



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LA ROYA DEL
TALLO (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) EN GENOTIPOS
DE TRIGO HARINERO.

GARCÍA LEÓN ELIZABETH

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis titulada: **Genética de la resistencia a la roya del tallo *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* en genotipos de trigos harineros (*Triticum aestivum* L.)** realizada por la alumna: **Elizabeth García León** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA
CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO



Dr. José Sergio Sandoval Islas

ASESOR



Dr. Héctor Eduardo Villaseñor Mir

ASESOR



Dr. Julio Huerta Espino

ASESOR



Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

ASESOR



Dr. Ignacio Benítez Riquelme

ASESOR



Dr. Serafín Cruz Izquierdo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2016

GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LA ROYA DEL TALLO (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) EN GENOTIPOS DE TRIGO HARINERO

Elizabeth García León, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

Se determinó la genética de la resistencia a roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) en los genotipos de trigo harinero 'Huites' y '150', mediante el análisis de sus progenies F₃ derivadas de las cruzas con los genotipos 'Cacuke', 'Bonza 63', 'Romero', 'Apav-14' y 'Apav-92'. El estudio se realizó en plántula y planta adulta en el Campo Experimental Valle de México y el Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades de trigo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. La segregación de familias F₃ mostró que 'Huites' posee tres genes de resistencia de efecto aditivo y un gen mayor dominante mientras que Apav-14', 'Cacuke', 'Romero' y 'Bonza 63' poseen un gen.; En el progenitor '150' se determinó que posee dos genes de resistencia de efecto aditivo. Se detectaron molecularmente mediante SNPs los genes de planta adulta/ enroscamiento lento entre éstos, *Sr57* se detectó en 'Romero' y 'Cacuke', *Sr2* en 'Cacuke' y 'Apav-14'; *Sr58* en 'Huites', 'Romero', 'Cacuke', '150', 'Apav-14' y 'Bonza 63'. Este es el primer reporte en México de 'Huites' y '150' como fuentes de resistencia en plántula y planta adulta a la roya del tallo.

Palabras clave: *Triticum aestivum*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, royas, SNP.

GENETICS OF RESISTANCE TO STEM RUST (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) IN ADULT PLANT OF BREAD WHEAT

Elizabeth García León, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

the genetics of resistance to stem rust was determined (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) in wheat genotypes 'Huites' and '150', by analyzing their progeny F₃ derived from crosses with genotypes 'Cacuke', 'Bonza 63', 'Romero', 'Apav-14' and 'Apav-92'. The study was performed in seedling and adult plant in the Experimental Valle de Mexico and the National Laboratory Rusts and other diseases of wheat at the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research. F₃ families segregating showed that 'Huites' has three resistance genes additive effect and a dominant gene while greater 'Apav-14', 'Cacuke', 'Romero' and 'Bonza 63' possess a gene; In the parent '150' is determined which has two genes of resistance additive effect. genes adult plant / slow rusting *Sr57* was detected in 'Romero' and 'Cacuke', *Sr2* in 'Cacuke' and 'Apav-14' molecularly detected by SNPs; *Sr58* in 'Huites', 'Romero', 'Cacuke', '150', 'Apav-14' and '63 Bonza'. This is the first report in Mexico of 'Huites' and '150' as sources of resistance in seedling and adult stem rust plant.

Key Words: *Triticum aestivum*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, rusts, SNP

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico durante mis estudios de Doctorado.

Al **Colegio de Postgraduados** especialmente el programa de Fitopatología por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación profesional.

Al **Instituto de Fitosanidad** del Colegio de Postgraduados, por ser la base de mi preparación postprofesional.

A los **integrantes de mi consejo particular**: Dr. J. Sergio Sandoval Islas, Dr. Héctor Eduardo Villaseñor Mir, Dr. Julio Huerta Espino, Dr. Gerardo Leyva Mir, Dr. Ignacio Benítez Riquelme y Dr. Serafín Cruz Izquierdo por sus atinadas sugerencias y su participación en las diferentes etapas de mi formación profesional.

A los **trabajadores del programa de trigo y avena del CEVAMEX-INIFAP** por su apoyo en la fase experimental de campo.

Al **Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades del Trigo (LANARET)** que me proporciono la infraestructura, material y equipo para la realización de la fase experimental en invernadero.

Al **Dr. Daniel Bárcenas Santana** por apoyarme en el aspecto de técnicas moleculares.

Esta tesis fue financiada por el proyecto denominado: Sistema de Mejoramiento genético para generar variedades de trigo resistentes a roya, de alto rendimiento y alta calidad para una producción sustentable en México. Numero 146788 financiado por el fondo sectorial SAGARPA-CONACYT. 2012-2017.

DEDICATORIA

A mis padres Virgilio García y Rosa León

A mis hermanos Diana y Alfonso

A Japhet Torres

CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	vii
INTRODUCCION.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
Razas fisiológicas con énfasis en <i>Ug99</i>	13
Resistencia.....	14
III. LITERATURA CITADA.....	16
CAPÍTULO I: GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LA ROYA DEL TALLO DEL TRIGO EN PLANTA ADULTA DE TRIGO HARINERO.....	19
RESUMEN.....	19
ABSTRACT.....	20
INTRODUCCIÓN.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Obtención de generaciones F ₁ , segregantes F ₂ y familias F ₃	22
Manejo experimental e inoculaciones.....	23
Registro de datos.....	23
Análisis de datos y pruebas estadísticas.....	24
Análisis molecular.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Genética de los cruzamientos con el progenitor ‘Huites’.....	29
Genética de los cruzamientos con el progenitor ‘150’.....	30
CONCLUSIONES.....	33
AGRADECIMIENTOS.....	33
LITERATURA CITADA.....	33
CAPÍTULO II: ESTUDIO DE RESISTENCIA EN PLÁNTULA A <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> EN INVERNADERO.....	37
INTRODUCCIÓN.....	37

MATERIALES Y MÉTODOS	38
Material genético	38
Manejo experimental e inoculación	38
Pruebas en invernadero	38
Toma de datos	39
Análisis de datos y pruebas estadísticas	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	41
LITERATURA CITADA	41
CONCLUSIONES GENERALES	42

LISTA DE CUADROS

INTRODUCCION

	PAGINA
Cuadro 1 Razas fisiológicas que conforman la población de <i>Puccinia graminis</i> f. s.p. <i>tritici</i> en México.	13

CAPÍTULO I

	PÁGINA
Cuadro 1 Frecuencias esperadas en las cuatro categorías en que se clasifica la F ₃ en cruza susceptible por resistente, según el número de genes involucrados.	25
Cuadro 2 Porcentaje de infección en la hoja bandera de los progenitores a <i>Pgt</i> raza RTR cuando el testigo susceptible alcanzó el 100 % de severidad, Chapingo, México 2013.	29
Cuadro 3 Distribución y frecuencias observadas y esperadas de familias F ₃ de las cruza con los progenitores 'Huites' y '150'.	31
Cuadro 4 Detección molecular de genes APR mediante el uso de marcadores moleculares SNPs	32

CAPÍTULO II

	PÁGINA
Cuadro 1 Evaluación en plántula de las frecuencias observadas y esperadas de familias F ₃ de las cruza con el progenitor 'Huites'.	40

LISTA DE FIGURAS

	CAPÍTULO I	PÁGINA
Figura 1	Ciclo biológico de <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	12
Figura 2	Distribución de familias F ₃ de las cruzas 'Apav-14' x 'Huites' (a), 'Apav-92' x 'Huites' (b), 'Huites' x 'Romero' (c), 'Huites' x 'Bonza 63' (d) y 'Huites' x 'Cacuke' (e).	27
Figura 3	Distribución de familias F ₃ de las cruzas '150' x 'Bonza 63' (a) y '150' x 'Cacuke' (b).	28

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La roya del tallo del trigo, causada por el hongo *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*), misma que histórica y económicamente es una enfermedad devastadora que ha ocasionado grandes epidemias en el mundo. Entre los años 1950 y 1960 durante la “revolución verde” se obtuvieron variedades resistentes principalmente con el descubrimiento e incorporación del gen *Sr2* derivado de la variedad Hope que es muy efectivo para reducir considerablemente los daños causados por este patógeno. La enfermedad estuvo controlada por casi 50 años, gracias al esfuerzo de los mejoradores de trigo y a los programas de vigilancia nacionales e internacionales (Singh, 2002).

Fue hasta el año de 1998 cuando se detectó una variante agresiva del patógeno en el continente Africano conocida comúnmente como raza Ug99 de *P. graminis*, ésta tiene virulencia hacia los genes *Sr31* y *Sr38*, genes de resistencia que se encuentran en la mayoría del fondo genético de las variedades en el mundo. La problemática que se vislumbra surge ante la rápida evolución del linaje Ug99 (designada por el sistema de nomenclatura norte americana como raza TTKSK (Jin *et al*, 2008) hacia mayor virulencia ya que en los últimos 10 años han surgido siete nuevas virulencias por parte del patógeno venciendo la resistencia a los genes *Sr21* y *Sr24* o la combinación de éstos (Singh, *et al.*, 2011).

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo en colaboración con los institutos de investigación y desarrollo de variedades de diferentes países se han dado a la tarea de evaluar germoplasma en más de 30 países y han identificado cerca de 60 genotipos con resistencia a las razas existentes en África y sur de Asia, identificando de esta manera fuentes de resistencia de raza específica como son los genes *Sr25*, *Sr26*, *SrTmp*, *SrHuw234* y *SrSha7* (Singh *et al.*, 2011).

Debido a que la reproducción del patógeno es clonal produciendo urediniosporas dicarióticas generalmente se dispersan con facilidad a través del viento a grandes distancias incluso entre continentes desde los sitios iniciales de infección hacia otros continentes. La eficiente habilidad del patógeno de mutar e infectar variedades hace que se analice y reconvierta el sistema de selección y

mejoramiento para la resistencia a enfermedades en trigo, el cual esta principalmente enfocado al uso de genes de raza específica, cuya efectividad es por corto tiempo.

Para lograr resistencia durable a la mayoría de las razas a la roya del tallo es necesario conjuntar de cuatro a cinco genes de efectos menores con acción génica aditiva (Singh *et al.*, 2008), lo que se conoce como resistencia cercana a la inmunidad. Los genes que confieren resistencia de desarrollo lento de la enfermedad (*Slow rusting*) tienen un efecto que fluctúa de pequeño a moderado, aumentando su eficacia a medida que más genes aditivos son involucrados (Singh y Rajaram, 1994). La combinación de un mayor número de diferentes genes de resistencia con efectividad parcial y total, proporciona una resistencia durable y estable (Anderson, 1998).

En México *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* está bajo control genético; sin embargo existe la creciente amenaza de la llegada de *Ug99* o alguna de sus variantes se tendría que reconvertir el material incorporando diversos genes de resistencia ya que el 70 % de las variedades son susceptibles.

En otros países productores de trigo se ha detectado germoplasma con buenos niveles de resistencia a *Ug99* y a sus variantes y que además presentan buena calidad en las harinas. Dentro de los genes de raza no específica se han evaluado en diversos países los genes *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* y *Lr68* que dan resistencia para *Puccinia triticina*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, Barley Yellow Dwarf Virus, *Eryshiphe graminis*, entre otras. Se podría incorporar a las líneas élite de México.

Por lo anteriormente expuesto los objetivos de esta investigación fueron:

- 1) Determinar el número de genes que poseen y la genética de la resistencia a la raza RTR de los progenitores 'Huites' y '150' resistentes a *Ug99*, a través de su cruce con los progenitores susceptibles 'Bonza 63', 'Romero', 'Cacuke', 'Apav-14' y 'Apav-92'.

- 2) Determinar el número de genes en plántula y planta adulta mediante el estudio de familias F3.

Hipótesis:

- 1) La resistencia está dada por un número reducido de genes.
- 2) Los progenitores resistentes tienen genes de resistencia diferentes.
- 3) Los progenitores al menos tienen un gen APR.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

***Puccinia graminis* f. sp. *tritici* agente causal de la roya del tallo del trigo**

Roelfs *et al.*, (1992); Singh *et al.*, (2011); Singh *et al.*, (2012); Huerta-Espino *et al.*, (2014) solo por citar algunos autores, describen a la roya negra o roya del tallo como la enfermedad histórica más agresiva y devastadora de las tres royas que atacan al cultivo del trigo a nivel mundial. *P. graminis* fue descrita por Persoon en 1794 y la categoría de forma especial *tritici* por Eriksson y E. Henning en 1894.

P.g.t. es una roya macrocíclica heteroica, la cual presenta 5 fases que completan su ciclo biológico: promicelial, picnial o espermagonial, aecial, uredial y telial (**Figura 1**); consta de dos hospedantes de especies taxonómicamente diferentes, un hospedante primario que es el trigo, un hospedante alterno en el que se reportan especies como *Berberis vulgaris* y *Mahonia* spp. Los hospedantes secundarios como algunas especies de pastos podrían jugar un papel fundamental en la sobrevivencia del hongo.

En la mayoría de los ambientes la forma principal de propagación y reproducción del hongo es a través de masas de uredosporas/urediniosporas (Huerta-Espino *et al.*, 2014). A pesar de ser la urediniospora la estructura de reproducción asexual del hongo, ésta tiene la capacidad de generar variación genética principalmente por mutación.

La uredospora es capaz de causar enfermedad si se presentan las tres condiciones ambientales óptimas como son la temperatura, humedad en forma de rocío y horas luz. Se requiere de 1 a 3 horas de temperatura óptima (15 a 20 °C), y

un periodo de 6 a 8 horas de agua libre en forma de rocío para que se produzca un tubo germinativo que se mueve perpendicularmente en busca de un estoma, en el que desarrolla el apresorio para posteriormente formar una vesícula subestomática.

Cuando los uredios invaden casi el 100 % del tejido vegetal y la planta se aproxima a madurez fisiológica, se produce el segundo tipo de esporas llamadas teliosporas, que son estructuras binucleadas, con terminación elíptica o clavada y con su célula apical alargada y con terminación en punta.

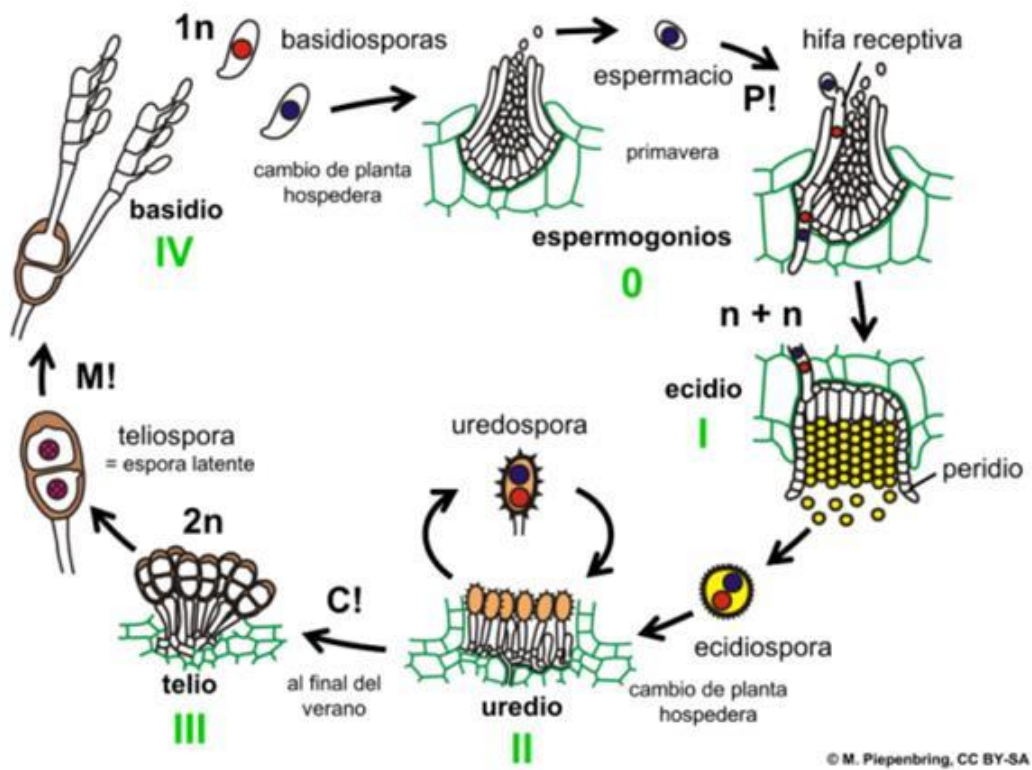


Figura 1. Ciclo biológico de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*

Los síntomas generalmente no son visibles al ojo humano, sin embargo la enfermedad se reconoce cuando los signos aparecen en los tallos como pústulas que rompen la epidermis que se levanta y da la impresión de un rasgado al quedar porciones adheridas al tejido (Villaseñor *et al.*, 2000).

P. graminis f. sp. *tritici* se considera la enfermedad más peligrosa de las tres royas que atacan al cultivo de trigo debido a que infecta toda la parte aérea de la planta. Si el hongo se establece en etapas tempranas reduce el área fotosintética y los procesos fisiológicos donde la ruptura de la epidermis causa heridas por lo que la planta gasta energía en reparar el daño. Sin embargo el problema principal radica en que el patógeno se convierte en la demanda, los nutrientes acumulados en las hojas en lugar de ser traslocados al grano, el patógeno lo utiliza para la producción de esporas y como consecuencia se obtienen granos chupados cuando éstos llegan a formarse (Roelfs *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 2012).

Razas fisiológicas con énfasis en *Ug99*

P. graminis f. sp. *tritici* es un hongo altamente especializado, en razas fisiológicas. En México la población de *P.g.t.* la conforman 6 razas, las que actualmente solo se pueden encontrar en variedades muy susceptibles o lotes de experimentación (Singh, 1991).

Cuadro 1. Razas fisiológicas que conforman la población de *Puccinia graminis* f. s.p. *tritici* en México.

Raza	Fórmula de avirulencia/virulencia
GFC	5, 6, 7a, 7b, 8b, 9b, 10, 11, 14, 36, (Dp2), H/8a, 9a, 9d, 17, 21
MCC	6, 6a, 9a, 9b, 9d, 11, (14), 21, 36, Dp2/5, 7a, 7b, 8b, 10, 17, H
QFC	6, 7a, 7b, 9b, 10, 11, 14, (36), (Dp2), H/5, 8a, 8b, 9a, 9d, 17, 21
RKQ	7a, 10, 11, (14), 17, Dp2, H/5, 6, 7b, 8a, 8b, 9a, 9d, 21, 36
RTQ	7a, 10, 14, 17, Dp2, H/5, 6, 7b, 8a, 8b, 9a, 9b, 9d, 11, 21, 36
RTR	7a, 10, 14, Dp2, H/5, 6, 7b, 8a, 8b, 9a, 9b, 9d, 11, 17, 21, 36

Todas las razas son avirulentas a los genes *Sr9e*, 12, 13, 22,23, 24,25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, *Gt*, *Wld*, *W3560* y *Agi*. Son virulentas a los genes *Sr9f*, *9g*, 15, 28, 34 y *SrPI*. Genes en paréntesis indican avirulencia parcial (Singh, 1991).

En Norteamérica es recordada la epidemia causada por *P.g.t.* en 1955, donde el uso de variedades resistentes y la erradicación del hospedante alterno fueron clave en el manejo de la enfermedad.

No obstante, después de 50 años de exitoso control, en 1998 en lotes experimentales del sur de África, se identificó en Uganda una nueva raza denominada Ug99 (Raza TTKSK; Jin *et al.*, 2007, 2008) con virulencia hacia el gen de resistencia *Sr31* que se encuentra presente en la mayoría de las variedades cultivadas en el mundo, ésta raza provocó una severa epidemia, causando pérdidas del 30 al 100% cuando se presenta en etapas tempranas (Pretorius *et al.*, 2000; MASWHEAT, 2016).

Se sabe que complejo *Ug99* evolucionó y a la fecha está compuesto por 11 razas fisiológicas con virulencia hacia un mayor número y combinación de genes. Este patógeno se ha extendido desde África oriental a Yemen, Sudán, Etiopía e Irán. En la actualidad no hay evidencias de la dispersión de la enfermedad hacia países como: Pakistán, Egipto, India y China (Wanyera *et al.*, 2006).

Se calcula que el 80% de las variedades de trigo en Asia y África son susceptibles de ser atacadas por nuevas variantes. La situación en México es similar ya que se estima que cerca del 70% de las variedades sembradas son susceptibles.

Las esporas de la roya del trigo se trasladan principalmente por medio del viento a través de largas distancias y de un continente a otro, dentro de los riesgos fitosanitarios que tiene México ante la inminente llegada de *Ug99* se encuentran los 23 estados donde se cultiva trigo (SENASICA. 2013).

Resistencia

Desde 1950 a la fecha se ha incrementado la producción de trigo en México y con esto el avance del mejoramiento genético, el cual sigue siendo la forma más eficiente para el control de las royas (Huerta-espino *et al.*, 2014).

Sin embargo en el fitomejoramiento para patógenos biótropos del trigo, debemos dar un paso adelante ya que las variedades liberadas comercialmente permanecen poco tiempo inmunes y al cabo de 3 a 5 años se vuelven susceptibles debido a la alta presión de inóculo que éstos patógenos ejercen sobre las variedades o una variedad en específico. Los mejoradores y fitopatólogos han trabajado conjuntamente para la identificación, caracterización y transferencia de

genes de resistencia, además del apoyo de las herramientas moleculares para efectuar una eficiente selección de caracteres baja heredabilidad.

Por años el quehacer del fitomejorador se centró principalmente en el uso de la herencia monogénica para el manejo de enfermedades, sin embargo a la fecha se ha avanzado considerablemente en el estudio de caracteres poligénicos que contribuyen en resistencia durable para un complejo de enfermedades en trigo, éste tipo de resistencia permanece por más tiempo en las variedades otorgándole casi inmunidad a un número mayor de razas del patógeno como lo son los genes de planta adulta (APR: Adult Plant Resistance) *Lr34*, *Lr46*, *Lr67*, *Lr68* y *Sr2*.

Uso de herramientas moleculares para explorar la variación genética

La diversidad entre organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. La variación genética es notable, y cada individuo de una especie, a excepción de los gemelos monocigóticos, poseen una secuencia de ADN única. Las variaciones en el ADN son mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido – SNP), inserción o delección de fragmentos de ADN de diversas longitudes o duplicación o inversión de fragmentos de ADN.

Los SNPs se utilizan como alternativa a los microsatélites en los estudios de diversidad genética.

Los SNP son variaciones en nucleótidos únicos que no cambian la longitud total de la secuencia de ADN en la región. Existen SNP en todo el genoma, son muy abundantes en el genoma humano, a razón de un SNP por cada 1 000 pares de bases (Sachinandam *et al.*, 2001). La mayoría de SNP se localizan en las regiones no codificantes, y no tienen un impacto directo en el fenotipo de un individuo. No obstante, algunos introducen mutaciones en secuencias expresadas o en regiones que influyen en la expresión génica (promotores, potenciadores), y pueden inducir cambios en la estructura o regulación de las proteínas. Dichos SNP tienen el potencial de detectar la variación genética funcional.

Los marcadores genéticos se comportan como caracteres mendelianos; dicho de otro modo, siguen las leyes de segregación y distribución independiente que Mendel fue el primero en describir. Dos genes que se encuentren en el mismo cromosoma están físicamente ligados y tienden a heredarse juntos. Durante la meiosis, la recombinación entre cromosomas homólogos puede romper este ligamiento. La frecuencia de recombinación entre dos genes situados en el mismo cromosoma depende de la distancia que los separa. La tasa de recombinación entre marcadores es, por tanto, indicativa de su grado de ligamiento: cuanto más baja es la tasa de recombinación, más cerca estarán los marcadores. La construcción de mapas genéticos aprovecha esta característica para inferir el orden probable de los marcadores y la distancia entre ellos.

III. LITERATURA CITADA

- Huerta-Espino J., Rodríguez-García M.F., Villaseñor-Mir H.E., Singh R., Martínez-Cruz E., Hortelano Santa Rosa R. y Espitia-Rangel E. 2014. Descripción de las royas del trigo. Folleto técnico Núm. 64, INIFAP-CEVAMEX. México. 31 p.
- Jin Y, Singh RP, Ward R.W, Wanyera R, Kinyua M, Njau P, Fetch T Jr, Pretorius ZA, Yahyaoui A. 2007. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease* 91:1096-1099
- Jin, Y., L.J. Szabo, Z.A. Pretorius, R.P. Singh, R. Ward, and T. Fetch, Jr. 2008. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease* 92:923-926.
- MASWHEAT. 2016. Consultada en línea el 17 de Junio de 2016: <http://maswheat.ucdavis.edu/index.htm>

- McIntosh, R. A., C. R. Wellings and R. F. Park. 1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRO Publications, East Melbourne, Victoria. Australia. 200 p.
- Pretorius ZA, Singh RP, Wagoire WW, Payne TS. 2000. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. Plant Disease 84:203
- SENASICA. 2013. Roya del tallo del trigo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici* raza Ug99). Dirección General de Sanidad Vegetal. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 25. 16 p.
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C., Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., Hunt, S.E., Cole, C.G., Coggill, P.C., Rice, C.M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D.R., Kwok, P.Y., Mardis, E.R., Yeh, R.T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R.H., McPherson, J.D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W.J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M.J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., StangeThomann, N., Zody, M.C., Linton, L., Lander, E.S. y Altshuler, D.; International SNP Map Working Group. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature, 409: 928–933
- Singh, R. P. 1991. Pathogenicity variation of *Puccinia recóndita* f. sp. *tritici* and *P. graminis* f. sp. *tritici* in Wheat-growing áreas of Mexico during 1988 and 1989. Plant dis. 75:790-794.
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino, and A. P. Roelfs. 2002. The wheat rust. *In*: Bread Wheat. Curtis, B.C., S. Rajaram, M. H. Gomez (eds). FAO. Roma, Italia. pp: 246-271.

Singh, P.R., D.P., Hodson, J. Huerta-Espino, Y. Jin, S. Bhavani, N. Njau, R. Wanyera, S. Herrera-Foeseel and R. W. Ward. 2008. Will Stem Rust Destroy the World's Wheat Crop? : In Advances in Agronomy Chapter five Volume 98. 271-309.

Singh, P.R., D.P., Hodson, J. Huerta-Espino, Y. Jin, S. Bhavani, N. Njau, S. Herrera-Foeseel, P.K. Singh, S. Singh, and V. Govindan. 2011. The emergence of ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. Annual Review of Phytopathology 49: 465-481.

Wanyera R, Kinyua MG, Jin Y, Singh R. 2006. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on *Sr31* in wheat in Eastern Africa. Plant Disease 90:113.

CAPÍTULO I: GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A LA ROYA DEL TALLO DEL TRIGO EN PLANTA ADULTA DE TRIGO HARINERO

Elizabeth García-León¹, Héctor Eduardo Villaseñor-Mir², Julio Huerta-Espino², José Sergio Sandoval-Islas¹, Santos Gerardo Leyva-Mir³, Ignacio Benítez-Riquelme⁴, Serafín Cruz-Izquierdo⁴

RESUMEN

Se determinó la genética de la resistencia a roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) en los genotipos de trigo harinero 'Huites' y '150', mediante el análisis de sus progenies F₃ derivadas de las cruzas con los genotipos 'Cacuke', 'Bonza 63', 'Romero', 'Apav-14' y 'Apav-92'. El estudio se realizó en el Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. La segregación de familias F₃ mostró que 'Huites' posee dos genes de resistencia de efecto aditivo mientras que 'Apav-14', 'Cacuke', 'Romero' y 'Bonza 63' poseen un gen.; En el progenitor '150' se determinó que posee dos genes de resistencia de efecto aditivo y al analizar las progenies de las cruzas de '150' con 'Cacuke' y 'Bonza 63' se confirmó la presencia de 3 genes de efecto aditivo. Se detectaron genes de resistencia de planta adulta y de enroscamiento lento en los siguientes genotipos: *Sr57* se detectó en 'Romero' y 'Cacuke', *Sr2* en 'Cacuke' y 'Apav-14'; *Sr58* en 'Huites', 'Romero', 'Cacuke', '150', 'Apav-14' y 'Bonza 63'. Este es el primer reporte en México de 'Huites' y '150' como fuente de resistencia en planta adulta a la roya del tallo.

Palabras clave: *Triticum aestivum*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, efecto aditivo, royas.

¹Fitopatología.Colegio de Postgraduados.56230.Montecillo, Estado de México. elizabeth.garcia@colpos.mx

²Campo Experimental Valle de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.56250.Los Reyes-Textcoco, Coatlinchán, Estado de México.

³Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México.

⁴Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética. Colegio de Postgraduados.56230.Montecillo, Estado de México.

ABSTRACT

The genetics of resistance to stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) was determined in the wheat genotypes 'Huites' and '150', by analyzing their F₃ progeny derived from crosses with 'Cacuke', 'Bonza 63', 'Romero', 'Apav-14' indicated that 'Huites' has two resistance genes with additive effect while 'Apav-14', 'Cacuke', 'Romero' and 'Bonza 63' carry one gene. '150' wheat on the other hand was to carry two additive genes and when analyzing the progeny of the crosses with 'Cacuke' and 'Bonza 63' it was confirmed the presence of three genes with additive effect. The slow rusting adult plant resistance genes *Sr57* gene was detected in t 'Romero' and 'Cacuke'; *Sr2* in 'Cacuke' and 'Apav-14'; *Sr58* in 'Huites', 'Romero', 'Cacuke', '150', 'Apav-14' and 'Bonza 63'. This is the first report in Mexico that 'Huites' and '150' are sources of adult plant resistance to stem rust.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, additive effect, rusts.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los cultivos alimenticios de primera necesidad con una superficie sembrada de 225 millones de hectáreas en el mundo (FAO, 2014), en altitudes que van desde 0 hasta 3000 m (Huerta-Espino y Singh, 2000). *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Pgt), patógeno causal de la roya del tallo del trigo, es un parásito biótrofo especializado con una alta variación genética para virulencia, debido a mutaciones y recombinación genética (Singh *et al.*, 2011). El mejoramiento genético aplicado al trigo ha reducido los daños por enfermedades, incrementando la productividad y el mejor uso de los insumos. Entre los futuros retos del fitomejoramiento, asociados al cambio climático global, destacan la escasez de agua para el riego, lluvias más erráticas, mayor fluctuación de las temperaturas (ondas de calor y heladas) y la gran variación de razas de roya que en su conjunto, podrían acabar con la producción nacional (Rajaram *et al.*, 1988).

En México la roya del tallo del trigo, se controló genéticamente en 1955 gracias al gen *Sr2* derivado de la variedad Hope (McIntosh, 1995), gen que incluso a la fecha es efectivo. Sin embargo, se estima que la raza TTKSK comúnmente denominada *Ug99* (Jin *et al.*, 2007, 2008) ha sido devastadora en el continente africano y podría llegar a México entre 5 a 7 años, por lo que sería necesario cambiar al menos el 75 % de las variedades recomendadas actualmente debido a su alta susceptibilidad (Villaseñor-Mir, 2006).

Para lograr resistencia durable a la roya del tallo es necesario conjuntar de cuatro a cinco genes de efectos menores con acción génica aditiva, lo que se conoce como resistencia cercana a la inmunidad. Los genes que confieren resistencia de desarrollo lento de la enfermedad (*Slow rusting*) tienen un efecto que fluctúa de pequeño a moderado, aumentando su eficacia a medida que más genes aditivos son involucrados (Singh y Rajaram, 1994). La combinación de un mayor número de genes de resistencia con efectividad parcial y total, proporciona una resistencia durable y estable (Anderson, 1998). En diversos países se ha detectado germoplasma con buenos niveles de resistencia a esta enfermedad, mismo que caracterizado, se podría incorporar a las líneas élite de México.

Sañudo y Muriel (2011) utilizaron la variedad 'Bonza 63', desarrollada en Colombia, como fuente de resistencia a roya del tallo, alto rendimiento y características de calidad deseables para la industria panificadora. El Centro de Agricultura Tropical (CIAT) perteneciente a la Asociación Mundial de Investigación Agrícola (GCIAR), en 1981 generó la variedad 'Romero' con la característica de poseer alta resistencia a *Pgt*. 'Huites M-95' es una variedad de trigo harinero de alto rendimiento ampliamente sembrada en el norte de México, que posee genes de resistencia a roya de la hoja y a la roya amarilla (Barreras-Soto, 1995; Villaseñor-Espín, 2009).

En estudios preliminares realizados en el Kenyan Agriculture Divestock Research Institute en Njoro, Kenya, se evaluaron los genotipos 'Bonza 63', 'Romero' y la raza TTKSK, en los cuales se observó 0 y 10 % de infección, respectivamente. Por otro lado 'Cacuke', 'Apav-14' y 'Apav-92' fueron susceptibles a *Ug99*.

Bajo este contexto, teniendo como antecedente que los genotipos utilizados como progenitores en la presente investigación, fueron evaluados por su resistencia a *Ug99* y con el antecedente que en México la población de *P.g.t* la conforman 6 razas fisiológicas, se introdujo dicho germoplasma con la finalidad de evaluar la resistencia a la raza más predominante como fue la RTR e incorporarlas a variedades de trigo comerciales actuales. El objetivo de la presente investigación fue: determinar la herencia de la resistencia a la severidad del daño causado por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* raza RTR en las progenies F₃ de las cruzas entre los genotipos 'Huites' y '150' con los progenitores 'Cacuke', 'Bonza 63', 'Romero', 'Apav-14' y 'Apav-92'.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de generaciones F₁, segregantes F₂ y familias F₃

Los progenitores se sembraron en el vivero de cruzamientos del Campo Experimental Valle de México–INIFAP y se realizaron cruzas entre los genotipos 'Huites' y '150' con los genotipos 'Romero', 'Bonza 63', 'Cacuke', 'Apav-14' y 'Apav-92', originando las cruzas 'Huites' X 'Romero', 'Huites' X 'Bonza 63', 'Huites'

X 'Cacuke', 'Huites' X 'Apav-14' y 'Huites' X 'Apav-92'; '150' X 'Bonza 63' y '150' X 'Cacuke'. Se obtuvo la primera generación filial (F₁). La F₁ se sembró en parcelas de cuatro surcos de 1.0 m de longitud, de manera espaciada en el ciclo P-V/2012 en el CEVAMEX ubicado en Chapingo, México. Para avanzarlas a la generación F₂; en cada parcela se cosecharon todas las plantas individualmente. De cada una de las cruzas se eligieron tres plantas para sembrar su semilla de manera espaciada en el ciclo O-I/12-13, en el Campo Experimental INIFAP Bajío, Guanajuato., con el objetivo de obtener de cada planta 50 familias F₃.

Manejo experimental e inoculaciones

En el CEVAMEX, en el ciclo P-V/2013 se sembraron entre 98 y 118 familias F₃ derivadas de los cruzamientos. Para lograr una alta incidencia de la enfermedad, se sembró una mezcla de genotipos susceptibles a la raza RTR en plántula y planta adulta en bordos con doble surco en la periferia y plantas entre cada parcela, las cuales actuaron como fuente dispersante de inóculo.

La raza de roya del tallo usada fue RTR cuya fórmula de avirulencia/virulencia es: *7a, 10,14, Dp2, H, 9e, 12, 13, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 37, Gt, Wld, W3560, Agi/5, 6, 7b, 8a, 8b, 9a, 9b, 9d, 11, 17, 21, 36, 9f, 9g, 15, 28, 34 y SrPI* (Singh *et al.*, 1991).

La inoculación se llevó a cabo mediante aspersores manuales a los 30, 35 y 37 días después de la siembra con una suspensión de urediniosporas en aceite mineral Soltrol® como vehículo de dispersión a una concentración de 1×10^6 urediniosporas·mL⁻¹.

Registro de datos

La primera toma de datos se realizó una vez que el progenitor susceptible de cada cruce alcanzó de 90 a 100 % de infección en la hoja bandera y la segunda 7 días después. En las familias se registró el porcentaje de infección de acuerdo con la escala de Cobb modificada (Peterson, 1946). En las familias heterocigóticas identificadas por su segregación, se utilizó la misma escala y se registró el dato promedio de infección. Cada familia F₃ se clasificó en cuatro

grupos (Singh y Rajaram, 1994). Grupo 1: Familias homocigóticas con una respuesta similar a la del progenitor resistente; Grupo 2: Familias homocigóticas con una respuesta similar a la del progenitor susceptible; Grupo 3: Familias heterocigóticas segregantes, hasta un porcentaje intermedio; Grupo 4: familias heterocigóticas segregantes en las que se agrupan todas las categorías, de plantas tan resistentes como el progenitor resistente, intermedias y tan susceptibles como el progenitor susceptible.

Análisis de datos y pruebas estadísticas

Las frecuencias esperadas de las familias F_3 en planta adulta es bajo el supuesto de que la resistencia es condicionada por al menos un gen de efecto aditivo y que las frecuencias de las familias homocigóticas susceptibles determinan el número de genes de resistencia.

Las condiciones de temperatura (20 y 30°C) y humedad (mayor a 70%) fueron favorables para el desarrollo de la enfermedad. En la evaluación de los progenitores y familias F_3 la toma de datos se realizó dos veces; la primera permitió identificar a las familias homocigóticas susceptibles, las familias homocigóticas resistentes y las segregantes, la segunda evaluación se realizó una semana después para corroborar los datos.

Es importante mencionar que la frecuencia de familias susceptibles similares al progenitor susceptible, es la que sirve de base para determinar el número de genes de acuerdo con la proporción esperada (Singh y Huerta-Espino, 2001). Las familias susceptibles son más fáciles de identificar en campo bajo el supuesto de que la virulencia del patógeno es recesiva y que la resistencia en la planta es dominante siguiendo la teoría del gen por gen (Roelfs y Groth, 1988). Las frecuencias esperadas de las familias F_3 en los cuatro grupos de clasificación se calcularon bajo el supuesto de que la resistencia está condicionada por 2, 3, 4 y 5 genes de efecto aditivo (frecuencias de familias homocigóticas susceptibles de 1/16, 1/64, 1/256 y 1/1024) de acuerdo con el Cuadro 1. Entonces, si la resistencia estuviera controlada por dos genes la frecuencias esperadas de familias homocigóticas susceptibles sería de 6.25% (1/16); si fuera condicionada por tres

genes, la proporción sería de (1/64) y si estuviera controlada por cuatro genes, la proporción sería de 0.4% (1/256).

Cuadro 1. Frecuencias esperadas en las cuatro categorías en que se clasifica la F₃ en cruza susceptible por resistente, según el número de genes involucrados.

No. de genes	Categoría			
	1 LHRPR	2 LHSPS	3 Seg 1	4 Seg S
2	6.3	6.3	37.5	50
3	1.6	4.6	56.3	40.6
4	0.4	0.4	68	31.3
5	0.1	0.1	76.2	23.6

LHRPR: Líneas homocigóticas como el progenitor resistente.

LHSPS: Líneas homocigóticas como el progenitor susceptible.

Seg 1: Líneas segregantes intermedias pero sin plantas completamente susceptibles.

Seg S: Líneas segregantes desde completamente resistentes hasta completamente susceptibles.

Para el análisis genético las frecuencias observadas y esperadas se compararon mediante la prueba de Ji-cuadrada (X^2), el valor de tablas y la significancia se determinó de acuerdo al valor de X^2 que obtuvieron las proporciones de las familias de cada crusa. Para el valor de tablas se usaron $n-1$ grados de libertad, donde n es el número de grupos de clasificación de familias F₃ (Infante y Zárate de Lara, 1998).

Análisis molecular

Se realizó la caracterización génica a los progenitores mediante la metodología SNP (*Single Polymorphic Nucleotide*) para la detección de genes en planta adulta, para la cual se realizó la extracción del DNA de 'Huites', '150', 'Romero', 'Cacuke', 'Apav-14', 'Apav-92' y 'Bonza 63'. A los 15 días después de la emergencia se cosecharon 2 g de tejido en tubos (Micro Tube Strips of 8 Attached 1.1 mL de Micro Pack™) colocados en placas de 96 (Collection Microtubes Cracked 10 x 96), de las cuales se procedió a mantener en congelación durante 2

días para posteriormente liofilizar y realizar la extracción de DNA; mediante la técnica de extracción DNA-CTAB de los Protocolos del Laboratorio de Mejoramiento Molecular del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) (<http://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/3221>). Cada muestra de DNA se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific™) y se ajustó a 50 ng·µL⁻¹.

La identificación de genes se realizó con marcadores SNP (*Polimorfismos de un solo nucleótido*). Se utilizaron los SNP: Lr46jf2-2 y Lr46_SNP1622 para el gen *Lr46*, CSLV67 para el gen *Lr67*, Lr34_TCCIND para el gen *Lr34*, Lr68-2 para el gen *Lr68* y Sr2_ger9 3p para el gen *Sr2*; todos estos confieren resistencia a royas en planta adulta.

Para la PCR se utilizaron 5 µL de DNA, mismos que se colocaron en microplacas de PCR de 384 pozos de la marca Midsci™, en donde se dejaron para su secado. La mezcla de reacción se preparó con un volumen final de 5 µL, 2.5 µL de 2X KASPAR, 0.1 µL Assay Mix, 0.2 µL dd H₂O por muestra, en el termociclador, con el programa Touchdown (TD) (1 ciclo: 94°C × 15 min, 11 ciclos: 94°C × 30 seg, 65°C × 1 min, 72°C × 30 seg, 26 ciclos: 94°C × 30 seg, 57°C × 1 min, 72°C × 30 seg, 1ciclo: 72°C × 2 min y una extensión a 72°C × 15 min), posteriormente se realizó la lectura en un lector de placas de fluorescencia Pherastar Plus de la compañía BMG Labtech™.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observó una distribución discreta de clases que pudiese indicar la presencia de genes de resistencia de efectos mayores o factores de resistencia de dominancia completa; lo que se detectó fue una variación continua en la expresión de la resistencia de las familias F₃ típica de un tipo de herencia poligénica.

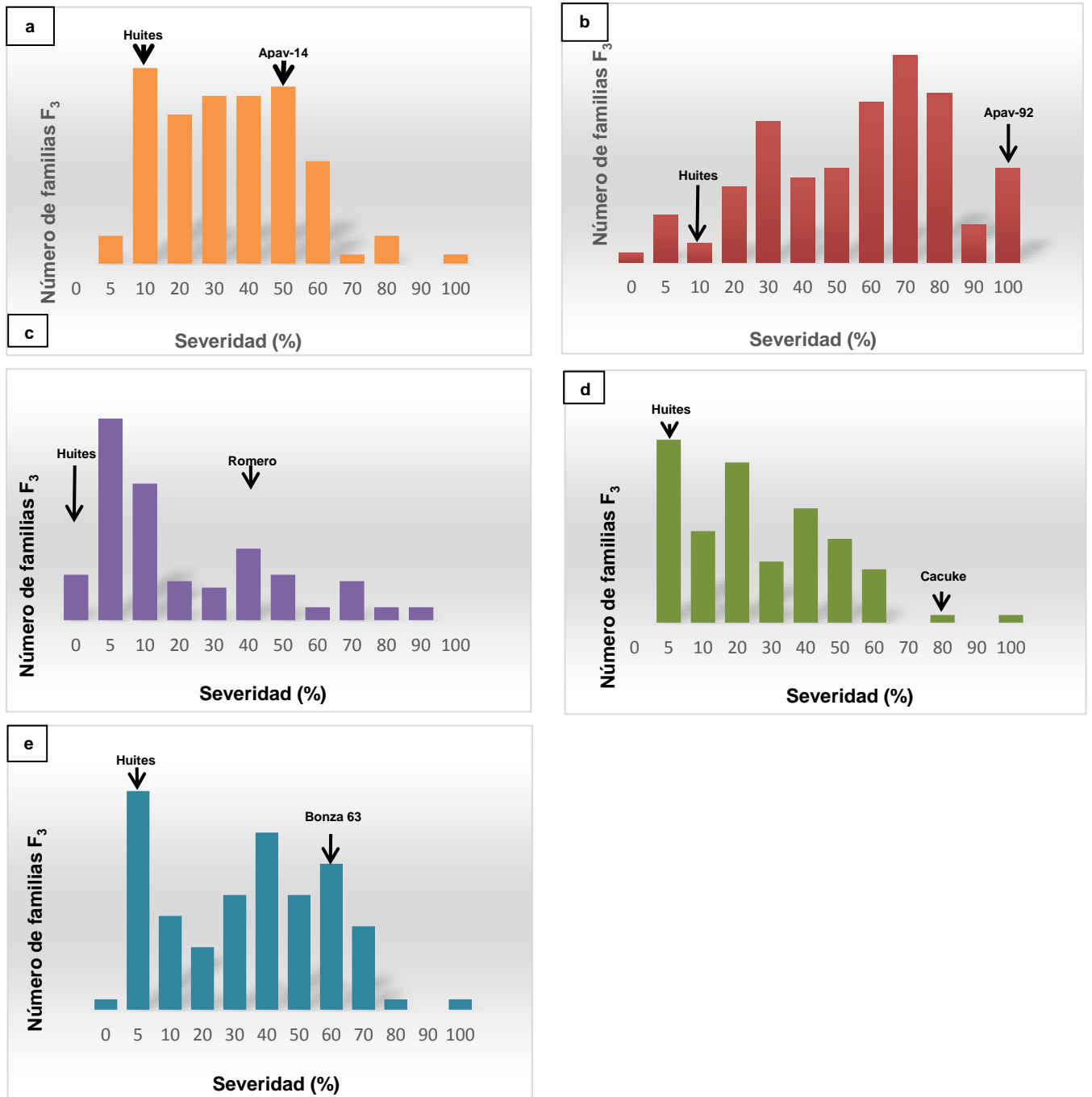


Figura 1. Número de familias F₃ con diferentes porcentajes de severidad producto de cruces de las variedades de trigo harinero ‘Apav-14’ x ‘Huites’ (a), ‘Apav-92’ x ‘Huites’ (b), ‘Huites’ x ‘Romero’ (c), ‘Huites’ x ‘Bonza 63’ (d) y ‘Huites’ x ‘Cacuke’ (e) en el Campo Experimental Valle de México-INIFAP PV/2013.

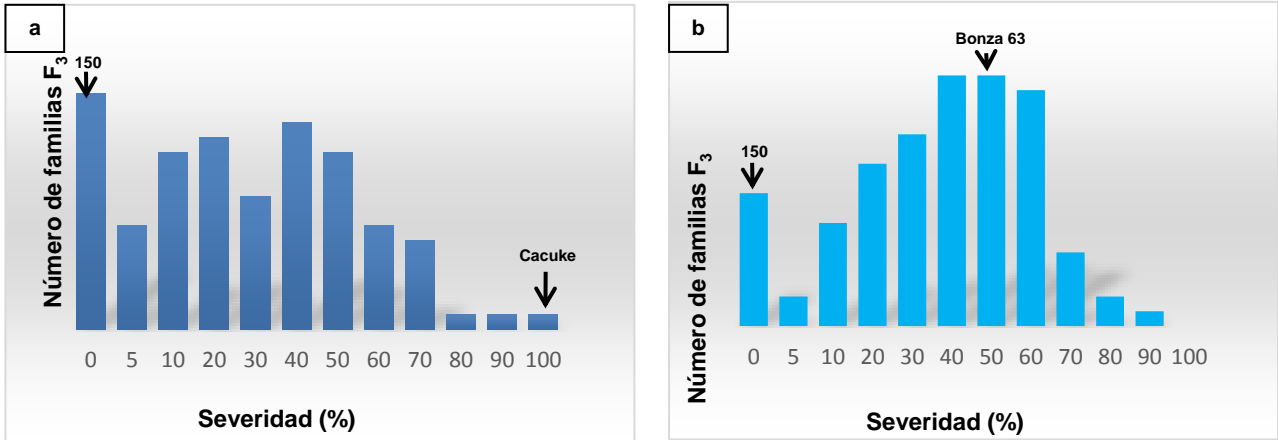


Figura 2. Número de familias F₃ con diferentes porcentajes de severidad producto de cruces de las variedades de trigo harinero ‘150’ x ‘Bonza 63’ (a) y ‘150’ x ‘Cacuke’ (b). en el Campo Experimental Valle de México-INIFAP PV/2013.

En la figura 1 y 2 se presenta la distribución de las familias F₃, para cada una de las siete cruces ‘Apav-14’ x ‘Huites’, ‘Apav-92’ x ‘Huites’, ‘Huites’ x ‘Romero’, ‘Huites’ x ‘Bonza 63’, ‘Huites’ x ‘Cacuke’, ‘150’ x ‘Bonza 63’ y ‘150’ x ‘Cacuke’, el número de genes que condicionan la resistencia en cada variedad y la prueba de X²; las distribuciones observadas se ajustan a la segregación de tres o cuatro genes de efectos menores, según la raza.

La distribución continua de las familias F₃ en cuanto al nivel promedio de la enfermedad, muestra que las familias homocigóticas resistentes en la (Figura 1a) superan el nivel de resistencia que el progenitor resistente, existiendo segregación transgresiva, sin embargo el número de familias susceptibles es muy bajo por lo que los progenitores podrían tener un gen en común o talvez el tamaño de la población es muy pequeño para poder observar el número de genes involucrados.

En el Cuadro 2, se muestra la severidad de la raza RTR en planta adulta de cada progenitor. ‘Apav-14’ tuvo un porcentaje intermedio de severidad (40 %), mientras que el progenitor ‘Apav-92’ alcanzó el 100 % de severidad.

Cuadro 2. Porcentaje de infección en la hoja bandera de los progenitores a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* raza RTR cuando el testigo susceptible alcanzó el 100 % de severidad, Chapingo, México 2013.

Progenitor	Respuesta (%)
'Huites M-95'	10
'Apav-92'	100
'Apav-14'	40
'Romero'	40
'Bonza 63'	70
'Cacuke'	80
'150'	0

Los progenitores 'Huites' y '150' mostraron los niveles más bajos de severidad a la raza RTR de 10 y 0 %, respectivamente.

Genética de los cruzamientos con el progenitor 'Huites'

Las frecuencias observadas y esperadas, el número de genes que condicionan la resistencia y la prueba de X^2 en las cruza se observan en el Cuadro 3.

En el cruzamiento de 'Apav-92' x 'Huites'; las proporciones de 3:105:1, resistentes, segregantes y susceptibles, respectivamente, se observa que la resistencia de 'Huites' en planta adulta está condicionada por tres a cuatro genes de efecto aditivo, y en las frecuencias observadas en planta adulta de las cruza 'Apav-14' x 'Huites' 20:81:8, 'Huites' x 'Romero' de 18:77:2, 'Huites' x 'Bonza 63' de 31:66:1 y 'Huites' x 'Cacuke' de 25:73:0; resistentes, segregantes, susceptibles.

En la cruza de 'Huites' x 'Cacuke' se podría tener por lo menos un gen en común debido a que no se observaron familias homocigóticas susceptibles, además de que al analizar la distribución de frecuencias de los niveles de la enfermedad (Figura 1), las familias tienden a la resistencia, lo que evidencia la presencia de 3 genes de efecto aditivo, posiblemente provenientes de 'Huites'.

En los cruzamientos de 'Huites' x 'Romero' y 'Huites' x 'Bonza 63' el nivel de infección de la enfermedad se relacionó con lo obtenido por Harder (1999), quien demostró que la presencia de 2 a 3 genes de efecto aditivo que contribuyen hacia mayores niveles de resistencia. De acuerdo al análisis génico de éstos progenitores se detectó la presencia del gen *Sr58* en 'Bonza 63' y el gen *Sr57* en 'Romero' cual se detectó por medio de un marcador morfológico, es decir se observó la presencia de necrosis en la punta de la hoja, lo cual coincide con los estudios por Rouse *et al.* (2014), en el que demostraron que el gen *Sr57* confiere resistencia a *Pgt*. Aunado a esto, también se detectó la presencia de un melanismo en la base de las espiguillas y en los entrenudos de los tallos mejor conocido como *Pseudo-black chaff*, marcador morfológico ligado al gen *Sr2*, el cual coincide con lo demostrado por Faris *et al.* (2008), quienes observaron altos niveles de resistencia en contra de la roya del tallo en las familias derivadas con las cruas del progenitor 'Cacuke'.

Genética de los cruzamientos con el progenitor '150'.

En el cruzamiento de '150' x 'Bonza 63', se observó que 'Bonza 63' es susceptible en campo ya que alcanzó niveles de 70 % de severidad sin embargo el progenitor '150' presentó niveles de 0 % de severidad; al analizar las familias observamos que existió una proporción de 8:81:0, con ninguna familia susceptible y con una distribución que tiende a mayor número de familias segregantes, postulando la presencia de 2 genes de efecto aditivo proveniente del progenitor '150' el cual presenta el gen *Sr58* y un gen de 'Bonza 63'; sin embargo, existen familias con niveles de severidad del 0 %, lo cual puede deberse a que tienen un gen en común o existe segregación transgresiva.

En '150' x 'Cacuke' se presenta una distribución similar a '150' x 'Bonza 63', ya que tiende a la resistencia, y con solo una familia homocigótica susceptible como el progenitor susceptible, comprobando la presencia de 2 genes de '150' y uno de 'Cacuke'.

Cuadro 3. Distribución y frecuencias observadas y esperadas de familias F₃ de las cruzas con los progenitores ‘Huites’ y ‘150’.

Cruza	Total fam. F ₃	Res	Seg	Susc	Núm. genes	χ ²
‘Apav-92’ x ‘Huites’	119	3	105	1	3 4	3.614
‘Apav-14’ x ‘Huites’	109	20	81	8	3	0.813
‘Huites’ x ‘Romero’	98	76	21	1	3	0.039
‘Huites’ x ‘Cacuke’	98	25	73	0	3	0.039
‘Huites’ x ‘Bonza 63’	98	88	9	1	3	0.039
‘150’ x ‘Bonza 63’	98	8	81	0	3	0.036
‘150’ x ‘Cacuke’	98	15	82	1	3	0.039

Res= Resistentes observados, Seg= Segregantes observados, Susceptibles observados.

2 gl, α =0.05, X²_t =5.9

La resistencia no específica ofrece una opción de resistencia durable en trigo, pero su desarrollo es complicado debido a que dicha resistencia a menudo es enmascarada por genes epistáticos, es de herencia compleja y por tanto no se hereda fácilmente o se identifica en la progenie, en el presente estudio se identificó por medio de marcadores SNP la presencia del gen *Sr2*, *Sr57/Lr34* y *Sr58/Lr46*, genes de raza no específica en los genotipos utilizados como progenitores presentan al menos un gen APR que podría ser utilizado en algún programa de mejoramiento. Por medio de la hibridación podemos insertar varios genes favorables a líneas candidatas por medio del proceso de piramidación de genes.

Cuadro 4. Detección molecular de genes APR mediante el uso de marcadores moleculares SNPs

Genotipos	Sr57	Sr2	Sr58
Huites			X
Romero	X		X
Cacuke	X	X	X
150			X
Apav-14		X	X
Apav-92			
Bonza 63			X

Singh *et al.* (2008), determinaron la efectividad del gen *Sr2* para resistencia a *Ug99*, y postularon que éste gen tiene efecto aditivo para resistencia a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* cuando existe la presencia de 2 o 3 genes de efecto poligénico en conjunto.

En los Estados Unidos de América estudiaron la herencia de la resistencia a la roya del tallo en la variedad 'Waldron', mediante el análisis de la progenie F₃ derivada del cruzamiento con otras 13 líneas, de las cuales 6 contribuyeron con un gen de resistencia y las otras 7, con dos.

Villaseñor-Mir (2009) demostró que la presencia de más de tres genes de efecto aditivo en royas es deseable en todo programa de fitomejoramiento; en este sentido, la presencia de hasta tres genes de resistencia con efectos aditivos en el germoplasma de trigo es una ventaja, ya que podría considerarse como fuente genética para la formación de futuras variedades.

Para acumular más de tres genes aditivos quedaría la posibilidad de generar el entrecruzamiento o la combinación entre la variedad 'Huites' o '150' con

otras variedades que posean cierto grado de resistencia. Además, se ha demostrado que no existen efectos negativos en el rendimiento (Huerta-Espino y Singh, 2000; Villaseñor-Mir *et al.*, 2003).

Un análisis más detallado de la resistencia a la roya del tallo en poblaciones derivadas de 'Huites' y '150' podrían proporcionar a los fitomejoradores de trigo recursos genéticos valiosos para el desarrollo de variedades con niveles deseables de resistencia a royas, incluyendo *Ug99*. Sin embargo, ésta resistencia debe ser evaluada y confirmada a través del uso de marcadores moleculares y a la caracterización fenotípica de las líneas obtenidas en éste estudio o a través de la evaluación de las poblaciones en Kenia contra *Ug99*.

CONCLUSIONES

Se demostró que 'Huites' posee de tres a cuatro genes de efecto aditivo que confieren resistencia en los cruzamientos derivados de este progenitor, por lo cual puede ser utilizado para posteriores estudios.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de éste estudio.

Al proyecto denominado: Sistema de Mejoramiento genético para generar variedades de trigo resistentes a roya, de alto rendimiento y alta calidad para una producción sustentable en México. Numero 146788 financiado por el fondo sectorial SAGARPA-CONACYT. 2012-2017.

LITERATURA CITADA

- Anderson J. 1998. Marker Assisted Selection of Disease Resistance Genes in Wheat. *In*: Kolhi M. (ed). International Workshop on the Application of Biotechnologies to Wheat Breeding. INIA. La Estanzuela. 215-240 p.
- Barreras-Soto, M.A.1995. 'Huites F-95' y 'Choix M-95' Nuevas variedades de trigo harinero para Sinaloa. INIFAP, CIR-NOROESTE CEVAF. México. Folleto técnico Núm.12. pp: 4-7.

- Dreisigacker, S.; Tiwari, R.; Sheoran, S. 2013. Laboratory manual: ICAR-CIMMYT molecular breeding course in wheat. 36 pags. Haryana (India). ICAR. BMZ. CIMMYT.
- González, E. A., E. Solís-Moya y S. Wood. 2005. Impacto económico del mejoramiento genético del trigo en México: Variedad Salamanca S75. INIFAP-SAGARPA. pp: 23-30.
- FAO.Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.2014. Wheat Rust Disease Global Programme. Consultado en línea el 12 de diciembre de 2014 en: www.fao.org
- Harder D. E. 1999. Usefulness of gene *Pg10* as a source of stem rust resistance in oat breeding. *Phytopathology* 89: 1214- 1217.
- Huerta-Espino J., y R.P. Singh. 2000. Las royas del trigo. *In*: Villaseñor-Mir, H. E. y Espitia-Rangel E. (eds.). El Trigo de Temporal en México. SAGAR, INIFAP, CIR-CENTRO CEVAMEX. México. Libro técnico Núm.1. pp: 231-251.
- Infante G., S., y G. P. Zárate de Lara. 1998. Métodos Estadísticos: Un Enfoque Interdisciplinario. 2^{da} ed. Editorial Trillas. México, D. F. 643 p.
- Jin Y., R.P. Singh, R.W. Ward, R. Wanyera, M. Kinyua, P. Njau, T. Fetch, Z.A. Pretorius, and A. Yahyaoui. 2007. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease* 91:1096-1099.
- Jin, Y., L.J. Szabo, Z.A. Pretorius, R.P. Singh, R. Ward, and T. Fetch, Jr. 2008. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease* 92:923-926.
- Mariscal-Amaro, L. A., J. Huerta-Espino, E. E. Villaseñor-Mir, S. J. Leyva-Mir., S. Sandoval-Islas y I. Benítez-Riquelme. 2009. Genética de la resistencia a roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae* Erikss. & Henning) en tres genotipos de avena (*Avena sativa* L.). *Agrociencia* 43: 869-879.
- McIntosh, R. A., C. R. Wellings and R. F. Park.1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRO Publications, East Melbourne, Victoria. Australia. 200 p.

- Singh, R. P. and J. H. Dubin. 1997. Sustainable control of wheat diseases in Mexico. *In: Mem. First International Wheat Symposium. Cd. Obregon, Sonora, Mexico. pp: 93-103.*
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino, and A. P. Roelfs. 2002. The wheat rust. *In: Bread Wheat. Curtis, B.C., S. Rajaram, M. H. Gomez (eds). FAO. Roma, Italia. pp: 246-271.*
- Singh, P.R., D.P., Hodson, J. Huerta-Espino, Y. Jin, S. Bhavani, N. Njau, S. Herrera-Foeseel, P.K. S. Bhavani, D. Singh, and P.K. Singh. 2008. Adult plant resistance in wheat to Ug99 race of stem rust and its utilization. *In: International conference on wheat Stem Rust-A threat to food security. Huerta-Espino, J., K. V. Prabhu, and A. M. Singh. (eds). Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India. pp: 28-32.*
- Singh, P.R., D.P., Hodson, J. Huerta-Espino, Y. Jin, S. Bhavani, N. Njau, S. Herrera-Foeseel, P.K. Singh, S. Singh, and V. Govindan. 2011. The emergence of ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annual Review of Phytopathology 49: 465-481.*
- USDA. 2014. Wheat Stem Rust. . United States Department of Agriculture. Consultado en línea el 12 de diciembre de 2014 en <http://www.usda.gov>
- Rajaram, S., R.P. Singh, and E. Torres. 1988. Current CIMMYT approaches in breeding wheat for rust resistance. *In: Simmonds, N.W. and S. Rajaram (eds.). Breeding Strategies for Resistance to The Rust of Wheat for Rust Resistance. Mexico, D.F., CIMMYT. Pp 101-118.*
- Riede, C. R., N.D. Williams, and J.D. Miller. 1994. Wheat lines monogenic for resistance to stem rust from the wheat cultivar 'Waldron'. *Theoretical and Applied Genetics. 90: 1164-1168.*
- Rouse, M. N., J.H. Nirmala, Y. Jin, S. Chao, T.G. Fetch, Z. Pretorius, and C. Hiebert. 2014. Characterization of Sr9h, a Ug99-resistant allele of wheat stem rust resistance gene Sr9, and coupling to Sr28 on chromosome arm 2BL. *Journal of Theoretical and Applied Genetics. 127: 1681-1688.*

- Singh, R.P. 1991. Pathogenicity variations of *Puccinia recóndita* f.sp. *tritici* and *P.graminis* f.sp. *tritici* in wheat-growing areas of México during 1988 and 1989. *Plant Disease* 75: 790-794.
- Villaseñor-Espin, O. M, J. Huerta-Espino, S. G. Leyva-Mir, H.E. Villaseñor-Mir, R. Singh, S. Sandoval-Islas y E. Espitia-Rangel. 2009. Genética de la resistencia a roya amarilla en plantas adultas de trigo harinero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 217-223.
- Villaseñor-Mir, H. E. 2006. Estrategia para la liberación de variedades de trigo en México. *In: Memoria de resúmenes del XXI Congreso Nacional y I Internacional de Fitogenética. Del 3 al 8 de septiembre del 2006, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. p.46.*

CAPÍTULO II: ESTUDIO DE RESISTENCIA EN PLÁNTULA A *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* EN INVERNADERO.

INTRODUCCIÓN

La roya del tallo del trigo causada por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, es considerada la enfermedad más devastadora del cultivo por los daños que ocasiona, disminuyendo el rendimiento y peso de grano del 30, 50 y 100 % en variedades susceptibles (Mariscal *et al.*, 2010). La resistencia del trigo a *P. graminis* está condicionada por factores genéticos, tanto del hospedante como del patógeno que actúan en una interacción gen por gen, lo que implica que por cada gen de resistencia en una variedad, existe un gen de avirulencia en el patógeno (Huerta-Espino *et al.*, 2002). Para un uso más eficiente de las fuentes de resistencia que posee el germoplasma de trigo es necesario conocer su tipo de herencia, en este caso en particular, el número de genes que la condicionan.

Desde la detección de una nueva raza de *P.g.t.* en el año 1999 en África hasta la fecha el patógeno ha evolucionado en 12 variantes diferentes, emigrando a 4 continentes en poco tiempo, causando grandes pérdidas a la producción global de trigo. La inminente amenaza hacia la seguridad alimentaria ante la presencia de éste patógeno es alarmante, por ello grupos multidisciplinarios en cada país se han dado a la tarea de buscar nuevas fuentes de resistencia en parientes silvestres y variedades ancestrales.

En la mayoría de las variedades liberadas en México, actualmente se conocen los genes que les confirieron resistencia a las razas que conforman la población de *P.g.t.* sin embargo se necesitan realizar estudios para conocer que genes poseen algunas otras variedades o germoplasma que se desean introducir a un programa de mejoramiento, permite identificar los genes de resistencia que aún permanecen efectivos contra el patógeno así como identificar los genes que serán efectivos cuando se detecten nuevas razas. Por otra parte, también es una herramienta valiosa para tomar decisiones sobre el tipo de resistencia genética más conveniente a utilizar su resistencia de plántula o resistencia de planta adulta,

ésta última se considera como la más efectiva y conveniente dentro del control genético de este patógeno, ya que las pérdidas en rendimiento llegan a ser insignificantes y porque se piensa que se establece una relación de convivencia entre la especie hospedante y el patógeno, presumiblemente de tipo durable (Huerta-Espino *et al.*, 2010).

El objetivo del estudio fue determinar el número de genes de resistencia en plántula en familias F₃ de cruza entre el progenitor 'Huites' con los progenitores 'Apav-14', 'apav-92', 'Romero' y 'Cacuke'; por su importancia para los programas de mejoramiento como fuentes de resistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

Se estudiaron familias F₃ derivadas de los cruzamientos de 'Huites' x 'Apav-14', 'Huites' x 'Apav-92', 'Huites' x 'Romero', 'Huites' x 'Cacuke', variedades de trigo harinero con genoma AABBDD (Huerta y González, 2000).

Manejo experimental e inoculación

Se sembraron 20 charolas con la variedad susceptible 'Noio' para el incremento de inóculo. A los 5 días después de la siembra, las plántulas se trataron con ácido maleíco (MH*) para regular su crecimiento y se inocularon artificialmente a los 8 días con una suspensión de urediniosporas en aceite mineral Soltrol, la raza RTR fue proporcionada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. La colecta del inóculo se realizó a los 10 días utilizando un colector manual conectado a una aspiradora, y posteriormente dicho inóculo se almacenó a 4° C para su inmediata utilización.

Pruebas en invernadero

La prueba de plántula se realizó en el Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades del Trigo (LANARET), en el CEVAMEX-INIFAP, Estado de México.

Cada familia F₃ se sembró en charolas con ocho hileras y seis columnas, con capacidad para 48 entradas. Al inicio de cada familia se sembraron los dos progenitores para la toma de notas. Diez días después de la siembra o cuando la segunda hoja se encontrara completamente extendida se inocularon con urediniosporas de la raza RTR. Las plántulas inoculadas se secaron por 20 min y se trasladaron a una cámara de incubación a 20° C y a un humidificador al 100 % de HR por 8 horas; después se trasladaron al invernadero (24–30 °C).

Diez días después de la inoculación se evaluaron los tipos de infección de los progenitores aplicando una escala de 0 a 4, de acuerdo con Stakman *et al.* (1962); los fenotipos con el tipo de infección de 0 a 2 o 2+ se clasifican como resistentes y con 3 a 4 como susceptibles.

Toma de datos

Cuando el progenitor susceptible mostró una infección de 4 en la escala del 0-4 (Figura 1), 10 días después de la inoculación, comenzó la evaluación de las familias clasificándolas en resistentes, segregantes y susceptibles.

Análisis de datos y pruebas estadísticas

Las frecuencias esperadas de las familias F₃ en plántula es el supuesto de que la resistencia es condicionada por uno o dos genes mayores y se usan las frecuencias de las familias homocigóticas susceptibles para determinar el número de genes de resistencia, basándose en la proporción 1:2:1 (Resistentes: Segregantes: Susceptibles) para un gen dominante y 13:3 para un gen dominante y un gen recesivo (Gardner *et al.*, 1998). Se realizaron las pruebas X² con las frecuencias observadas y esperadas. El valor de tablas y la significancia fue determinado de acuerdo al valor de X² que obtuvieron las proporciones. Para el valor de tablas se tomaron 2 grados de libertad ($n-1$), donde n es el número de grupos de clasificación de familias F₃ (Infante y Zárate de Lara, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En estado de plántula en invernadero, el progenitor 'Huites' tuvo como lectura (; ,1), indicando su resistencia ante el aislamiento de *P.g.t.* raza RTR y los progenitores 'Apav-14', 'Apav-92', 'Romero' y 'Cacuke', tuvieron (2+), (4), (4) y (4) respectivamente. El progenitor '150' no fue utilizado en este estudio debido a que en la evaluación previa de los progenitores mostró susceptibilidad correspondiente a un nivel 4 en la escala.

En plántula 'Huites' x 'Apav-92', 'Huites' x 'Apav-14' y 'Huites' x 'Cacuke' obtuvieron frecuencias 33:66:19, 20:59:24, 45:42:11 resistentes: segregantes: susceptibles respectivamente; éstas frecuencias se ajustaron a la relación 1:2:1 y 3:1, por lo que se confirma que el progenitor resistente posee un gen mayor de dominancia completa.

Cuadro 1. Evaluación en plántula de las frecuencias observadas y esperadas de familias F₃ de las cruzas con el progenitor 'Huites'.

Cruza	Res	Seg	Susc	Núm. Genes	X ²
'Apav-92' X 'Huites'	33	66	19	1:2:1	3.58
'Apav-14' X 'Huites'	20	59	24	1:2:1	0.77
'Huites' X 'Romero'	45	42	11	13:03	0.039
'Huites' X 'Cacuke'	35	46	17	81:17	0.039

2 gl, $\alpha = 0.05$, $X^2 t = 5.99$

La resistencia en plántula fue eficaz hasta planta adulta ya que las frecuencias observadas se ajustaron a la misma relación fenotípica en ambas etapas. Además, la resistencia en este patosistema tiene características en común como lo es el caso de la roya de la hoja en trigo, donde la resistencia está dada en su mayoría por uno o dos genes teniendo una acción génica principalmente dominante.

Hiebert *et al.* (2010), estudiaron la genética de la resistencia en plántula a *Ug99* en variedades de trigo canadienses 'Peace' y 'AC Cadillac' en poblaciones segregantes F_{2:3} donde detectaron el efecto del gen designado *SrCad* en

moderado efecto para resistencia a *Ug99* cuando se presenta solo y con altos niveles de resistencia cuando se presenta el gen de planta adulta *Lr34*.

El gen *Sr25*, gen de raza específica, fue transferido en Australia al fondo genético del trigo confiriendo altos niveles de resistencia a *Pgt* raza TTKSK, especialmente cuando el gen *Sr2* de planta adulta se encontraba presente (Knott, 1982; Jain *et al.* 2009).

En un estudio realizado por Cheruiyot *et al.* (2015), utilizaron cuatro genotipos para evaluar su resistencia en plántula y en planta adulta en cruzamientos, donde evalúan la variedad 'Cacuke' como progenitor susceptible a *Ug99* (TTKSK + *Sr24*), demostrando que la resistencia de plántula se debe utilizar como base del mejoramiento ya que muestra total protección al cultivo contra la roya.

Los genes *Sr22* y *Sr35* derivados de *Triticum monococcum* muestran altos niveles de efectividad en contra de *Ug99* y pueden ser utilizados en los programas de cruzamiento de trigo a nivel mundial (Singh, 2011).

En 'Huites' x 'Romero' en el análisis en invernadero se observó una proporción de 45:42:11 resistentes: segregantes: susceptibles respectivamente, ajustándose a la proporción 13:3 para dos genes un dominante y un recesivo. Mariscal (2010) menciona que la proporción 13:3 es común en estudios de resistencia a *P. graminis* en *Avena sativa* en estudios de resistencia en plántula en familias F₃.

CONCLUSIONES

En los tres genotipos estudiados, la genética de la resistencia en plántula a la roya del tallo del trigo es de herencia simple y está condicionada por uno a dos genes. El tipo de acción génica en 3 cruzamientos fue dominante, excepto en 'Huites' x 'Romero' que se observó que fue un gen dominante y un recesivo. Se demostró que 'Huites' presenta un gen dominante.

LITERATURA CITADA

- Luis Antonio Mariscal Amaro, Julio Huerta Espino, Héctor Eduardo Villaseñor Mir, Santos Gerardo Leyva Mir, Sergio Sandoval Islas e Ignacio Benítez Riquelme. 2010. Prueba de similitud en genes con resistencia a roya del tallo en genotipos de avena. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol. 1 No. 4 p. 542-554.
- Hiebert, C.W., T.G. Fetch, Zegeye T. Thomas J.B., Somers D.J. 2010. Genetics and mapping of seedling resistance to Ug99 stem rust in Canadian wheat cultivars 'Peace' and 'AC Cadillac'. *Theor. Appl. Genet.* 121:1083-1091.
- Huerta, E.J., Villasenor, M.H.E., Espitia, R.E., Leyva, M.S.G., Singh, R.P. 2002. Análisis de la resistencia a la roya de la hoja en trigos harineros para temporal. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25:161-169.
- M. Florencia Rodríguez-García, Julio Huerta-Espino, Héctor E. Villaseñor-Mir, José Sergio Sandoval-Islas y Ravi P. Singh. 2010. Análisis de virulencia de la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en los Valles Altos de México. *Agrociencia* 44: 491-502.

CONCLUSIONES GENERALES

En planta adulta:

- ✓ la genética en el cruzamientos de 'Huites' x 'Apav-92' son de 3 a 4 genes de efecto aditivo que están condicionando la resistencia de desarrollo lento, en 'Huites' x 'Apav-14', 'Huites' x 'Romero 73', 'Huites' x 'Bonza 63' y 'Huites' x 'Cacuke' son 3 genes de efecto aditivo los que condicionan la resistencia.
- ✓ En el cruzamiento '150' x 'Bonza 73' y '150' x 'Cacuke', 3 genes de efecto aditivo están condicionando la resistencia.
- ✓ Se observó la presencia de marcadores morfológicos como la necrosis de la punta de la hoja (*Ltn*) y melanismo de la base de las espigas (*PBC*) asociados a los genes *Sr57* y *Sr2*.

En plántula:

- ✓ No se evaluaron las familias derivadas de los cruzamientos con el progenitor '150'.
- a) En 'Huites' x 'Apav-14' y 'Huites' x 'Apav-92' la proporción se ajusta a 1:2:1, evidencia de un gen mayor con dominancia completa.
- b) En 'Huites' x 'Cacuke', se ajusta a un gen con dominancia completa, ajustándose a la proporción 3:1.
- c) 'Huites' x 'Romero' se ajusta a la proporción 13:3 con dos genes: 1 dominante y 1 recesivo.