

Roya de la Soja: una perspectiva biológica.

El manejo de enfermedades es un continuo desafío para los productores. Las variaciones en virulencia frente a genotipos previamente considerados resistentes (ejemplo, cancro del tallo) y la potencial pérdida de eficacia de productos fungicidas se encuentran entre las principales restricciones al manejo de enfermedades y plagas (McDonald 1997). Esto es así, en buena medida, debido a los constantes cambios en las poblaciones de patógenos. Estos cambios pueden tener su origen en la propia biología del organismo, en las variaciones del ambiente donde éstas se desarrollan, o a la interacción entre ambos (selección).

Entre los mecanismos biológicos de cambio se cuentan la mutación, los sistemas de apareamiento, la migración (flujo génico) y el tamaño de la población. Entre los principales cambios medioambientales en los ecosistemas agrícolas están la incorporación de nuevas variedades resistentes, la aplicación de fungicidas y fertilizantes, la irrigación y la rotación de cultivos, entre otros.

Los productores deben afrontar a menudo el quiebre de la resistencia en cultivares de uso comercial. Esto puede deberse a una nueva cepa introducida por alguna vía (migración), o bien puede ser el resultado del establecimiento de una mutación beneficiosa. El incremento de aislamientos tolerantes/resistentes puede ser también el resultado de un proceso selectivo dentro de la población original del lote. Cuestiones similares surgen frente a la eventual pérdida de eficacia de productos biocidas.

Las prácticas culturales imponen una fuerte selección direccional sobre las poblaciones de microorganismos, y ésto impulsa el cambio en su estructura genética. Las estrategias de control deben por lo tanto enfocarse sobre las poblaciones en vez de sobre genotipos individuales para lograr ser efectivas. De otra forma, se produce la disminución de un genotipo previamente mayoritario, que es reemplazado por otro que se adapta mejor a las condiciones de manejo impuestas. Un ejemplo de este tipo de situación lo constituye el “cambio de razas” en el nematodo del quiste de la soja (Dong et al., 1997).

Se denomina “estructura genética” a la cantidad y distribución de variación heredable dentro y entre poblaciones (McDonald 1997). Definir sus parámetros es un primer paso lógico para determinar cuáles son los factores que juegan un rol mayor en la capacidad de adaptación de un patógeno o plaga. Algunas de las preguntas que contribuyen a estimar dichos parámetros se relacionan directamente con la estructura genética:

- ¿Cuánta diversidad genética que existe en una población?
- ¿Cómo está distribuida la diversidad genética dentro de una población?
- ¿Cómo está distribuida la diversidad genética entre las poblaciones?
- ¿Cómo afecta el grado de reproducción sexual/asexual a la estructura poblacional?

Otro grupo de preguntas tiene que ver con el proceso evolutivo en sí:

- ¿Cómo afectan la migración y el tamaño de la población a la estructura genética?
- ¿Cómo afecta la selección a la estructura poblacional?
- ¿Cuál es la velocidad de cambio en la estructura genética del patógeno?

Un tercer grupo de preguntas tiene que ver de manera directa con la patología vegetal:

¿Cuáles son los límites de las poblaciones del patógeno?

¿Cómo afectan las estrategias de control (agentes selectivos) la estructura poblacional?

¿Cuál es el potencial adaptativo del patógeno frente a las estrategias utilizadas?

Marcadores moleculares:

Las herramientas de análisis que permiten abordar directamente los temas planteado más arriba han sido desarrolladas a un punto en que son accesibles para los investigadores en un tiempo relativamente reciente. Esto es así especialmente en los países pobres, donde su utilización masiva ha sido económicamente viable sólo a partir del advenimiento de la tecnología de Reacción de Polimerización en Cadena (PCR).

Existe un número creciente de sistemas de marcadores moleculares, cuya naturaleza y diferencias han sido analizadas extensamente en diferentes libros y publicaciones (Ferreira y Grattapaglia 1995). Su elección dependerá tanto de las condiciones experimentales como de los objetivos de la investigación. El tipo de marcador molecular que se utilice puede tener un impacto substancial sobre el análisis e interpretación de los datos obtenidos.

Los marcadores de loci únicos resultan más informativos para estimar la estructura de una población. Esto es así debido a que sus variantes (polimorfismos) son homólogas, y por lo tanto pueden ser analizadas mediante métodos genético-poblacionales específicos. En el caso de los marcadores multilocus, los patrones de bandas no pueden ser considerados homólogos. En consecuencia la información es procesada con metodologías numéricas. Éstas sólo permiten establecer relaciones de similitud que son utilizadas a posteriori para proponer hipótesis sobre la estructura genética de las poblaciones. Por otra parte, los sistemas multilocus proveen un mayor nivel de discriminación cuando lo que se intenta es diferenciar cepas ó clones dentro y entre poblaciones.

Como regla general, puede decirse que para evaluar hipótesis relacionadas con el papel de la migración, el tamaño poblacional y el sistema de apareamiento es conveniente utilizar marcadores neutros. Cuando se desea estudiar el efecto de los factores selectivos es deseable utilizar marcadores asociados a caracteres con influencia sobre la eficacia biológica. En el caso de los hongos que se reproducen predominantemente de manera asexual puede hacerse una excepción a esta regla: la correspondencia casi absoluta entre genotipo y fenotipo que resulta de la ausencia de recombinación hace que un marcador neutral pueda ser utilizado para preguntas relacionadas con el valor adaptativo (Cubeta y Vilgalys 1997).

Además de los objetivos del trabajo a realizar, deben ser considerados los aspectos metodológicos y logísticos (preparación de la muestra, reproducibilidad, costo, toxicidad de la metodología) y los analíticos, (base genética del marcador, sensibilidad, modo de herencia, etc.). Desde un punto de vista netamente operacional puede señalarse que si el organismo a estudiar puede ser cultivado sobre medios artificiales, la elección del marcador a utilizar es libre. Sin embargo, en el caso de los biótrofos obligados (como la roya de la soja) los métodos basados en la PCR son los más apropiados debido a las limitaciones en la cantidad de tejido que puede ser utilizado para la extracción de ADN.

Diagnóstico y distribución de la roya de la soja

La roya de la soja es causada por dos especies de hongos: *Phakopsora pachyrhizi* Sydow, originaria de Asia, y *Phakopsora meibomiaae* (Arth.) Arth., originaria de Sudamérica. *P. pachyrhizi* ha existido durante años en el Hemisferio Oriental y causa pérdidas significativas en los cultivos (Japón hasta 40%, y Taiwán hasta 80%, Pivonia y Yang 2004). En los pasados años, la enfermedad se ha dispersado hacia nuevas áreas: Hawaii en 1994 (Killgore y Heu 1994) y África en 1996 (Kawauki et al. 2003). La “roya asiática” fue observada en Brasil y Paraguay durante las campañas 2000/2001 y 2001/2002 (Yorinori et al. 2002). *P. meibomiaae* fue detectada sobre diferentes especies de leguminosas en Puerto Rico (1913), en México (1917) y en Cuba en 1926 (Bromfield 1984). En el año 1976 la “roya americana” fue detectada por primera vez sobre lotes de soja en Puerto Rico (Vakili y Bromfield 1976). Esta especie es mucho menos agresiva que la asiática, y no es considerada una amenaza importante desde el punto de vista económico.

El diagnóstico a campo de la roya de la soja es a menudo dificultoso debido a que sus síntomas pueden ser confundidos con los de otras patologías como la mancha marrón (*Septoria glycines*) o la pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), especialmente durante los estadios tempranos del desarrollo de la enfermedad. Aún con una lupa de mano, las lesiones de ambas enfermedades sobre la cara axial y abaxial son similares a las de la roya de la soja (Hartman et al. 1999). *Phakopsora* desarrolla estructuras de color pardo claro (uredios) que contienen abundantes urediosporas. La observación microscópica de dichas urediosporas confirma la presencia de roya, pero no permite diferenciar la forma asiática de la americana basándose en su morfología. Las únicas estructuras que permiten distinguir entre ambas son los telios, pero éstos se observan raramente en la naturaleza.

Frederick et al (2002) desarrollaron un protocolo de determinación taxonómica molecular que permite identificar ambas especies. La EEA INTA Marcos Juárez estableció un acuerdo de transferencia de materiales con la Foreign Disease – Weed Science Research Unit (USDA) que permitió poner a punto y validar los protocolos para la detección de ambos patógenos. La posibilidad de contar con esta tecnología en la Argentina contribuyó al establecimiento del Programa Nacional de la Roya de la Soja.

La roya de la soja se detectó en la provincia de Chaco durante la campaña 2001/2002, pero por cuestiones operativas no fue posible realizar la determinación taxonómica correspondiente. La primer cita confirmada para *P. pachyrhizi* en Argentina data de abril del 2002 en Leandro N. Alem, Misiones (Rossi 2003).

El diagnóstico molecular realizado en la EEA INTA Marcos Juárez (abril de 2003) confirmó la presencia de *Phakopsora pachyrhizi* sobre lotes de soja y hospedantes alternativos colectados en Cerro Azul (figura 1). Las especies sobre las cuales fue detectada fueron cajanus (*Cajanus cajan*), kudzu (*Pueraria lobata*) y mucuna (*Stylobium niveum*). El mismo estudio reveló la presencia de roya asiática sobre dos lotes de productores en la localidad de Gobernador Virasoro (Corrientes).

Ya en el marco del Programa Nacional, la presencia de la roya asiática fue oficializada en Cerro Azul durante enero de 2004, y en meses posteriores (febrero a mayo) fue confirmada en varias localidades de las provincias de Chaco, Corrientes, Formosa, Santiago del Estero, Tucumán, Salta, Catamarca, Entre Ríos, y Santa Fe, evidenciando un notable avance de la enfermedad hacia la zona núcleo sojera (tabla I y figuras 2 y 3). Aunque durante la pasada campaña la roya fue observada mayormente en los estadios avanzados del cultivo (figura 4), ésto se debió a las condiciones climáticas desfavorables durante los períodos previos. Los estudios realizados hasta el momento no han detectado la presencia de *P. meibomiae* en el país.

Las tareas descritas (determinación taxonómica y relevamiento epidemiológico) constituyen un buen ejemplo de la confluencia entre análisis genético y fitopatología: en ambos casos lo realizado es el primer paso tanto en los estudios evolutivos como en el manejo de enfermedades. El Programa logró establecer la especie a la que pertenece el patógeno y la distribución geográfica del mismo. La detección de *Phakopsora pachyrhizi* como único agente causal de la roya de la soja en la Argentina permite delinear estrategias de manejo y control específicas. Además, este conocimiento permitió encarar estudios genético-poblacionales, sabiendo que toda la variabilidad observada está distribuida dentro de una única especie.

Biología de poblaciones y roya de la soja.

Si bien la mayoría de las veces la determinación específica es trivial, esto no es así en el caso de los hongos, donde incluso el concepto mismo de especie es complejo. Existe una amplia discusión al respecto, y casi tantos puntos de vista como autores. En lo tocante al manejo de enfermedades puede adoptarse un criterio utilitario. Para el caso de la roya, baste considerar simplemente que existe una relación consistente entre las características morfológicas y moleculares con la agresividad y virulencia de los dos patógenos.

Durante el presente año, el Programa Nacional de la Roya de la Soja (componente de investigación) ha comenzado a trabajar en el estudio de la estructura poblacional de las poblaciones de *Phakopsora pachyrhizi* en Argentina. Para ello se ha desarrollado un diseño experimental basado en las características biológico-poblacionales de la especie, según se comenta a continuación.

Aunque las teliosporas germinan bajo condiciones de laboratorio (Saksirirat y Hoppe 1991), es poco lo que se conoce acerca del papel que desempeñan los telios en el ciclo de vida del hongo. Hasta el momento, sólo se ha verificado la funcionalidad de las urediosporas (Pivonia y Yang 2004), por lo que se supone que *P. pachyrhizi* presenta una reproducción básicamente asexual. Otra característica importante a considerar es que se trata de un patógeno policíclico, es decir que durante el ciclo del cultivo se desarrollan varias generaciones del hongo. Si a esto se le suma el hecho de que cada urediniosoro produce numerosas urediniosporas, resulta evidente que la enfermedad puede llegar a desarrollarse muy rápidamente si se presentan condiciones ambientales favorables.

Por otro lado, las urediniosporas pueden sobrevivir hasta 50 días y son fácilmente diseminadas por el viento. Las mismas pueden ser trasladadas a grandes distancias por las

corrientes de la alta atmósfera (jet streams, Pivonia y Yang 2004). Esta forma de dispersión favorece una distribución heterogénea de la variabilidad genética.

Es esperable entonces que el sistema reproductivo y el tipo de ciclo que presenta la roya asiática promuevan una estructura genética básicamente clonal dentro de los lotes de producción. A la vez, el tipo de dispersión de las esporas puede generar una significativa diversidad de genotipos en áreas relativamente pequeñas (campos aledaños, distritos, departamentos, etc.).

El estudio de la distribución espacial permitirá establecer cuál es la partición real de la variabilidad genética y cuál ó cuáles han sido las rutas de entrada del patógeno al país. El conocimiento de la estructura genética junto con la distribución de patotipos resultará de particular importancia para diseñar líneas de desarrollo de germoplasma resistente (apilamiento de genes de resistencia, desarrollo de multilíneas, obtención de germoplasma con resistencia horizontal, etc.) y contribuirá a definir dispositivos para el manejo de la enfermedad.

Phakopsora pachyrhizi es un patógeno biotrófico, por lo que no sobrevive en los rastrojos infectados. En cambio, sí sobrevive en plantas guachas de soja, así como en los numerosos hospedantes alternativos que tiene este hongo. Se han citado 31 especies en 17 géneros de leguminosas que son hospedantes de *P. pachyrhizi* en la naturaleza, entre las que se puede mencionar a las siguientes: kudzu (*Pueraria lobata*), trébol (*Melilotus* spp.), lupino (*Lupinus hirsutus*), poroto (*Phaseolus vulgaris*), caupi (*Vigna unguiculata*) (Hennen, 1996). También han sido citadas como hospedantes diversas otras especies en los géneros *Cajanus*, *Crotalaria*, *Dolichos*, *Lablab*, *Medicago*, *Pachyrhizus*, *Rhynchosia*, y *Vicia* (Pivonia y Yang 2004). En Argentina la roya asiática fue detectada en muestras de kudzu, mucuna y cajanus durante el 2003, y sobre alfalfa y trébol blanco en la presente campaña.

El análisis de la distribución temporal de la variabilidad genética permitirá definir si el inóculo primario tiene su origen en los aislamientos que han sobrevivido en hospedantes alternativos o si, por el contrario, la presencia del patógeno en los lotes va a depender primordialmente del régimen de vientos en cada campaña. La información conjunta de la distribución espacial y temporal permitirá establecer si existe un flujo génico significativo entre las poblaciones de *P. pachyrhizi* detectadas en las diferentes áreas de producción sojera y contribuirá a estimar el riesgo de diseminación dentro de regiones mayores de producción de un año al otro. Todo este conocimiento tendrá también relevancia a la hora de diseñar estrategias de manejo sanitario y de desarrollo de cultivares resistentes.

El advenimiento de los marcadores moleculares ha provocado una tendencia creciente hacia la publicación de artículos que analizan la estructura genética de organismos patógenos (Milgroom 2001). Sin embargo, en lugar de contribuir a la integración entre los diferentes campos del saber, esta profusión de datos ha incrementado el aislamiento entre genética y fitopatología. Mientras un mejor diagnóstico (diferenciación de razas, patotipos ó especies) tiene un claro beneficio para el manejo de enfermedades, el análisis genético debe ser cuidadosamente planificado para responder preguntas pertinentes, y de este modo contribuir a mejorar el estado sanitario de los cultivos.

La síntesis entre epidemiología y genética de poblaciones puede lograrse en un marco que integre conceptos evolutivos, ecológicos y genéticos (figura 5). La intersección de estos tres campos define, al decir del Dr. Osvaldo Reig, el terreno de la Biología de Poblaciones. La irrupción de la roya asiática, si bien en principio perjudicial desde el punto de vista económico, puede tomarse como oportunidad para el desarrollo de un modo de trabajo integrado que contribuya a una más eficiente resolución los problemas sanitarios planteados en los lotes de producción.

Bibliografía:

1. Bromfield K.R. 1984. Soybean Rus. Monograph 11. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
2. Cubeta M.A. and Vilgalys R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathology* 87: 480 -484.
3. Dong K, Barker KR, Opperman CH. 1997. Genetics of soybean-*Heterodera* interactions. *J Nematol* 29:509–522.
4. Frederick, R.D., Snyder, C.L., Peterson, G.L., and Bonde, M.R. 2002. Polymerase chain reaction assays for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomia*e. *Phytopathology*, 92: 217–227 (Abstr.).
5. Harman GL., Sinclair J.B. and Rupe J.C. eds. 1999. Compendium of Soybean Diseases. 4th. ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN.
6. Kawauki E., Adipala E. and Tukamuhabwa P. 2003. Yield loss associated with soya bean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Uganda. *J. Phytopathol.* 151: 7 – 12.
7. Killgore K. and Heu R. 1994. First report of soybean rust in Hawaii (Abstr.). *Plant Dis.* 78: 1216.
8. McDonald B.A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448 – 453.
9. Milrgoom M.G. 2001. The synthesis of genetics and epidemiology: contributions of population biology in plant pathology. *Journal of Plant Pathology* 8: 57 – 62.
10. Pivonia S. and Yang X.B. 2004. Assessment of the potential year-round establishment of soybean rust throughout the world. *Plant Disease* 88 (5): 523 – 529.
11. Ferreira M.E. y Grattapaglia D. 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA - CENARGEN (Documento 20). pp. 220.
12. Rossi R.L. 2003. First report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. *Plant Dis. notes* 87 (1): 102.
13. Saksirirat W. and Hoppe H.H. 1991. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). *J. Phytopathol.* 132: 339 – 342.
14. Vakili N.G. and Bromfield K. R. 1976. *Phakopsora* rust on soybean and other legumes in Puerto Rico. *Plant Dis. Rep.* 60: 995 – 999.
15. Yorinori J. T., Pavia W.M., Frederick R.D. y Fernandez P.F.T. 2002. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2000/2001 e 2001/2002. In: II Congresso Brasileiro de Soja (Foz do Iguazú, PR). Embrapa Soja, Londrina, Paraguay.