

Pathogenic characteristics of the Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Mexico

Características patogénicas de la roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi*) en México

Julio César García-Rodríguez, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Las Huastecas, Carretera Tampico-Mante Kilómetro 55, Villa Cuauhtémoc, Altamira, Tamaulipas, C.P. 89610, México; **Mio Morishita, Masayasu Kato & Naoki Yamanaka***, Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan. * Autor para correspondencia: naokiy@affrc.go.jp.

Recibido: 30 de Enero, 2017.

Aceptado: 13 de Abril, 2017.

García-Rodríguez JC, Morishita M, Kato M, Yamanaka N. 2017. Pathogenic characteristics of the Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 338-349.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1701-5

Primera publicación DOI: 02 de Mayo, 2017.

First DOI publication: May 02, 2017.

Resumen. En México, la roya asiática de la soya causada por *Phakopsora pachyrhizi* reduce el rendimiento del cultivo desde un 25 hasta un 80 %. El uso de variedades resistentes es la estrategia más rentable para el manejo de esta enfermedad. El objetivo del presente estudio fue determinar las características patogénicas de poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi*, con la finalidad de encontrar resistencia eficiente a dicho patógeno en germoplasma de soya. Para evaluar los perfiles patogénicos de cuatro poblaciones de *P. pachyrhizi*, colectadas en el noreste de México durante el 2015, se utilizaron 12 diferenciales de soya portando 0 - 3 genes

Abstract. In Mexico, the Asian soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*, reduces soybean yield by 25 % to 80 %. The use of resistant cultivars is the most cost-effective strategy for management of this disease. The objective of this study was to determine the pathogenic characteristics of *P. pachyrhizi* populations in Mexico in order to look for effective resistance in soybean germplasm. Using 12 soybean differentials carrying 0-3 resistance genes, the pathogenic profiles of four *P. pachyrhizi* populations sampled in northeastern Mexico in 2015, were evaluated. Three of the populations had similar pathogenic characteristics. Cluster analysis supported the distinction by the location of two clusters of Mexican *P. pachyrhizi* populations apart, in the dendrogram of South American and Japanese rust populations. This indicates a large variation in the soybean rust populations in Mexico. In addition, no soybean differential carrying a single resistance gene showed resistance to all the four Mexican populations; however, the differential carrying three genes was resistant to all the *P. pachyrhizi* populations. Therefore, introducing multiple

de resistencia. Tres poblaciones mostraron características patogénicas similares. El análisis clúster diferenció dos grupos en las poblaciones de *P. pachyrhizi* de México, los cuales se asociaron con la localidad de muestreo. El dendrograma no incluyó poblaciones de roya de Sudamérica y Japón en dichos grupos. Lo cual indicó una gran variación en las poblaciones de roya asiática de México. Por otro lado, ningún diferencial de soya portando un solo gen de resistencia fue resistente a las cuatro poblaciones mexicanas de roya; pero el diferencial con tres genes mostró resistencia a todas las muestras de *P. pachyrhizi*. Por lo tanto, el uso de germoplasma con múltiples genes de resistencia será útil para desarrollar variedades de soya resistentes a la roya asiática en México.

Palabras clave: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, diferenciales de soya, piramidación de genes, patogenicidad

La roya asiática de la soya (ASR) causada por el patógeno *Phakopsora pachyrhizi*, es una de las principales amenazas para la producción de dicha oleaginosa en los trópicos y subtrópicos. En México, las pérdidas de rendimiento por la ASR oscilan entre el 25 y el 80 % (Terán-Vargas *et al.*, 2007), lo que hace necesario el uso del control químico (Yañez-López *et al.*, 2015). El estado de Tamaulipas, en el noreste de México, produce la mayor parte de soya en el país, aunque también posee el período más largo con condiciones climáticas favorables, para la infección del cultivo por la ASR (Yañez-López *et al.*, 2015). Dado que todas las variedades comerciales de soya que actualmente se utilizan en México son susceptibles a la ASR, el costo por la aplicación de fungicidas es elevado.

El uso de variedades de soya resistentes a la ASR se considera la estrategia más rentable para

resistance genes in soybean breeding programs will be useful to develop rust-resistant cultivars in Mexico.

Key words: *Glycine max*, *Phakopsora pachyrhizi*, differentials, gene pyramiding, pathogenicity

Asian soybean rust (ASR) caused by the pathogen *Phakopsora pachyrhizi*, is a major threat to soybean in the tropics and subtropics. In Mexico, yield losses caused by ASR range from 25 % to 80 % (Terán-Vargas *et al.*, 2007) making chemical control necessary (Yañez-López *et al.*, 2015). Tamaulipas in northeastern Mexico, has the highest soybean production in the country, but it also has the longest period with favorable weather conditions for ASR infection (Yañez-López *et al.*, 2015). Since all soybean commercial cultivars currently used in Mexico are susceptible to ASR, the cost of chemical control is high.

The use of resistant soybean cultivars to ASR is considered to be the most cost-effective strategy for disease management (Hartman *et al.*, 2005). Although seven ASR resistance genes have been reported, namely *Rpp* (resistance to *P. pachyrhizi*) 1 to *Rpp6* and *Rpp1-b*, they cannot be used for breeding without knowing which gene is effective against a given ASR population in a target region. Thus, pathogenic characteristics of *P. pachyrhizi* populations in South American countries have been examined by the use of a differential soybean cultivar set (Akamatsu *et al.*, 2013; 2017). From the results, a breeding scheme for developing resistant cultivars has been implemented in South America, using a highly resistant soybean line carrying multiple resistance genes (Yamanaka *et al.*, 2013; 2015).

In Mexico, there are few reports on resistance to ASR in soybean germplasm (Peña-del-Río *et al.*,

el manejo de la enfermedad (Hartman *et al.*, 2005). Aunque se han reportado siete genes de resistencia a la ASR, identificados como *Rpp* (resistencia a *P. pachyrhizi*) 1 a *Rpp6* y *Rpp1-b*, no se pueden utilizar sin saber cuál gen es efectivo contra poblaciones específicas de ASR en cierta región. Así, las características patogénicas de poblaciones de *P. pachyrhizi* en países sudamericanos se han examinado mediante un conjunto de diferenciales de soya (Akamatsu *et al.*, 2013, 2017). A partir de los resultados, se ha implementado en Sudamérica un esquema de mejoramiento genético para el desarrollo de variedades resistentes, utilizando una línea de soya que porta múltiples genes *Rpp* (Yamanaka *et al.*, 2013, 2015).

En México existen pocos reportes sobre germoplasma de soya con resistencia a la ASR (Peñadel-Río *et al.*, 2014). Debido a que se tiene poco conocimiento sobre cuáles genes *Rpp* confieren resistencia a poblaciones específicas de *P. pachyrhizi*, la incorporación de éstos no ha sido considerada en los programas de mejoramiento genético de soya. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar las características patogénicas de poblaciones de *P. pachyrhizi* de México.

Durante el ciclo primavera-verano 2015, se colectaron en el noreste de México cuatro poblaciones de *P. pachyrhizi* en parcelas de soya no tratadas con fungicidas (Figura 1). Tres muestras se colectaron en los municipios de Reynosa, Matamoros y Altamira en el estado de Tamaulipas. En San Luis Potosí se colectó una población en el municipio de Tamuín. Las poblaciones se codificaron como MRP (población mexicana de roya asiática) -4, MRP-13, MRP-16 y MRP-19, respectivamente. En cada sitio de muestreo se recogieron varias hojas infectadas con ASR y se colocaron en una bolsa de plástico. Posteriormente se transfirieron a cajas de Petri y las hojas se cubrieron con algodón esterilizado y humedecido con agua destilada. Las muestras de

2014). Because little is known about which *Rpp* genes confer resistance to specific *P. pachyrhizi* populations, the incorporation of resistance genes in soybean has not been considered in breeding programs. Thus, the aim of this study was to determine the pathogenic characteristics of *P. pachyrhizi* populations in Mexico.

During the 2015 soybean growing season, four *P. pachyrhizi* populations were sampled in fungicide-untreated soybean fields in northeastern Mexico (Figure 1). Three were sampled in the municipalities of Reynosa, Matamoros, and Altamira in the State of Tamaulipas. In the State of San Luis Potosí, one population was sampled in the municipality of Tamuín. They were coded as MRP (Mexican Asian Soybean Rust Population)-4, MRP-13, MRP-16, and MRP-19, respectively. At each site, several ASR-infected leaves were collected and placed in a plastic bag. Then, they were placed on Petri dishes and the leafstalks were covered with sterilized cotton moistened with distilled water. These samples were exported to Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), Japan, under import permit 27Y935. After arrival, urediniospores on leaflets were collected and suspended in 2 or 3 mL of 0.04% Tween 20 solution. The urediniospore suspensions ($10\text{--}25 \times 10^4$ spores/mL) were inoculated on susceptible cultivar BRS184 for multiplication according to Yamanaka *et al.* (2016). The multiplied urediniospores were used for the following experimental inoculations.

In this study, 12 soybean differentials were used (Yamanaka *et al.*, 2016) (Table 1); ten carry one of the ASR-resistance genes: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6*, or *Rpp1-b*; No6-12-1 carries *Rpp2*, *Rpp4*, and *Rpp5*; and BRS154 is the susceptible control.

Plants were grown in a growth chamber at 24 °C under a 14-h light period of approximately 19,000–23,000 lux provided by fluorescent lamps. The first

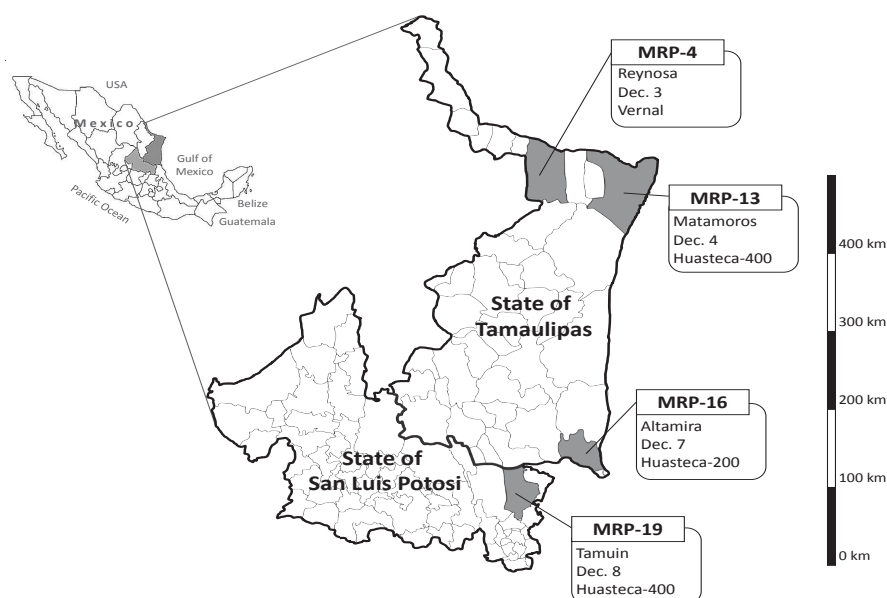


Figura 1. Localidades de México en donde se colectaron las poblaciones de *Phakopsora pachyrhizi* durante el 2015. En las etiquetas se indica el municipio, la fecha de muestreo y la variedad hospedera.

Figure 1. Locations where *Phakopsora pachyrhizi* populations were collected in Mexico in 2015. Labels indicate municipality, sampling date, and host cultivar.

ASR se exportaron al Centro Internacional de Investigación en Ciencias Agrícolas de Japón (JIRCAS), bajo el permiso de importación 27Y935. Una vez en Japón, se aislaron las urediniosporas y se suspendieron en 2 ó 3 mL de solución Tween 20 al 0.04 %. La variedad BRS184, susceptible a ASR, se inoculó con las suspensiones de urediniosporas ($10\text{--}25 \times 10^4$ esporas/mL) para su multiplicación (Yamanaka *et al.*, 2016). Las urediniosporas multiplicadas se utilizaron para las inoculaciones experimentales.

En este estudio se utilizaron 12 diferenciales de soya (Yamanaka *et al.*, 2016) (Cuadro 1); diez portan un solo gen de resistencia a ASR: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6* o *Rpp1-b*; No6-12-1 porta tres genes: *Rpp2*, *Rpp4* y *Rpp5*; y BRS-154 fue el testigo susceptible.

Las plantas se cultivaron en una cámara de crecimiento a 24 °C bajo un fotoperiodo de 14 h,

trifoliate leaflets were detached, inoculated with a urediniospore suspension (5×10^4 spores/mL), placed in Petri dishes, and incubated in a growth chamber at 21 °C under a 12-h light photoperiod of approximately 3,000 lux provided by fluorescent lamps. Fourteen days after inoculation, the rust sporulation level (SL) was visually assessed as nil (0), low (1), moderate (2), or high (3). Then, the urediniospores were removed with a paint brush, and the average number of uredinia per lesion (NoU) was determined microscopically in 30 lesions. The reaction type of each differential was classified as resistant (R), intermediate (IM), or susceptible (S), according to values of SL and NoU. This criterion and the SL standard are mentioned in Yamanaka *et al.* (2016).

The results were compared with those of 145 South American (Argentina, Brazil, and Paraguay), and eight Japanese ASR pathogens (Akamatsu *et*

Cuadro 1 Reacciones de 12 diferenciales de soya a cuatro poblaciones de *Phakopsora pachyrhizi* colectadas en el noreste de México durante el 2015. Las frecuencias de reacciones resistentes a poblaciones de *P. pachyrhizi* de México, Sudamérica y Japón en los 12 diferenciales de soya también se incluyen en este cuadro.

Table 1. Reactions of 12 soybean differentials to four *Phakopsora pachyrhizi* populations collected in northeastern Mexico in 2015. The frequency of the resistant reaction to Mexican, South American, and Japanese *P. pachyrhizi* populations in 12 soybean differentials is also included in this table.

ID No.	Soybean differentials			Mexican <i>Phakopsora pachyrhizi</i> population				Frequency of resistant reaction [*]		
	Genotype	Alternative	Resistance gene	MRP-4	MRP-13	MRP-16	MRP-19	Mexico	South America	Japan
RDV1	PI 200492	Komata	<i>Rpp1</i>	S	R	S	IM	25.0 %	4.3 %	100.0 %
RDV2	PI 587886	Bai Dou	<i>Rpp1</i>	S	S	S	S	0.0 %	12.1 %	25.0 %
RDV3	PI 230970	No. 3	<i>Rpp2</i>	IM	S	S	S	0.0 %	23.7 %	50.0 %
RDV4	PI 462312	Ankur	<i>Rpp3</i>	R	R	S	R	75.0 %	45.0 %	100.0 %
RDV5	PI 416764	Akasaya	<i>Rpp3</i>	R	R	IM	R	75.0 %	32.8 %	100.0 %
RDV6	PI 459025	Bing Nan	<i>Rpp4</i>	S	IM	S	S	0.0 %	50.7 %	87.5 %
RDV7	PI 200526	Shiranui	<i>Rpp5</i>	R	R	S	R	75.0 %	76.1 %	100.0 %
RDV8	PI 567102B	MARIF 2767	<i>Rpp6</i>	R	R	S	IM	50.0 %	66.7 %	100.0 %
RDV9	PI 587880A	Huang Dou	<i>Rpp1-b</i>	S	S	R	S	25.0 %	83.8 %	100.0 %
RDV10	PI 594767A	Zhao Ping Hei Dou	<i>Rpp1-b</i>	S	S	S	S	0.0 %	86.5 %	100.0 %
RDV11	BRS154	-	-	S	S	S	S	0.0 %	0.0 %	0.0 %
RDV12	No6-12-1	-	<i>Rpp2+Rpp4+Rpp5</i>	R	R	R	R	100.0 %	97.8 %	100.0 %

^{*} Los datos de las poblaciones de Sudamérica fueron tomados de los reportes de Akamatsu *et al.* (2013; 2017), y los de las poblaciones de Japón de Yamanaka *et al.* (2015) y Yamaoka *et al.* (2014). S = Susceptible; IM = Intermedia; R = Resistente / ^{*} Data of South American populations were used from the reports by Akamatsu *et al.* (2013; 2017), and that of Japanese populations by Yamanaka *et al.* (2015) and Yamaoka *et al.* (2014). S = Susceptible; IM = Intermediate; R = Resistant

aproximadamente 19,000-23,000 lux proporcionados por lámparas fluorescentes. Los primeros folíolos trifoliados se separaron de las plantas, se inocularon con la suspensión de urediniosporas (5×10^4 esporas/mL), se colocaron en cajas de Petri y se incubaron en una cámara de crecimiento a 21 °C bajo un fotoperiodo de 12 h, aproximadamente 3,000 lux proporcionados por lámparas fluorescentes. Catorce días después de la inoculación, el nivel de esporulación de la roya (SL) se evaluó visualmente como nulo (0), bajo (1), moderado (2) o alto (3). Enseguida se retiraron las urediniosporas con un pincel y se determinó el número promedio de uredinias por lesión (NoU) en 30 lesiones. El tipo de reacción en cada diferencial se clasificó como resistente (R), intermedio (IM) o susceptible

al., 2013, 2017; Yamaoka *et al.*, 2014), in which the data were obtained using the same soybean differentials. The reactions were changed to numerical scores: R=0, IM=1, and S=2. Distance matrices were prepared by calculating Euclidian distances between samples in R v. 3.0.1 software (<https://www.r-project.org>), and input into a hierarchical clustering function, which constructed a dendrogram based on the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

Population MRP-19 caused a resistant reaction in differential PI 462312, PI 416764, PI 200526, and No6-12-1 (Table 1); MRP-4 had similar effect on those differentials and in addition in PI 567102B. MRP-13 caused a resistant reaction in the same differentials as MRP-4, and in addition in PI

(S), de acuerdo con los valores de SL y NoU. Estos criterios, así como el procedimiento para determinar el SL se mencionan en Yamanaka *et al.* (2016).

Los resultados fueron comparados con los obtenidos de 145 poblaciones de ASR procedentes de países sudamericanos (Argentina, Brasil y Paraguay) y ocho de Japón (Akamatsu *et al.*, 2013, 2017; Yamaoka *et al.*, 2014), en donde se utilizaron los mismos diferenciales de soya. Las reacciones se convirtieron a valores numéricos: R=0, IM=1 y S=2. Se prepararon matrices de distancia, calculando las distancias Euclidianas entre muestras con el software R v. 3.0.1 (<https://www.r-project.org>), y se sometieron a una función de agrupación jerárquica, que construyó un dendrograma basado en el método de grupo de pares no ponderado, utilizando la media aritmética (UPGMA).

La población MRP-19 causó reacciones resistentes en los diferenciales PI 462312, PI 416764, PI 200526 y No6-12-1 (Cuadro 1); MRP-4 tuvo un efecto similar sobre los mismos diferenciales y además en PI 567102B. Los diferenciales que fueron resistentes a MRP-4 y PI 200492 fueron resistentes a MRP-13, mientras que MRP-16 causó reacciones de resistencia sólo en PI 587880A y No6-12-1. Aunque las poblaciones MRP-13, -4 y -19 produjeron reacciones similares sobre los diferenciales, éstas mostraron algunas diferencias en sus patrones patogénicos: MRP-4 y -13 generaron lesiones distintas en los diferenciales PI 200492 (*Rpp1*), PI 230970 (*Rpp2*) y PI 459025 (*Rpp4*).

MRP-4 produjo menos de 30 lesiones en PI 200492 (*Rpp1*), PI 416764 (*Rpp3*) y No6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*); mostró solamente cinco lesiones en PI 200492, pero estas lesiones produjeron altos niveles de uredinia con abundantes urediniosporas (NoU=4.2, SL=3), dando como resultado el fenotipo S. Por el contrario, en PI 200492 la población MRP-13 produjo menores niveles de uredinia y de urediniosporas (NoU=0.8, SL=1), mostrando

200492, while MRP-16 caused a resistant reaction in PI 587880A and No6-12-1. Although populations MRP-13, -4, and -19 showed similar behavior on differentials, there were some differences in their pathogenic patterns. Populations MRP-4 and -13 produced different lesion types on differentials PI 200492 (*Rpp1*), PI 230970 (*Rpp2*), and PI 459025 (*Rpp4*).

MRP-4 produced less than 30 lesions on PI 200492 (*Rpp1*), PI 416764 (*Rpp3*), and No6-12-1 (*Rpp2*+*Rpp4*+*Rpp5*). It produced only five lesions on PI 200492, but these lesions had many uredinia with abundant urediniospores (NoU=4.2, SL=3), giving S phenotype. Conversely, MRP-13 produced fewer uredinia and less urediniospores (NoU=0.8, SL=1), giving R phenotype to PI 200492. S and IM phenotypes were observed on PI 230970 and PI 459025 by MRP-13 inoculation, respectively; while IM and S phenotypes were observed on these differentials by MRP-4 inoculation, respectively. MRP-19 caused the same reactions on most differentials as MRP-4 and -13, but it caused an intermediate reaction on PI 567102B (*Rpp6*), which was resistant to MRP-4 and -13. This population also showed a different reaction on PI 200492 from MRP-4 and -13 (Table 1). As a result, MRP-13, -4, and -19 showed rather similar pathogenic patterns on the 12 soybean differentials. Aside from the differential pathogenicity, MRP-16 was the most virulent to the differentials. It caused a susceptible reaction in nine differentials, while in PI 416764 (*Rpp3*) it was intermediate, and resistant in PI 587880A (*Rpp1-b*) and No6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*). MRP-16 produced few uredinia and urediniospores on PI 587880A (NoU=1.0, SL=0.8), and did not sporulate in No6-12-1 (NoU=0.0, SL=0.0).

The UPGMA dendrogram revealed that MRP-4, -13, and -19 made a single cluster distantly from MRP-16; these two clusters of Mexican

el fenotipo R. Fenotipos S e IM se observaron en PI 230970 y PI 459025 con la inoculación de MRP-13, respectivamente; mientras que fenotipos IM y S se registraron en los mismos diferenciales con la inoculación de MRP-4, respectivamente. MRP-19 provocó las mismas reacciones que MRP-4 y -13 en la mayoría de los diferenciales, pero la reacción fue intermedia en PI 567102B (*Rpp6*), el cual fue resistente a MRP-4 y -13. Esta población también mostró reacciones diferentes en PI 200492 en comparación con MRP-4 y -13 (Tabla 1). Por lo tanto, MRP-13, -4 y -19 tuvieron perfiles patogénicos muy similares en los 12 diferenciales de soya. MRP-16 fue la población más virulenta. Ésta produjo reacciones susceptibles en nueve diferenciales, mientras que en PI 416764 (*Rpp3*) fueron intermedias y en PI 587880A (*Rpp1-b*) y No6-12-1 (*Rpp2 + Rpp4 + Rpp5*) resistentes. MRP-16 produjo pocas uredinias y urediniosporas en PI 587880A (NoU = 1.0, SL = 0.8) y no esporuló en No6-12-1 (NoU = 0.0, SL = 0.0).

El dendrograma UPGMA reveló que MRP-4, -13 y -19 formaron un grupo distante de MRP-16; estos grupos no incluyeron poblaciones de *P. pachyrhizi* de Sudamérica y Japón (Figura 2). MRP-16, población altamente virulenta, se agrupó en el conjunto principal de muestras sudamericanas, mientras que el grupo formado por MRP-4, -13 y -19 se localizó distantemente, aunque algunas poblaciones de Japón y Paraguay formaron un grupo aparte.

Los perfiles patogénicos de las poblaciones MRP-4, -13 y -19 no fueron idénticos pero mostraron similitudes (Cuadro 1). Las semejanzas en la patogenicidad de MRP-4 y -13 podrían explicarse por la proximidad de los lugares de muestreo; ambas poblaciones se colectaron en el norte de Tamaulipas, aproximadamente a 80 km de distancia entre cada sitio. MRP-19, que causó reacciones similares a MRP-4 y -13 en la mayoría de los diferenciales,

P. pachyrhizi populations did not contain any populations from South America and Japan (Figure 2). The highly virulent MRP-16 belonged to the major cluster of South American samples, while the MRP-4, -13, and -19 cluster was located distantly from the South American samples even though there were some Japanese and Paraguayan samples which made a cluster outside of them.

MRP-4, -13, and -19 showed not identical but similar pathogenic profiles (Table 1). Similarities in pathogenicity between MRP-4 and -13 could be due to the proximity of the sampling locations; both were collected in northern Tamaulipas about 80 km apart. MRP-19, which caused similar responses as MRP-4 and -13 in most differentials was collected in the State of San Luis Potosi (Huasteca region), approximately 450 km from the sampling sites of MRP-4 and -13, but 75 km from that of MRP-16. It was expected that the pathogenicity of MRP-19 would be similar to that of MRP-16, however, it was not the case (Table 1, Figure 2). This means that geographical differentiation in pathogenicity is rather limited in Mexican ASR pathogen within a small region in Mexico, unlike *P. pachyrhizi* populations collected in a small area in Japan which showed six races (Yamaoka *et al.*, 2014). MRP-16 showed the highest virulence among the four Mexican *P. pachyrhizi* populations. Uredinia and urediniospores were observed except in differential No6-12-1 (*Rpp2 + Rpp4 + Rpp5*), which it indicates that the MRP-16 population includes at least one race which is virulent to any *Rpp* gene that the differentials carry. According to these observations, Mexican ASR pathogen has high pathogenic diversity and strong virulence to resistant soybean differentials.

Frequencies of resistant reactions observed in soybean differentials by the inoculations of Mexican, South American, and Japanese *P. pachyrhizi* populations show a clear difference between

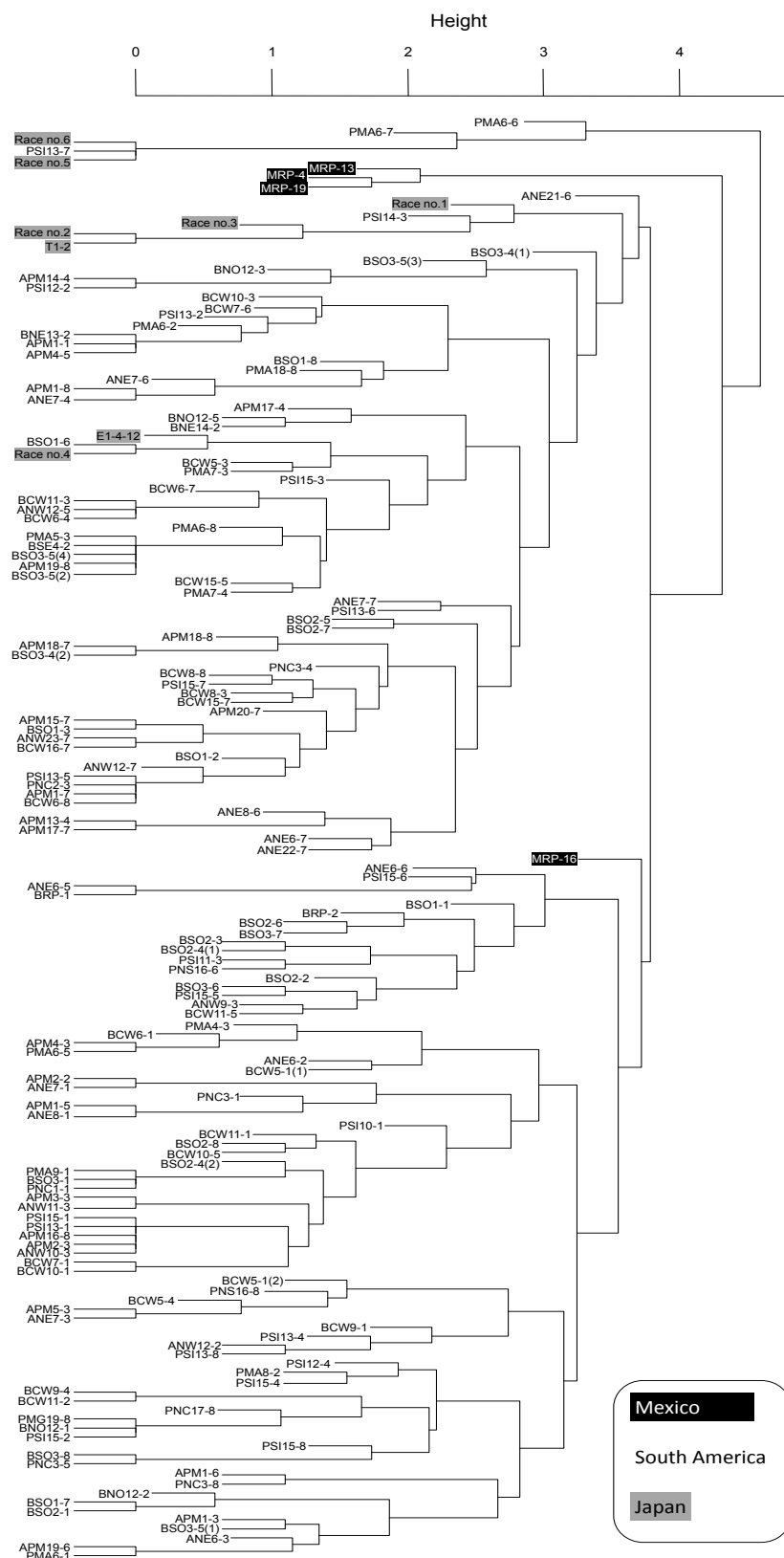


Figura 2. Dendrograma UPGMA que presenta las relaciones entre cuatro poblaciones mexicanas de *Phakopsora pachyrhizi*, 145 de Sudamérica y ocho de Japón, el cual se basa en la patogenicidad mostrada sobre 12 diferenciales de soja. Las poblaciones de México y Japón están coloreadas de negro y gris, respectivamente. Las poblaciones de Sudamérica están etiquetadas con ‘A’ para Argentina, ‘B’ para Brasil y ‘P’ para Paraguay. Los datos de las poblaciones de Sudamérica fueron tomados de los reportes de Akamatsu *et al.* (2013; 2017), y los de las poblaciones de Japón de Yamanaka *et al.* (2015) y Yamaoka *et al.* (2014).

Figure 2. UPGMA dendrogram of the relationships among four Mexican, 145 South American, and eight Japanese *Phakopsora pachyrhizi* populations based on pathogenicity on 12 soybean differentials. Mexican and Japanese populations are colored with black and gray, respectively. South American populations are labeled as ‘A’ for Argentina, ‘B’ for Brazil, and ‘P’ for Paraguay. Data of South American populations were used from the reports by Akamatsu *et al.* (2013; 2017), and those from Japan by Yamanaka *et al.* (2015) and Yamaoka *et al.* (2014).

se colectó en el estado de San Luis Potosí (región Huasteca), aproximadamente a 450 km de los sitios de muestreo de MRP-4 y -13, pero a 75 km del sitio de colecta de MRP-16. Se esperaba que la patogenicidad de MRP-19 fuera parecida a la de MRP-16, sin embargo no fue el caso (Cuadro 1, Figura 2). Esto significa que, considerando la diferenciación geográfica, la patogenicidad de las poblaciones mexicanas de ASR se encuentra limitada a pequeñas regiones, a diferencia de las poblaciones de *P. pachyrhizi* colectadas en una área reducida de Japón, en donde se identificaron seis razas (Yamaoka *et al.*, 2014). MRP-16 presentó la mayor virulencia de las cuatro poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi*. Se observaron uredinias y urediniosporas en todos los diferenciales, excepto en No6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*), indicando que MRP-16 incluye al menos una raza que es virulenta a cualquier gen *Rpp* de los diferenciales. De acuerdo con estas observaciones, la ASR en México presenta alta diversidad patogénica y es fuertemente virulenta a los diferenciales de soya evaluados.

Las frecuencias de las reacciones resistentes en los diferenciales que portan el gen *Rpp1-b* con la inoculación de los patógenos de *P. pachyrhizi* de México, Sudamérica y Japón, muestran una clara diferencia entre las poblaciones mexicanas y las poblaciones procedentes de las otras dos regiones. *Rpp1-b* de los diferenciales PI 587880A y PI 594767A fue resistente a > 80 % de las poblaciones de ASR de Japón y Sudamérica. Por el contrario, fue menos eficiente contra las poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi*, ya que PI 587880A fue susceptible a tres de las cuatro poblaciones y PI 594767A fue susceptible a todas (Cuadro 1). Otra diferencia significativa entre las poblaciones mexicanas, sudamericanas y japonesas de *P. pachyrhizi* se detectó en PI 459025: hubo reacciones resistentes en aproximadamente el 50 y el 90 % de las poblaciones de Sudamérica y Japón, respectivamente;

Mexican and the other two regional populations in *Rpp1-b* carrying differentials. *Rpp1-b* conferred PI 587880A and PI 594767A resistance to >80 % of ASR populations from Japan and South America. In contrast, it was less effective against Mexican *P. pachyrhizi* populations, since PI 587880A was susceptible to three of the four populations and PI 594767A was susceptible to all (Table 1). Another significant difference among Mexican, South American, and Japanese *P. pachyrhizi* population was detected in PI 459025: a resistant reaction was detected in about 50 % and 90 % of South American and Japanese *P. pachyrhizi* populations, respectively; however, resistant reaction was not observed by the inoculation with Mexican *P. pachyrhizi* populations.

The ineffectiveness of *Rpp1-b* detected in Mexico was previously observed in the USA (Li, 2009; Walker *et al.*, 2014). The pathogenic similarity between the ASR populations from Mexico and the USA is also observed in *Rpp3*; it caused resistance reactions to most of the ASR pathogens (Walker *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2015). On the other hand, *Rpp5* (PI 200526) showed a geographical difference between Mexico and USA, conferring resistance to three of the four Mexican *P. pachyrhizi* populations, as well as to all Japanese and most South American *P. pachyrhizi* populations (Table 1), but its susceptibility to 24 USA *P. pachyrhizi* populations was reported (Paul *et al.*, 2015). Therefore, the virulence of Mexican pathogen to *Rpp5*, like that of South American and Japanese pathogens, is different from those from the USA.

Most *P. pachyrhizi* populations in South America are virulent to *Rpp1* (PI 200492 and PI 587886). In contrast, Japanese ASR populations were avirulent to these differentials (Yamanaka *et al.*, 2010; Yamaoka *et al.*, 2014). In the USA, *Rpp1* (PI 200492) was resistant in most cases (Li, 2009;

sin embargo, con las poblaciones mexicanas no se observó resistencia.

La ineficiencia de *Rpp1-b* detectada en México se observó previamente en Estados Unidos (Li, 2009; Walker *et al.*, 2014). La similitud patogénica entre las poblaciones de ASR de México y Estados Unidos también se observa en *Rpp3*; ya que fue resistente a la mayoría de los patógenos de ASR (Walker *et al.*, 2014, Paul *et al.*, 2015). Por otro lado, *Rpp5* (PI 200526) mostró diferencias geográficas entre México y Estados Unidos, confiriendo resistencia a tres de las cuatro poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi*, así como a todas las poblaciones japonesas y a la mayoría de las sudamericanas; sin embargo, Paul *et al.* (2015) informó sobre su susceptibilidad a 24 poblaciones estadounidenses de ASR. Por lo tanto, la virulencia del patógeno en México a *Rpp5*, al igual que la del patógeno en Sudamérica y Japón, es diferente a la del patógeno en Estados Unidos.

La mayoría de las poblaciones de *P. pachyrhizi* en Sudamérica son virulentas a *Rpp1* (PI 200492 y PI 587886). Mientras que las poblaciones de Japón no provocaron síntomas en estos diferenciales (Yamanaka *et al.*, 2010; Yamaoka *et al.*, 2014). En Estados Unidos, *Rpp1* (PI 200492) fue resistente en la mayoría de los casos (Li, 2009; Li *et al.*, 2012; Twizeyimana y Hartman, 2012; Walker *et al.*, 2014), pero en México, PI 200492 fue resistente a MRP-13, intermedia a MRP-19 y susceptible a MRP-4 y -16. Dado que MRP-4 produjo sólo pocas lesiones, es probable que la mayoría de las reacciones fueron de inmunidad, o que una raza dominante en MRP-4 fue asintomática en PI 200492. En este sentido, las poblaciones mexicanas de ASR evaluadas son moderadamente virulentas a *Rpp1* (PI 200492), características que son diferentes a las de Sudamérica, Estados Unidos y Japón. En general, las poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi* presentan características patogénicas diferentes en comparación con las poblaciones de dichas regiones..

Li *et al.*, 2012; Twizeyimana and Hartman, 2012; Walker *et al.*, 2014), but in Mexico, PI 200492 was resistant to MRP-13, intermediate to MRP-19, and susceptible to MRP-4 and -16. Since MRP-4 produced only few lesions, suggesting that most reactions might have been of immunity, or that a dominant race in MRP-4 might be avirulent to PI 200492. The tested Mexican ASR populations, therefore, are moderately virulent to *Rpp1* (PI 200492) and the characteristics are different from those in South America, the USA, and Japan. Overall, Mexican *P. pachyrhizi* populations may have different characteristics from the pathogens from those regions.

Genes *Rpp2* (PI 230970), *Rpp1* (PI 587886), *Rpp4* (PI 459025), and *Rpp1-b* (PI 594767A) are useless for conferring resistance to ASR in Mexican soybean cultivars, since none conferred resistance to the four MRPs. In addition, *Rpp1* (PI 200492) and *Rpp1-b* (PI 587880A) conferred adequate resistance to only one of the four populations (Table 1), therefore, they would have a very limited use for soybean breeding in Mexico. Peña-del-Río *et al.* (2014) identified 23 genotypes with low susceptibility to the Mexican *P. pachyrhizi* population in 2007; two (PI 230970 and PI 417125) carried the *Rpp2* gene. Thus, *Rpp2* may have become ineffective against ASR in Mexico from 2007 to 2015.

Since *Rpp3* (PI 462312 and PI 416764) and *Rpp5* (PI 200526) conferred resistance to three of the populations, and *Rpp6* (PI 567102B) to two (Table 1), they could be useful as sources of resistance in soybean breeding in Mexico. However, it would be risky to use these genes singly, as none of the differentials carrying single *Rpp* genes showed resistance to all four Mexican populations. Only No6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*) was resistant to the four populations, and remained free of uredinia and urediniospore production, indicating that gene pyramiding (Yamanaka *et al.*, 2015) may confer to

Los genes *Rpp2* (PI 230970), *Rpp1* (PI 587886), *Rpp4* (PI 459025) y *Rpp1-b* (PI 594767A) no son útiles para conferir resistencia a la ASR en las variedades mexicanas de soya, ya que ninguno mostró resistencia a las cuatro MRPs. Además, *Rpp1* (PI 200492) y *Rpp1-b* (PI 587880A) confirieron resistencia a una de las cuatro poblaciones solamente (Cuadro 1), por lo tanto, su uso en la generación de variedades mexicanas de soya resistentes a ASR sería muy limitado. Peña-del-Río *et al.* (2014) identificaron 23 genotipos de soya con baja susceptibilidad a poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi* en 2007; dos (PI 230970 y PI 417125) portando el gen *Rpp2*. Por lo que se sugiere que en México, *Rpp2* ha mostrado ineficiencia contra ASR en el periodo de 2007 a 2015.

Considerando que *Rpp3* (PI 462312 y PI 416764) y *Rpp5* (PI 200526) son resistentes a tres de las poblaciones, y *Rpp6* (PI 567102B) a dos (Tabla 1), podrían utilizarse como fuentes de resistencia en México. Sin embargo, el uso de estos genes por separado constituye un riesgo, ya que ninguno de los diferenciales que portan un solo gen *Rpp*, mostraron resistencia a las cuatro poblaciones mexicanas de ASR. Solamente No6-12-1 (*Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*) fue resistente a las cuatro muestras del patógeno, no produciendo uredinias ni urediniosporas, lo que indica que la pirimidación de genes (Yamanaka *et al.*, 2015), puede conferir alto nivel de resistencia a un espectro amplio de razas de *P. pachyrhizi* en México.

CONCLUSIONES

Una de las cuatro poblaciones mexicanas de *P. pachyrhizi* mostró alta virulencia en los diferenciales de soya resistentes y su patogenicidad fue completamente diferente a la de las otras tres. La patogenicidad de las poblaciones mexicanas de ASR

soybeans not only resistance to a broad range of *P. pachyrhizi* races in Mexico but also a high level of resistance.

CONCLUSIONS

One of four Mexican *P. pachyrhizi* populations used in this study showed high virulence on resistant soybean differentials and quite different pathogenicity from the other three. Pathogenicity of Mexican populations was different from South American and Japanese ones which indicates that there should be highly virulent and diverse *P. pachyrhizi* races in Mexico. Gene-pyramiding such as the combination of *Rpp2*+*Rpp4*+*Rpp5*, is necessary to confer adequate and stable ASR resistance to soybean cultivars in Mexico.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) for providing seeds of the single-gene differential varieties. We are deeply grateful to Dr. Héctor Cortinas-Escobar and M.C. Nicolás Maldonado-Moreno (INIFAP), and to Ing. Iván Ausencio Delgado-Robles (CESAVETAM, Altamira) for their help during collection of ASR samples in Mexico. We are also deeply grateful to Mses. Yukie Muraki, and Midori Hasegawa (JIRCAS) for their technical assistance.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

fue diferente a la de las poblaciones de Sudamérica y Japón, indicando que puede haber razas de *P. pachyrhizi* altamente virulentas y diversas en México. La pirimidación de genes, como es el caso de la combinación de *Rpp2* + *Rpp4* + *Rpp5*, es necesaria

para conferir resistencia estable a ASR en las variedades de soya en México.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (Embrapa) por proporcionar la semilla de los diferenciales de soya que portan un solo gen. Expresamos nuestro profundo agradecimiento al Dr. Héctor Cortinas-Escobar y al M.C. Nicolás Maldonado-Moreno (INIFAP), y al Ing. Iván Ausencio Delgado-Robles (CESAVETAM, Altamira) por su ayuda durante la colecta de muestras de ASR en México. También muchas gracias a las Sritas. Yukie Muraki y Midori Hasegawa (JIRCAS) por su asistencia técnica.

## LITERATURA CITADA

- Akamatsu H., Yamanaka N., Soares R.M., Ivancovich A.J.G., Lavilla M.A., Bogado A.N., Morel G., Scholz R., Yamaoka Y., and Kato M. 2017. Pathogenic variation of South American *Phakopsora pachyrhizi* populations isolated from soybeans from 2010 to 2015. Japan Agricultural Research Quarterly (in press).
- Akamatsu H., Yamanaka N., Yamaoka Y., Soares R.M., Morel W., Ivancovich A.J.G., Bogado A.N., Kato M., Yori-nori J.T., and Suenaga K. 2013. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. Journal of General Plant Pathology 79:28–40. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-012-0421-7>
- Hartman G.L., Miles M.R., and Frederick R.D. 2005. Breeding for resistance to soybean rust. Plant Disease 89:664–666. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0664>
- Hartman G.L., Miles M.R., and Frederick R.D. 2005. Breeding for resistance to soybean rust. Plant Disease 89:664–666. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0664>
- Li S. 2009. Reaction of soybean rust-resistant lines identified in Paraguay to Mississippi isolates of *Phakopsora pachyrhizi*. Crop Science 49:887–894. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2008.06.0305>
- Li S., Smith J.R., Ray J.D., and Frederick R.D. 2012. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. Theoretical and Applied Genetics 125:133–142. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-012-1821-y>
- Paul C., Frederick R.D., Hill C.B., Hartman G.L., and Walker D.R. 2015. Comparison of pathogenic variation among *Phakopsora pachyrhizi* isolates collected from the United States and international locations, and identification of soybean genotypes resistant to the US isolates. Plant Disease 99:1059–1069. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0989-RE>
- Peña-del-Río M.L.Á., Maldonado-Moreno N., and Díaz-Franco A. 2014. Reaction of germplasm to *Phakopsora pachyrhizi* in the field. Revista Fitotecnia Mexicana 37:225–227.
- Terán-Vargas AP, Ascencio-Luciano G, Maldonado-Moreno N, and Ávila-Valdez J. 2007. La roya asiática de la soya en México. Tamaulipas, Mexico. CIRNE-INIFAP. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/818>
- Twizeyimana M., and Hartman G.L. 2012. Pathogenic variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean in the United States from 2006 to 2009. Plant Disease 96:75–81. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0379>
- Walker D.R., Harris D.K., King Z.R., Li Z., Boerma H.R., Buckley J.B., Shipe E.R., Mueller J.D., Weaver D.B., Sikora E.J., Moore S.H., Hartman G.L., Miles M.R., Harris D.K., Wright D.L., Marois J.J., and Nelson R.L. 2014. Evaluation of soybean germplasm accessions for resistance to *Phakopsora pachyrhizi* populations in the southeastern United States, 2009–2012. Crop Science 54:1673–1689. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2013.08.0513>
- Yamanaka N., Yamaoka Y., Kato M., Lemos N.G., Passianotto A., dos Santos J.V.M., Benitez E.R., Abdelnoor R.V., Soares R.M., and 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 35:153–162. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-567620100003>
- Yamanaka N., Lemos N.G., Uno M., Akamatsu H., Yamaoka Y., Abdelnoor R.V., Braccini A.L., and Suenaga K. 2013. Resistance to Asian soybean rust in soybean lines with the pyramided three *Rpp* genes. Crop Breeding and Applied Biotechnology 13:75–82. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-70332013000100009>
- Yamanaka N., Morishita M., Mori T., Lemos N.G., Hossain M.M., Akamatsu H., Kato M., and Yamaoka Y. 2015. Multiple *Rpp*-gene pyramiding confers resistance to Asian soybean rust isolates that are virulent on each of the pyramided genes. Tropical Plant Pathology 40:283–290. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-015-0038-4>
- Yamanaka N., Kato M., Akamatsu H., and Yamaoka Y. 2016. Laboratory manual for studies on soybean rust resistance. [www.jircas.affrc.go.jp/english/manual/soybean\\_rust/soybean\\_rust.html](http://www.jircas.affrc.go.jp/english/manual/soybean_rust/soybean_rust.html). (Accessed on February, 2016).
- Yamaoka Y., Yamanaka N., Akamatsu H., and Suenaga K. 2014. Pathogenic races of soybean rust *Phakopsora pachyrhizi* collected in Tsukuba and vicinity in Ibaraki, Japan. Journal of General Plant Pathology 80:184–188. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-014-0507-5>
- Yañez-López R., Hernández-Zul M.I., Quijano-Carranza J.A., Terán-Vargas A.P., Pérez-Moreno L., Díaz-Padilla G., and Rico-García, E. 2015. Potential distribution zones for soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Mexico. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 2:291–302. <http://www.scielo.org.mx/pdf/era/v2n6/v2n6a5.pdf>