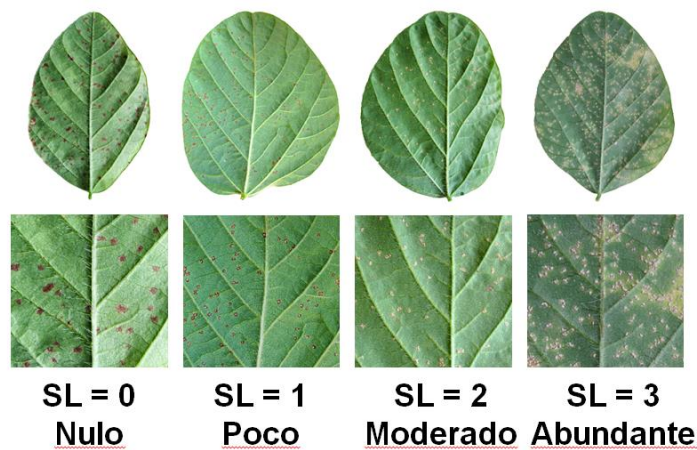


Figura 4. Nivel de esporulación (SL).

Imagen extraída de “Manual de laboratorio para estudios sobre la resistencia a roya de la soja” (Yamanaka 2016)

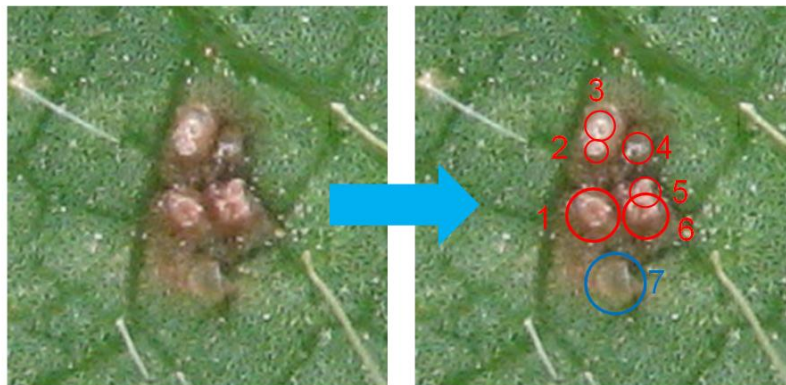


Figura 5. Número de uredinias por lesión (NoU).

Imagen extraída de “Manual de laboratorio para estudios sobre la resistencia a roya de la soja” (Yamanaka *et al.* 2016)

Cuadro 10. Criterios de clasificación resistente/susceptible.

Carácter de resistencia	Fenotipo resistente	Fenotipo susceptible
% LU	<70,0	≤ 70,0
NoU	<2,0	≥ 2
SL	<2,0	≥2,0

Cuadro 11. Criterio de clasificación de genotipos de soja resistente/susceptible a RAS.

Categoría de resistencia	Criterio
Resistente	lesiones con o sin uredinias, fenotipo resistente para más de un carácter
Susceptible	fenotipo susceptible para los tres caracteres

2.3. ANÁLISIS DE DATOS

La bondad de ajuste fue realizada mediante una prueba de χ^2 para contrastar las frecuencias génicas, para uno y dos genes, tomando en cuenta la relación de plantas resistentes y susceptibles dentro de cada familia y para el conjunto de familias de una misma retrocruza o población. Los χ^2 se calcularon para las frecuencias 15:1, 13:3, 9:7, 3:1, donde el primer número es la proporción de resistentes y el segundo la proporción de susceptibles, esperadas para la segregación de dos genes dominantes. Como quizá la variabilidad entre plantas no reflejaba condiciones experimentales normales, se decidió incluir el test de homogeneidad propuesto por Strickberger (1985) de forma de respaldar la agrupación de los datos.

3. RESULTADOS

Los porcentajes de recuperación de plantas con los dos genes apilados en cada generación estuvieron entre 0 y 12 %, y el número de plantas obtenidas en cada generación fue entre 0 y 9 (Cuadro 12). Finalmente se obtuvieron plantas de la retrocruza RC₃F₁ con los respectivos genes introgresados de tres combinaciones de cruza; Py7-1-47 (Py) x SJ10-158-039 (039) que posee los genes *Rpp1b* + *Rpp5*, Py7-1-47 x SJ10-122-040 (040) que posee los genes *Rpp1b* + *Rpp5* y No6-12-B (No) x SJ10-173-072 (072) que posee los genes *Rpp4* + *Rpp5*. La presencia de los genes fue confirmada con los marcadores moleculares SSR que flanquean los genes y están representadas las tres líneas avanzadas de INIA. Sin embargo, se perdieron tres de las combinaciones de cruza posibles (Cuadro 12).

Cuadro 12. Número de plantas con dos genes de resistencia logradas en cada generación.

Número de plantas con dos genes						
Cruza			F1	RC1F1	RC2F1	RC3 F1
SJ10-158-039	x	Py7-1-47	2	1	3	5
SJ10-158-039	x	NO6-12-B	2	0	0	0
SJ10-122-040	x	Py7-1-47	3	6	8	4
SJ10-122-040	x	NO6-12-B	1	0	0	0
SJ10-173-072	x	Py7-1-47	9	2	4	0
SJ10-173-072	x	NO6-12-B	7	7	4	4
Total			24	16	19	13

Las plantas segregantes RC₃F₂ de las 16 familias evaluadas presentaron reacciones de susceptibilidad y resistencia frente a la roya utilizada, incluso se pudieron identificar plantas inmunes (sin signo ni síntoma de la enfermedad). Los progenitores INIA (039, 040 y 072) fueron caracterizados como susceptibles en la totalidad de las plantas evaluadas (Fig. 6), mientras que los materiales de JIRCAS, Py7-1-47 siempre se comportaron como resistentes, presentando la mayoría de las

plantas con reacciones inmunes y solo un 4,5 % de las plantas lesiones resistentes pero con esporulación (Fig. 6). Por el contrario, el material No6-12-B no presentó ninguna reacción inmune y la mayoría de las plantas fueron caracterizadas como resistentes con variabilidad en nivel de esporulación (SL) y uredinias por lesión (NoU), excepto por un 7,7 % de las plantas que presentaron reacciones de susceptibilidad (Fig. 6). El testigo PI 587880A (RDV 9), poseedor de un único gen de resistencia (*Rpp1b*) siempre presentó reacciones de inmunidad.

En todos los casos los niveles de resistencia observados fueron mayores al 40% en las plantas segregantes, contrariamente a las líneas avanzadas de INIA donde se observó un 100% de reacciones de susceptibilidad (Fig. 6).

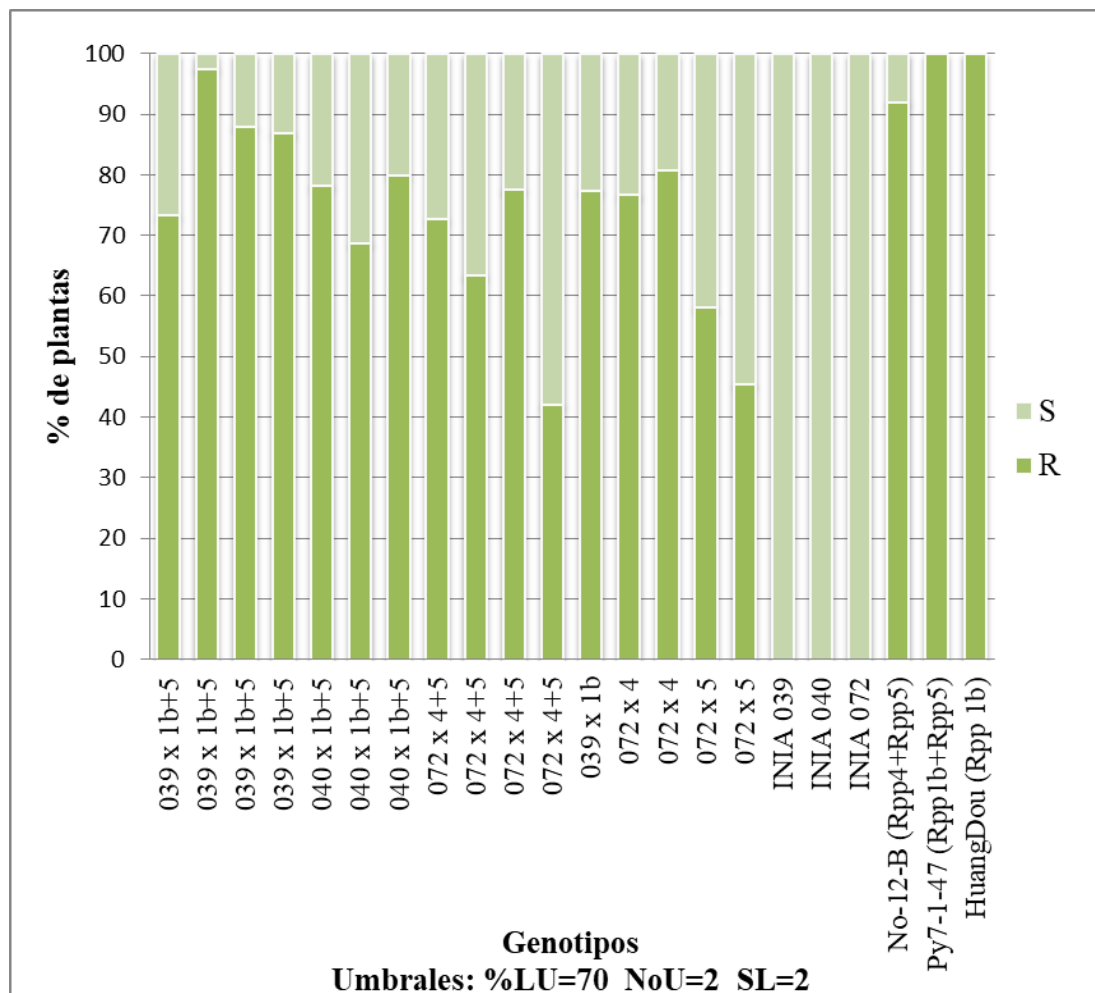


Figura 6. Porcentaje de plantas RC_3F_2 resistentes y susceptibles por familia, progenitores y control inmune.

El porcentaje de plantas para cada uno de los niveles de SL y NoU permitió determinar que existió diferencia en la resistencia de la generación RC_3F_2 respecto a los padres recurrentes de origen INIA, evidenciando el efecto de los genes de resistencia. Para la población Py x 039, si bien hubo un amplio rango de variación, el 85% de las plantas segregantes calificaron como resistentes para NoU (Fig. 7-a) y un 83% como resistente para SL (Fig. 7-b). Por el contrario, el 93% de las plantas del genotipo INIA 039 fueron susceptibles según NoU y el 100% fue susceptible para SL. Una distribución muy similar, con el mismo patrón se observó para el caso de la población Py x 040, con un 76 y 75% de plantas resistentes para NoU y SL respectivamente, mientras que el 100% de las plantas del genotipo INIA 040 fueron susceptibles para NoU como SL (Fig. 7-c y d). En la población No x 072, un 64% de las plantas fueron resistentes para NoU y un 53% resistentes para SL, mientras que el genotipo INIA 072 mostró reacciones de susceptibilidad en el 98 y 95% de las plantas para NoU y SL respectivamente (Fig. 7-e y f).

La distribución de plantas en las distintas categorías, ya sea para la variable NoU o SL, fueron muy similares cuando se utilizó el portador de resistencia Py (Fig. 7a-c). El mayor porcentaje de plantas se concentró en la primera categoría de 0,0-0,5, con porcentajes de NoU y SL por encima de 55%, y mostraron una tendencia a bajar abruptamente en las siguientes categorías. Por el contrario, la distribución de plantas segregantes en las diferentes categorías fue más homogénea cuando se utilizó el portador de resistencia NoU. No se encontró una categoría predominante siendo la distribución más homogénea en todas las categorías.

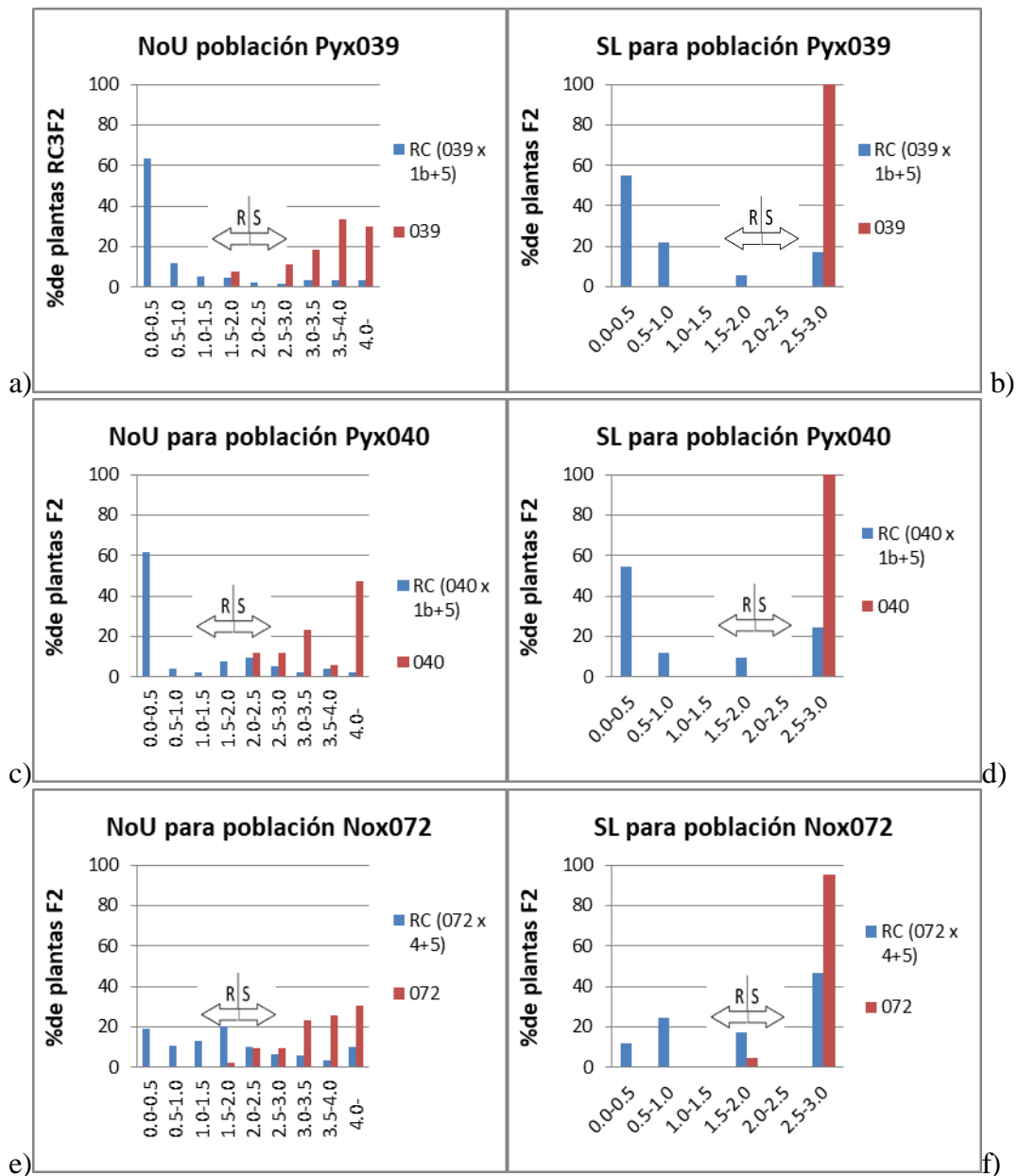


Figura 7. Porcentaje de plantas RC_3F_2 de cada población (grupo de familias de la misma retrocruza) y padre recurrente con distinto nivel de esporulación (SL) y número de uredinias (NoU), Ry S marcan el punto de división entre resistente y susceptible y permiten observar el % de plantas en cada categoría, tanto para las plantas de la familia como para los padres recurrentes.

De los test χ^2 realizados, la segregación observada que mejor ajustó fue de 13:3 (resistente: susceptible) para las familias RC_3F_2 de las retrocruzas 039x1b+5 y

040x1b+5. Esta proporción fenotípica concuerda con dos hipótesis probables. Una epístasis doble dominante recesiva, en la cual la proporción fenotípica 13:3 correspondería con los genotipos A_B_ + aaB_ : A_bb. Y la segunda hipótesis de un gen dominante y otro recesivo, en la cual la proporción genotípica correspondería a A_B_ + A_bb + aabb: aaB_. Por el contrario, para las familias 072x4+5 la proporción 3:1 (resistente: susceptible) fue la que mejor ajustó y concuerda con la hipótesis de que el segundo gen no aporta a la resistencia y por lo tanto la proporción fenotipo 3R:1S estaría dada por los genotipo A_ : aa). Todas las combinaciones con un solo gen dieron una proporción 3:1, concordantes con un gen único dominante.

Cuadro 13. Valor del test de Chi² para los patrones de segregación de las RC₃F₂ obtenidas en la población 039x1b+5.

Familia	Genes <i>Rpp</i>	N	Reacción	X ²	GL	P tabla (0.05)	Proporción
3	039 x 1b+5	45	R	1,85	1	3,8415	13:3
			S				
9	039 x 1b+5	41	R	7,16	1	3,8415	13:3
			S				
11	039 x 1b+5	25	R	0,75	1	3,8415	13:3
			S				
15	039 x 1b+5	23	R	0,49	1	3,8415	13:3
			S				
Datos sumados		134	R	1,84	1	3,8415	
			S				
Test de homogeneidad		Total		10,25	4		
		Datos sumados		1,84	1		
		Homogeneidad		8,41	3		

En el análisis estadístico de los resultados nos planteamos como hipótesis nula que la diferencia entre los valores observados y esperados era producto del azar para un valor de significancia de 5%. La comparación mediante Chi² nos permite no rechazar la hipótesis nula para la proporción 13:3 en tres de las cuatro familias que conforman la población (Cuadro 13). De la misma forma cuando se hace la prueba para el conjunto de la población, la diferencia entre los valores observados y esperados no es significativa.

Cuadro 14. Valor del test de Chi² para los patrones de segregación de las RC₃F₂ obtenidas para la población 040x1b+5.

Familia	Genes <i>Rpp</i>	N	Reacción	X²	GL	P tabla (0.05)	Proporción
1	040 x 1b+5	46	R	0,27	1	3,8415	13:3
			S				
6	040 x 1b+5	32	R	3,28	1	3,8415	13:3
			S				
13	040 x 1b+5	40	R	0,04	1	3,8415	13:3
			S				
Datos sumados		118	R	1,92	1	3,8415	
			S				
Test de homogeneidad		Total		3,59	3		
		Datos sumados		1,92	1		
		Homogeneidad		1,67	2		

La prueba Chi² en la población 040x1b+5 no mostró diferencias significativas para una significancia de 5%, razón por la cual la proporción 13:3 puede representar lo que sucede durante la segregación y expresión fenotípica de los genes involucrados.

Cuadro 15. Valor del test de χ^2 para los patrones de segregación de las RC_3F_2 obtenidas para la población 072 x 4+5.

Familia	Genes <i>Rpp</i>	N	Reacción	χ^2	GL	P tabla (0.05)	Proporción
5	072 x 4+5	44	R	0,12	1	3,8415	3:1
			S				
8	072 x 4+5	41	R	2,93	1	3,8415	3:1
			S				
12	072 x 4+5	40	R	0,13	1	3,8415	3:1
			S				
14	072 x 4+5	38	R	21,93	1	3,8415	3:1
			S				
Datos sumados		163	R	9,74	1	3,8415	
			S				
Test de homogeneidad		Total		25,12	4		
		Datos sumados		9,74	1		
		Homogeneidad		15,38	3		

La población 072x4+5 mostró un comportamiento diferente a las anteriores. La proporción fenotípica que mejor ajustó fue 3:1. Una de las familias resultó con una diferencia significativa en el χ^2 entre los valores observados y esperados (familia 14), esta diferencia fue de una magnitud tal, que significó el rechazo de la hipótesis nula al realizar el estudio de datos sumados (Cuadro 15). Razón por la cual esta familia finalmente se sacó del análisis y los nuevos resultados se expresan en el Cuadro 16.

Para la familia 039x1b, que posee un solo gen, la proporción 3:1 permitió no rechazar la hipótesis nula, confirmando la segregación de un gen.

Para la población 072x4, que sólo tiene un gen de resistencia, el análisis de χ^2 permitió no rechazar la hipótesis nula, confirmando que la proporción fenotípica 3:1 acompaña el patrón de segregación esperado para un gen.

En cambio, para la población 072x5 que sólo tiene uno de los genes en cuestión, la proporción fenotípica no ajusta a los parámetros esperados 3:1. Aunque según el test de homogeneidad el análisis χ^2 es válido.

Como no todas las poblaciones segregaban en las proporciones esperadas, se realizó el análisis χ^2 para cada una, comparando las diferentes proporciones de segregación que se encuentran en la bibliografía para dos clases (R y S) (Cuadro 16). De esta manera se verificó cual fue el mejor ajuste en cada una de las poblaciones. En particular para la que tiene los genes *Rpp4+* *Rpp5*, no se encontró ninguna proporción de ajuste a proporciones mendelianas. Pero cuando se sacó del análisis la familia 14 que presentaba un patrón claramente diferente del resto la población ajustó a un patrón de segregación 3:1. Por otro lado, si bien la población 040x1b+5 ajustó a un patrón de segregación 13:3, al hacer esta nueva comparación se constató que la proporción 3:1 se ajusta mejor.

Cuadro 16. Valores de χ^2 para las proporciones de segregación observadas en las distintas poblaciones

Genes	GL	13:3	X ² de Homogeneidad d < 5,99 p/2GL	3:1	X ² de Homogeneidad d < 5,99 p/2GL	9:7	X ² de Homogeneidad < 5,99 p/2GL
039 x 1b+5	3	0,0	3,1	1,6	2,5	22,5	1,9
040 x 1b+5	3	1,9	1,7	0,1	1,4	19,2	1,0
072 x 4+5	3	8,3	2,7	1,0	2,2	11,4	1,7

4. DISCUSIÓN

Ha sido muy claro el efecto de los genes introgresados sobre la resistencia a roya asiática en las líneas obtenidas. Aún en el estudio que incluye las plantas segregantes, la familia más afectada tiene más de 40% de plantas resistentes. Por otro lado, el aspecto más discutible de este trabajo ha sido el tipo de herencia y segregación de los genes de resistencia en cuestión. Era al menos esperable encontrar una segregación típica para un cruzamiento dihíbrido, que por tener sólo dos clases (resistente o susceptible) derivaría de la proporción mendeliana 9:3:3:1. Por ejemplo podría ser 15:1, proporción que se asemeja a lo que ocurre en el cruzamiento Py x 039 pero que no alcanza un ajuste significativo mediante χ^2 . El paso siguiente es plantear una hipótesis de segregación 3:1, si bien esta proporción tiene un mejor ajuste en el análisis de χ^2 aún no es significativo. En cambio, sí se obtiene un excelente ajuste para 3:1 en el cruzamiento Py x 040. Seguramente el background genético de las líneas de INIA influye en las proporciones obtenidas (Cuadro 14). Pero tener esta proporción en un cruzamiento dihíbrido demuestra que existen otro tipo de interacciones de estos genes y el background genético en el cual se introgresaron.

La proporción 13:3 ya ha aparecido en estudios sobre herencia de genes de resistencia a roya asiática y podría indicar que se trata de la relación entre un gen dominante y otro recesivo o una epístasis doble dominante recesiva. Pierozzi *et al.* (2008), sugiere la presencia de epístasis digénica, quiere decir que en ausencia de un alelo dominante de uno de los genes de resistencia son necesarios dos alelos dominantes del otro gen para que se exprese la resistencia. En cambio Griffiths *et al.* (2002) plantea que el patrón de segregación 13:3 puede indicar la presencia de genes supresores, es decir un alelo que elimina el efecto de una mutación ocurrida en otro gen con el objetivo de mantener el fenotipo normal. Sin embargo, Ray *et al.* (2009), reportaron dominancia incompleta en el gen *Rpp1b* en el material PI 587880A (el mismo alelo introgresado). A su vez, Rocha *et al.* (2016), reportaron para el mismo gen, pero en PI 594767A (*Rpp1b*), resistencia asociada a un gen recesivo.

El gen *Rpp5* puede presentarse como dominante o recesivo, según el background genético en el que se encuentre. Por ejemplo, Childs *et al.* (2018b) reportaron que el alelo del gen *Rpp5* presente en PI 200526 (RDV7) difiere del presente en PI 471904 y PI 200487 (progenitor de No6-12-B). Con respecto a la herencia, sólo comenta que PI 200456 ha exhibido acción génica recesiva. A la vez que García *et al.* (2008) reportaron que el gen *Rpp5* presente en PI 471904 presenta un patrón de segregación característico de un gen con dominancia incompleta. En el mismo trabajo, analizando la herencia de *Rpp2* en PI 230970, que había sido previamente reportado como un gen dominante por Bromfield y Hartwig (1980), encontraron un patrón de segregación distorsionado 9:7 en lugar de 3:1 como era esperado, y concluyeron que no podían determinar las bases genéticas de la herencia de la resistencia a roya asiática.

Para las familias, Py x040 y No x 072 ya sea en los casos de dos genes o de un gen, la proporción que mejor ajustó fue 3:1. Esto era esperable en las familias que tienen un solo gen y no así para las familias con dos genes. Por otra parte, hay que tener en cuenta que el alelo *Rpp5* presente en RDV7, proviene de PI 200526 mientras que el alelo *Rpp5* introgresado proviene de PI 200487. Aunque según García *et al.* (2008) ambos alelos son dominantes. Este mismo autor estudió la segregación fenotípica de *Rpp5* en PI 471904 y encontró una segregación 1:1, lo que puede ser explicado por la presencia de un locus con dominancia incompleta. Otros autores han señalado alelos del *Rpp5* con dominancia completa, dominancia incompleta (PI 471904) y hasta alelos de acción recesiva (PI 200456) (García *et al.* 2008; Childs *et al.* 2018a).

En la misma investigación García *et al.* (2008), plantean que la segregación de *Rpp4* en PI 459025 (RDV6) fue 13:3 con $X^2 = 0.22$ y la segregación de *Rpp5* en PI 200526 (RDV7) fue 13:3 con $X^2 = 2.58$. Según estos autores el resultado sustenta una hipótesis de acción epistática de dos genes de resistencia independientes. La complementariedad de la acción génica a través de la acción epistática de genes de resistencia dominantes e independientes piramidados ya ha sido reportada para los genes *Rpp2*, *Rpp3* y *Rpp4* (Maphosa *et al.* 2012), así como también para roya de la

hoja de trigo con los genes Lr9 y Lr24 (Moulet *et al.* 2008). La efectividad de estos genes de resistencia depende del background genético en el cual son introgresados (Yamanaka *et al.* 2010).

La resistencia resulta de la interacción del patógeno con su huésped, por tanto es posible que una cepa de *P. pachyrhizi* resulte excepcionalmente virulenta y reduzca la dominancia de la acción del gen creando un efecto de dosificación en la acción del gen de resistencia. Esta diferencia podría estar dada por la homocigosis o heterocigosis del gen de avirulencia del patógeno (Calvo *et al.* 2008).

Los aislamientos de roya utilizados fueron avirulentos frente al gen *Rpp5*, por el contrario 9 de los 11 aislados utilizados fueron virulentos para el *Rpp4* (Cuadro 9). Teniendo en cuenta esto es que podríamos pensar que el cruzamiento No x 072 poseedor de los genes *Rpp4* y *Rpp5* presenta una proporción 3:1 debido a que el único gen que se expresa es *Rpp5*. Esto se opone a los resultados expresados en el comportamiento individual de los genes donde se observa que las familias que solo tienen el *Rpp4* presentan mayor porcentaje de plantas resistentes que las familias que solo tienen *Rpp5*, incluso mayor a algunas de las familias que tienen *Rpp4* más *Rpp5*. Este resultado podría explicarse porque cuando se realizó la selección asistida por marcadores moleculares de la RC₃F₁, las plantas que dieron origen a las familias evaluadas que sólo poseen el *Rpp4*, podrían eventualmente tener también el *Rpp5* porque tenían sólo uno de los marcadores flanqueantes de este gen, lo que permite inferir que el gen no está presente pero no asegurarlo. Aún si esta hipótesis fuera correcta, hay que considerar que el patrón de segregación de las familias que tienen el *Rpp4* es 3:1, propio de un solo gen. Entonces según esto el alto nivel de resistencia expresada por las familias que al parecer sólo tienen el *Rpp4* podría estaría dada también por la presencia del gen *Rpp5* que quedó oculto en su análisis. La hipótesis para esto, consiste en que este mayor nivel de resistencia podría provenir de un efecto epistático aditivo del *Rpp4* sobre el *Rpp5*, aunque *Rpp4* no se exprese.

Al respecto, este trabajo carece del diseño adecuado para adentrarse en la explicación de los factores que realmente llevaron a la aparición de patrones de segregación distorsionados y se limita a aportar la información sobre los efectos

posibles distorsivos de las segregaciones esperadas. Adicionalmente, se debe de tener en cuenta que el número de plantas evaluadas fue bajo (entre 23 y 45) para llegar a conclusiones sobre la segregación, por lo que deben ser considerados como un primer acercamiento al conocimiento de la herencia de estos genes de resistencia a RAS introducidos en el programa de mejoramiento genético de Uruguay..

5. CONCLUSIONES

Las líneas de progenie desarrolladas y testeadas en su fase de RC_3F_2 presentaron muy buenos niveles de resistencia, incluso teniendo en cuenta que dentro de las plantas evaluadas existe un porcentaje de homocigotas recesivas.

Las dos combinaciones de genes aportan de manera significativa a la resistencia y el gen *Rpp1b* sigue confiriendo una respuesta inmune, aún en interacción con el background genético de los genotipos INIA. Esto que es muy importante para Uruguay porque es el único país en la región que lo está incorporando en su programa de mejoramiento. Como en Uruguay la roya no sobrevive entre zafras, sino que entra cada zafra desde Brasil, la probabilidad de que una nueva raza resistente al *Rpp1b* surgida a partir de la presión de selección en Uruguay pueda incrementar su población y afectar la siguiente zafra es menor que si este gen fuera introducido en materiales comerciales en Brasil u otro país de la región.

Los patrones de segregación resultaron diferentes a los esperados. En tal sentido, recurriendo a otros autores que han descrito la herencia para algunos de los genes *Rpp*, se puede observar que en general el comportamiento de estos genes depende de muchas interacciones génicas que aún no han podido ser totalmente esclarecidas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios GN. 2005. Introducción a la fitopatología. En: Agrios, G.N. Plant pathology. 5. ed San Diego, California (USA). Elsevier Academic Press. 922 p.
- Akamatsu H, Yamanaka N, Yamaoka Y. 2013. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. *Journal of General Plant Pathology* 79(1):28–40. DOI: 10.1007/s10327-012-0421-7
- Andrade P, Andrade D. 2002. Ferrugem asiática: uma ameaça a sojicultura brasileira. Circular Técnica No. 11. Dourados. Editorial Embrapa. 11pp.
- Baigorri H. 2004. Criterios para la elección y manejo de cultivares de soja. En: Baigorri H, del Pino A, Segura L. eds. Soja actualización 2004 [En línea]. Marcos Juárez, AR, INTA. pp. 1-21 Consultado 12 may. 2014. Disponible en: http://agro.unc.edu.ar/~ceryol/documentos/soja/Eleccion_cultivares.pdf
- Baigorri H, Croatto D. 2000. Manejo del cultivo de la soja en Argentina. Córdoba, INTA. p.6.
- Baigorri H, Ferrari B, Quiroga M. 2011. Mejoramiento genético y resistencia a enfermedades. En: Sillon MR, Muñoz R. eds. Las enfermedades de la soja y su importancia en los países del Mercosur. Buenos Aires, Hemisferio Sur. pp. 214-233.
- Balardin R, Lenz G, Gripa M, Zobot L. 2011. El costo de las enfermedades y el beneficio de su control. Valoración económica del impacto de las enfermedades. En: Sillon MR, Muñoz R. eds. Las enfermedades de la soja y su importancia en los países del Mercosur. Buenos Aires, Hemisferio Sur. pp. 27-33.
- Baohui S. 2006. Market power and competitive analysis of china's soybean import market. Doctoral Dissertations. Lexington, Kentucky, USA. University of Kentucky. 136 p.

- Barrios A, Larzábal J, Schaffner S. 2014. Relavamiento de las principales enfermedades de hoja, tallo y raíz en el cultivo de soja. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 78 p.
- Boerma HR, Specht JE. 2004. Soybeans: Improvement, Production, and Uses. Madison, Wisconsin, USA. Third Edition: (Eds), American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America. 1144 pp.
- Bonde MR, Nester SE, Austin CN, Stone CL, Frederick RD, Hartman GL, Miles M R. 2006. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia* isolates. *Plant Disease*. 90 (6):708-716. doi: 10.1094/PD-90-0708.
- Borem A, Condori M, Miranda G. 2008. Mejoramiento de plantas. Vicoza, Brasil. Universidad Federal de Vicoza. 438 p.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32(3):314–331.
- Bromfield KR. 1984. Soybean rust, monograph No. 11. St. Paul, MN. American Phytopathological Society. 65 p.
- Bromfield KR, Hartwig EE. 1980. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop Science*. 20 (2): 254-255.
- Bromfield KR, Melching JS. 1982. Sources of specific resistance to soybean rust (Abstract). *Phytopathology*. 72 (6):706.
- Calvo S, Kiihl R, Garcia A, Harada A, Hiromoto D. 2008. Two Major Recessive Soybean Genes Conferring Soybean Rust Resistance. *Crop Science*. 48 (4):1350-1354.
- Chakraborty N, Curley J, Frederick RD, Hyten DL, Nelson RL, Hartman GL, Diers BW. 2009. Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion type resistance to soybean rust. *Crop Science*. 49(3):783–790.

- Chen H, Zhao S, Yang Z, Sha A, Wan Q. 2015. Genetic analysis and molecular mapping of resistance gene to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean germplasm SX6907. *Theoretical Applied Genetic* 128 (4): 733-743.
- Childs SP, James W, Buck JW, Zenglu L. 2018a. Breeding soybeans with resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). *Plant Breeding*. 137 (3):250-261.
- Childs SP, King ZR, Walker DR. 2018b. Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. *Theoretical Applied Genetic* 131(1):27–41. doi: 10.1007/s00122-017-2983-4.
- Chisholm S, Coaker G, Day B, Staskawicz B. 2006. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell Press* 124 (4):803-814.
- Cooper B, Campbell K, McMahon M, Luster D. 2013. Disruption of Rpp1-mediated soybean rust immunity by virus-induced gene silencing, *Plant Signaling Behavior*, 8(12):e27543. doi: 10.4161/psb.27543.
- Del Ponte E, Godoy C, Canteri M, Reis E, Yang X. 2006b. Models and applications for risk assessment and prediction of Asian soybean rust epidemics. *Fitopatologia Brasileira*, 31(6):533-544.
- Del Ponte E, Godoy C, Li X, Yang X. 2006a. Predicting Severity of Asian Soybean Rust Epidemics with Empirical Rainfall Models. *Phytopathology*. 96(7):797-803.
- Dunleavy J. 1973. Soybean. En Nelson R. (Eds.). *Breeding plants for disease resistance*. Pennsylvania. Second printing 1977. 270-284.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2020. [En línea]. Online statistics databases (FAOSTAT). Consultado: oct-2020. Disponible en: <https://app.amis-outlook.org/#/market-database/custom-query>.
- Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9:275-296. doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423.

- Formento A. 2005. Roya asiática de la soja (*Phakopsora pachyrhizi*). En: Roya asiática de la soja; campaña 2004-05. Paraná, INTA. pp. 5-6.
- Garcia A, Calvo ÉS, Kiihl RA de S, Harada A, Hiromoto DM Vieira LGE. 2008. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics* 117(4):545–553.
- Godoy C, Del Ponte E. 2011. Roya de la soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. &P.Syd. *Phakopsora meibomia* (Arthur). En: Sillon MR, Muñoz R. eds. Las enfermedades de la soja y su importancia en los países del Mercosur. Buenos Aires, Hemisferio Sur. pp. 104-112.
- Godoy C, Flausino AM, Santos LCM, Del Ponte EM. 2009a. Eficiência do controle da ferrugem asiática da soja em função do momento de aplicação sob condições de epidemia em Londrina, PR. *Tropical Plant Pathology* 34(1):56-61.
- Godoy C, Silva L, Utiamada C, Siquera F, Lopes I, Roese A. 2009b. Eficiência de fungicidas para controle da ferrugem asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2008/2009. Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos 2009. Circular técnica 69. Embrapa, Londrina, PR/Brazil.
- Godoy C, Utiamada C, Meyer M, Campos H, Lopes I, Dias A, Deuner C, Pimenta C, Jaccoud Filho D, Moreira E, Borges E, Andrade Junior E, Siqueri F, Juliatti C, Juliatti F, Favero F, Feksa H, Araújo I, Grigolli J, Nunes J, Belufi L, Carneiro L, Carregal L, Sato L Canteri M, Volf M, Goussain M, Dias M, Debortoli M, Martins M, Balardin R, Furlan S, Madalosso T, Carlin V, Venancio W. 2018. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Circular técnica 138. Londrina, PR Julho.

- Goellner K, Loehrer M, Langonbach C, Cenrath U, Koch E, Schaffrath U. 2010. *Phakopsora pachirhizi*, the causal agent of Asian Soybean Rust. *Plant Pathology* 11(2):169-177.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. 2002. *Genética*. 7ª Edición. Madrid. McGraw-Hill/ Interamericana de España. 840 p.
- Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC. 1999. *Compendium of soybean diseases*. 4th ed. St. Paul, MN, American Phytopathological Society. 100 p.
- Hartwig EE. 1986. Identification of a 4th major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop Science* 26(6):1135–1136.
- Hartwig E, Bromfield K. 1983. Relationships Among Three Genes Conferring Specific Resistance to Rust in Soybeans. *Crop Science* 23(2):237-239.
- He P, Shan L, Sheen J. 2007. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. *Cellular Microbiology* 9(6):1385-1396.
- Hennings VP. 1903. A few new Japanese uredinacea. *Hedwigia*. 42:107–108.
- Hossain M M, Akamatsu H, Morishita M, Mori T, Yamaoka Y, Suenaga K, Soares R, Bogado AN, Ivancovich AJG, Yamanaka N. 2015. Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in soybean landraces PI 594767A, PI 587905 and PI 416764. *Plant Pathology* 64(1):147-156.
- Hymowitz T. 1970. On the domestication of the soybean. *Economic Botany*. 24: 408–421. doi.org/10.1007/BF02860745.
- Instituto Uruguay XXI. 2019. Exportaciones incluyendo zonas francas. [En línea] Consultado: 15/11/2020. Disponible en: <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/centro-informacion/articulo/exportaciones-incluyendo-zonas-francas/>.
- Isard SA, Gage SH, Comtois P, Russo JM. 2005. Principles of the Atmospheric Pathway for Invasive Species Applied to Soybean Rust. *BioScience* 55(10): 851-860.

- Ivancovich A, Botta G. 2003. La roya de la soja en la Argentina. INTA Rafaela Información técnica de cultivos de verano Campaña 2003. Pergamino. INTA. Publicación Miscelánea N° 100.
- Jones J, Dangl J. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323–329.
- Jones D, Takemoto D. 2004. Plant innate immunity – direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* 16(1):48-62.
- Kim K, Unfried J, Hyten DL, Frederick RD, Hartman GL, Nelson RL, Song Qijian, Diers BW. 2012. Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI 561356 and SNP haplotype analysis of the Rpp1 region in diverse germplasm. *Theoretical Applied Genetics*. 125(6):1339-1352. doi: 10.1007/s00122-012-1932-5.
- King ZR, Harris DK, Wood ED, Buck JW, Boerma HR, Li Z. 2016. Registration of four near-isogenic soybean lines of G00-3213 for resistance to Asian soybean rust. *Journal of Plant Registration*. 10(2): 189–194.
- Klosowski AC, May De Mio LL, Miessner S, Rodrigues R, Stammer G. 2016. Detection of the F129L mutation in the cytochrome b gene in *Phakopsora pachyrhizi*. *Pest Management Science*. 72(6):1211–1215.
- Li S, Smith J, Ray J, Frederick R. 2012. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theoretical and Applied Genetics* 125(1):133–142.
- Maphosa M, Talwana H, Tukamuhabwa P. 2012. Enhancing soybean rust resistance through Rpp2, Rpp3 and Rpp4 pair wise gene pyramiding. *African Journal of Agricultural Research* 7(30), pp. 4271-4277. DOI: 10.5897/AJAR12.1123
- McLean RJ. 1979 Histological studies of resistance to soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. *Australian Journal Agriculture Research*. 30(1):77–84

- McLean RJ, Byth DE. 1976. Resistance of soybean to rust in Australia. *Australian Plant Pathology Society Newsletter* 5: 34–36.
<https://doi.org/10.1071/APP9760034a>
- MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) 2019. Encuesta agrícola invierno 2019. Montevideo, Uruguay. 28p. Consultado febrero 2020, Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/encuesta-agricola-invierno-2019>.
- Miles M, Bonde M, Nester S, Berner D, Frederick R, Hartman G. 2011. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. *Plant Disease*. 95(5):577-581. doi.org/10.1094/PDIS-06-10-0450.
- Miles MR, Frederick RD, Hartman GL. 2006. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Phakopsora pachyrhizi*. *Plant Health Progress*. 7(1):577-581
- Moulet O, Fossati D, Mascher-Frutschi F, Guadamagnolo R, Schori A. 2008. Use of marker assisted selection (MAS) for pyramiding two leaf rust genes, (Lr9 and Lr24) in wheat [En línea]. Consultado junio 2018. Disponible en: www.agroscope.admin.ch/publikationen/
- Pandey AK, Yang C, Zhang C, Graham MA, Horstman HD, Lee Y, Zabolina OA, Hill JH, Pedley KF, Whitham SA. 2011. Functional analysis of the Asian soybean rust resistance pathway mediated by *Rpp2*. *Molecular Plant-Microbe Interact* 24(2):194-206.
- Pedersen P. 2004. Soybean Growth and Development. Ames, Iowa State University. University Extension. p. 2.
- Pedley K, Pandey A, Ruck A, Lincoln L, Whitham S, Graham M. 2019. *Rpp1* Encodes a ULP1-NBS-LRR Protein That Controls Immunity to *Phakopsora pachyrhizi* in Soybean. *Molecular Plant-Microbe Interact*. 32(1):120–133.
- Picó MB, Esteras C. 2012. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats). Microsatélites [En línea], consultado feb-2018. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/16743>

- Pierozzi PHB, Ribeiro AS, Moreira JUV, Laperuta LDC, Rachid BF, Lima WF, Arias CAA, Oliveira MF, Toledo JFF. 2008. New soybean (*Glycine max* Fabales, Fabaceae) sources of qualitative genetic resistance to Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* (Uredinales, Phakopsoraceae). *Genetics and Molecular Biology* 31(2):505–511.
- Poehlman JM, Sleper DA. 2003. Mejoramiento genético de la soja. En: Poehlman JM, Sleper DA. Mejoramiento genético de las cosechas. D.F. Mexico. Limusa. 511p.
- Ray JD, Morel W, Smith JR. 2009. Genetics and mapping of adult plant rust resistance in soybean PI 587886 and PI 587880A. *Theoretical Applied Genetics*. 119(2):271–280.
- Rocha GAF, Alves DP, Oliveira JC, Brommonschenkel SH. 2016. Identification and mapping of resistance genes to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean (*Glycine max* L.) accession PI 594767-A [En línea]. Consultado ago-2019. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Laboratório de Genômica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038475>
- Rossi RL. 2003. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. *Plant Disease*. 87(1):102-102.
- Schmitthenner AF, Hobe M, Bhat RG. 1994. *Phytophthora sojae* races in Ohio over a 10-year interval. *Plant Disease*. 78:269-276.
- Schmitz HK, Medeiros AC, Craig IR, Stammler G. 2014. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-oxidase inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. *Pest Management Science* 7(3):378-388.
- Schneider R, Hollier C, Whitam H, Palm M, McKemy J, Hernández J, Levy L, DeVries-Paterson R. 2005. First Report of Soybean Rust Caused by

- Phakopsora pachyrhizi in the Continental United States. *Plant Disease* 89(7):774-774
- Silva DCG, Yamanaka N, Brogin RL. 2008. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. *Theoretical Applied Genetics*. 117(1):57–63.
- Simões K, Hawlik A, Rehfus A, Gava F, Stammeler G. 2018. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 125:21-26. doi.org/10.1007/s41348-017-0117-5.
- Sinclair JB, Hartman GL. 1999. Soybean Rust. En: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC. 1999. *Compendium of soybean diseases*. 4th ed. St. Paul, MN. American Phytopathological Society. 100 p.
- Slaminko TL, Miles MR, Marois JJ, Wright DL, Hartman G. 2008. Hosts of *Phakopsora pachyrhizi* identified in field evaluations in Florida.
- Stewart S, Guillin E, Díaz L. 2005. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in Uruguay. *Plant Disease* 89(8):909-909.
- Stewart S, Rodríguez M, Escalante F, Martínez S. 2018. Eficiencia de diversos fungicidas para el control de la roya asiática de la soja [En línea]. Nota técnica. Fitopatología INIA, Programa de Cultivos. Consultado 2-junio-2019. Disponible en:
http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20La%20Estrategia/eficiencia_fungicidas_roya_soja_INIA2019.pdf
- Stewart S, Rodríguez M, Yamanaka N. 2019. Pathotypic variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from Uruguay. *Tropical Plant Pathology*. 44:309–317.
- Strickberger MW. 1985. Probability and Statistical Testing. En: Strickberger M. W. (Eds.). *Genetics*. Nueva York. Mcmillan publishing Company. 126-146.

- Takken FL, Albrecht M, Tameling WI. 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biology*. 9(4):383-390.
DOI: 10.1016/j.pbi.2006.05.009
- Vallone S, Giorda L. 1997. Respuesta de cultivares comerciales a inoculaciones artificiales con el hongo causal de cancro del tallo. Marcos Juárez, Córdoba Argentina. INTA. 8 p.
- Wrather JA, Koenning SR. 2009. Effects of diseases on soybean yields in the United States 1996 to 2007. [En línea]. Wooster, OH, Plant Health Progress. s.p. Consultado 14 may. 2018. Disponible en <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2009/yields/>
- Yamanaka N, Hossain MM, Yamaoka Y. 2015. Molecular mapping of Asian soybean rust resistance in Chinese and Japanese soybean lines, Xiao Jing Huang, Himeshirazu, and Iyodaizu B. *Euphytica*. 205:311-324.
- Yamanaka N, Kato M, Akamatsu H, Yamaoka Y. 2016. Laboratory manual for studies on soybean rust resistance. Version 24 (Updated in April 15, 2019). Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS).
- Yamanaka N, Lemos NG, Uno M, Akamatsu H, Yamaoka Y, Abdelnoor RV, Braccini AL, Suenaga K. 2013. Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three Rpp genes. *Crop Breeding Applied Biotechnology* 13(1):75–82.
- Yamanaka N, Yamaoka Y, Kato M, Lemos N, Passianotto A, Dos Santos J, Benitez E, Abdelnoor R, Soares R, Suenaga K. 2010. Development of classification criteria for resistance to soybean rust and differences in virulence among Japanese and Brazilian rust populations. *Tropical Plant Pathology* 35(3):153-162.
- Yang X, Dowler W, Tschanz A. 1991. A Simulation model for assessing soybean rust epidemics. *Journal of Phytopathology*. 133(3):187-200.

- Yorinori JT, Paiva WM, Costamilan LM, Bertagnolli PF. 2003. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*): identificação e controle. Londrina, PR. Informações agronômicas, Embrapa. 4 pp.
- Yorinori JT, Paiva WM, Frederick RD, Costamilan LM, Bertagnolli PF, Hartman GE, Godoy CV, Nunes JJ. 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Disease*. 89 (6):675-677.