

T119 - CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE LA RESISTENCIA A LA CANCROSIS DEL TALLO DE LA SOJA EN UNA POBLACIÓN SEGREGANTE PARA EL GEN *Rdm2*.

M.A. Chiesa¹; R.N. Pioli²; M.V. Cambursano¹; C.O. Gosparini¹ & E.N. Morandi^{1*}

¹Fisiología Vegetal y ²Fitopatología, Fac. Cs. Agrarias, UNR. CC 14, 2125 Zavalla, Santa Fe, Argentina. TE: 0341- 4970080/85. emorandi@unr.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades constituyen uno de los principales factores limitantes del cultivo de la soja [*Glycine max* (L) Merr.], afectando tanto su rendimiento como la calidad de la semilla. Se conocen más de 100 patógenos que afectan a la soja de distinta naturaleza (hongos, bacterias, virus, nemátodos), de los cuales unos 35 tienen importancia económica.

La severidad de una determinada enfermedad dependerá del grado de compatibilidad de la interacción específica planta-patógeno, de la influencia de las condiciones ambientales sobre la misma, como también del manejo de dicha asociación. La incorporación de genes de resistencia (genes *R*) es el método más eficaz para reducir el daño causado por las enfermedades. Por este motivo, la obtención de cultivares resistentes a enfermedades de importancia económica es un objetivo prioritario en todos los programas de fitomejoramiento.

Ciertos patógenos se agrupan en taxas intra-específicas de distinta virulencia, lo que aumenta las posibilidades de reacciones compatibles en la interacción planta-patógeno, pudiendo eventualmente "quebrar" resistencias previas, especialmente cuando una misma fuente es usada prolongadamente en cultivares de amplia difusión. Por lo mencionado, el diseño de estrategias para la incorporación de resistencia a una enfermedad determinada, y su mantenimiento en el tiempo, requiere tanto del conocimiento de la variabilidad patogénica del agente causal, como del grado de compatibilidad con los genes *R* que controlan la respuesta fisiológica de la planta.

Diaporthe phaseolorum var. *meridionalis* (DPM) es uno de los agentes causales de la enfermedad conocida como Cancrosis del Tallo de la Soja, CTS. La CTS es una enfermedad potencialmente muy destructiva debido a que puede causar la muerte de las plantas desde la mitad de la estación de crecimiento hasta la madurez (Yorinori, 1996). Esta enfermedad irrumpió con fuerza en nuestro país en las campañas 1996/97 y 1997/98, causando grandes pérdidas en la zona pampeana núcleo (Pioli *et al.*, 1997; 1998).

Se conocen cuatro genes mayores (*Rdm1*, *Rdm2*, *Rdm3* y *Rdm4*) de resistencia a CTS. Los mismos fueron caracterizados como dominantes y de herencia simple; aunque no todos son igualmente efectivos frente a distintos patotipos de DPM (Kilen & Hartwing, 1987). Recientemente hemos demostrado la existencia de variabilidad patogénica en aislamientos locales de DPM interactuando con distintos genes *Rdm* (Pioli *et al.*, 2003). En particular, el gen *Rdm2* fue caracterizado como un gen mayor con dominancia completa y está presente junto al gen *Rdm1* en el cv. Tracy-M (Kilen *et al.*, 1985).

La hipótesis planteada en este trabajo fue que el grado de resistencia (*i.e.* completa o parcial) conferida por el gen *Rdm2* depende de la interacción específica planta-patotipo evaluada y de la cantidad de alelos dominantes del gen de resistencia presentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para probar esta hipótesis se evaluó el grado de resistencia al aislamiento local CE109, de DPM, previamente caracterizado morfológica, patogénica y molecularmente (Pioli *et al.*, 2003), en una población segregante F2 (n=72) obtenida del cruzamiento entre el genotipo susceptible J77-339 (*rdm2/rdm2*) y el genotipo resistente J11 (*Rdm2/Rdm2*). Los genotipos utilizados fueron provistos por T.C. Kilen. La caracterización genotípica de los individuos F2 se obtuvo a partir del análisis fenotípico de su correspondiente progenie F3 (11 individuos por cada línea F2 para recuperar con un 95 % de probabilidad el genotipo susceptible).

Las plántulas en estadio V2 (12 a 15 días de edad) fueron inoculadas artificialmente realizando una herida debajo del nudo cotiledonar donde se aplicó el micelio del aislamiento CE109. Las inoculaciones se realizaron en invernadero, en condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. Los resultados finales se evaluaron como

porcentaje de plantas muertas (% PM) a los 63 dpi (días post inoculación). Para categorizar las interacciones planta-patógeno según su grado de compatibilidad se consideró como interacción incompatible (genotipo resistente) a las líneas que mostraron un % PM menores al 20,0% y como interacción altamente compatible (genotipo susceptible) a las que mostraron % PM mayores al 70,0%. Los valores de % PM entre 20,0 y 70,0 se consideraron interacciones moderadamente compatibles. Además, se evaluaron los síntomas cada 7 días, durante 2 meses, para construir la curva de progreso de la enfermedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Segregación del locus *Rdm2*. La descendencia F3 del 23,6 % de los individuos F2 analizados mostró un $5,09 \pm 5,03$ % PM (interacción incompatible; genotipo resistente); otro 29,2 % mostró un $81,80 \pm 9,30$ % PM promedio (interacción altamente compatible; genotipo susceptible); mientras que el 47,2 % restante presentó un $39,05 \pm 15,10$ %PM promedio (interacción intermedia; genotipo moderadamente resistente) (Tabla 1, Figura 1). Los valores promedio entre los tres grupos determinados fueron diferentes significativamente (test de T, $P < 0,0001$) (Figura 1).

Tabla 1. Valores observados y esperados para la segregación (1:2:1) de la resistencia en la población derivada del cruzamiento J77-339 x J11 ($n = 72$), inoculada con el patotipo CE109 de DPM, medida a los 63 días post-inoculación, dpi. ($\chi^2 = 0,6667$; $P \leq 0,95$).

GENOTIPO	F2		F3
	Observ. N (%)	Esper.	N
Homocigota Dominante (RR)	17 (23,6 %)	18 (25,0 %)	187 (17 x 11)
Heterocigota (Rr)	34 (47,2 %)	36 (50,0 %)	374 (34 x 11)
Homocigota Recesivo (rr)	21 (29,2 %)	18 (25,0 %)	231 (21 x 11)

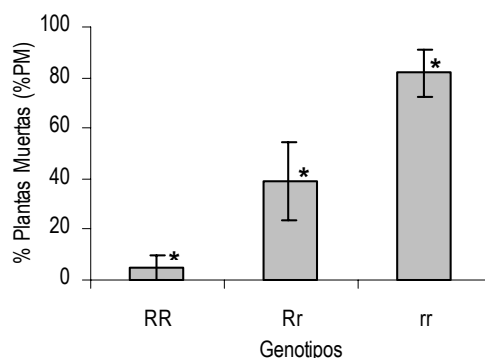


Figura 1. Promedios de porcentajes de plantas muertas (%PM) después de 63 dpi, para cada genotipo estudiado, donde se observan las diferencias significativas entre los mismos. (*) diferencia significativa, $P < 0,0001$.

Se realizó la prueba χ^2 para verificar que los datos observados ajustaran a los esperados para una segregación 1:2:1, es decir la segregación esperada para un locus con dominancia parcial o incompleta. El valor de χ^2 obtenido ($\chi^2_{(2\text{ gl})} = 0,6667$) es bajo (P entre 0,50-0,75) por lo tanto se concluye que no existe diferencia significativa entre los valores observados y esperados para una segregación 1 homocigota dominante: 2 heterocigotas: 1 homocigota recesivo; característica de loci con dominancia parcial o incompleta. Los resultados de segregación obtenidos indican que el gen *Rdm2* en estado heterocigota sólo confiere resistencia parcial a la enfermedad, sugiriendo que, en la interacción estudiada, su efecto es de tipo cuantitativo intra-locus (Tabla 1 y Figura 1).

Resultados similares se obtuvieron para el gen *Rdm4*, previamente caracterizado por nuestro grupo de trabajo (Chiesa *et al*, 2005).

Progreso de la enfermedad. Analizando las curvas de progreso de la enfermedad para cada grupo genotípico, se destaca que las tasas de progreso de la enfermedad, TPE (pendiente de las curvas de progreso de la enfermedad), fueron: 0,2; 1,1 y 2,1 % PM.d⁻¹, para los genotipos *RR*, *Rr* y *rr*, respectivamente (Figura 2). De esta manera, las TPE de los genotipos *Rr* y *rr* fueron 5,5 y 10,5 veces superiores, respectivamente, que la TPE del genotipo *RR*, demostrando que el avance de la enfermedad fue proporcional a la dosis del alelo *Rdm2* presente. Además, los períodos de incubación, calculados a partir de las ecuaciones de las curvas de ajuste, fueron 22, 23 y 27 dpi para los genotipos *rr*, *Rr* y *RR*, respectivamente (Figura 2), demostrando que la dosis del alelo dominante prolonga el período de incubación de la enfermedad.

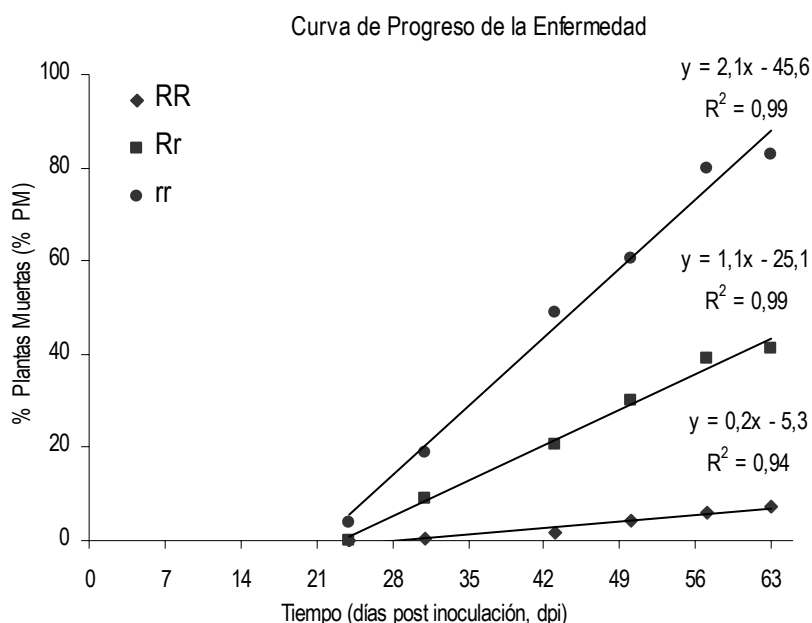


Figura 2. Progreso de la enfermedad a distintos tiempos (días post inoculación, dpi) expresado en % PM para cada una de las categorías genotípicas de la población segregante. La pendiente de cada recta de ajuste representa la tasa de progreso de la enfermedad, TPE.

Es importante destacar que cuando se caracterizó previamente el gen *Rdm2*, utilizando poblaciones derivadas del mismo cruzamiento usado en este estudio, inoculadas con un aislamiento de DPM procedente de Verona, MS, USA; el mismo mostró una segregación 3:1, típica de un gen con dominancia completa (Kilen *et al*, 1985). Como consecuencia de las diferencias obtenidas entre nuestros resultados (segregación 1:2:1) y los mencionados anteriormente, y siendo la única variación entre ambos experimentos la raza fisiológica del hongo utilizada, proponemos que el tipo de interacción establecida entre la planta y el

patógeno depende de la virulencia del patotipo específico de DPM. Existen muchos ejemplos en la literatura que describen genes de resistencia con estas características en interacciones raza-específicas (Concibido *et al*, 1997; Gunduz *et al*, 2004).

Los resultados obtenidos muestran, además, un comportamiento dependiente de la dosis génica de este gen, o locus de efecto cuantitativo (Quantitative Trait Loci, QTL). Esta característica está asociada frecuentemente a los genes *R* (Collard *et al*, 2005), siendo algunos ejemplos de resistencia a enfermedades conferidas por QTLs la resistencia a la infección de *Phytophthora infestans* en papa, de *Cercospora zea-maydis* en maíz, de *Pseudomonas solanacearum* en tomate y de *Heterodera glycines* en soja (Young, 1996).

Estos resultados son la primera evidencia experimental de que el grado de resistencia conferido por el gen *Rdm2*, a la CTS causada por DPM, depende de: i) el patotipo específico de DPM con el que se establece la interacción, y ii) del número de copias del alelo dominante del gen.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT) (PICT N° 08-09890). M. A. Chiesa y M. V. Cambursano son becarias doctorales, y E. N. Morandi es investigador, del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

BIBLIOGRAFÍA

1. Chiesa M.A., Cambursano M.V., Pioli R.N.; Gosparini C.O.; Cairo C.A. and Morandi E.N. (2005). Soybean Stem Canker Resistance conferred by *Rdm4* gene. Presented in XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología y III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos, Villa Carlos Paz - Córdoba. Argentina.
2. Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B and Pang E.C.K. (2005). An Introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker- assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.
3. Concibido V.C., Lange D.A., Denny R.L., Orf J.H. and Young N.D. (1997). Genome mapping of Soybean Cyst nematode resistance in Peking, PI90763 and PI 88988 using DNA markers. *Crop Sci.* 37:258-264.
4. Gunduz I., Buss G.R., Chen P., and Tolin S.A. (2004). Genetic and phenotypic analysis of *Soybean mosaic virus resistance* in PI 88788 soybean. *Phytopathology* 94:687-692.
5. Kilen T.C., Keeling B.L., and Hartwig E.E. (1985). Inheritance of reaction to stem canker in soybean. *Crop Sci.* 25:50-51.
6. Kilen T.C. & Hartwig E.E.(1987). Identification of single genes controlling resistance to stem canker in soybean. *Crop Sci.* 27: 220-222.
7. Pioli R.N., Gattuso S. Prado D. and Borghi A. (1997). Recent outbreak of stem canker (*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*) of soybean in Santa Fe, Argentina. *Plant Dis.* 81: 1215.
8. Pioli R.N., Morandi E.N., Gattuso S. and Gosparini C.O. (1998). Characterization of *Diaporthe-Phomopsis* complexes isolates obtained from soybean stem canker in Santa Fe. *Fitopatología* 33:44.
9. Pioli R.N., Morandi E.N., Martínez M.C., Lucca F., Tozzini A, Bizarro V and Hopp E. (2003). Morphologic, molecular nad pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean producing area of Argentina. *Phytopathology* 93 (2): 136-145
10. Yorinori, J.T (1996). Cancro da haste da soja: Epidemiologia e controle. *Circ. Técnica* N 14. EMBRAPA. Londrina- Brasil.
11. Young N.D. (1996). QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathology* 34:479-501.