



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA**

**ESTUDIO DE LA GENÉTICA DE LA RESISTENCIA DE
VARIETADES DE TRIGO, A ROYA AMARILLA (*Puccinia
striiformis* f. sp. *tritici*) Y ROYA DE LA HOJA (*Puccinia
triticina* Ericks.)**

LUIS JONATAN PONCE MOLINA

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

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: Estudio de la genética de la resistencia de variedades de trigo, a roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) y roya de la hoja (*Puccinia triticina* Ericks) realizada por el alumno: Luis Jonatan Ponce Molina, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



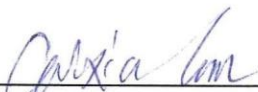
DR. VICTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

DIRECTOR



DR. JULIO HUERTA ESPINO

ASESOR



DRA. CAIXIA LAN

ASESOR



DR. GREGORIO ALVARADO BELTRÁN

ASESOR



DR. RICARDO LOBATO ORTIZ

ASESOR



DR. J. JESÚS GARCÍA ZAVALA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 31 de julio de 2017

ESTUDIO DE LA GENÉTICA DE LA RESISTENCIA DE VARIEDADES DE TRIGO, A
ROYA AMARILLA (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) Y ROYA DE LA HOJA (*Puccinia
triticina* Ericks.)

Luis Jonatan Ponce Molina, Dr
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Las royas son las enfermedades más importantes en el cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.), porque reducen el rendimiento más de un 60%. Cultivar variedades resistentes es el método más económico y efectivo para controlar estas enfermedades. En la presente investigación la genética de la resistencia a roya de la hoja y roya amarilla fue investigada para dos poblaciones F5 de líneas endogámicas recombinantes (RIL), la primera derivada de la cruce entre 'Avocet' y 'Chilero', y la segunda de la cruce 'Avocet' y 'New Pusa 876' (NP876). Además, se realizó la postulación e identificación de genes de roya de la hoja y del tallo usando 75 líneas de origen mexicano.

'Chilero' es una línea desarrollada por el CIMMYT y ha mostrado altos niveles de resistencia a roya de la hoja y roya amarilla desde su distribución en 1984. La base genética de su resistencia fue investigada en una población de 96 RIL. Los parentales y las RIL fueron caracterizadas para roya de la hoja y roya amarilla en campo desde el 2012 al 2015 en tres localidades de México. La población de RIL fue genotipada con marcadores DArT-array, DArT-GBS y SSR. Un total de 6,168 marcadores polimórficos se usaron para construir el mapa de ligamiento genético. El mapeo de intervalos compuestos detectó cuatro *loci* de resistencia co-localizados para ambas royas así como dos *loci* de resistencia a roya amarilla. Entre estos, un QTL en el cromosoma

1BL que es el conocido gene de resistencia de planta adulta (RPA) *Lr46/Yr29*, además el *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* un nuevo *loci* co-localizado de resistencia para ambas enfermedades. De igual manera, un nuevo *locus* de resistencia a roya amarilla en el cromosoma 7BL fue mapeado en esta población.

Por otra parte, la genética de la resistencia del cultivar Indio NP876 fue estudiada en 148 RIL. Los parentales y la población fueron fenotipados en ensayos de campo por tres y dos años, para resistencia a roya de la hoja y roya amarilla, respectivamente, y genotipados con marcadores moleculares ligados a genes conocidos. El análisis de segregación indicó que la resistencia de planta adulta (RPA) a roya de la hoja y roya amarilla es conferida por cinco y cuatro genes de efecto aditivo, respectivamente. Entre ellos, el gen *Lr46/Yr29* que reduce 14% y 16% la severidad media de roya de la hoja y roya amarilla, respectivamente, en tanto que una reducción del 26% ocurre debido al gen *Lr67/Yr46* para ambas enfermedades. Un efecto aditivo positivo entre los genes de roya de la hoja *Lr46* y *Lr67* fue detectado, este efecto reduce hasta 11% la severidad cuando están juntos. La aditividad para roya amarilla entre *Yr29* y *Yr46* fue positiva pero no significativa, por lo que la severidad media se reduce en 5%.

El estudio de postulación de genes de resistencia de roya de la hoja y del tallo mostró que las 75 líneas de origen mexicano poseen un total de siete genes de plántula para roya de la hoja: *Lr1*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr23* y *Lr26*. Adicionalmente, *Lr27* y *Lr34* fueron identificados usando marcadores moleculares. Además, se postularon usando diferentes razas, tres genes de resistencia en plántula para roya del tallo (*Sr7a*, *Sr8a* y *Sr11*) y se identificaron cuatro genes de resistencia

(*Sr2*, *Sr12*, *Sr31* y *Sr57*) empleando marcadores moleculares. Las líneas portan estos genes ya sean solos o combinando más de dos genes. Se identificó seis líneas que portan genes de resistencia a roya de la hoja desconocidos, tres de los cuales portan un gen con una reacción similar al gen *Lr28*.

Palabras Clave: Resistencia de planta adulta, mapeo de QTL, análisis genético, aditividad, postulación de genes, roya de la hoja, roya amarilla, roya del tallo, *Triticum aestivum* L.

GENETIC ANALYSIS OF ADULT PLANT RESISTANCE TO STRIPE RUST (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) AND LEAF RUST (*Puccinia triticina* Ericks.) IN COMMON WHEAT

Luis Jonatan Ponce Molina, PhD
Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Rusts are the most important diseases to affect wheat production (*Triticum aestivum* L.), causing more than 60% on yield losses. Growing resistant varieties is the most effective and economical method for controlling those diseases. Genetics resistance of leaf rust and stripe rust were investigated in two F5 recombinant inbred lines (RIL) populations respectively derived from a cross between 'Avocet' and 'Chilero' and a cross of 'Avocet' and 'New Pusa 876' (NP876). In addition, a gene postulation analyses and identification was conducted using 75 Mexican lines.

'Chilero' is a line developed by CIMMYT and has shown high levels of resistance to leaf rust and stripe rust since its development in 1984. The genetic basis of its resistance was investigated in a 96 RIL population. The parents and RIL were characterized in field trials for resistance to leaf rust and stripe rust at three locations in Mexico from 2012 to 2015. RIL population was genotyped with DArT-array, DArT-GBS and SSR markers. A total of 6,168 polymorphic markers were used to construct genetic linkage maps. Inclusive composite interval mapping detected four co-located resistance loci to both rusts as well as two stripe rust resistant loci. Among these, QTL on chromosome 1BL was the known pleiotropic adult plant resistance (APR) gene *Lr46/Yr29*, whereas *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* was a new co-located resistance loci to

both rusts in Chilero. Additionally, one new stripe rust resistance locus on chromosome 7BL was mapped in the present population.

On the other hand, the genetics of the resistance of the Indian cultivar NP876 was studied in 148 RILs. The parents and the RIL population were phenotyped for resistance in field trials for three and two years for leaf rust and stripe rust, respectively, and genotyped with the known gene-linked molecular markers. The segregation analyses indicated that the adult plant resistance (APR) to leaf rust and stripe rust was conferred by five and four additive effect genes, respectively. Among them, the slow-rusting APR gene *Lr46/Yr29* reduced 14% and 16% of mean leaf rust and stripe rust severities, respectively, whereas a severity reduction of 26% occurred due to *Lr67/Yr46* for both rusts. Both resistance genes were contributed by NP876. A positive additivity effect between leaf rust resistance genes *Lr46* and *Lr67* was detected with a reduction up to 11% when they were present together. The additivity for stripe rust between *Yr29* and *Yr46* was positive but not significant with a mean reduction of 5% in severity.

Leaf rust and stem rust resistance gene postulation study showed that a total of seven leaf rust seedling resistance genes, viz. *Lr1*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr23* and *Lr26* have been speculated among 75 Mexican wheat lines. In addition, *Lr27* and *Lr34* were identified based on molecular markers. Furthermore, three stem rust seedling resistance genes (*Sr7a*, *Sr8a* and *Sr11*) postulated by difference races and four resistance genes (*Sr2*, *Sr12*, *Sr31* and *Sr57*) identified by closely linked molecular markers. The lines either carries single resistance gene or combines more than two

genes. Six lines carrying unknown leaf rust resistance genes was identified, three of them with a gene reaction similar to *Lr28*.

Keywords: Adult plant resistance, QTL mapping, genetic analyses, additivity, gene postulation, leaf rust, stripe rust, stem rust, *Triticum aestivum* L.

DEDICATORIA

A Dios en primer lugar, por la vida, la salud y todas sus bendiciones.

A mi amada esposa quien ha sido mi apoyo y fortaleza en esta travesía, por estar a mi lado brindándome su amor incondicional, cuidado, comprensión y ánimo día a día.

A mi hijo, que es un regalo del cielo, quien me transmite su alegría y energía en cada sonrisa.

A mis padres, por enseñarme el buen camino.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT-Ecuador), al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP-Ecuador), al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y a la Universidad de Minnesota-CDL-USDA, quienes de una u otra manera contribuyeron con el financiamiento y la culminación de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
CAPÍTULO I. INTRODUCCION GENERAL.....	1
Importancia.....	1
Origen.....	2
Taxonomía.....	3
Características botánicas.....	4
Etapas de desarrollo del cultivo.....	5
Las royas del trigo.....	6
Resistencia a royas.....	8
Tipos de acción génica.....	13
Base genética de la resistencia.....	14
Objetivos.....	23
Bibliografía.....	23
CAPÍTULO II. CHARACTERIZATION OF LEAF RUST AND STRIPE RUST RESISTANCE IN SPRING WHEAT ‘CHILERO’.....	31
Resumen.....	32
Abstract.....	33
Introduction.....	34
Materials and Methods.....	36
Results.....	40
Discussion.....	51
Acknowledgements.....	57
References.....	57
CAPÍTULO III. CHARACTERIZATION OF ADULT PLANT RESISTANCE TO LEAF RUST AND STRIPE RUST IN INDIAN WHEAT CULTIVAR ‘NEW PUSA 876’.....	63

Resumen.....	64
Abstract.....	65
Introduction.....	66
Materials and Methods.....	69
Results.....	72
Discussion.....	82
Conclusion.....	85
Acknowledgments.....	86
References.....	86
CAPÍTULO IV. POSTULACIÓN E IDENTIFICACION DE GENES DE RESISTENCIA A ROYA DEL TALLO Y ROYA DE LA HOJA EN GERMOPLASMA MEXICANO DE TRIGO HARINERO.....	91
Resumen.....	92
Abstract.....	93
Introducción.....	94
Materiales y Métodos.....	96
Resultados.....	101
Discusión.....	112
Referencias.....	115
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES.....	118

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I. INTRODUCCION GENERAL	
Figura 1. Origen del trigo hexaploide.....	3
CAPÍTULO II. CHARACTERIZATION OF LEAF RUST AND STRIPE RUST RESISTANCE IN SPRING WHEAT ‘CHILERO’	
Figure 1. Frequency distribution of the recombinant inbred lines (RILs) of the cross Avocet/Chilero	42
Figure 2. Graphics of quantitative trait loci (QTL) for adult plant resistance (APR) to leaf rust and stripe rust.....	46
Figure 3. Comparison of recombinant inbred lines (RILs) from Avocet/Chilero in the presence or absence QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS	50
CAPÍTULO III. CHARACTERIZATION OF ADULT PLANT RESISTANCE TO LEAF RUST AND STRIPE RUST IN INDIAN WHEAT CULTIVAR ‘NEW PUSA 876’	
Figure 1. Frequency distribution of the 148 Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) for leaf rust and stripe rust.....	74
Figure 2. Comparison of Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) for mean leaf rust and stripe rust severities in the presence or absence of two postulated resistance genes in field trials.	77
Figure 3. Frequency distribution of leaf rust and stripe rust severities for Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) carrying two genes.....	81
CAPÍTULO IV. POSTULACIÓN E IDENTIFICACION DE GENES DE RESISTENCIA A ROYA DEL TALLO Y ROYA DE LA HOJA EN GERMOPLASMA MEXICANO DE TRIGO HARINERO	
Figura 1. Identificación en líneas mexicanas del marcador CAPS <i>CsSr2</i> ligado al gene RPA <i>Sr2/Lr27</i>	106
Figura 2. Identificación en líneas mexicanas del marcador SSR <i>cssfr5</i> ligado al RPA <i>Lr34/Sr57</i>	106
Figura 3. Identificación en líneas mexicanas del marcador SSR <i>lag95</i> ligado al gene RPA <i>Sr31</i>	107
Figura 4. Discriminación alélica de las líneas de origen mexicano que llevan el gen de planta adulta <i>Sr12</i> , usando el marcador KASP NB-LRR3....	107

LISTA DE CUADROS

Página

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Cuadro 1. Etapas de desarrollo del cultivo de trigo según Feekes y Zadoks.....	5
Cuadro 2. Marcadores moleculares y sus principales características.....	18

CAPÍTULO II. CHARACTERIZATION OF LEAF RUST AND STRIPE RUST RESISTANCE IN SPRING WHEAT 'CHILERO'

Table 1. Estimation of the number of APR genes in a RIL population of Avocet × Chilero using Mendelian segregation analysis based on final disease severities in each environment and mean of leaf rust and stripe rust over four seasons of field evaluation (LRM and YRM).....	41
Table 2. Pearson's correlation coefficient between final disease severities of RILs in four environments for leaf rust (LR13Y, LR14Y, LR15Y and LR15B) and stripe rust (YR13M, YR14M, YR15M and YR15B).....	43
Table 3. Position and effects of quantitative trait loci (QTL) for adult plant resistance (APR) to leaf rust (LR) and stripe rust (YR) and final disease severity over all tested environments by using inclusive composite interval mapping (ICIM) by IciMapping 4.0 software in the RIL population (Avocet×Chilero).....	45
Table 4. Frequencies of Avocet × Chilero recombinant inbred lines (RILs) with resistance locus QLr.cim-5DS and QYr.cim-5DS, with their mean leaf rust and stripe rust severities, when resistance genes were absent or present.....	51

CAPÍTULO III. CHARACTERIZATION OF ADULT PLANT RESISTANCE TO LEAF RUST AND STRIPE RUST IN INDIAN WHEAT CULTIVAR 'NEW PUSA 876'

Table 1. Estimated minimum number of resistance genes using the Wright's formula based on severity phenotypes from three years of leaf rust and two years of stripe rust in Avocet/NP876 population.....	73
Table 2. Estimation of resistance genes numbers in the 148 F ₅ Avocet × NP876 RILs derived by using the Mendelian segregation analysis based on the final disease severity in each environment.....	75
Table 3. Phenotypic correlation between final disease severities of 148 F ₅ Avocet × NP876 RILs in the three environments for leaf rust (LRB2011,	

LRY2012 and LRY2013) and two environments for stripe rust (YR2011 and YR2012).....	76
Table 4. Additivity effect between slow-rusting adult plant resistance genes <i>Lr46</i> and <i>Lr67</i> on leaf rust in adult plant stage in Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) population.....	79
Table 5. Additivity effect between slow-rusting adult plant resistance genes <i>Yr29</i> and <i>Yr46</i> on stripe rust in adult plant stage in Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) population.....	80

CAPÍTULO IV. POSTULACIÓN E IDENTIFICACION DE GENES DE RESISTENCIA A ROYA DEL TALLO Y ROYA DE LA HOJA EN GERMOPLASMA MEXICANO DE TRIGO HARINERO

Cuadro 1. Tipos de reacción de 75 genotipos de trigo de origen mexicano (<i>Triticum aestivum</i>) en respuesta a 10 razas de roya del tallo.....	102
Cuadro 2. Tipos de reacción de las líneas isogénicas usadas como probadores o diferenciales con las 10 razas de roya del tallo (<i>Puccinia graminis</i>).....	104
Cuadro 3. Tipos de reacción de 75 genotipos de trigo de origen mexicano (<i>Triticum aestivum</i>) en respuesta a 10 razas de roya de la hoja.....	109
Cuadro 4. Tipos de reacción de las líneas isogénicas usadas como probadores o diferenciales con las 10 razas de roya de la hoja (<i>Puccinia triticina</i>).....	112

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia

La palabra “trigo” se deriva del latín *triticum*, que significa quebrado, triturado, trillado; haciendo referencia a la trilla que es la actividad que se debe realizar para separar el grano de la paja y cascarilla que lo recubre (Hernández, 2006). En otras palabras, *Triticum* significa, "grano que se debe trillar para ser consumido".

El trigo es sin duda la base de la alimentación de gran parte de la población mundial, convirtiéndose en un elemento de subsistencia de una gran proporción de la misma. Su consumo abarca a poblaciones tanto urbanas como rurales que han establecido sus dietas con base en este cereal.

El trigo, por su gran diversidad genética y adaptabilidad a un sin número de ambientes (desde el nivel del mar hasta los 3000 m), es el cereal más ampliamente cultivado. En el año 2014 el área cosechada a nivel mundial fue de 222 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2017), mientras que en el 2015 fue de alrededor de 224 millones de hectáreas y 221 millones de hectáreas en 2016 (USDA-ERS, 2017). Entre tanto, en México se han cultivado más de 713,000 ha/año con un rendimiento de 5.2 t/ha durante los últimos 10 años (<http://www.siap.gob.mx>).

A nivel mundial, alrededor del 75% y 15% del trigo se destina para consumo humano y consumo animal, respectivamente, mientras que el restante 10% se destina para semilla y uso industrial. (Ekboir y Morris, 2003)

Todos los cultivares modernos de trigo pertenecen básicamente a dos especies: (1) trigo harinero hexaploide, *Triticum aestivum* L. var. *aestivum* ($2n = 42$ cromosomas), y (2) trigo duro tetraploide, *Triticum turgidum* L. var. *durum* ($2n=28$).

Origen

No se conoce con precisión dónde y cuándo se originó el trigo, tal y como lo conocemos hoy. En 1883 De Candolle en sus estudios indica que el trigo es originario de Mesopotamia (región comprendida entre los ríos Tigris y Éufrates), entre tanto Vavilov en 1926 afirma que las especies del género *Triticum* han tenido su centro de diferenciación en Turquía, Afganistán y La India. Por otra parte, recientes investigaciones sostienen que el trigo tuvo su origen en la zona comprendida entre Asia Menor y Afganistán. (Moreno *et al.*, 2001)

La determinación de los orígenes del trigo ha conllevado a un estudio intensivo de las posibles afinidades genómicas de un gran número de especies del género *Triticum* y de géneros relacionados tales como *Aegilops* y *Haynaldia*, ambos pertenecientes a la tribu *Triticeae*. Dado que no se conoce un ancestro hexaploide del trigo, la hipótesis de la formación del trigo harinero hexaploide incluye: hibridaciones naturales, duplicaciones cromosómicas de diploide a tetraploide y de ésta a hexaploide, y procesos de domesticación (Holden *et al.*, 1993).

Según Petersen *et al.* (2006) el trigo harinero hexaploide se originó por la hibridación entre *Triticum urartu* Thum, donador del genoma A, y *Aegilops speltoides*, donador del genoma B. Luego de una duplicación espontánea de los cromosomas, el

híbrido AB dio origen a la especie tetraploide *Triticum turgidum* var. *dicoccum* (AABB). Posteriormente se produjo el cruzamiento entre esta especie y *Aegilops tauschii*, con genoma D, y al igual que el híbrido anterior, se duplicó espontáneamente y el híbrido ABD dio origen al trigo harinero *Triticum aestivum* L. (AABBDD), Figura 1.

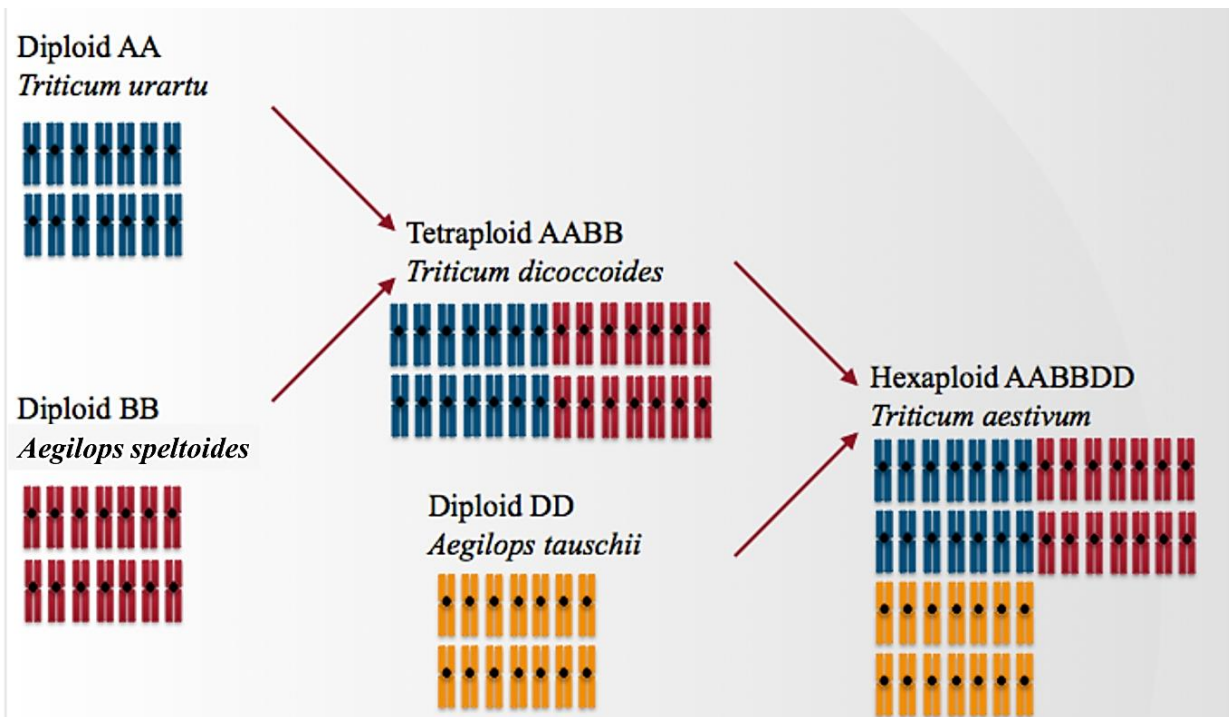


Figura 1. Origen del trigo hexaploide (cortesía Dr. Matthew Rouse).

Taxonomía de *Triticum aestivum* (L)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Tribu: Triticeae

Género: *Triticum*

Especie: *aestivum*

Nombre científico - *Triticum aestivum* (L)

Nombres comunes – trigo harinero; trigo de primavera; trigo panadero

Características botánicas

El trigo es una gramínea anual, su ciclo completo desde la siembra a la cosecha es de 4 a 10 meses, dependiendo de la región y la variedad que se cultive, es decir, si son variedades primaverales, facultativas o invernales.

Los trigos modernos alcanzan una altura que va de 60 a 120 cm, y su tallo es un rizoma corto que posee de cinco a siete nudos (Mathias, 2004). Las hojas son cintiformes, paralelinervas, constituidas de lámina, vaina, lígula y aurículas. Los tallos laterales o macollos, se forman a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas basales. Sus raíces son fasciculadas (Guerrero, 1999).

Este cereal es una planta monocotiledónea (Guerrero, 1999); su inflorescencia es una espiga terminal que consta de 15 a 20 espiguillas que nacen en un eje, cada espiguilla puede tener de 1 a 5 flores. Cada flor posee un ovario, tres estambres y dos lodículos (reguladores de la apertura de la flor en la antesis), encerrados por dos brácteas (lemma y paléa) (Mathias, 2004).

Por otro lado, esta gramínea es una planta de autopolinización, por lo que las anteras se abren antes de su salida, de los lodículos y brácteas, produciéndose la polinización cuando la flor está cerrada, sin embargo, existe una pequeña frecuencia de cruzamientos que no supera el uno por ciento (Allan, 1980). El fruto es una cariósida de forma ovalada y levemente curvado en su parte dorsal; el grano está formado por el embrión, escutelo, endospermo, nucelo y la testa (Ken y Evers, 1994).

Etapas de desarrollo del cultivo

Según Feekes las etapas de desarrollo del cultivo de trigo son 11, mientras que para Zadoks son 9 (Zadoks *et al.*, 1974; Miller, 1992), Cuadro 1.

Cuadro 1. Etapas de desarrollo del cultivo de trigo según Feekes y Zadoks

Escala Feekes	Etapas	Escala Zadoks	Etapas
1.0	Emergencia y formación del tallo principal	0	Germinación
		1	Producción de hojas del tallo principal (TP)
2.0	Comienzo del macollamiento	2	Producción de macollos
3.0	Macollos formados		
4.0	Comienzo del crecimiento erecto, alargamiento de vainas	3	Producción de nudos TP (encañado)
5.0	Vainas de hojas erectas		
6.0	Primer nudo visible		
7.0	Segundo nudo visible		

8.0	Hoja bandera visible		
9.0	Lígula de la hoja bandera visible		
10.0	Estado de bota	4	Vaina engrosada
	10.1 Aristas visibles		
	10.2 25% espigado	5	Espigado
	10.3 50% espigado		
	10.4 75% espigado	6	Antesis
	10.5 Espigazón completa, floración y cuajado		
11.0	Maduración	7	Estado lechoso del grano
	11.1 Grano lechoso		
	11.2 Grano pastoso	8	Estado pastoso del grano
	11.3 Grano duro		
	11.4 Cosecha	9	Madurez

Las royas del trigo

Las principales enfermedades que atacan al trigo provocando grandes pérdidas económicas en este cultivo son: la roya de la hoja, la roya amarilla y la roya del tallo.

Las royas son hongos de dispersión eólica en las que las esporas viajan arrastradas por el viento largas distancias, afectando la parte aérea de las plantas de trigo.

Roya de la hoja o roya café

La roya de hoja es causada por el hongo *Puccinia triticina* Eriks, es la enfermedad más difundida en el mundo, se encuentra en casi todas las regiones que se cultiva trigo, en general causa pérdidas del rendimiento del orden del 10%, sin embargo se han

reportado pérdidas superiores al 30% (Roelfs *et al.*, 1992). En el caso particular de México, bajo alta presión del patógeno se han reportado una disminución del rendimiento de hasta un 63% en las zonas de alta producción de trigo en el estado de Sonora y la región del Bajío (Calvo-Salazar *et al.*, 2015).

Las condiciones favorables para el desarrollo de esta enfermedad son: para la germinación, alta humedad (períodos de rocío de 3 a 4 horas) y temperaturas mínima, óptima y máxima de 2, 20 y 30°C, respectivamente; para el crecimiento, temperaturas de 2, 25 y 35°C, como mínimo, óptimo y máximo, respectivamente; mientras que para la esporulación temperaturas mínima, óptima y máxima de 10, 25 y 35 °C, respectivamente. (Roelfs *et al.*, 1992). Muy pocas o ninguna infección se produce cuando las temperaturas son superiores a 32°C o inferiores a 2°C.

Roya amarilla o roya lineal

El agente causal de la roya amarilla es el hongo *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* West, puede causar pérdidas de hasta 50% y en casos extremos pérdidas completas del cultivo (Roelfs *et al.*, 1992). En México bajo alta presión de este patógeno se han producido pérdidas de hasta 60% en el rendimiento en las principales zonas de alta producción de trigo en el estado de Sonora y la región del Bajío (Calvo-Salazar *et al.*, 2015).

Las condiciones favorables para el desarrollo de esta enfermedad son: para la germinación, alta humedad (períodos de rocío de 3 a 4 horas) y temperaturas mínima, óptima y máxima de 0, 9-13 y 23°C, respectivamente; para el crecimiento temperaturas de 3, 12-15 y 20°C, como mínimo, óptimo y máximo, respectivamente;

mientras que para la esporulación temperaturas mínima, óptima y máxima de 2, 12-15 y 20°C, respectivamente. (Roelfs *et al.*, 1992). Por encima de los 23°C se paraliza su desarrollo y temperaturas por debajo de -4°C la matan si está expuesta.

Roya del tallo o roya negra

El agente causal de la roya del tallo es *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Esta enfermedad es la más temida por los agricultores, ya que un cultivo aparentemente sano tres semanas antes de la cosecha puede ser reducido a un montón de tallos rotos y granos arrugados, provocando la pérdida total del cultivo (Roelfs *et al.*, 1992). Esta enfermedad puede causar pérdidas superiores al 70% de la producción (FAO, 2017). En Estados Unidos se han reportado pérdidas del rendimiento superiores al 25% (Roelfs, 1978).

Las condiciones favorables para el desarrollo de esta enfermedad son: para la germinación, alta humedad (períodos de rocío de 6 a 8 horas) y temperaturas mínima, óptima y máxima de 2, 15-24 y 30 °C, respectivamente; para el crecimiento temperaturas de 5, 30 y 40 °C, como mínimo, óptimo y máximo, respectivamente; mientras que para la esporulación temperaturas mínima, óptima y máxima de 15, 30 y 40 °C, respectivamente (Roelfs *et al.*, 1992). Al igual que con la roya de la hoja, muy pocas o ninguna infección se produce cuando las temperaturas son superiores a 32°C o inferiores a 2°C.

Resistencia a royas

El método más eficaz, desde el punto de vista económico y ambiental, para proteger el cultivo de trigo de las royas, es el uso de variedades con resistencia genética.

Tipos de resistencia

Los tipos de interacción entre patógenos y hospedantes se pueden clasificar en al menos dos categorías, específicas y no-específicas; y la respuesta del hospedante a esta interacción con el patógeno está relacionada con la resistencia de las plantas.

La resistencia es la capacidad de la planta para reducir el crecimiento y desarrollo del patógeno después que ha habido contacto entre el hospedante y el patógeno o después que este ha iniciado su desarrollo o se ha establecido (Niks *et al.*, 1993).

Resistencia específica

Cuando un solo aislamiento del patógeno interactúa con un genotipo (hospedante) para producir una respuesta a la enfermedad diferente de la que provoca otro aislamiento con el mismo hospedante en el mismo medio, a esta respuesta del hospedante se le conoce como resistencia específica o de genes mayores (R). A esta resistencia se le conoce también como de plántula, vertical, total, gen a gen (CIMMYT, 2012; Ellis *et al.*, 2014).

Estos genes son de “amplio espectro” ya que confieren resistencia a varias razas del patógeno. Una característica de la respuesta de resistencia de los genes R es la muerte celular (respuesta de hipersensibilidad o HR) como acción para inhibir al patógeno, sin embargo, esta respuesta puede variar dependiendo del gen R presente (Ellis *et al.*, 2014).

Las interacciones de tipo específico constituyen el fundamento de la teoría del gen por gen desarrollada por Flor en 1955 (Ellis *et al.*, 2014), y debido a que la

resistencia a un aislamiento del patógeno es una característica genética, una variedad nunca pierde su resistencia a ese aislamiento (CIMMYT, 2012).

Algunos ejemplos de genes R son: para roya de la hoja, algunos de los genes que han sido clonados son, el gen *Lr1* identificado en el cromosoma 5DL (Cloutier *et al.*, 2007), el gen *Lr10* identificado en el cromosoma 1AS (Loutre *et al.*, 2009) y el gen *Lr21* identificado en el cromosoma 1DS (Huang *et al.*, 2003); para roya amarilla, el gen *Yr5* que se encuentra en el cromosoma 2BL ligado al marcador Xgwm501 (Sun *et al.*, 2002) y el gen *Yr15* que se encuentra el cromosoma 1BS flanqueado por los marcadores *Xbarc8* y *Xgwm493* (McIntosh *et al.*, 1996; Yaniv *et al.*, 2013); y, para la roya del tallo, el gen *Sr24* ligado al gen *Lr24* en el cromosoma 3DL (McIntosh *et al.*, 1995); *Sr31* es un gen del cromosoma 1RS del centeno y que ha sido translocado al cromosoma 1BL de trigo (Proterius *et al.*, 2000), el gen *Sr33* fue descubierto en *Aegilops tauschii* y transferido al cromosoma 1DS de trigo (Periyannan *et al.*, 2013) y el gen *Sr35* identificado en el cromosoma 3AL (Saintenac *et al.*, 2013).

Resistencia no-específica

Cuando todos los aislamientos de patógenos de una especie provocan una respuesta similar en un determinado genotipo del hospedante, a esta respuesta del hospedante se la conoce como resistencia no-específica o de genes menores. A este tipo de resistencia se la conoce también como de planta adulta (APR), horizontal, generalizada, de progreso lento, parcial (CIMMYT, 2012, Ellis *et al.*, 2014).

Este tipo de resistencia se caracteriza por el bajo y lento crecimiento del patógeno, sin una respuesta necrótica (a veces denominada "slow rusting" o

enroscamiento lento), y se identifica en campo y no en invernadero. El enmascaramiento de los genes APR por los genes R evita una efectiva selección de éstos, y hacen que su uso sea más complejo que el de los genes R; sin embargo, si se combinan varios genes APR se tendrá plantas adultas casi inmunes a la enfermedad (Ellis *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2005).

Una alternativa para la generación de variedades con resistencia durable, es el uso de genes que confieren resistencia de enroscamiento lento (Huerta *et al.*, 2012). Las resistencias de enroscamiento lento en trigo, a roya de la hoja, amarilla y del tallo, a menudo las confieren genes de tipo parcialmente eficaz, no hipersensibles y con efectos aditivos. Estudios de herencia en el CIMMYT-México han demostrado que, aunque individualmente estos genes pueden tener efectos pequeños a intermedios, combinaciones de 3 a 5 de estos genes dan como resultado un alto nivel de resistencia (Singh *et al.*, 2000).

Se considera que la resistencia no-específica es la más adecuada para un programa de fitomejoramiento, sin embargo, se cree que ciertas combinaciones de genes de resistencia específica y no-específica tienen un efecto aditivo o complementario, que favorecen la resistencia a las enfermedades (CIMMYT, 2012).

Algunos ejemplos de genes APR son: *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* (Singh *et al.*, 2012; Lillemo *et al.*, 2008), *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39* (William *et al.*, 2003), y *Lr67/Yr46/Sr55/Pm46* (Herrera-Foessel *et al.*, 2011).

Dyck *et al.* (1966) fueron los primeros en identificar el gen *Lr34* en el cultivar de trigo Frontana. Este gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 7D y ligado

al marcador microsatélite *Xgwm295.1* (Suenaga *et al.*, 2003). El gen *Lr34* ha sido ampliamente usado a nivel mundial en programas de mejoramiento para resistencia durable a royas y ahora se conoce que este locus confiere resistencia a las tres royas y a mildiu polvoso (Liang *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2012; Singh y Huerta-Espino, 2013). Algunos de los cultivares que llevan este gen son: Chinese Spring, Glenlea, Jagger, Jupateco R, Fletcher, Newton, Parula, Tonichi, Opata, Fukuho-komugi, Chihoku, Condor, Cook, Anza, Janz, Sunco, Forno, Bezostaya, Kavkaz (Kolmer *et al.*, 2008).

El gen APR *Lr46/Yr29* fue descrito por primera vez por Singh *et al.* (1998) en el cultivar Pavon 76. Este gen está localizado en el cromosoma 1BL de trigo a una distancia de 5-6 cM del marcador microsatélite *Xwmc44* (Suenaga *et al.*, 2003). En varios estudios este gen redujo la severidad cerca de un 40% en la roya de la hoja y un 30% en la roya amarilla, en distintos cultivares (Calvo-Salazar *et al.*, 2015; Herrera-Foessel *et al.*, 2011; Lan *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 1998; William *et al.*, 2003). Este gen ha sido ampliamente usado en la generación de germoplasma mejorado de trigo en el CIMMYT (Singh *et al.*, 2011).

El gen *Lr67/Yr46* fue identificado en la accesión de trigo PI250413 (Dyck y Samborski, 1979) y transferido al cultivar Thatcher para producir la línea RL6077 (Thatcher*6/PI250413). Este gen se encuentra en el cromosoma 4DL del trigo y está flanqueado por los marcadores microsatélite *Xcfd71-4D* y *Xcfd23-4D* (Hiebert *et al.*, 2010). Herrera-Foessel *et al.* (2011) observaron una reducción de la enfermedad en un 50-55% en líneas que portan este gen. *Lr67/Yr46* proviene de líneas criollas de la India, pero no ha sido ampliamente usado en programas de mejoramiento; ha sido mapeado solamente en el cultivar Sujata proveniente de la India (Lan *et al.*, 2015), y

confiere resistencia parcial a roya del tallo y mildiu polvoso (Herrera-Foessel *et al.*, 2014).

Tipos de acción génica

Existen dos tipos de acción génica: acción génica intralocus y acción génica interloci.

Acción génica intralocus

Es aquella interacción que ocurren entre los alelos de un mismo locus (Ferreira *et al.*, 2005)

Aditividad.- los alelos actúan de forma aditiva cuando el valor del heterocigoto es intermedio entre los dos homocigotos.

Dominancia parcial.- ocurre cuando el heterocigoto es casi igual a uno de los homocigotos.

Dominancia completa.- se da cuando el heterocigoto y uno de los homocigotos producen fenotipos idénticos.

Sobredominancia.- en este caso el heterocigoto supera a cualquiera de los dos homocigotos.

Acción génica interloci

Esta interacción se produce entre genes de diferente *loci*, por ello pueden estar situados en cromosomas diferentes.

Epistasis.- es la interacción génica en que la expresión de un gen es modificada por uno o varios genes que no son alelos (también se les conoce como modificadores).

Hipostático.- se denomina así al alelo cuya expresión es inhibida por la acción del o los alelos epistáticos

La aditividad, la dominancia y los efectos epistáticos pueden todos contribuir con la expresión fenotípica de un carácter cuantitativo, sin embargo, la aditividad juega el papel más importante en la expresión génica (Rédei, 2008).

Base genética de la resistencia

Los métodos que se pueden emplear para conocer la base genética de la resistencia a enfermedades son: la postulación de genes y el análisis genético.

Postulación de genes

La postulación de genes es uno de los métodos más empleado para identificar los genes R de resistencia a las royas. Para esta técnica se emplean plántulas individuales de la variedad cuyos genes de resistencia se desconocen junto con líneas que posean los genes a investigar (líneas diferenciales), y se usan aislamientos con muchos genes de avirulencia y virulencia. Cuando una línea experimental tiene una intensa reacción de infección, nos indica que esta no tiene ninguno de los genes de resistencia para los que estamos evaluando, pero cuando las líneas experimentales tienen la misma reacción de infección (leve) y el mismo patrón de infección que una línea con un gen conocido, se postula la presencia de ese gen (Roelfs *et al.*, 1992).

Las ventajas de esta metodología son: el análisis se puede realizar en pocas semanas, es un método preciso cuando se analizan pocos genes, y se puede demostrar en forma concluyente la ausencia de un gen de resistencia. Sus desventajas son: se necesita una buena colección de aislamientos con diversas virulencias, y el resultado nos permite inferir la presencia de un gen (Roelfs *et al.*, 1992).

Una vez hecha la postulación de un gen, es necesario realizar el análisis genético para confirmar la presencia del mismo.

Análisis genético

Los estudios de herencia o análisis genéticos requieren de cruzamientos entre un parental susceptible y uno resistente o, en su caso, de varios progenitores con uno o más genes conocidos de resistencia, a esta se le denomina prueba de 'alelismo'. Además, el estudio de herencia en poblaciones filiales se utiliza para determinar el número de genes de resistencia segregantes en un cruzamiento, donde la proporción de susceptibles indica el número de genes segregantes de resistencia presentes (Roelfs *et al.*, 1992).

Por otra parte, el análisis genético se puede realizar mediante el uso de marcadores genéticos, los cuales se definen como "cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada para hacer análisis genético" (Alay *et al.*, 1987), los marcadores genéticos pueden ser: morfológicos, bioquímicos y moleculares.

Marcadores morfológicos

Desde el punto de vista agronómico y comercial, la caracterización del germoplasma se ha basado fundamentalmente en características de alta y de baja heredabilidad, medidas a través del fenotipo (Becerra y Paredes, 2000). Los marcadores morfológicos por lo tanto son aquellas características fenotípicas de fácil identificación visual tales como forma, color, tamaño o altura. Estas características se convierten en marcadores morfológicos si están vinculadas a características deseables (rendimiento, calidad, resistencia, etc).

Los programas de mejoramiento genético y conservación emplean la caracterización morfológica como primer paso para estudiar la diversidad genética, la identificación de cultivares y la conservación de los recursos genéticos. En la actualidad, los marcadores morfológicos establecen las bases para identificar y diferenciar variedades, pero presentan varias limitantes, entre ellas: su obtención lleva mucho tiempo, son métodos complejos, limitados, subjetivos, influenciados por el ambiente, caros e involucran estados de desarrollo específicos del cultivo (Yasmin *et al.*, 2006).

Marcadores Bioquímicos

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas y constituyen la primera generación de marcadores moleculares.

a) Proteínas

El uso de esta metodología se basa en el hecho que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes. Debido a que las proteínas carecen de

actividad enzimática, estas pueden ser detectadas en el gel por medio de técnicas generales de tñido (Becerra y Paredes, 2000).

Leonard et al. (1988) demostraron que los patrones de bandas de las proteínas son heredados como características discretas y en forma codominante, observándose en algunos casos un efecto maternal o materno. Sin embargo, el número de genes que controlan estas características es reducido y varía de acuerdo a la especie (Gepts, 1990). Como marcador bioquímico las proteínas tienen una baja influencia ambiental, con algunas excepciones, y permiten un análisis rápido de un gran número de muestras por ser un método simple y de bajo costo comparado con otras técnicas (Becerra y Paredes, 2000).

b) Isoenzimas

Las isoenzimas son proteínas que catalizan la misma reacción, con los mismos requerimientos, pero con propiedades cinéticas y fisicoquímicas diferentes, lo cual permitió su descubrimiento y estudio en los años 70. Las isoenzimas son formas diversas de una enzima que les confieren peculiaridades metabólicas a los tejidos del organismo (Cardélla y Hernández, 2013).

Sus principales características son: simplicidad del proceso, mínima cantidad del material en estudio, bajo costo y una cobertura del genoma de 10-20 *loci* por especie, ausencia de epistasis e influencias ambientales, expresión alélica de tipo codominante, lo que permite establecer comparaciones entre especies, poblaciones de una misma especie, y detectar la presencia de híbridos e introgresión de genes. Entre sus desventajas se puede mencionar un nivel bajo de polimorfismo al presentar

pocos alelos por locus, especialmente cuando la base genética es estrecha (Becerra y Paredes, 2000).

Marcadores Moleculares

Aun cuando algunos tipos de marcadores (morfológicos y bioquímicos) existían desde hace décadas, su uso en forma aplicada al mejoramiento ha sido muy limitado, con algunas excepciones, sin embargo, el advenimiento de la Biotecnología en los años ochentas del siglo XX y el desarrollo de los marcadores moleculares han abierto el camino hacia el uso práctico y rutinario de los marcadores moleculares de ADN. La automatización de esta tecnología permitió el nacimiento de una nueva etapa en el conocimiento de las funciones génicas, la genómica. Permitiendo el desarrollo de marcadores génicos o genéticos a partir de las secuencias de los propios genes de interés, y con éstos, dándole a la mejora genética un nuevo enfoque. (Álvarez, 2011)

En el Cuadro 2 se presenta un resumen de los principales marcadores moleculares y sus características.

Cuadro 2. Marcadores moleculares y sus principales características

	RFLP*	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Técnica	Restricción Transferencia Hibridación	Amplificación con cebadores al azar	Amplificación limitada de fragmentos	Amplificación de microsatélites	Basado en la secuenciación de ADN
Polimorfismo detectado	Cambios puntuales Deleciones Inserciones	Cambios puntuales Deleciones Inserciones	Cambios puntuales Deleciones Inserciones	Número de repeticiones	Cambio de un solo nucleótido
Tipo	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
Número	Medio	Muy Alto	Alto	Alto	Muy Alto
Nivel de	Bajo	Medio	Medio	Alto	Alto

polimorfismo					
Cantidad de ADN (µg)	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
Calidad de ADN	Alta	Alta	Media	Media	Alta
Uso de PCR	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Conocimiento de Secuencias	No requerido	No requerido	No requerido	Requerido	Requerido
Uso de radiactivos	Sí/no	No	Sí/no	No	No
Costo Desarrollo	Medio/alto	Bajo	Medio/alto	Alto	Alto
Costo análisis	Alto	Medio	Medio	Bajo	Bajo
Fácil de usar	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Automatización	Baja	Media	Media	Alta	Alta
Reproducibilidad	Alta	Baja	Alta	Alta	Alta
Aplicaciones	Mapas de ligamiento Caracterización	Mapeo Caracterización Diversidad Filogenia	Mapeo Caracterización Diversidad Filogenia	Mapeo Secuenciación Diversidad Huella genética Filogenia QTL MAS	Mapeo Secuenciación Diagnostico Huella genética Herencia Filogenia QTL MAS

Fuente: Azofeifa-Delgado (2006); Becerra y Paredes (2000); Dorado *et al.* (2007); Pérez de la Vega (1997).

*RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción; RAPD= Random Amplification of Polymorphic DNA - Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico; AFLP= Amplified Fragment Length Polymorphism - Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados; SSR= Simple Sequence Repeat – Secuencia de Repetición Simple o Microsatélite; SNP= Single Nucleotide Polymorphism – Polimorfismo de un solo Nucleótido.

Algunas de las aplicaciones prácticas de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético son:

a) Mapeo de QTL (Quantitative Trait Loci)

El mapeo de características cuantitativas a través de la identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL) se considera una herramienta importante dentro del mejoramiento genético de plantas. Los QTLs son identificados dentro del genoma de una planta basado en el principio de asociación entre los marcadores moleculares polimórficos y el fenotipo de los individuos de una población de mejoramiento (Mora *et al.*, 2008).

Para lo anterior se usan los mapas genéticos de marcadores moleculares que permiten la identificación de regiones de cromosomas (o grupos de ligación) las cuales son importantes para determinar la presencia de genes que determinan un carácter de interés.

b) Selección Asistida por Marcadores

Las selección asistida por marcadores (MAS - Marker Assisted Selection) consiste en identificar una secuencia de ADN que está próxima (o en el mejor de los casos que codifica) al gen (o locus) de interés agronómico y utilizarla como herramienta en el proceso de selección, independizándose así la expresión del gen y su interacción con el ambiente. Los marcadores de ADN, ligados al gen o genes de interés, son empleados para detectar la presencia de variaciones alélicas en éstos, con mucha eficiencia y precisión (Álvarez, 2011).

La MAS en la actualidad está ganando una considerable importancia en la mejora genética de plantas, por permitir transferir de forma más precisa que los métodos clásicos de selección, regiones genómicas de interés (“foreground selection”) y acelerar la recuperación del genoma del parental recurrente (“background selection”) (Álvarez, 2011).

c) Huella genética

Es una técnica desarrollada en 1986 para detectar patrones individuales con base en la información genética de un individuo. Ya que cada organismo posee una información genética única. En la mejora vegetal se utiliza para la identificación y distinción de variedades, líneas puras e híbridos para proteger los derechos del obtentor vegetal en el Registro de Variedades Protegidas, así como el establecimiento de relaciones de parentesco o "pedigree" entre líneas o variedades en estudios genéticos.

Estas técnicas son empleadas por instituciones tanto públicas como privadas, nacionales e internacionales, para mejoramiento genético. Entre ellas la más importante en mejoramiento de trigo, es el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y trigo (CIMMYT) quien por más de 50 años ha generado y desarrollado germoplasma mejorado de trigo, el cual es distribuido a nivel mundial para que sea empleado por programas de mejoramiento locales en países en desarrollo como fuente de resistencia durable a las principales enfermedades que atacan a este cereal. La resistencia durable es aquella “resistencia que ha permanecido efectiva mientras

que el cultivar que la posee ha sido cultivado ampliamente en un ambiente favorable para el desarrollo de la enfermedad” (Jhonson, 1983).

Entre el germoplasma generado por el CIMMYT se encuentra la línea de trigo harinero ‘Chilero’ con pedigree ‘4777*2//FKN/Gabo 54/3/Veery#5/4/Buckbuck/Pavon F76’ (GID CM66684), que fue generada y distribuida a nivel mundial en 1984 y desde esa fecha ha mantenido altos niveles de resistencia a roya de la hoja y roya amarilla en las zonas trigueras en México, sin embargo, las bases genéticas de su resistencia han permanecido desconocidas hasta el momento.

Por otra parte, el CIMMYT también ha realizado varias colectas de germoplasma a nivel nacional e internacional con el fin de contar con una amplia base genética para la generación de nuevas líneas mejoradas. Como parte de este germoplasma se cuenta con 75 líneas de origen mexicano del cual se desconoce su base genética de resistencia.

Como parte del germoplasma internacional colectado por el CIMMYT se encuentra la línea ‘New Pusa 876’ que fue desarrollada en los años sesentas del siglo XX por el Instituto Indio de Investigaciones Agropecuarias (IARI) y tiene el siguiente pedigree: “C281/3/Thatcher//NP4/FR Sib” (Jain, 1994). Este material ha mostrado resistencia de planta adulta a roya amarilla y de la hoja por más de 50 años (Jain, 1994), y al igual que Chilero las bases genéticas de su resistencia permanecen sin conocerse.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue:

Determinar e identificar los genes involucrados en la resistencia a royas, su ubicación y posible efecto pleiotrópico, en germoplasma de trigo harinero con resistencia durable.

Como objetivos específicos se tuvieron:

- i. Caracterizar la resistencia de planta adulta del trigo de primavera 'Chilero' a roya de la hoja y roya amarilla,
- ii. Caracterizar la resistencia de planta adulta a roya de la hoja y roya amarilla en el cultivar Indú, New Pusa 876, y
- iii. Postular e identificar genes de resistencia a roya de la hoja y roya del tallo en líneas mexicanas de trigo harinero.

Bibliografía

- Alay F., J. F. Gavilán, J. Cabello, R. Gonzáles, Y E. Almoacid. 1987. Marcadores genéticos. Importancia y aplicaciones en medicina veterinaria. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol. 9, No. 2.
- Allan, R. E. 1980. Wheat. In: Hybridization of crop plants. Fehr W.R. and Hadley H.H., eds. American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin.

- Álvarez, M. 2011. La selección asistida por marcadores (MAS, Marker-assisted selection) en el mejoramiento genético de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) *Cultivos Tropicales*, Vol. 32, No. 2.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17:221-242.
- Becerra, V., y M. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica* V.60 No. 3.
- Calvo-Salazar, V., R. P. Singh, J. Huerta-Espino, S. Cruz-Izquierdo, R. Lobato-Ortiz, S. Sandoval-Islas, M. Vargas-Hernández, S. German, P. Silva, B. R. Basnet, C. X. Lan, and S. A. Herrera-Foessel. 2015. Genetic analysis of resistance to leaf rust and yellow rust in spring wheat cultivar Kenya Kongoni. *Plant Dis.* 99:1153-1160.
- Cardélla, L., y R. Hernández. 2013. *Bioquímica Médica*. Tomo I. Editorial Ciencias Médicas, Cuba. ISBN 978-959-212-873-6
- CIMMYT. 2012. Las royas del trigo. Disminuye rendimiento, reduce el número y la calidad de los granos y la espiga. *Agrosíntesis*. <http://agrosintesis.com/las-royas-del-trigo-2/>
- Cloutier, S., B. D. McCallum, C. Loutre, T. W. Banks, T. Wicker, C. Feuillet, B. Keller, and M. C. Jordan. 2007. Leaf rust resistance gene Lr1, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large psr567 gene family. *Plant Mol. Biol.* 65:93–106.
- Dorado, G., P. Rallo, P. Hernández, J. Giménez, Y. Benítez, A. Díaz, R. de la Rosa, J. L. Caballero, J. Muñoz-Blanco, y A. Martín. 2007. Desarrollo de marcadores moleculares y herramientas genómicas para la trazabilidad, identificación y mejora del olivo, la aceituna y el aceite de oliva. En: *I Congreso de Cultura del Olivo*, Parras et al (eds). Jaén, España. pp: 539-549.
- Dyck, P. L., D. J. Samborsk, and R. G. Anderson. 1966. Inheritance of adult plant leaf rust resistance derived from common wheat varieties exchange and frontana. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 8:665–671.

- Dyck, P. L., and D. J. Samborski. 1979. Adult plant resistance in PI250413, an introduction of common wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 59:329–332.
- Ekboir, J., y M. Morris. 2003. Perspectivas del mercado internacional de trigo: implicaciones para los países de América del Sur. En: *Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento de trigo: un enfoque multidisciplinario*. Ed: Kohli, M. M., M. Díaz, Y M. Castro. Seminario Internacional, La Estanzuela, Uruguay. CIMMYT-INIA. pp: 3-12.
- Ellis, J. G., E. S. Lagudah, W. Spielmeyer, and P. N. Dodds. 2014. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5, Art. 641.
- FAO. 2017. Wheat Stem Rust - Ug99 (Race TTKSK). <http://www.fao.org/agriculture/crops/rust/stem/rust-report/stem-ug99racettksk/es/> Consultada 19 Abril 2017
- FAOSTAT. 2017. Data, Production, Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Consultada 03 Enero 2017.
- Ferreira, V., B. Szpiniak, y E. Grassi. 2005. *Manual de Genética*. Tomo I. 2a ed. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 252 p.
- Gepts, P. 1990. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In: Brown, H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir. (Eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. pp: 64-82.
- Guerrero, A. 1999. *Cultivos herbáceos extensivos. Trigo*. 6 ed. Mundi-Prensa, España. pp: 19-142.
- Hernández, A. 2006. *Las palabras de moda*. 2ed. Universidad de Cádiz y Murcia, España. Compobell S.L. pp: 443-444.
- Herrera-Foessel, S. A., E. S. Lagudah, J. Huerta-Espino, M. J. Hayden, H. S. Bariana, D. Singh, and R. P. Singh. 2011. New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes Lr67 and Yr46 in wheat are pleiotropic or closely linked. *Theor. Appl. Genet.* 122:239-249.

- Herrera-Foessel, S. A., R. P. Singh, M. Lillemo, J. Huerta-Espino, S. Bhavani, S. Singh, C. X. Lan, V. Calvo-Salazar, and E. S. Lagudah. 2014. Lr67/Yr46 confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theoretical Applied Genetics* 127:781–789.
- Hiebert, C. W., J. B. Thomas, B. D. McCallum, D. G. Humphreys, R. M. DePauw, M. J. Hayden, R. Mago, W. Schnippenkoetter, and W. Spielmeyer. 2010. An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher*6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (Lr67). *Theoretical Applied Genetics* 121:1083-1091.
- Holden, J., J. Peacock, y T. Willianís. 1993. *Genes, Variedades y Ambiente. Manejo y Evaluación de Recursos Fitogenéticos*. Editado por: Cambridge, University Press.
- Huang, L., S. A. Brooks, W. Li, J. P. Fellers, H. N. Trick, and B. S. Gill. 2003. Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics* 164:655–664.
- Huerta E., J., R. Torres G., M. F. Rodríguez G., H. E. Villaseñor M., S. G. Leyva M., y E. Solís M. 2012. Resistencia a roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) en variedades de trigo harinero (*triticum aestivum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:879-891.
- Jain, K.B.L. 1994. *Wheat Cultivars in India: Names, Pedigrees, Origins, and Adaptations*. Research Bulletin No.2, 72 p. Directorate of Wheat Research, Kamal, India.
- Jhonson, R. 1983. Genetic Background of Durable Resistance. In: *Durable Resistance in Crops*. Lamberti, F., J. M. Waller, and Van der Graaff (eds). NATO Advanced Science Institutes Series, Volume 55. Plenum Press, New York. pp: 5-26.
- Ken, N. L., and A. D. Evers. 1994. *Technology of cereals. An introduction for students of food and agriculture*. 4th ed. Elsevier Science Ltd, Great Britain. pp: 29-52.
- Kolmer, J. A., R. P. Singh, D. F. Garvin, L. Viccars, H. M. William, J. Huerta-Espino, F. C. Ogonnaya, H. Raman, S. Orford, H. S. Bariana, and E. S. Lagudah. 2008.

Analysis of the Lr34/Yr18 rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Science* 48:1841-1852.

Lan, C. X., G. M. Rosewarne, R. P. Singh, S. A. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, B. R. Basnet, Y. L. Zhang, and E. N. Yang. 2014. QTL characterization of resistance to leaf rust and stripe rust in the spring wheat line Francolin#1. *Molecular Breeding* 34:789–803.

Lan, C. X., Y. L. Zhang, S. A. Herrera-Foessel, B. R. Basnet, J. Huerta-Espino, E. S. Lagudah, and R. P. Singh. 2015. Identification and characterization of pleiotropic and co-located resistance loci to leaf rust and stripe rust in bread wheat cultivar Sujata. *Theoretical Applied Genetics* 128:549-561.

Liang, S. S., K. Suenaga, Z. H. He, Z. L. Wang, H. Y. Liu, D. S. Wang, R. P. Singh, P. Sourdille, and X. C. Xia. 2006. Quantitative trait loci mapping for adult-plant resistance to powdery mildew in bread wheat. *Phytopathology* 96:784-789.

Lillemo, M., B. Asalf, R. P. Singh, J. Huerta-Espino, X. M. Chen, Z. H. He, and A. Bjornstad. 2008. The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 and Lr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theoretical Applied Genetics* 116:1155-1166.

Leonard, A., C. Damerval, and D. De Vienne. 1988. Organ-specific variability and inheritance of maize proteins revealed by two dimensional electrophoresis. *Genetics Research* 52:97-103.

Loutre, C., T. Wicker, S. Travella, P. Galli, S. Scofield, T. Fahima, C. Feuillet, and B. Keller. 2009. Two different CC-NBS-LRR genes are required for Lr10-mediated leaf rust resistance in tetraploid and hexaploid wheat. *Plant Journal* 60:1043–1054.

Mathias, M. 2004. Detección de mutaciones asociadas a dureza de grano a 113 genotipos de trigo por medio de herramientas biotecnológicas. Universidad Austral de Chile, Valdivia-Chile.

- McIntosh, R. A., C. R. Wellings, and R. F. Park. 1995. *Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes*. Melbourne: CSIRO Publishing.
- McIntosh, R. A., and J. Silk. 1996. Cytogenetic studies in wheat XVII. Monosomic analysis and linkage relationships of gene Yr15 for resistance to stripe rust. *The TT. Euphytica* 89:395-399.
- Miller, T. D. 1992. *Better Crops with Plant Food*. Potash and Phosphate Institute (PPI), Norcross, GA, EEUU. pp: 12-17.
- Mora, F., A.I. Santos, y C. A. Scapim. 2008. Mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL) usando un enfoque multivariado. *Ciencia e Investigación Agrária* 35:137-145.
- Moreno, I., A. Ramírez, R. Plana, y L. Iglesias. 2001. El cultivo de trigo. Algunos resultados de su producción en Cuba. *Cultivos Tropicales* 22:55-67.
- Niks, R. E., P. R. Ellis, and J. E. Parlevliet. 1993. Resistance to parasites. In: *Plant breeding: principles and prospects*. Hayward, M. D., N. O. Bosemark, and I. Romagosa, eds. London, Chapman & Hall. pp: 422-447.
- Periyannan, S., J. Moore, M. Ayliffe, U. Bansal, X. Wang, L. Huang, K. Deal, M. Luo, X. Kong, H. Bariana, R. Mago, R. McIntosh, P. Dodds, J. Dvorak, and E. Lagudah. 2013. The gene Sr33, an ortholog of barley mla genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99. *Science* 341:786–788.
- Pérez de la Vega, M. 1997. Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. En: *III Simposio Científico en biología Celular y Molecular*. A Coruña, España. pp: 247-266.
- Petersen, G., O. Seberg, M. Yde, and K. Berthelsen. 2006. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39:70-82.

- Pretorius, Z., R. Singh, W. Wagoire, and T. Payne. 2000. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene Sr31 in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Disease* 84:203–203.
- Rédei, G. R. 2008. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*. 3 ed. Springer Science & Business Media, USA.
- Ren, Y., R. P. Singh, B. R. Basnet, C. X. Lan, J. Huerta-Espino, E. S. Lagudah, and L. J. Ponce-Molina. 2017. Identification and Mapping of adult plant resistance loci to leaf rust and stripe rust in common wheat cultivar Kundan. *Plant Disease* 101:456-463.
- Roelfs, A. P. 1978. Estimated losses caused by rust in small grain cereals in the United States: 1918–76. USDA Miscellaneous Publication, USA 1363.
- Roelfs, A. P., R. P. Singh, and E. E. Saari. 1992. *The Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management*. México, D.F.: CIMMYT. 81 p.
- Saintenac, C., W. Zhang, A. Salcedo, M. N. Rouse, H. N. Trick, E. Akhunov, and J. Dubcovsky. 2013. Identification of wheat gene Sr35 that confers resistance to Ug99 stem rust race group. *Science* 341:783–786.
- Singh, R. P., A. Mujeeb-Kazi, and J. Huerta-Espino. 1998. Lr46: a gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88:890–894.
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino, and S. Rajaram. 2000. Achieving near immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 35:133-139.
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino, and H. M. William. 2005. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rust in wheat. *Turkish Journal for Agriculture and Forestry* 29:121-127.
- Singh, R. P., S. S. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, H. S. Bariana, U. Bansal, B. D. McCallum, C. W. Hiebert, S. Bhavani, S. Singh, C. Lan, and E. S. Lagudah. 2012. Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Bdv1/Ltn1 confers slow rusting, adult plant resistance to

Puccinia graminis tritici. In: 13th Cereal Rust and Powdery Mildew Conference, August 28–September 1, 2012. Friendship Hotel, Beijing. p 173.

Singh, R.P., and J. Huerta-Espino. 2013. Effect of leaf rust resistance gene Lr34 on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. *Euphytica* 129:371-376.

Suenaga, K., R. P. Singh, J. Huerta-Espino, and H. M. William. 2003. Microsatellite markers for Lr34/Yr18 and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust in bread wheat. *Phytopathology* 93:881-890.

Sun, Q., Y. Wei, Z. Ni, C. Xie, and T. Yang. 2002. Microsatellite marker for yellow rust resistance gene Yr5 in wheat introgressed from spelt wheat. *Plant Breeding* 121:539-541.

USDA-ERS. 2017. Wheat data: World Production, Supply and Disappearance; Table 3-- Wheat supply and disappearance. [https://www.ers.usda.gov/data-products/wheat-data/wheat-data/#World Production, Supply, and Disappearance](https://www.ers.usda.gov/data-products/wheat-data/wheat-data/#World%20Production,%20Supply,%20and%20Disappearance). Consultada 03 Enero 2017

William, M., R. P. Singh, J. Huerta-Espino, S. Ortíz-Islas, and D. Hoisington. 2003. Molecular marker mapping of leaf resistance gene Lr46 and its association with stripe rust resistance gene Yr29 in wheat. *Phytopathology* 93:153-159.

Yaniv, E., D. Raats, Y. Ronin, A. B. Korol, A. Grama, H. Bariana, J. Dubcovsky, A. H. Schulman, and T. Fahima. 2013. Evaluation of marker-assisted selection for the stripe rust resistance gene Yr15, introgressed from wild emmer wheat. *Molecular Breeding* 35:43.

Yasmin, S., M. S. Islam, M. Kondoker, M. Nasiruddin, and S. Alam. 2006. Molecular characterization of potato germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Biotechnology* 5:27-31.

Zadoks, J. C., T. T. Chang, and C. F. Kozank. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14: 415-421.

CAPÍTULO II. CHARACTERIZATION OF LEAF RUST AND STRIPE RUST RESISTANCE IN SPRING WHEAT 'CHILERO'

AUTHORS:

Luis J. Ponce-Molina, Julio Huerta-Espino, Ravi P. Singh, Bhoja R. Basnet, Víctor H. Aguilar-Rincón, Gregorio Alvarado, Ricardo Lobato-Ortiz, J. Jesús García-Zavala, Mandeep S. Randhawa, Caixia Lan*

L. J. Ponce-Molina, National Institute of Agricultural and Livestock Researches (INIAP-Ecuador), Santa Catalina Experimental Station, Panamericana Sur Km 1, Quito, Ecuador, and Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Road México- Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, State of México, México; J. Huerta-Espino, Campo Experimental Valle de México INIFAP, Apdo. Postal 10, 56230 Chapingo, State of México, México; R. P. Singh, B. R. Basnet, G. Alvarado, M. S. Randhawa and C. X. Lan, International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Apdo. Postal 6-641, 56237 México, DF, México; V. H. Aguilar-Rincón, R. Lobato-Ortiz and J.J. García-Zavala, Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Road México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, State of México, México.

*Corresponding author C. X. Lan, Email: c.lan@cgiar.org

Article accepted to be published in Plant Disease.

Resumen

'Chilero' una línea de trigo de primavera derivada del CIMMYT ha mostrado altos niveles de resistencia a roya de la hoja y roya amarilla desde que fue desarrollada en 1984. Las bases genéticas de su resistencia fueron investigadas en una población de líneas endogámicas recombinantes (RIL-Recombinant Inbred Line) derivadas de la cruce entre Avocet y Chilero. Las RILs y sus parentales fueron caracterizadas en ensayos de campo por resistencia a roya de la hoja y roya amarilla en tres localidades en México, del 2012 al 2015. La población de RILs fue genotipificada con marcadores DArT-array, DArT-GBS y SSR. Un total de 6,168 marcadores polimórficos fueron usados para construir el mapa de ligamiento genético. El mapeo de intervalos compuestos incluido detectó en la población Avocet x Chilero cuatro loci de resistencia co-localizados para ambas royas, así como dos loci de resistencia a roya amarilla. Entre ellos, un QTL en el cromosoma 1B que es el conocido gene de resistencia de planta adulta (RPA) *Lr46/Yr29*, mientras que *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* es un nuevo co-localizado loci para ambas royas presente en Chilero. Adicionalmente, en esta población fue mapeado un nuevo locus de resistencia a roya amarilla en el cromosoma 7BL. Avocet también contribuyó con dos co-localizados QTL menores, ubicados en el cromosoma 1DL y 4BS. Los marcadores SNP flanqueantes pueden ser convertidos en marcadores KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) para ser empleados en programas de mejoramiento de trigo.

Palabras Clave: Resistencia de planta adulta, roya de la hoja, mapeo de QTL, roya amarilla, *Triticum aestivum*

Abstract

The CIMMYT-derived spring wheat line 'Chilero' has shown high levels of resistance to leaf rust and stripe rust since its development in 1984. The genetic basis of its resistance was investigated in a recombinant inbred line (RIL) population derived from the cross between Avocet and Chilero. The parents and RILs were characterized in field trials for resistance to leaf rust and stripe rust at three locations in Mexico from 2012 to 2015. RIL population was genotyped with DArT-array, DArT-GBS and SSR markers. A total of 6,168 polymorphic markers were used to construct genetic linkage maps. Inclusive composite interval mapping detected four co-located resistance loci to both rusts as well as two stripe rust resistant loci in Avocet × Chilero population. Among these, QTL on chromosome 1BL was the known pleotropic adult plant resistance (APR) gene *Lr46/Yr29*, whereas *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* was a new co-located resistance loci to both rusts in Chilero. Additionally, one new stripe rust resistance locus on chromosome 7BL was mapped in the present population. Avocet also contributed two minor co-located resistance QTL situated on chromosomes 1DL and 4BS. The flanking SNP markers can be converted to breeder friendly Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) markers for wheat breeding program.

Keyword: Adult plant resistance, Leaf rust, QTL mapping, Stripe rust, *Triticum aestivum*

Introduction

Leaf rust (LR) and stripe rust (YR) incited by *Puccinia triticina* Eriks and *P. striiformis* f. sp. *tritici* West., respectively, are two major diseases that cause significant wheat yield losses, especially when susceptible cultivars are grown widely. LR, generally causes yield losses of less than 10%, but in severe epidemics, reported losses can be as high as 30%. On the other hand, YR can cause yield losses up to 50% and in extreme situations complete crop losses (Roelfs et al. 1992). In Mexico, yield losses of 63% caused by LR and 60% caused by YR have been reported in major wheat production areas in the state of Sonora and the El Bajío region, respectively under high disease pressure (<http://www.gob.mx/siap/>). The use of resistant cultivars is considered the most cost-effective and eco-friendly approach to manage both diseases.

Rust resistance is often classified in two categories: race-specific and race non-specific. Race-specific resistance is often controlled by major genes and effective genes against certain races of the pathogen with corresponding avirulence (Flor 1942). In contrast, race non-specific resistance is characterized by broad-spectrum effectiveness against a number of pathogen races. Race non-specific resistance is generally expressed at the adult plant stage and governed by a number of minor-effect resistance genes. It is considered to be more durable. Race non-specific resistance is characterized by a reduced pathogen establishment and growth. As a result, it is commonly referred as “slow rusting” or “partial” or “adult plant resistance” (APR) (Caldwell 1968). The effect of APR genes is usually minor when present alone, however, “near immunity” it can be achieved in a cultivar by combining three to five APR genes (Singh et al. 2000).

So far, more than 75 LR and a similar number of YR resistance genes have been characterized and mapped on specific chromosomes. Among these, three APR genes with pleiotropic effects have been identified, characterized and mapped in wheat, namely; *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* on chromosome 7DS (Dyck 1987; Singh et al. 2012b; Lillemo et al. 2008), *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39* on chromosome 1BL (William et al. 2003) and *Lr67/Yr46/Sr55/Pm46* on 4DL (Herrera-Foessel et al. 2011). These APR genes provide durable resistance to multiple diseases. In addition, several studies in wheat have reported dozens of quantitative trait loci (QTL) distributed across 20 chromosomes for LR resistance (Li et al. 2014) and across all 21 chromosomes for YR resistance (Rosewarne et al. 2013). Therefore, identification of new pleiotropic/co-located resistance sources to leaf rust and stripe rust plays an important role in breeding durable rust resistant wheat cultivars in combination with high and stable yield potential and other important traits (Basnet et al. 2014). Several molecular marker platforms have been used in mapping rust resistance loci, such as simple sequence repeats (SSRs) (Litt and Lutty 1989) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Lander 1996), diversity array technology (DArT) (Jaccoud 2001) and genotyping-by-sequencing (GBS) (Elshire et al. 2011). SSR markers show co-dominance, accuracy, high repeatability, high levels of polymorphism, chromosome specificity, and ease of manipulation (Röder et al., 1998), however the number of available markers are limited compared to high throughput genotyping platform. DArT-array and DArT-silico genotyping systems have markers with presence/absence (dominant). We cannot use them to genotype the early generation due to presence of heterozygotes. However, the DArT-GBS system including DArT-silico and DArT-SNP provides additional

benefits over other genotyping platforms because of its high-throughput capabilities where the whole-genome genotyping system allows detection, scoring of hundreds of polymorphic loci without the need of prior sequence information at lower cost and co-dominance with large number of available markers (Schouten et al. 2012).

Chilero, a bread wheat variety developed by the Global Wheat Program of the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) with pedigree '4777*2//FKN/Gabo 54/3/Veery#5/4/Buckbuck/Pavon F76' (GID CM66684) and was distributed worldwide in 1984. Since then, Chilero has remained highly resistant to LR and YR in the Mexican environment, although the genetic basis of its resistance remains unknown. Therefore, this study was conducted to: 1) determine the number of genes involved in controlling LR and YR resistance in bread wheat line Chilero; 2) identify genomic locations of APR genes to LR and YR; and 3) find the pleotropic/co-located resistance loci to both rusts.

Materials and Methods

Genetic material

An F4-derived F5 population of 96 recombinant inbred lines (RILs) developed from the cross of Avocet-YrA and Chilero was used for this research. Avocet-YrA (here after referred to Avocet) is a YR and LR susceptible selection from the Australian wheat cultivar Avocet without YrA and also known as Avocet S. Chilero displays APR to the predominant races of both rust fungi in Mexico despite a susceptible infection type in seedling stage to one or more races of each pathogen used in field studies. The single-

head descent approach was used to develop this RIL population as described by Basnet et al. (2014). The seed of F5 RILs along with their parents was used in each phenotypic evaluation and genotypic analysis.

Field experiments

The field evaluations were conducted at CIMMYT-México experimental stations: in El Batán, near the city of Texcoco, State of México; Toluca, State of Mexico, and in the Yaqui valley in Ciudad Obregón, State of Sonora (Obregón/CENEB). The LR was evaluated in Obregon during the autumn-winter cycle of 2012-13 (henceforth abbreviated as LR13Y), 2013-14 (LR14Y) and 2014-15 (LR15Y) as well as in El Batán during the 2014 (LR14B) summer-fall cycle. Similarly, the YR was evaluated during summer-fall cycle of 2013 (YR13M), 2014 (YR14M) and 2015 (YR15M) at Toluca and El Batán (YR15B).

The RIL population and the parents were planted in double rows of 0.7 m length, spaced with 0.3 m between them, with around 100 seeds of each RIL. A mixture of Avocet+Yr24 and Avocet+Yr26 lines were used as LR spreader, whereas a mixture of six susceptible wheat lines derived from an Avocet x Attila cross, Morocco and Avocet near-isogenic line carrying gene Yr31 and Yr17 were used as a YR spreader in field trials. Spreaders were planted around the experimental area and as hill plots in the middle of a 0.3 m pathway on one side of each experimental plot. A mixture of Mexican *P. triticina* races MBJ/SP and MCJ/SP (in 1:1 ratio) suspended in Soltrol® 170 Isoparaffin TDS was used to inoculate the LR spreader, whereas a mixture of Mexican

P. striiformis races (Mex96.11, Mex08.13 and Mex14.191) also suspended in Soltrol® 170 was sprayed onto YR spreaders within and around the experimental areas.

The avirulence/virulence formulas of *P. triticina* isolates MBJ/SP and MCJ/SP were described in Herrera-Foessel et al. (2012), and for the *P. striiformis* isolates Mex96.11 and Mex08.13 in Lan et al. (2015). Isolate Mex14.191 is virulent to stripe rust resistance genes *Yr1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 17, 27, 31, A* based on the seedling reactions of the testers (Huerta-Espino, pers. Comm.).

Data collection

The modified Cobb Scale (Peterson et al., 1948) was used to determine the percentage of leaf area affected by the rust in both RILs and parents from the milk stage onwards. In case of repeated disease severity data, the first notes were recorded when the susceptible parent Avocet displayed approximately 70-80% severity and repeated about a week later when it reached 90-100%.

Data analysis

Mendelian segregation analysis (Knott and Padidam 1988; Singh and Rajaram 1992) was used to estimate the number of resistance genes based on the disease severity and reaction, where the observed frequencies for each of the following categories, homozygous parental type resistant (HPTR): homozygous parental type susceptible (HPTS): lines whose responses were different from those of the two parents (OTHER), were tested against the expected frequencies for different numbers of additive genes using Chi-squared (χ^2) test.

Correlation between two rusts across different environments was performed using the statistical software SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC), with PROC CORR program. Calculations for phenotypic effects of single resistance quantitative trait loci (QTL) according to flanking markers and tests of statistical significance for pair-wise comparisons of the means when resistance locus was absent or present were conducted using the PROC GLM and t-test in SAS software.

Molecular analysis

DNA of parents and RILs was extracted from approximately 20 plants per line using the CTAB method (CIMMYT 2006). The diluted DNA of each RIL and parents was sent to Triticarte Pty. Ltd., Canberra, Australia (www.triticarte.com.au) for DArT (Diversity Arrays Technology) genotyping and DArT-GBS analysis. Additionally, some SSR markers were run and used for genotyping the population.

Joinmap 4.1 software (Van Ooijen 2006) was used to construct the linkage map by using the polymorphic molecular markers. Inclusive composite interval mapping (ICIM) was used to detect and map quantitative trait loci (QTL) that provide resistance to both rusts by IciMapping 4.1 software (Meng et al. 2015) based on the final disease severity, the AUDPC of each experiment and the mean of final disease severity (LRM and YRM) across experiments for LR and YR. MapChart was used to draw the graphically visualized linkage maps (Voorrips 2002).

Results

Phenotyping of parents and RILs for resistance to LR and YR

The parents, Avocet and Chilero, displayed a final LR severity (response) of 80-90% (S) and 10-15% (MS), respectively, across all the seasons. Mean LR severity among RILs ranged from 48.7 to 68.3% during four years of evaluation (Table 1). The frequency distribution of RILs for LR severities was continuous across the tested environments (Fig. 1A) which indicates the absence of major genes and quantitative inheritance of APR to LR in this population. Mendelian segregation analysis indicated the presence of 3-5 APR genes that confer resistance to LR in the Avocet × Chilero population (Table 1).

The final YR severity and response of Avocet and Chilero were 100% S and 1-30% MS, respectively. Mean of YR severity among RILs ranged from 57.9 to 71.7% across all environments (Table 1). The frequency distribution of RILs for YR was continuous with a pronounced skewedness towards susceptible across the tested environments (Fig. 1B). Based on Mendelian segregation analysis method, 3-6 APR genes were estimated to provide resistance to YR (Table 1).

Table 1. Estimation of the number of APR genes in a RIL population of Avocet × Chilero using Mendelian segregation analysis based on final disease severities in each environment and mean of leaf rust and stripe rust over four seasons of field evaluation (LRM and YRM).

Category	Number of RILs (adult plant) ^a									
	LRY13	LRY14	LRB14	LRY15	LRM	YRM13	YRM14	YRB15	YRM15	YRM
Avocet	90	90	90	80	87.5	100	100	100	100	97.5
Chilero	15	15	10	15	13.8	1	15	20	30	16.5
Mean of										
RILs	60.5	68.3	60.5	48.7	57.1	57.9	65.4	71.7	67.6	65.7
HPTR ^b	3	3	4	6	2	11	2	1	7	0
HPTS ^c	8	12	1	6	5	13	8	4	13	2
Others ^d	85	81	91	84	89	72	86	91	76	94
Total	96	96	96	96	96	96	96	96	96	96
No.										
Genes	3	3	5	4	4	3	4	4	3	6
<i>P-value</i>	0.15	0.05	0.10	0.15	0.30	0.05	0.05	0.40	0.30	0.20

^a Disease severity and host response to infection determined for leaf rust at Ciudad Obregón during the 2012–2013 (LRY13), 2013-2014 (LRY14) and 2014–2015 (LRY15) seasons; at El Batán 2014 (LRB14) and the mean of leaf rust over four years (LRM); and for stripe rust at Toluca during the 2013 (YRM13), 2014 (YRM14) and 2015 (YRM15) seasons; at El Batán 2015 (YRB15) and the mean of stripe rust over four years (YRM) to determine the adult plant response category of RILs.

^b Homozygous parental type resistant

^c Homozygous parental type susceptible

^d Lines with responses different from the two parents

^e *P* value is for the χ^2 test.

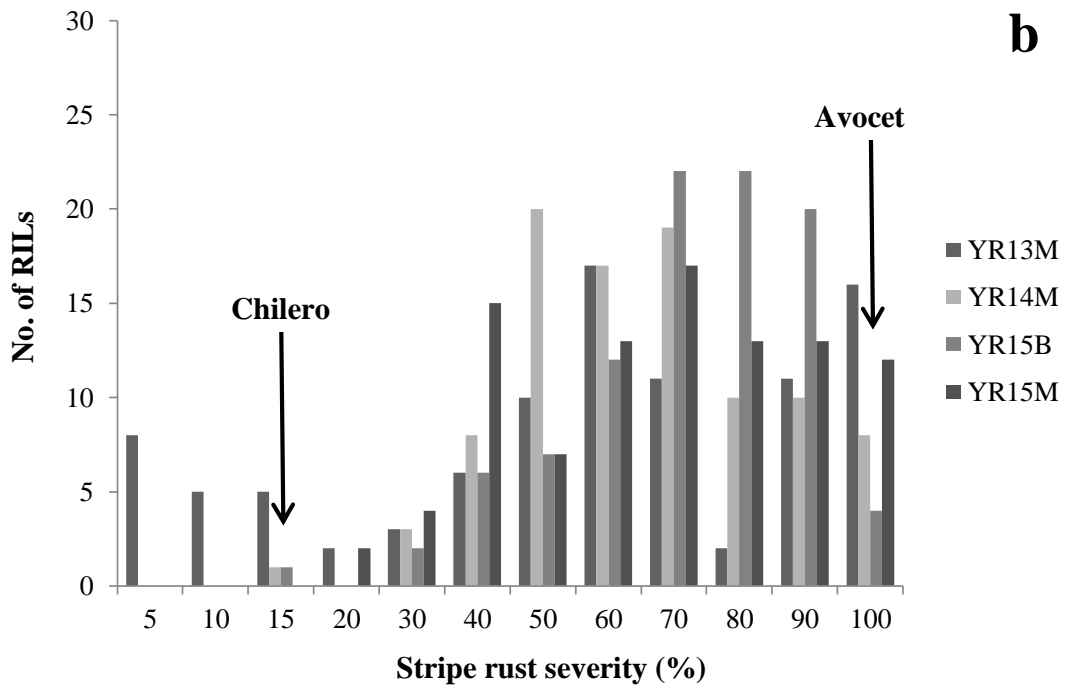
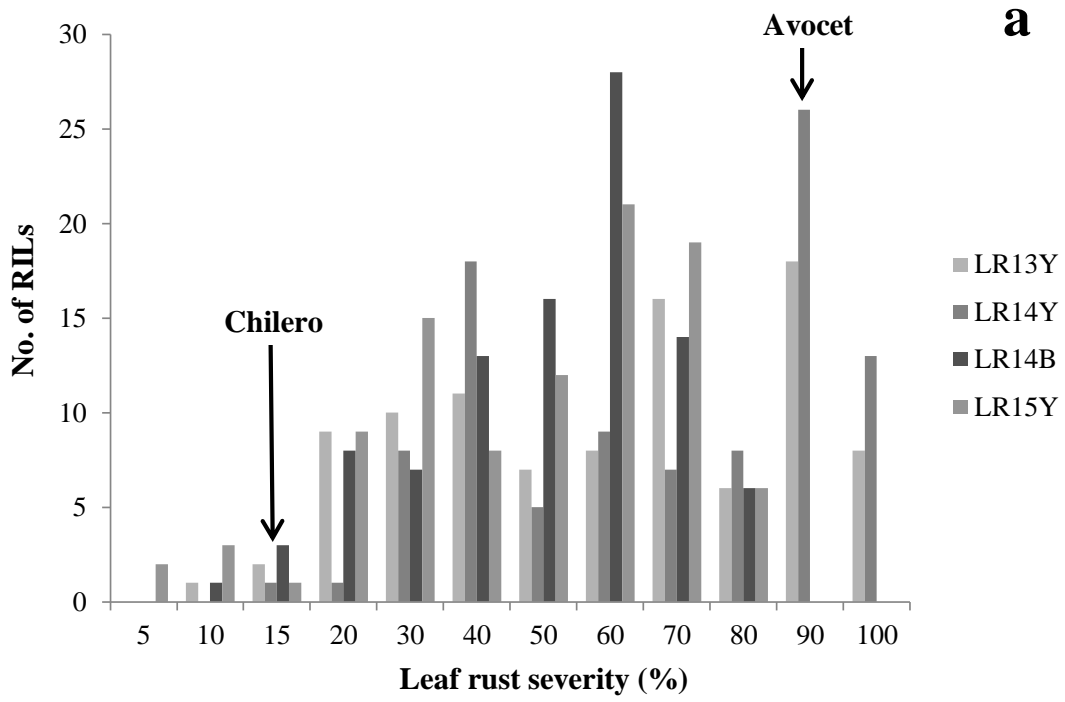


Figure 1. Frequency distribution of the recombinant inbred lines (RILs) of the cross Avocet/Chilero, for the final leaf rust severity (a) trials in Obregón cycles 2012-2013 (LR13Y), 2013-2014 (LR14Y) and 2014-2015 (LR15Y), and in Batán cycle 2014 (LR14B); for the final stripe rust severity (b) in Toluca cycles 2013 (YR13M), 2014 (YR14M) and 2015 (YR15M), and in Batán cycle 2015 (YR15B). The parent mean values are indicated by arrows.

Phenotypic correlation

Pearson correlation coefficients (r) for LR severities of RILs ranged from 0.78 to 0.91, whereas it was 0.46-0.84 for YR severities among RIL over four years (Table 2). Slightly lower but highly significant correlations were also observed between LR and YR severities ($r = 0.50$ - 0.78 , $P < 0.0001$) in all tested environments.

Table 2. Pearson's correlation coefficient between final disease severities of RILs in four environments for leaf rust (LR13Y, LR14Y, LR15Y and LR15B) and stripe rust (YR13M, YR14M, YR15M and YR15B).

	LR13Y	LR14Y	LR14B	LR15Y	YR13M	YR14M	YR15M
LR14Y	0.91**						
LR14B	0.78**	0.80**					
LR15Y	0.86**	0.88**	0.84**				
YR13M	0.54**	0.52**	0.51**	0.50**			
YR14M	0.72**	0.76**	0.77**	0.77**	0.62**		
YR15M	0.73**	0.76**	0.78**	0.75**	0.58**	0.84**	
YR15B	0.50**	0.52**	0.56**	0.56**	0.46**	0.70**	0.73**

** $P < 0.0001$

Linkage map construction

A total of 23,536 DArT and 150 simple sequence repeat (SSR) markers were genotyped in two parents and 96 RILs. Finally, 6,168 polymorphic molecular markers (6,151 DArT and 17 SSR) were used to construct the genetic linkage map, spanning 2,544 cM, 3,093 cM and 792 cM in the A, B and D genomes, respectively. A total of 68 linkage groups were defined on the 21 chromosomes and only the linkage groups related to the location of QTL are reported.

QTL for APR to LR and YR in Chilero

Two co-located resistance loci in Chilero imparted resistance to both LR and YR. *QLr.cim-1BL/QYr.cim-1BL* was found to be the most consistent locus with the largest effect and flanked by DArT markers 1164928 and 2289154 on the long arm of chromosome 1B (Table 3). This resistance locus was detected in all LR experiments, while for YR it was only detected in YR14M, YR15M, YR15B and YRM. It explained 42.6-74.5% and 9.6-55.2% of LR and YR variations, respectively (Fig. 2a; Table 3). The second co-located QTL, *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS*, located on the short arm of the chromosome 5D (Table 3). This QTL was flanked by the DArT markers 100002510 and 3948152. It explained 5.2-34.0% and 4.7% of LR and YR variations, respectively (Fig. 2b; Table 3).

In addition, two stripe rust resistance QTL were located on wheat chromosomes 6BS and 7BL, designated as *QYr.cim-6BS* and *QYr.cim-7BL*, respectively. *QYr.cim-6BS*, flanked by markers 4396419 and 1209575, was detected in YR14M, YR15M and YR15B. It explained 12.9-26.4% of YR variation (Fig. 2c; Table 3). The second QTL,

QYr.cim-7BL, was flanked by markers 100006719 and 1112830, and was consistently identified in all the environments and YRM. It explained 7.6-48.4% of YR variation (Fig. 2d; Table 3).

Table 3. Position and effects of quantitative trait loci (QTL) for adult plant resistance (APR) to leaf rust (LR) and stripe rust (YR) and final disease severity over all tested environments by using inclusive composite interval mapping (ICIM) by IciMapping 4.0 software in the RIL population (Avocet×Chilero).

	QTL ^a	Env	Position ^b	LeftMarker	RightMarker	LOD ^c	PVE(%) ^d	Add ^e
LR/YR	<i>QLr.cim-1BL</i>	LR13Y	74	<i>snp1137809</i>	<i>snp1697802</i>	37.2	64.6	18.2
		LR14Y	74	<i>snp1137809</i>	<i>snp1697802</i>	39.3	69.0	18.8
		LR15Y	74	<i>1164928</i>	<i>2289154</i>	11.3	42.6	18.3
		LR14B	74	<i>snp1137809</i>	<i>snp1697802</i>	23.9	49.4	12.6
		LRM	75	<i>1164928</i>	<i>2289154</i>	42.9	74.5	20.5
	<i>QYr.cim-1BL</i>	YR13M	62	<i>snp1112007</i>	<i>snp2263671</i>	18.8	20.0	12.9
		YR14M	62	<i>snp1112007</i>	<i>snp2263671</i>	21.0	47.1	12.1
		YR15B	76	<i>2289154</i>	<i>4005037</i>	9.4	24.8	8.6
		YR15M	75	<i>1164928</i>	<i>2289154</i>	21.9	53.3	15.5
		YRM	75	<i>1164928</i>	<i>2289154</i>	30.5	55.2	13.1
	<i>QLr.cim-1DL</i>	LR13Y	21	<i>wPt-741613</i>	<i>snp999473</i>	5.9	22.6	-6.7
		LR14Y	20	<i>snp1099827</i>	<i>wPt-741613</i>	4.8	12.4	-4.3
		LR15Y	16	<i>100458285</i>	<i>3944329</i>	4.3	14.4	-4.4
	<i>QYr.cim-1DL</i>	YR14M	26	<i>100001883</i>	<i>3934217</i>	5.3	11.6	-6.6
		YR15M	32	<i>3934217</i>	<i>wPt-732579</i>	3.4	13.2	-5.7
<i>QLr.cim-4BS</i>	LR14Y	14	<i>snp100456066</i>	<i>3946892</i>	3.8	12.1	-4.3	
	LR15Y	22	<i>4010053</i>	<i>snp100495483.2</i>	2.7	13.7	-8.7	
<i>QYr.cim-4BS</i>	YR15M	13	<i>1118129</i>	<i>snp100456066</i>	6.2	15.8	-6.2	
<i>QLr.cim-5DS</i>	LR13Y	20	<i>100002510</i>	<i>3948152</i>	12.2	34	8.4	
	LR15Y	19	<i>1695607</i>	<i>100093377</i>	2.6	5.2	52.7	
<i>QYr.cim-5DS</i>	YR13M	20	<i>100002510</i>	<i>3948152</i>	7	4.7	6.9	
YR	<i>QYr.cim-6BS</i>	YR14M	66	<i>4396419</i>	<i>1209575</i>	9.9	13.8	7.8
		YR15B	66	<i>4396419</i>	<i>1209575</i>	2.9	12.9	4.2
		YR15M	68	<i>3384782</i>	<i>4440245</i>	8.8	13.9	8.1
	<i>QYr.cim-7BL</i>	YR13M	190	<i>100006719</i>	<i>1112830</i>	9	11.2	10.7

YR14M	190	100006719	1112830	7.8	16	8.1
YR15B	190	100006719	1112830	2.7	12.3	4.2
YR15M	190	100006719	1112830	11.8	40.6	13.2
YRM	190	100006719	1112830	21.9	48.4	16

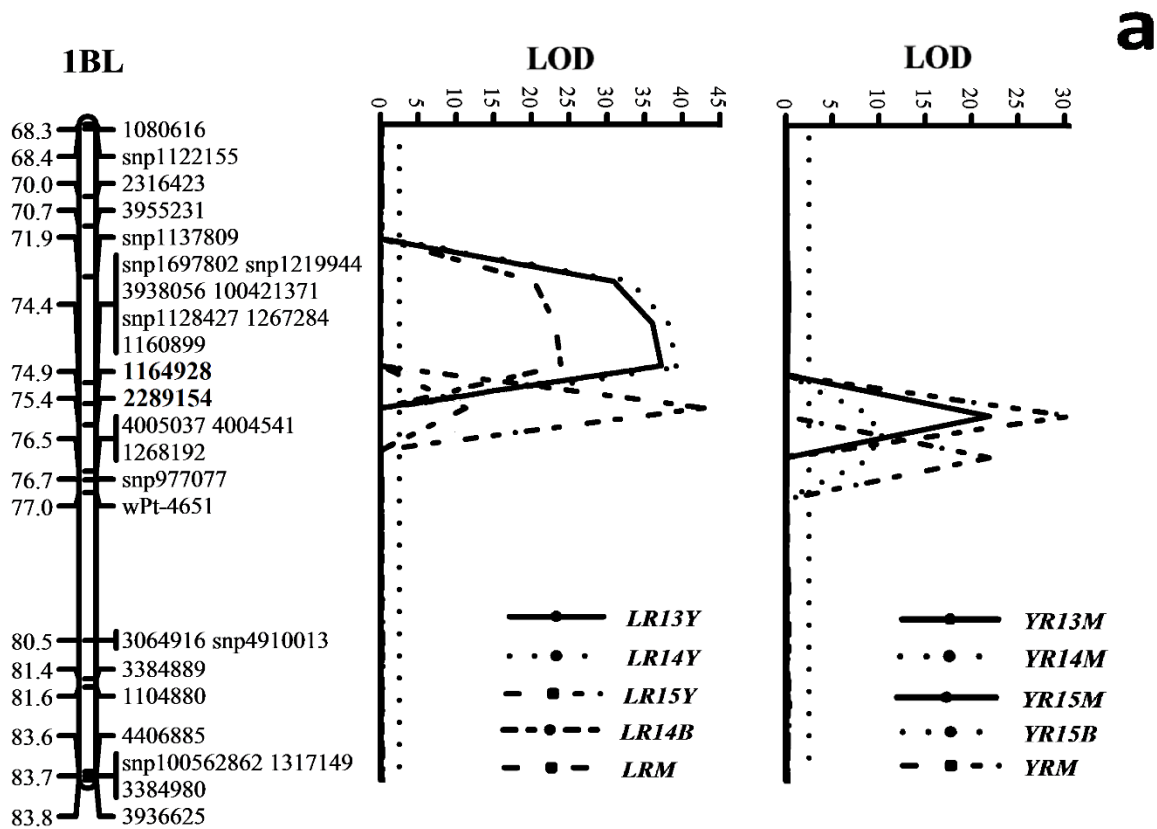
^a QTL extending across the same confidence intervals were assigned with the same symbol

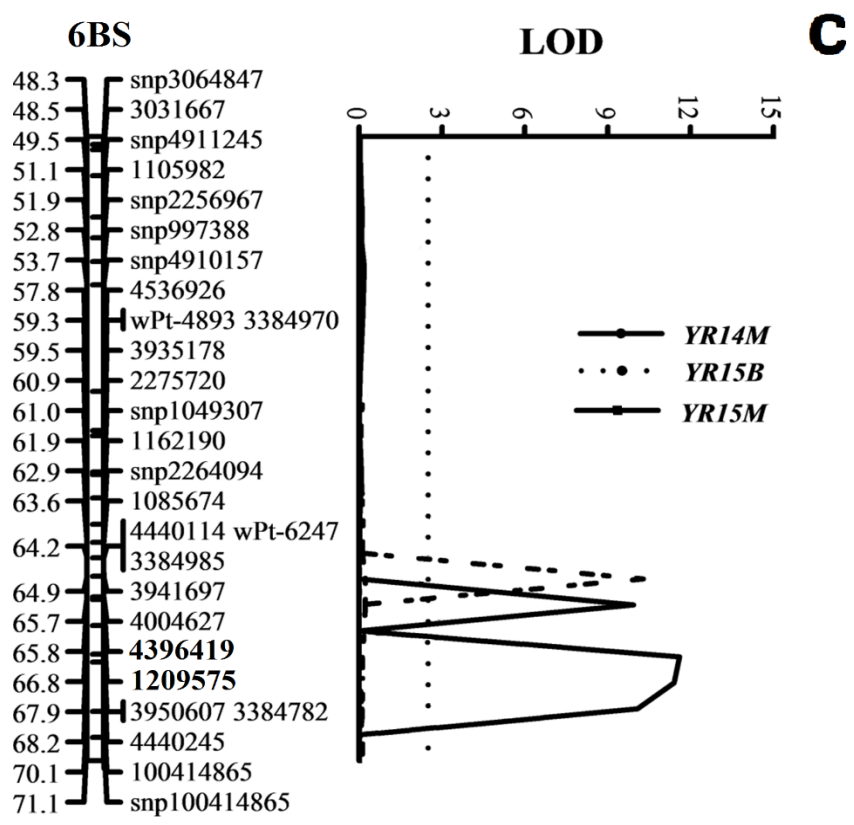
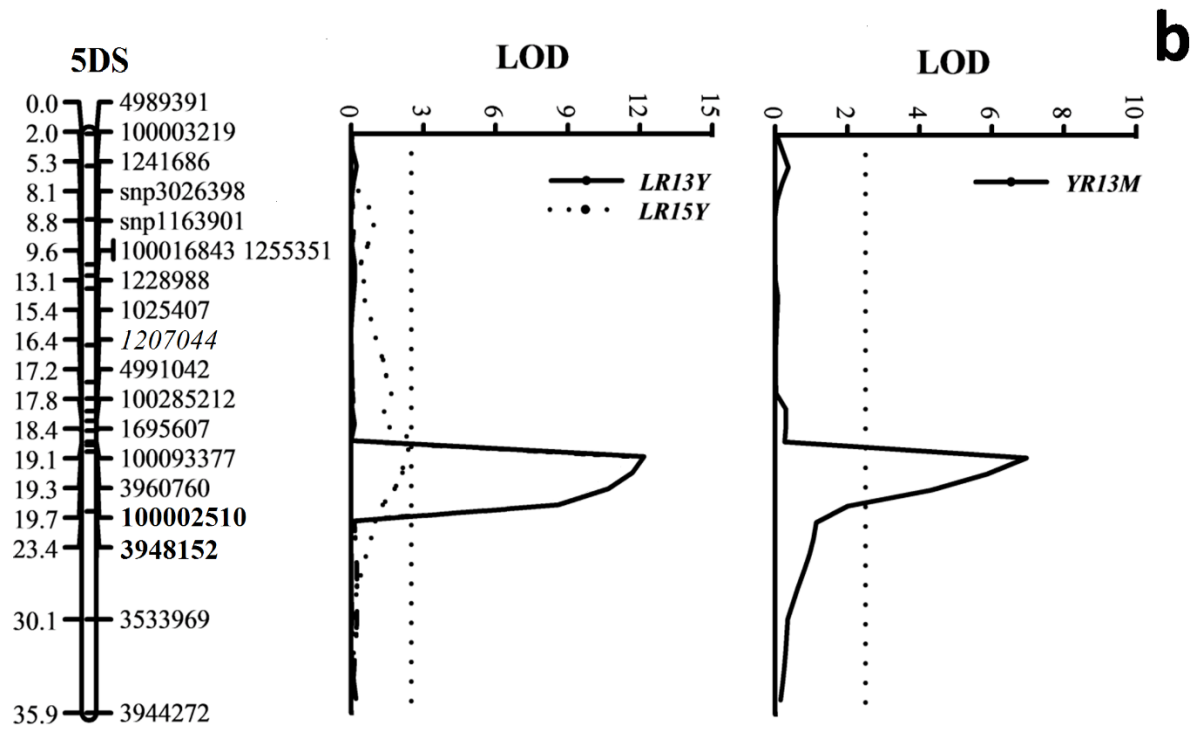
^b Peak position in centi-Morgans from the first linked marker of the relevant linkage group

^c Logarithm of odds (LOD) score to detect QTL

^d PVE is the proportion of phenotypic variance explained by the QTL

^e Additive effect of phenotypic variance for each QTL





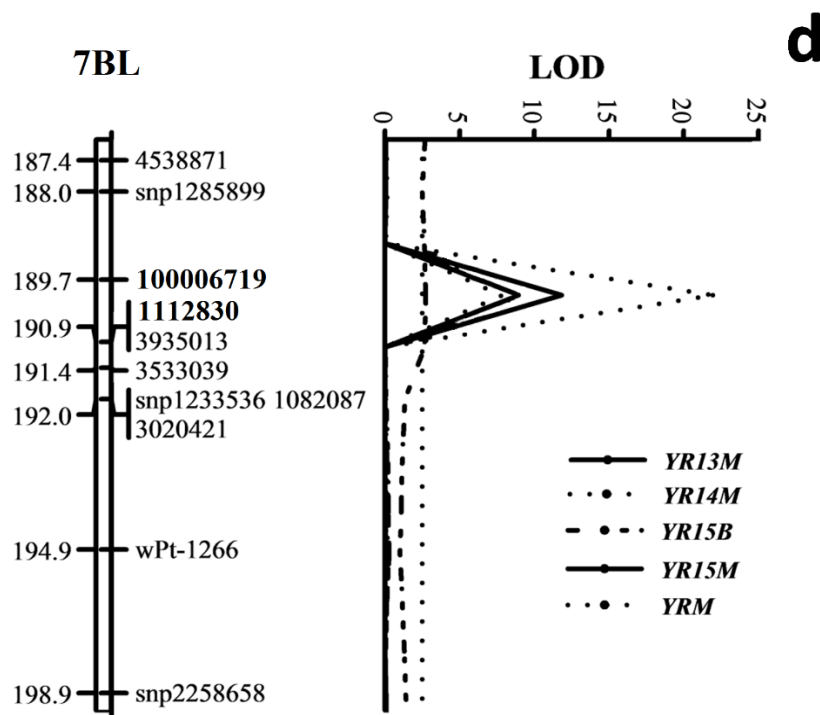


Figure 2. Graphics of quantitative trait loci (QTL) for adult plant resistance (APR) to leaf rust on chromosomes 1B (a), 1D (b), 4B (c), and 5D (d), and for stripe rust resistance on chromosomes 1B (a), 1D (b), 4B (d), 5D (d), 1B (e), 5B (f), 6B (g) and 7B (h), respectively, identified by using IciMapping 4.0 in the Avocet × Chilero RIL population. The LOD thresholds were detected based on 1,000 permutations. Positions (in cM) of the molecular markers along chromosomes are shown on the vertical axes. The phenotypic data for leaf rust tested in four environments (LR13Y, LR14Y, LR15Y and LR14B); for stripe rust phenotypic data also evaluated in four environments (YR13M, YR14M, YR15M and YR15B); area under disease progress curve (AUDPC) in each environment of evaluation and year (LR13AY, LR14AY, LR14AB, LR15AY,

YR13AM, YR14AM, YR15AM, YR15AB); and the mean of final disease severity over the tested environments (LRM and YRM).

QTL for APR to LR and YR in Avocet

Two co-located minor resistance QTL for LR and YR, *QLr.cim-1DL/QYr.cim-1DL* and *QLr.cim-4BS/QYr.cim-4BS*, were mapped on chromosomes 1DL and 4BS, respectively. *QLr.cim-1DL/QYr.cim-1DL* was detected in LR2012Y, LR2013Y, LR2014Y, YR2014M and YR2015M environments. It was flanked by markers wPt-741613 and snp999473 (Table 3), and explained 12.4-28.7% and 11.6-13.2% of LR and YR variation, respectively. The second QTL, *QLr.cim-4BS/QYr.cim-4BS*, was detected in LR2014, LR2015 and YR2015 environments. It was flanked by markers snp100456066 and 3946892, and explained 12.1-13.7 and 2.2-15.8% of LR and YR variation, respectively (Table 3) in the adult plant stage.

Single QTL analysis of *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS*

RILs were divided into two groups; RILs carrying *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* and RILs not-carrying *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS*, based on the flanking markers of of this locus. Mean leaf rust severity of RILs carrying this QTL ranged from 15 to 80%, whereas the severity of RILs without this locus was 20 to 90% (Fig. 3A). On the other hand, the mean for stripe rust severity for genotypes carrying this QTL was 20 to 80%, and that for those not carrying this locus was 30 to 90% (Fig. 3B). QTL *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* reduced 10-23% leaf rust severity while an 11-21% of stripe rust reduction was observed (Table 4).

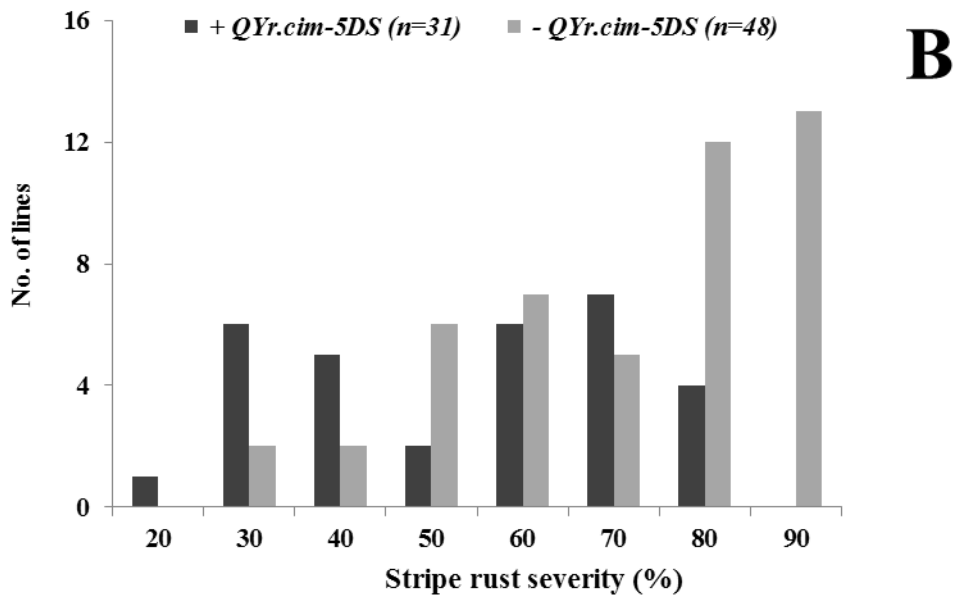
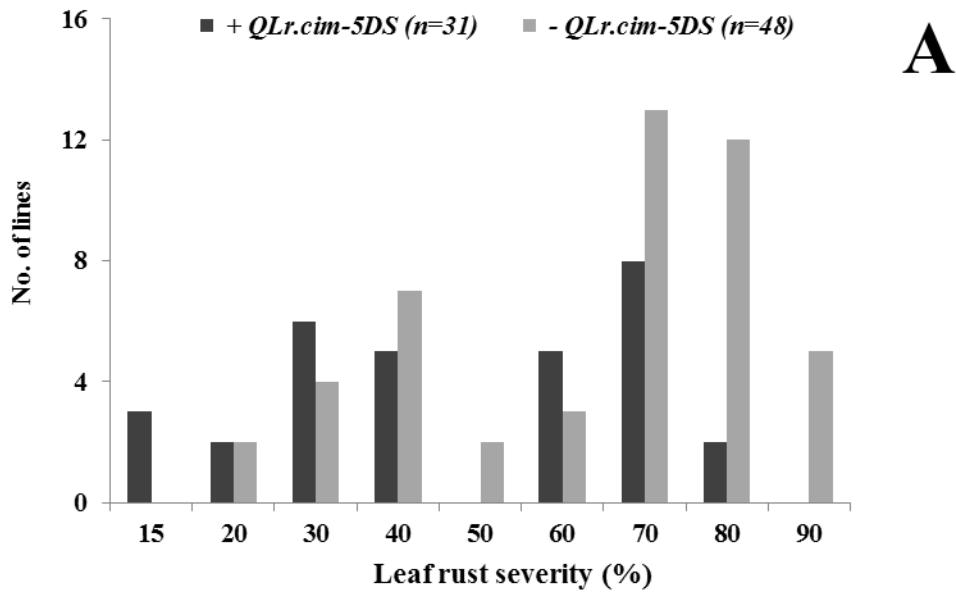


Figure 3. Comparison of recombinant inbred lines (RILs) from Avocet/Chilero, for mean leaf rust severity and mean stripe rust severity in the presence or absence of the co-located QTL, *QLr.cim-5DS*/*QYr.cim-5DS*. A, Effect of *QLr.cim-5DS* on leaf rust, present (+*QLr.cim-5DS*) and absent (-*QLr.cim-5DS*). B, Effect of *QYr.cim-5DS* on stripe

rust, present (+*QYr.cim-5DS*) and absent (-*Qyr.cim-5DS*). The number of RILs in each category is shown in parentheses.

Table 4. Frequencies of Avocet × Chilero recombinant inbred lines (RILs) with resistance locus *QLr.cim-5DS* and *QYr.cim-5DS*, with their mean leaf rust and stripe rust severities, when resistance genes were absent or present.

LR resistance locus	RILs (No)	^a LR1 3Y	LR1 4Y	LR14 B	LR15 Y	LR M	YR resistance locus	^b YR13 M	YR14 M	YR15 M	YR15 B	YR M
- <i>QLr.cim-5DS</i>	48	71a ^c	75a	56a	53a	64a	- <i>QYr.cim-5DS</i>	65a	72a	76a	75a	72a
+ <i>QLr.cim-5DS</i>	31	48b	62b	43b	43b	49b	+ <i>QYr.cim-5DS</i>	44b	56b	57b	64b	56b

^a Disease severity determined for leaf rust at Ciudad Obregón during the 2012–2013 (LRY13), 2013-2014 (LRY14) and 2014–2015 (LRY15) seasons, at El Batán 2014 (LRB14) and the mean of leaf rust over four years (LRM).

^b Disease severity determined for stripe rust at Toluca during the 2013 (YRM13), 2014 (YRM14) and 2015 (YRM15) seasons, at El Batán 2015 (YRB15) and the mean of stripe rust over four years (YRM).

^c Different letters within each column following the mean indicate significant differences based on the *t* test ($P < 0.01$).

Discussion

Mendelian analyses showed that around 3-5 APR genes for LR and 3-6 APR genes for YR segregated in Avocet × Chilero population, while four co-located resistance QTL and three YR resistance QTL were detected using the ICIM based on 1,000 permutations. In addition, two minor resistance QTL derived from Avocet were also

mapped in the population, confirming that to achieve near immune response to rusts 4-5 genes with additive effects need to be combined (Singh et al. 2000). A significant correlation between LR and YR ($r = 0.50-0.78$) was found, an indicator that co-located/pleiotropic effect loci are conferring resistance to both rusts. William et al. (2006) reported three co-located resistance loci on chromosomes 1BL, 4BL and 6AL to both rusts with a higher correlation ($r = 0.68-0.85$) between LR and YR severities in the Avocet × Pavon 76 F6 RIL population.

Lan et al. (2015) observed in the Avocet × Sujata population that the estimation of gene number usually represents the minimum number of polygenic loci segregating in a population, and estimated that the numbers of genes on the χ^2 and Wright's method were similar to the number of QTL detected, despite a slight discrepancy. These results are similar to the results found in earlier studies, where the estimation of gene number in the Avocet × Chilero population with the χ^2 method (3-5 APR genes for LR and 3-6 for YR) is comparable to significant QTL reported (4 QTL for LR and 7 for YR).

Resistance QTL on chromosome 1BL

The pleiotropic resistance locus on chromosome 1BL identified in Chilero corresponds to the known APR gene *Lr46/Yr29* based on the closely linked molecular markers and leaf tip necrosis (LTN) in the adult plant stage. This resistance gene is widely used in CIMMYT germplasm and confers partial resistance to LR and YR (Singh et al. 1998). The effectiveness of this locus in providing partial resistance to wheat rusts and the resistance performance depends on environmental conditions and genetic background

(Lan et al. 2015). *Lr46/Yr29* explained 7-65% and 8-66% of LR and YR severity variation, respectively, in different bi-parental mapping populations under different experimental conditions (Basnet et al. 2013; Calvo-Salazar et al. 2015; Lan et al. 2014; Lan et al. 2015; Rosewarne et al. 2012; Ren et al. 2017).

Resistance QTL on chromosome 5DS

QTL *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* was located on the short arm of the chromosome 5D. So far, leaf rust resistance gene *Lr1* has been mapped on long arm of chromosome 5D (Crossa et al. 2007; Feuillet et al. 1995), whereas it does not show any effect on stripe rust. Messmer et al. (2000) found a leaf rust resistance QTL flanked by markers *Xpsr906a* and *Xpsr580a* on 5DL in cultivar Oberkulmer, which explained 9.1% of leaf rust variance in the adult plant stage. Bariana et al. (2007) found a co-located resistance QTL to leaf rust and stripe rust on chromosome 5DS in Cranbrook. It was flanked by marker *psr326b* and explained 8% of LR and YR variation. It was more than 25 cM away from *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* based on the wheat consensus map (Akbari et al. 2006; Chalmers et al. 2001), suggesting that this QTL could be a new co-located resistance locus from Chilero.

Stripe rust resistance QTL on chromosome 6BS

QYr.cim-6BS was located in the short arm of chromosome 6B and explained 12.9-26.4% of the YR variation. High-temperature adult-plant (HTAP) stripe rust resistance gene *Yr36* (closely linked to *Gpc-B1* gene), was mapped on chromosome 6BS from the durum wheat cultivar Langdon and linked to SSR marker *Xbarc10*. This gene is approximately 50 cM away from *QYr.cim-6BS* based on the DArT map (Crossa et al.

2007; Marone et al. 2012). Thus, *QYr.cim-6BS* should be different from *Yr36*. Rosewarne et al. (2013) reported a QTL on chromosome 6BS that explained between 4-43% of the stripe rust variation in a region different to the HTAP *Yr36* gene. Santra et al. (2008) found two QTL, *QYrst.wgp-6BS.1* and *QYrst.wgp-6BS.2*, which explained 32-45% and 25-43% of stripe rust variation, respectively in wheat cultivar Stephens. These QTL were flanked by SSR markers *Xbarc101* & *Xbarc136* and *Xgwm132* & *Xgdm113* (mapped in a 17.5 cM region), respectively. *Yr36* was identified as different gene from the two QTL reported, based on allelism tests. However, based on the DArT map, the QTL *QYr.cim-6BS* from Chilero is located in the same region of QTL, *QYrst.wgp-6BS.2* reported in Stephens.

Stripe rust resistance QTL on chromosome 7BL

QYr.cim-7BL locus was located on the long arm of chromosome 7B and was detected across all environments explaining 7.6-68.4% of YR variation. So far, known YR resistance genes *Yr39* (Cossa et al. 2007; Coram et al. 2008), *Yr59* (Zhou et al. 2014) and *Yr67* (Bansal, personal communication; McIntosh et al. 2014) have been reported on chromosome 7BL. *Yr59*, flanked by markers *Xwgp5175* and *Xbarc32*, explained 31.8 to 54.7% of the YR severity variation and was identified in a line PI 178759 (collected from Iraq). This gene was also reported to be located 21-28 cM away from *Yr39* flanked by *Xwgp45* and *Xwgp43* markers explaining 64.2% of stripe rust variation in wheat cultivar Alpowa, whereas based on DArT linkage map, *QYr.cim-7BL* was estimated to be located approximately 21-28 cM away from *Yr39* (Marone et al. 2012). *Yr67* was identified in wheat line C591 and closely linked to SSR marker *cfa2040* with a genetic distance of 8 cM (Bansal, personal communication; McIntosh et al. 2014). In

addition, Lan et al. (2015) also mapped one stripe rust resistance gene at the same chromosome location in Sujata. However, *QYr.cim-7BL* was located at the same chromosome location as *wPt-1330* and *wPt-5816* on the distal end of 7BL based on DArT consensus map (Francki et al. 2009) that is closely linked to SSR marker *gwm344* with a genetic distance of 8 cM away from *Yr67*. Therefore, *QYr.cim-7BL* is most likely a new locus conferring APR to YR in Chilero.

Resistance QTL from Avocet

Two co-located resistance QTL to LR and YR on chromosomes 1DL and 4BS were contributed by Avocet. Several leaf-rust resistance genes have been mapped in wheat chromosome 1D; most of them are race-specific, such as *Lr21* (Kerber and Dyck 1969) and *Lr42* (Cox et al. 1994). *Lr21* was mapped in the cultivar KS86WGRC02 on chromosome 1DS and closely linked to the RFLP marker *KSUD14* that was identified as an excellent marker for selection of lines carrying *Lr40* and *Lr21* in diverse wheat breeding and wild *Ae. tauschii* populations (Huang and Gill 2001). *Lr42* showed recessive inheritance and was mapped in an F₂ population (KS93U50/Morocco) (Liu et al. 2013) and Avocet × Quaiu 3 (Basnet et al. 2014). It is located on the distal end of chromosome 1DS and flanked by markers, *Xwmc432* and *Xgdm33*. Ren et al. (2012) identified a QTL to stripe rust (*QYr.caas-1DS*, flanked by markers *Xgwm353* and *Xgdm33b*) on chromosome 1DS in cultivar Naxos that explained 2.1-5.8% of the phenotypic variation. *Yr25* was located on chromosome 1D and was identified to be present in several cultivars used for pathogen-race differentiation (Calonnec and Johnson 1998). QTL *QLr.cim-1DL/QYr.cim-1DL* detected in this study is located in the long arm of chromosome 1D and conferred resistance to both leaf rust and stripe rust.

Stripe rust resistance QTL, *QYr.cim-4BS* was mapped on the short arm of 4B from Avocet based on the DArT consensus map (Crossa et al. 2007; Marone et al. 2012). Several resistance genes (race specific) have been mapped in the chromosome 4B. The *Lr25* gene was transferred from *Secale cereale* L. and showed good resistance to leaf rust in Southeast Asia. It was closely linked to co-dominant SSR marker *Xgwm251* and placed 3.8 cM away from the *Lr25* locus on 4BL (Singh et al. 2012a). Singh et al. (1999) reported that *Lr12* is either completely linked with *Lr31* or is the same gene. In addition, *Lr31* is located on chromosome 4BS, indicating that *Lr12* must also be located on 4BS, whereas Singh and Bowden (2011) identified and mapped *Lr12* on chromosome 4BL in wheat line TcLr12 and flanked by markers *Xgwm251* and *Xgwm149*, Suenaga et al. (2003) found a stripe rust resistance QTL in cultivar Oligoculm that is closely linked to marker *Xgwm538* on the long arm of chromosome 4B. In the present study, QTL *QYr.cim-4BS* is located on the short arm of chromosome 4B and confers resistance to both rusts.

Lillemo et al. (2008) found a major QTL on chromosome 4BL in Avocet close to marker *XwPt-6209* that conferred resistance to powdery mildew. Rosewarne et al. (2012) identified four minor QTL from Avocet on chromosomes 3A, 4B, 6A and 7A. These loci had relatively low LOD and PEV values and were often inconsistent across environments. Thus, *QYr.cim-4BS* might be the same resistance locus as detected by Lillemo et al. (2008) and Rosewarne et al. (2012).

Chilero, a high yielding spring wheat line developed by CIMMYT, provides intermediate resistance to LR and YR in Mexican rust environment. We found three transgressive RILs combining three QTL on chromosomes 1BL (*Lr46/Yr29*), 1DL and

5DS with leaf rust severities lower than 10% under field condition, whereas the lowest stripe rust severities was observed in RILs carrying QTL on chromosomes 1BL (*Lr46/Yr29*), 5DS and 6BL. Unfortunately, we did not obtain RILs combining all detected resistance loci due to limited population size. Single gene mapping populations for RIL carrying QTL 5DS is under development for fine mapping. The closely linked molecular markers for *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* will also be converted to breeder-friendly kompetitive allele specific PCR (KASP) markers for utilization in wheat breeding.

Acknowledgements

This work was supported by Australian Grains Research and Development Corporation (GRDC), Australian Cereal Rust Control Program (ACRCP), National Natural Science Foundation of China (31301309) and the International Foundation for Science (C/5147-1). We are also grateful to the Secretary of Higher Education, Science, Technology and Innovation (SENESCYT-Ecuador) and to the National Institute of Agricultural and Livestock Researches (INIAP-Ecuador). English editing by Julie Mollins is also highly appreciated.

References

- Akabari, M., Wenzl, P., Caig, V., Carling, J., Xia, L., Yang, S., Uszynski, G., Mohler, V., Lehmensiek, A., Kuchel, H., Hayden, M. J., Howes, N., Sharp, P., Vaughan, P., Rathmell, B., Huttner, E., and Kilian, A. 2006. Diversity arrays technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theor. Appl. Genet.* 113:1409–1420.
- Bariana, H. S., Miah, H., Brown, G. N., Willey, N., and Lehmensiek, A. 2007. Molecular mapping of durable rust resistance in wheat and its implication in breeding. In: Buck, H. T., Nisi, J. E., Salomón, N. (eds) *Wheat production in stressed*

environments. *Developments in plant breeding*, vol 12, Springer, Berlin, pp 723-728.

- Basnet, B. R., Singh, R. P., Herrera-Foessel, S. A., Ibrahim, A. M. H., Huerta-Espino, J., Calvo-Salazar, V., and Rudd, J. 2013. Genetic analysis of adult plant resistance to yellow rust and leaf rust in common spring wheat Quaiu#3. *Plant Dis.* 97:728-736.
- Basnet, B. R., Singh, R. P., Ibrahim, A. M. H., Herrera-Foessel, S. A., Huerta-Espino, J., Lan, C., and Rudd, J. C. 2014. Characterization of Yr54 and other genes associated with adult plant resistance to yellow rust and leaf rust in common wheat Quaiu 3. *Mol. Breed.* 33:385-399.
- Caldwell, R. M. 1968. Breeding for general and/or specific plant disease resistance. In: Finlay KW, Shepherd KW (eds). *Proceedings of the Third International Wheat Genetics Symposium*. Canberra, Australia: Australian Academy of Sciences, pp. 263–272.
- Calonnec, A., and Johnson, R. 1998. Chromosomal Location of Genes for Resistance to *Puccinia striiformis* in the Wheat Line TP1295 Selected from the Cross of Soissonais-Desprez with Lemhi. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:835-847.
- Calvo-Salazar, V., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Cruz-Izquierdo, S., Lobato-Ortiz, R., Sandoval-Islas, S., Vargas-Hernández, M., German, S., Silva, P., Basnet, B. R., Lan, C. X., and Herrera-Foessel, S. A. 2015. Genetic analysis of resistance to leaf rust and yellow rust in spring wheat cultivar Kenya Kongoni. *Plant Dis.* 99:1153-1160.
- Chalmers, K. J., Campbell, A. W., Kretschmer, J., Karakousis, A., Henschke, P. H., Pierens, S., Harker, N., Pallotta, M., Cornish, G. B., Shariflou, M. R., Rampling, L. R., McLauchlan, A., Daggard, G., Sharp, P. J., Holton, T. A., Sutherland, M. W., Appels, R., Langridge, P. 2001. Construction of three linkage maps in bread wheat, *Triticum aestivum*. *Aust. J. Agric. Res.* 52:1089-1119.
- CIMMYT. 2006. *Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*, 3rd ed. CIMMYT, México D. F., Mexico.
- Coram, T. E., Settles, M. L., and Chen, X. 2008. Transcriptome analysis of high-temperature adult-plant resistance conditioned by Yr39 during the wheat-*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction. *Mol. Plant Pathol.* 9:479-493.
- Cox, T. S., Raupp, W. J., and Gill, B. S. 1994. Leaf rust-resistance genes Lr41, Lr42, and Lr43 transferred from *Triticum tauschii* to common wheat. *Crop Sci.* 34:339-43.
- Crossa, J., Burgueño, J., Dreisigacker, S., Vargas, M., Herrera-Foessel, S. A., Lillemo, M., Singh, R. P., Trethowan, R., Warburton, M., Franco, J., Reynolds, M., Crouch, J. H., and Ortiz, R. 2007. Association analysis of historical bread wheat

germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics* 177:1889-1913.

- Dyck, P. L. 1987. The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Gemone* 29: 467-469.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., and Mitchell, S. A. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6:e19379
- Feuillet, C., Messmer, M., Schachermayr, G., and Keller, B. 1995. Genetic and physical characterization of the Lr1 leaf rust resistance locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Mol. Gen. Genet.* 248:553-562.
- Flor, H. H. 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32:653-669.
- Francki, M. G., Walker, E., Crawford, A. C., Broughton, S., Ohm, H. W., Barclay, I., Wilson, R. E., McLean, R. 2009. Comparison of genetic and cytogenetic maps of hexaploid wheat (*Triticumaestivum* L.) using SSR and DArT markers. *Mol. Genet. Genomics* 281:181-191.
- Herrera-Foessel, S. A., Lagudah, E. S., Huerta-Espino, J., Hayden, M. J., Bariana, H. S., Singh, D., and Singh, R. P. 2011. New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes Lr67 and Yr46 in wheat are pleiotropic or closely linked. *Theor. Appl. Genet.* 122:239-249.
- Herrera-Foessel, S., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Rosewarne, G., Periyannan, S., Viccars, L., Calvo-Salazar, V., Lan, C., and Lagudah, E. S. 2012. Lr68: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 124:1475-1486.
- Huang, L., and Gill, B. S. 2001. An RGA-like marker detects all known Lr21 leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. *Theor. Appl. Genet.* 103:1007-1013.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., and Kilian, A. 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res.* 29: e25.
- Kerber, E. R., and Dyck, P. L. 1969. Inheritance in hexaploid wheat of leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa*. *Can. J. Genet. Cytol.* 11:639-647.
- Knott, D. R., and Padidam, M. 1988. Inheritance of resistance to stem rust in six wheat lines having adult plant resistance. *Genome* 30:283-288.
- Lan, C. X., Rosewarne, G. M., Singh, R. P., Herrera-Foessel, S. A., Huerta-Espino, J., Basnet, B. R., Zhang, Y. L., and Yang, E. N. 2014. QTL characterization of

- resistance to leaf rust and stripe rust in the spring wheat line Francolin#1. *Mol. Breed.* 34:789-803.
- Lan, C., Zhang, Y., Herrera-Foessel, S. A., Basnet, B. R., Huerta-Espino, J., Lagudah, E. S., and Singh, R. P. 2015. Identification and characterization of pleiotropic and co-located resistance loci to leaf rust and stripe rust in bread wheat cultivar Sujata. *Theor. Appl. Genet.* 128:549-561.
- Lander, E. S. 1996. The new genomics: Global views of biology. *Science*, 274, 5287; Proquest pg. 536.
- Li, Y., Niu, Y. C., and Chen, X. M. 2009. Mapping a stripe rust resistance gene YrC591 in wheat variety C591 with SSR and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 118:339-346.
- Li, Z., Lan, C., He, Z., Singh, R. P., Rosewarne, G. M., Chen, X., and Xia, X. 2014. Overview and application of QTL for adult plant resistance to leaf rust and powdery mildew in wheat. *Crop Sci.* 54:1907-1925.
- Lillemo, M., Asalf, B., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Chen, X. M., He, Z. H., and Bjornstad, A. 2008. The adult plant rust resistance loci Lr34/Yr18 and Lr46/Yr29 are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theor. Appl. Genet.* 116:1155-1166.
- Litt, M., and Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actine gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:397-401.
- Liu, Z., Bowden, R. L., and Bai, G. 2013. Molecular markers for leaf rust resistance gene Lr42 in wheat. *Crop Sci.* 53:1566-1570.
- Marone, D., Laido, G., Gadaleta, A., Colasuonno, P., Ficco, D., Giancaspro, A., Giove, S., Panio, G., Russo, M., De Vita, P., Cattivelli, L., Papa, R., Blanco, A., and Mastrangelo, A. 2012. A high-density consensus map of A and B wheat genomes. *Theor. Appl. Genet.* 125:1619-1638.
- McIntosh, R. A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Appels, R., and Xia, X. C. 2014. Catalogue of gene symbols for wheat. 12th International Wheat Genetics Symposium. Yokohama, Japan. 31 pp.
- Meng, L., Li, H., Zhang, L., and Wang, J. 2015. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *Crop J.* 3:269-283.
- Messmer, M. M., Seyfarth, R., Keller, M., Schachermayr, G., Winzeler, M., Zanetti, S., Feulliet, C., and Keller, B. 2000. Genetic analysis of durable leaf rust resistance in winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100:419-431.
- Peterson, R. F., Campbell, A. B., and Hannah, A. E. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals. *Can. J. Res.* 26:496-500.

- Ren, Y., He, Z., Li, J., Lillemo, M., Wu, L., Bai, B., Lu, Q., Zhu, H., Zhou, G., Du, J., Lu, Q., and Xia, X. 2012. QTL mapping of adult-plant resistance to stripe rust in a population derived from common wheat cultivars Naxos and Shanghai 3/Catbird. *Theor. Appl. Genet.* 125:1211-1221.
- Ren, Y., Singh, R. P., Basnet, B. R., Lan, C. X., Huerta-Espino, J., Lagudah, E. S., Ponce-Molina, L. J. 2017. Identification and Mapping of adult plant resistance loci to leaf rust and stripe rust in common wheat cultivar Kundan. *Plant Dis.* 101:456-463.
- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier M. H., Leroy, P., Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007–2023.
- Roelfs, A. P., Singh, R. P., and Saari, E. E. 1992. *The Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management.* México, D.F.: CIMMYT. 81 pp.
- Rosewarne, G. M., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Herrera-Foessel, S. A., Forrest, K. L., Hayden, M. J., and Rebetzke, G. J. 2012. Analysis of leaf and stripe rust severities reveals pathotype changes and multiple minor QTLs associated with resistance in an Avocet x Pastor wheat population. *Theor. Appl. Genet.* 124:1283-1294.
- Rosewarne, G. M., Herrera-Foessel, S. A., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Lan, C. X., and He, Z. H. 2013. Quantitative trait loci of stripe rust resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 126:2427–2449.
- Santra, D. K., Chen, X. M., Santra, M., Campbell, K. G., and Kidwell, K. K. 2008. Identification and mapping QTL for high-temperature adult-plant resistance to stripe rust in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar ‘Stephens’. *Theor. Appl. Genet.* 117:793-802.
- Schouten, H. J., van de Weg, W. E., Carling, J., Khan, S. A., McKay, S. J., van Kaauwen, M. P. W., Wittenberg, A. H. J., Koehorst-van Putten, H. J. J., Noordijk, Y., Gao, Z., Rees, D. J. G., Dyk, M. M. V., Jaccoud, D., Considine, M. J., and Kilian, A. 2012. Diversity arrays technology (DART) markers in apple for genetic linkage maps. *Mol. Breed.* 29:645-660.
- Singh, R. P., and Rajaram, S. 1992. Genetics of adult-plant resistance to leaf rust in “Frontana” and three CIMMYT wheats. *Genome* 35:24-31.
- Singh, R. P., Mujeeb-Kazi, A., and Huerta-Espino, J. 1998. Lr46: a gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88:890-894.
- Singh, D., Park, R. F., and McIntosh, R. A. 1999. Genetic relationship between the adult plant resistance gene Lr12 and the complementary gene Lr31 for seedling resistance to leaf rust in common wheat. *Plant Pathol.* 48:567-573.

- Singh, R. P., Huerta-Espino, J., and Rajaram, S. 2000. Achieving near immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 35:133-139.
- Singh, R. P., Huerta-Espino, J., and William, H. M. 2001. Resistencia durable a roya de la hoja y roya amarilla del trigo. In: *Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento de trigo un enfoque multidisciplinario*. Man, M. K., Díaz, A. M., y Castro M. (eds). La Estanzuela-Uruguay 8-11 de Octubre. pp:109-117.
- Singh, S., and Bowden, R. L. 2011. Molecular mapping of adult-plant race-specific leaf rust resistance gene Lr12 in bread wheat. *Mol. Breed.* 28:137-142.
- Singh, A., Pallavi, J. K., Gupta, P., and Prabhu, K. V. 2012a. Identification of microsatellite markers linked to leaf rust resistance gene Lr25 in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 53:19-25.
- Singh, R. P., Herrera-Foessel, S. A., Huerta-Espino, J., Bariana, H. S., Bansal, U., McCallum, B. D., Hiebert, C. W., Bhavani, S., Singh, S., Lan, C., and Lagudah, E. S. 2012b. Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Bdv1/Ltn1 confers slow rusting, adult plant resistance to *Puccinia graminis tritici*. In: *13th Cereal Rust and Powdery Mildew Conference, August 28–September 1, 2012. Friendship Hotel, Beijing.* p 173.
- Suenaga, K., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., and William, H. M. 2003. Microsatellite markers for Lr34/Yr18 and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust in bread wheat. *Phytopathology* 93:881-890.
- Van Ooijen, J.W. 2006. Join Map 4, software for the calculation of genetic linkage maps in experimental population. Plant Research International, Wageningen.
- Voorrips, R. E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTL. *J. Hered.* 93:77-78.
- William, M., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Ortíz-Islas, S., and Hoisington, D. 2003. Molecular marker mapping of leaf resistance gene Lr46 and its association with stripe rust resistance gene Yr29 in wheat. *Phytopathology* 93:153-159.
- William, H. M., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Palacios, G., and Suenaga, K. 2006. Characterization of genetic loci conferring adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in spring wheat. *Genome* 49:977-990.
- Zhou, X. L., Wang, M. N., Chen, X. M., Lu, Y., Kang, Z. S., and Jing, J. X. 2014. Identification of Yr59 conferring high-temperature adult-plant resistance to stripe rust in wheat germplasm PI 178759. *Theor. Appl. Genet.* 127:935-945.

**CAPÍTULO III. CHARACTERIZATION OF ADULT PLANT RESISTANCE
TO LEAF RUST AND STRIPE RUST IN INDIAN WHEAT CULTIVAR
NEW PUSA 876**

Authors:

Luis J. Ponce-Molina, Julio Huerta-Espino, Ravi P. Singh, Bhoja R. Basnet, Evans Lagudah, Víctor H. Aguilar-Rincón, Gregorio Alvarado, Ricardo Lobato-Ortiz, Jesús García-Zavala, Caixia Lan*

L. J. Ponce-Molina, National Institute of Agricultural and Livestock Researches (INIAP-Ecuador), Santa Catalina Experimental Station, Panamericana Sur Km1, Quito, Ecuador, and Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Road México- Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, State of México, México; J. Huerta-Espino, Campo Experimental Valle de México INIFAP, Apdo. Postal 10, 56230 Chapingo, State of Mexico, Mexico; R. P. Singh, B. R. Basnet, G. Alvarado and C. X. Lan, International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Apdo. Postal 6-641, 56237 México, DF, México; Evans Lagudah, CSIRO Agriculture & Food, GPO Box 1600, Canberra, ACT 2601, Australia; V. H. Aguilar-Rincón, R. Lobato-Ortiz and J.J. García-Zavala, Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Road México- Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, State of México, México.

“Received _____. *Corresponding author (c.lan@cgiar.org).”

Article sent to Crop Science

Resumen

Cultivar variedades resistente es el método más efectivo y económico para controlar las royas del trigo (*Triticum aestivum* L.). La genética de la resistencia a roya de la hoja y roya amarilla fue investigada en 148 F₅ líneas endogámicas recombinantes derivadas de la cruce entre 'Avocet' y 'New Pusa 876' (NP876). La población y los parentales fueron fenotipados por tres y dos años para resistencia a la roya de la hoja y amarilla, respectivamente, en ensayos de campo, y genotipados con marcadores moleculares ligados a genes conocidos. El análisis de segregación indicó que la resistencia de planta adulta (RPA) a roya de la hoja y roya amarilla es conferida por cinco y cuatro genes de efecto aditivo, respectivamente. Entre estos, el gene de planta adulta y enroscamiento lento *Lr46/Lr29* que reduce 14% y 16% la severidad media de la roya de la hoja y amarilla, respectivamente, y, por otra parte el gen *Lr67/Yr46* que reduce la severidad para ambas royas en un 26%. Ambos genes de resistencia provienen de NP876. Un efecto aditivo positivo entre los genes de roya de la hoja *Lr46* y *Lr67* fue detectado, el cual reduce la severidad hasta un 11% cuando están juntos. La aditividad para roya amarilla entre *Yr29* y *Yr46* fue positiva pero no significativa, con una reducción media de la severidad de 5%. NP876 puede ser usado como una múltiple fuente de resistencia en el mejoramiento de variedades de trigo harinero contribuyendo hacia una resistencia durable.

Palabras clave: aditividad, genes de resistencia de planta adulta, análisis genético, roya de la hoja, roya amarilla, *Triticum aestivum*

Abstract

Growing resistant varieties is the most effective and economical method for controlling rust diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.). Genetics of the resistance to leaf rust and stripe rust were investigated in 148 F₅ recombinant inbred lines derived from a cross between 'Avocet' and 'New Pusa 876' (NP876). The parents and population were phenotyped for resistance in field trials for three and two years for leaf rust and stripe rust, respectively, and genotyped with the known gene-linked molecular markers. The segregation analyses indicated that the adult plant resistance (APR) to leaf rust and stripe rust was conferred by five and four additive effect genes, respectively. Among them, the slow-rusting APR gene *Lr46/Yr29* reduced 14% and 16% of mean leaf rust and stripe rust severities, respectively, whereas a severity reduction of 26% occurred due to *Lr67/Yr46* for both rusts. Both resistance genes were contributed by NP876. A positive additivity effect between leaf rust resistance genes *Lr46* and *Lr67* was detected with a reduction up to 11% when they were present together. The additivity for stripe rust between *Yr29* and *Yr46* was positive but not significant with a mean reduction of 5% in severity. NP876 can be used as a multiple rust resistant source to breed wheat varieties that may contribute towards durable resistance.

Keywords: additivity, adult plant resistance genes, genetic analysis, leaf rust, stripe rust, *Triticum aestivum*.

Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a major staple food worldwide with harvested area of about 222 million hectares during 2014, 224 million hectares in 2015, and 221 million hectares in 2016 (USDA-ERS, 2017). During the last decade in Mexico, wheat has been grown on 713,000 ha annually with a yield of 5.2 t/ha (<http://www.siap.gob.mx>). Leaf rust (LR) and stripe rust (YR) caused by *Puccinia triticina* and *P. striiformis tritici*, respectively, are two major diseases that threaten wheat production worldwide. For example, yield losses caused by both rusts were up to 60% on susceptible cultivars (Herrera-Foessel et al., 2006; Vergara-Díaz et al., 2015). Breeding and cultivation of resistant varieties are the most effective, economical and environmentally friendly methods to manage these diseases in wheat.

Rust resistance is often grouped into two categories: race-specific resistance and race non-specific resistance (denominated as “slow rusting”). Race-specific resistance is usually detected at the seedling or adult growth stage with a range of hypersensitive responses to infection (Gustafson and Shaner, 1982). It is generally qualitatively inherited, short lived, and easily overcome by the new virulent races of rust fungi (Johnson, 1981) whereas slow rusting is exhibited in the post-seedling growth stages with delayed infection, reduced growth, and reproduction of the pathogen (Caldwell, 1968). This type of resistance is usually quantitatively inherited, race non-specific, remains durable and is mainly evaluated in the adult plant stage (Johnson and Law, 1973). Most slow rusting adult plant resistance (APR) genes do not confer adequate level of resistance, especially under high disease pressure when they are

present alone, but the resistance level can reach up to near immunity when four or five genes are combined together (Singh et al., 2000). Gupta and Saini (1993) reported that the interactive or additive expression of known and unknown APR genes could contribute effectively to an increase in resistance durability. Singh et al. (2013a) indicated that the opportunity to pyramid several genes including slow rusting APR can enhance the expression of resistance through transgressive segregation and presumably attain durability. So far, only three pleiotropic slow-rusting APR genes have been identified, characterized and mapped in wheat: *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38* (Lillemo et al., 2008; McIntosh, 1992; Singh and Rajaram, 1992; Singh et al., 2012), *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39* (Lillemo et al., 2008; Singh et al., 2013b; William et al., 2003), and *Lr67/Yr46/Sr55/Pm46* (Herrera-Foessel et al., 2011; 2014).

Dyck et al. (1966) first identified the *Lr34* gene in wheat cultivar Frontana. This gene is located on the short arm of chromosome 7D and closely linked with SSR marker *Xgwm295.1* (Suenaga et al., 2003). Cloning of pleiotropic gene *Lr34* by Krattinger et al. (2009) showed that it originated in encodes a putative ATP-binding cassette transporter. *Lr34* has been widely used in breeding programs to breed durable rust resistance worldwide and now known to confer resistance to all three rusts, powdery mildew and spot blotch (Lillemo et al., 2008, 2013; Singh et al., 2012; Singh and Huerta-Espino, 2013). Some cultivars carrying this gene are Chinese Spring, Glenlea, Jagger, Jupateco R, Fletcher, Newton, Parula, Tonichi, Opata, Fukuho-komugi, Chihoku, Condor, Cook, Anza, Janz, Sunco, Forno, Bezostaya, Kavkaz (Kolmer et al., 2008).

Pleiotropic APR gene *Lr46/Yr29* was first described by Singh et al. (1998) in cultivar Pavon 76. It is located on wheat chromosome 1BL with a genetic distance of 5-6 cM away from SSR marker *Xwmc44* (Suenaga et al., 2003). It reduced severities around 40% and 30% of leaf rust and stripe rust, respectively, in the cultivar backgrounds used in previous studies (Calvo-Salazar et al., 2015; Herrera-Foessel et al., 2011; Lan et al., 2014; Ren et al., 2017; Singh et al., 1998; William et al., 2003). This gene is widely present in CIMMYT germplasm and the ratio is dramatically increased due to shuttle breeding between Mexico and Kenya (Singh et al., 2011).

Lr67/Yr46 was identified in the common wheat accession PI250413 (Dyck and Samborski, 1979) and transferred into Thatcher to produce the RL6077 line (Thatcher*6/PI250413). It was mapped on wheat chromosome 4DL and flanked by SSR marker *Xcfd71-4D* and *Xcfd23-4D* (Hiebert et al., 2010). A reduction of 50-55% disease severity was observed in lines carrying *Lr67* alone (Herrera-Foessel et al., 2011). This gene encodes a hexose transporter and the resistance allele differs from the susceptible allele by two amino acids that are conserved in orthologous hexose transporters (Moore et al., 2015). *Lr67/Yr46* is derived from Indian landraces but has not been widely used in wheat breeding programs yet. So far, it has only been mapped in an Indian wheat cultivar Sujata (Lan et al., 2015) and also confers partial resistance to stem rust and powdery mildew (Herrera-Foessel et al., 2014).

New Pusa 876 (NP876) was developed in the 1960's by Indian Agricultural Research Institute (IARI) and has the following pedigree: "C281/3/Thatcher//NP4/FR Sib" (Jain, 1994). It showed APR to leaf rust and stripe rust for more than 50 years (Jain, 1994). However, the genetic basis of resistance remains unknown. The

objectives of our study were: (i) to determine the genetic basis of leaf rust and stripe rust resistance in an Avocet × NP876 recombinant inbred line (RIL) population, and (ii) to explore the genetic effects between two known slow-rusting APR genes, *Lr46/Yr29* and *Lr67/Yr46*, on leaf rust and stripe rust, respectively.

Materials and Methods

Plant materials

One hundred forty-eight recombinant inbred lines (RILs) derived from a wheat cross of Avocet-*YrA* and NP876 were used to analyze rust resistance in this study. Avocet-*YrA*, a reselection that lacks the resistance gene *YrA*, is susceptible to leaf rust and stripe rust at both seedling and adult plant stages, whereas NP876 is susceptible to both rusts at seedlings but resistant in the adult plant stage. Single spike descent approach, as described by Basnet et al. (2014), was used to develop this RIL population. The seeds of F₅ RILs and their parents were used for the phenotyping trials and genotypic analysis.

Field trials

The field trials were planted in different crop seasons and experimental stations managed by CIMMYT; for leaf rust, the evaluation was conducted during the summer-autumn season 2011 (LRB2011) at El Batán and during the autumn-winter seasons 2011-2012 (LRY2012) and 2012-2013 (LRY2013) at Ciudad Obregón, whereas stripe

rust resistance was phenotyped during summer-autumn seasons 2011 (YR2011) and 2012 (YR2012) at Toluca.

RILs and the parents were planted on top of 80 cm wide raised beds as double row plots of 0.7 m length and 0.2 m space between the rows, and with a pathway of 0.3 m. A mixture of lines Avocet + Yr24 and Avocet + Yr26 was used as spreaders for leaf rust and planted as hill plots in the middle of the pathway on one side of each plot to keep a uniform inoculum pressure. For stripe rust phenotyping, a mixture of wheat lines derived from an Avocet/Attila cross, Morocco and Avocet near-isogenic line for gene Yr31 was used as spreaders and planted the same way as leaf rust spreader. To inoculate the LR spreaders in the field, an equal mixture of *P. triticina* races MBJ/SP and MCJ/SP suspended in Soltrol 170 was used to inoculate leaf rust spreaders four weeks from sowing, whereas a mixture of *P. striiformis* races Mex96.11 and Mex08.13 was sprayed on the stripe rust spreader. The avirulence/virulence formulas of leaf rust isolates MBJ/SP and MCJ/SP were described in Herrera-Foessel et al. (2012), and the formulas of stripe rust isolates Mex96.11 and Mex08.13 were reported by Lan et al. (2015).

Data collection

A modified Cobb Scale (Peterson et al., 1948) was used to evaluate the disease severity in the field. The first disease notes were recorded when the susceptible parent Avocet displayed approximately 70-80% severity and the second notes recorded at about one-week interval.

Genetic and statistical analysis

Final severity was used to calculate the number of resistance genes by Mendelian segregation analysis (Knott and Padidam, 1988; Singh and Rajaram, 1992). The observed frequencies for each category, homozygous parental type resistant (HPTR), homozygous parental type susceptible (HPTS), and lines with phenotypic responses different to the two parents (OTHER) (Singh and Rajaram, 1992) were tested against the expected frequencies for different numbers of additive effect genes based on a Chi-squared (χ^2) test (Infante and Zárata de Lara, 1990). In addition, the minimum number of APR genes was also estimated using the quantitative approach described by Wright (1968) as $n = (GR)^2/4.57(\sigma_g^2)$, where GR (genotypic range) = phenotype range $\times h^2$ (narrow- sense heritability), σ_g^2 = genetic variance of the F₅ RILs in the present population, $h^2 = \sigma_g^2 / \sigma_g^2 + \sigma_e^2$. Analysis of variance (ANOVA), correlations between both rusts and additivity between resistances genes were performed using the program SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC) with the final disease severity in each environment.

Molecular analysis

DNA of parents and RILs was extracted from approximately 20 plants per line using the CTAB method (CIMMYT, 2006). RILs and parents were screened with four molecular markers known to be diagnostic or closely linked to *Lr46/Yr29* and *Lr67/Yr46*. These markers were: cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) marker *csLV46G22*, two simple sequence repeats (SSR) markers (*Xgwm192* and *Xgwm165*) for *Lr46/Lr67*, and a kompetitive allele specific PCR (KASP) marker (*Lr67SNP-TM4*) (Moore et al., 2015) for *Lr67/Yr46*. The following PCR program was used for *csLV46G22*, *Xgwm192*

and *Xgwm165*: Stage 1 = one cycle: 93°C (1 min); Stage 2 = 30 cycles: 93°C (30 sec), 56°C (1 min), 72°C (1 min); and Stage 3= one cycle: 72°C (1 min). *csLV46G22* PCR amplification products were digested in a thermocycler at 37°C for one hour with the restriction enzyme BSPE I when there was good PCR amplification. A 3% agarose gel was used to load the digested PCR for checking the polymorphism (CIMMYT, 2006). *Lr67SNP-TM4* KASP marker used a touchdown program: Stage 1 = one cycle: 94°C (2 min); Stage 2 = 7 cycles: 94°C (1 min), 61°C (1 min; decreasing 1°C per cycle to achieve a final annealing/extension temperature of 55°C); Stage 3 = 26 cycles: 94°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (1 min); Stage 4 = one cycle: 72°C (5 min) (CIMMYT, 2006). PHERAstar and KlusterCaller™ softwares were used to analyze the PCR products.

Results

Phenotype analysis

The final LR severity for Avocet was 80-90% with susceptible host reaction (S), whereas for NP876 displayed 10- 20% severity with moderately susceptible reaction (MS). Mean LR severity of RILs ranged from 33.1 to 47.7% during the three seasons (Table 1). The frequency distribution of RILs for LR severity was continuous over the tested environments (Fig. 1A), indicating a quantitative inheritance of slow-rusting APR to leaf rust. Assuming that resistance genes acted in an additive manner, the frequency distribution of RILs in three phenotypic categories (i.e. HPTR, HPTS, and OTHER) were in accordance with segregation at 3-4 independent loci (Table 2) and a similar result was also found by Wright's method (Table 1).

Avocet and NP876 displayed final YR severities of 80-90% and 5-10%, respectively, at adult plant stage during the crop seasons. Mean YR severity of RILs ranged from 38.3 to 41.1% during two crop seasons (Table 1). Variation of YR severity distribution for RILs was continuous (Fig. 1B). Both the Mendelian segregation analysis and Wright's method indicated the presence of 4 genes that conferred APR to YR in Avocet x NP876 population (Table 1 and 2).

Table 1. Estimated minimum number of resistance genes using the Wright's formula based on severity phenotypes from three years of leaf rust and two years of stripe rust in Avocet/NP876 population.

Parents/parameters	LRB2011	LRY2012	LRY2013	YR2011	YR2012
Avocet	80	80	90	80	90
NP876	10	10	20	5	10
Mean of population	47.7	33.1	36.2	38.3	41.1
Lowest value	10	1	10	5	0
Highest value	90	100	90	90	100
σ_g^2	-	477.39	207.02	-	483.22
σ_e^2	-	59.76	27.04	-	40.59
h^2	-	0.875	0.883	-	0.911
No. of genes	-	3.4	5.3	-	3.8

'-' values not estimated for field experiments LRB2011 and YR2011 because replicates were not used. ANOVA is necessary for estimating gene number when using Wright's method.

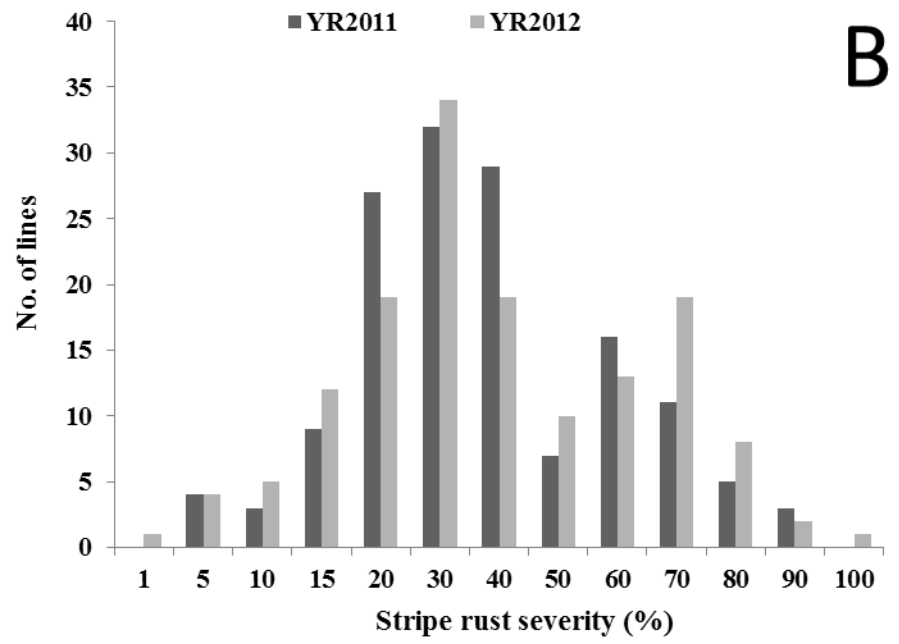
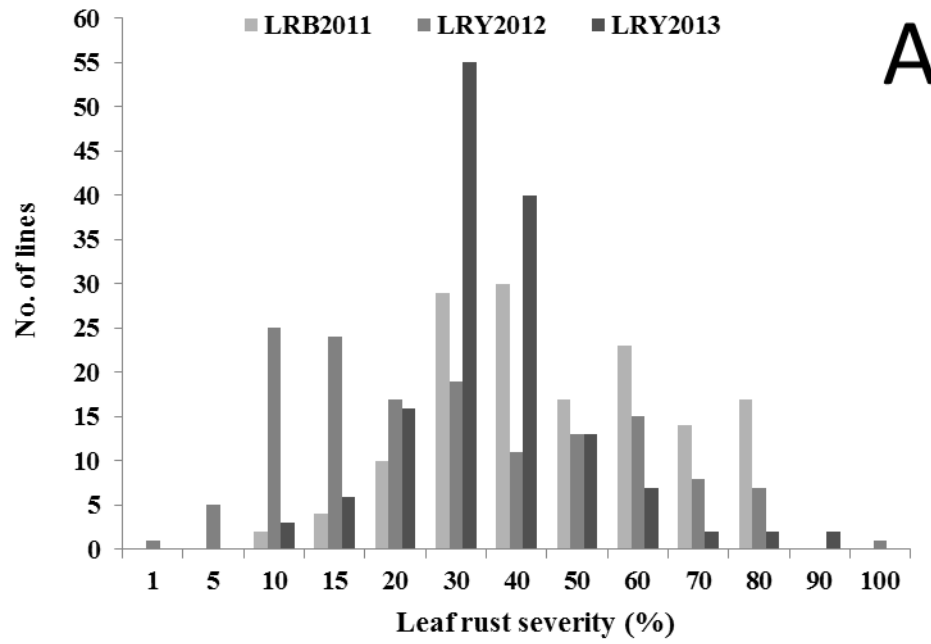


Figure 1. Frequency distribution of the 148 Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) for the final leaf rust severity; (A) trials in El Batán season 2011 (LRB2011) and in Obregón seasons 2011-2012 (LRY2012) and 2012-2013 (LRY2013); and for the final stripe rust severity (B) in Toluca seasons 2011 (YRT2011) and 2012 (YRT2012).

Table 2. Estimation of resistance gene numbers in the 148 F₅ Avocet × NP876 RILs derived by using the Mendelian segregation analysis based on the final disease severity in each environment.

Category	Number of RILs (adult plant stage) [†]				
	LRB2011	LRY2012	LRY2013	YRT2011	YRT2012
HPTR [‡]	6	6	8	4	9
HPTS§	17	8	3	8	4
Others [¶]	123	132	135	134	133
Total	146	146	146	146	146
No. Of Genes	3	4	4	4	4
<i>P</i> -value [#]	0.20	0.50	0.45	0.50	0.40

[†] Disease severity and host response to infection determined for leaf rust at El Batán during 2011 (LRB2011) season, at Ciudad Obregón during 2011-2012 (LRY2012) and 2012-2013 (LRY2013) seasons; for stripe rust at Toluca during the 2011 (YRT2011) and 2012 (YRT2012) seasons, to determine the category of RILs.

[‡] Homozygous parental type resistant

[§] Homozygous parental type susceptible

[¶] Lines with responses different from the two parents

[#] *P* value is for the χ^2 test.

LR severity of Avocet/NP876 RILs was significantly correlated between 3 years and ranged from 0.70 to 0.75 (Table 3). Stripe rust was also significantly correlated across 2 years ($r = 0.86$, Table 4). Moreover, significant correlations were observed between LR and YR severity ($r = 0.53-0.70$, $P < 0.0001$) in all tested environments, which is likely due to the presence of pleiotropic resistance genes in NP876.

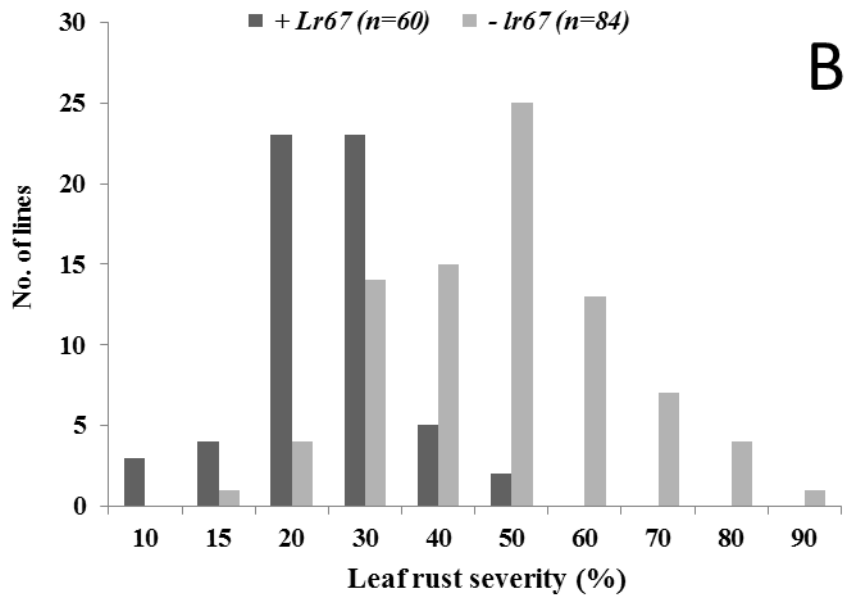
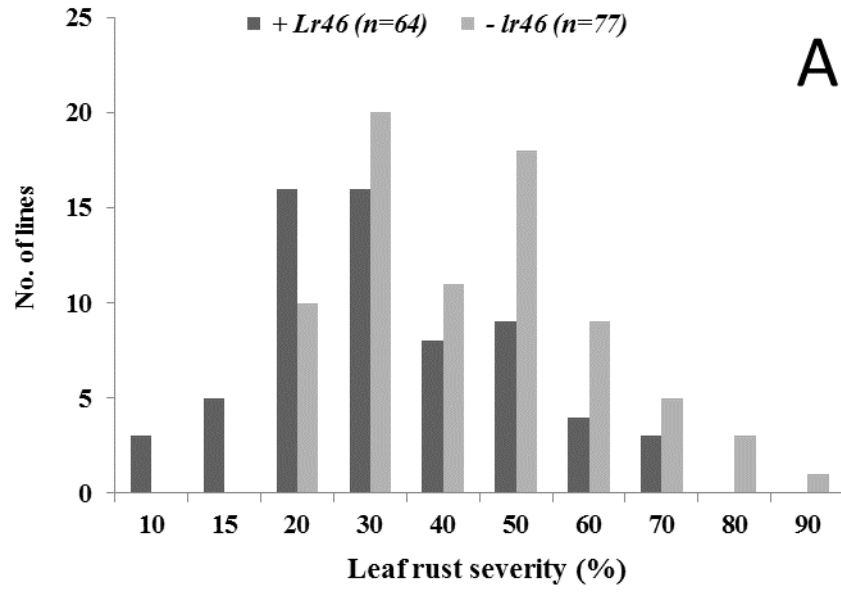
Table 3. Phenotypic correlation between final disease severities of 148 F₅ Avocet × NP876 RILs in the three environments for leaf rust (LRB2011, LRY2012 and LRY2013) and two environments for stripe rust (YR2011 and YR2012).

Environment	LRB2011	LRY2012	LRY2013	YR2011
LRY2012	0.75 ^{***}			
LRY2013	0.70 ^{***}	0.75 ^{***}		
YR2011	0.68 ^{***}	0.57 ^{***}	0.53 ^{***}	
YR2012	0.70 ^{***}	0.60 ^{***}	0.54 ^{***}	0.86 ^{***}

^{***}*P* > 0.0001

Identification of known APR genes and their effect

Two known pleiotropic APR genes, *Lr46/Yr29* and *Lr67/Yr46*, were identified in the Avocet/NP876 population based on the closely linked molecular markers. The LR severity of RILs with *Lr46* ranged from 10 to 70%, whereas it was 20-90% without this gene (Fig. 2A). A mean disease severity reduction of 14% was obtained for RILs with *Lr46* compared with RILs without this gene (Table 4). For *Lr67*, the LR severity ranged from 10-50% for RILs carrying this gene, whereas it ranged from 15-90% for RILs without this gene (Fig. 2B). A mean disease severity reduction of 26% was obtained for RILs with *Lr67* compared to RILs without this gene (Table 4).



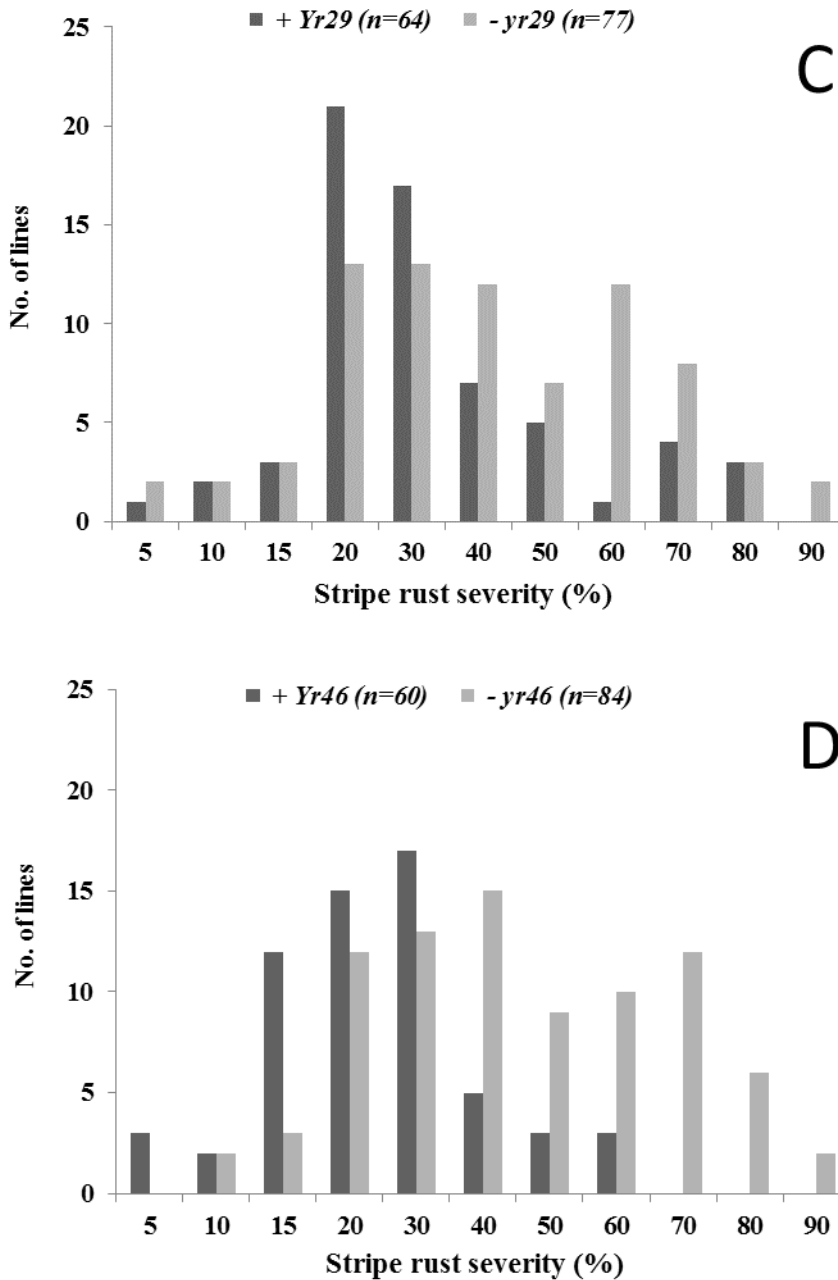


Figure 2. Comparison of Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) for mean leaf rust and stripe rust severities in the presence or absence of postulated resistance genes in field trials. A, Effect of *Lr46* on leaf rust, present (+*Lr46*) and absent (-*Lr46*). B, Effect of *Lr67* on leaf rust, present (+*Lr67*) and absent (-*Lr67*). C, Effect of *Yr29* on stripe rust, present (+*Yr29*) and absent (-*yr29*). D, Effect of *Yr46* on stripe rust, present

(+*Yr46*) and absent (-*yr46*). The number (n) of RILs in each categories are shown in parentheses.

Table 4. Additivity effect between slow-rusting adult plant resistance genes *Lr46* and *Lr67* on leaf rust in adult plant stage in Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) population.

Status of resistance			Mean leaf rust severity (%) [†]			
gene		RILs (No)	Mean leaf rust severity (%) [†]			
<i>Lr46</i>	<i>Lr67</i>		2011 [‡]	2012 [§]	2013 [¶]	Mean [#]
Absent	Absent	44	64a	56a	46a	55a
Present	Absent	40	50b	34b	38b	41b
Absent	Present	34	38c	18c	31b	29c
Present	Present	25	27d	12c	24c	21d

[†] Different letters following the mean in the same column indicates significant differences based on *t* test ($P < 0.01$).

[‡] Determined at El Batán during the 2011 season.

[§] Determined at Ciudad Obregón in the 2011–12 seasons.

[¶] Determined at Ciudad Obregón in the 2012–13 seasons.

[#] Mean of final leaf rust severity

For stripe rust, the mean disease severity of RILs with *Yr29* was 5 to 80%, whereas it ranged from 5 to 90% of RILs without this gene (Fig.2C). A mean stripe rust severity reduction of 16% was obtained for RILs with *Yr29* compared with RILs without it (Table 5). On the other hand, the mean stripe rust severity for RILs ranged from 5–60% when *Yr46* was present, compared to 10–90% when it was absent (Fig. 2D). A mean disease severity reduction of 26% was obtained for RILs with *Yr46* compared with RILs without this gene (Table 5).

Table 5. Additivity effect between slow-rusting adult plant resistance genes *Yr29* and *Yr46* on stripe rust in adult plant stage in Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) population.

Status of resistance			Mean stripe rust severity (%) [†]		
gene		RILs (No)	Mean stripe rust severity (%) [†]		
<i>Yr29</i>	<i>Yr46</i>		2011 [‡]	2012 [§]	Mean [¶]
Absent	Absent	44	52a	59a	56a
Present	Absent	40	38b	42b	40b
Absent	Present	34	31b	29c	30c
Present	Present	25	25c	25c	25c

[†] Different letters following the mean in the same column indicates significant differences based on *t* test ($P < 0.01$).

[‡] Determined at Toluca during the 2011 season.

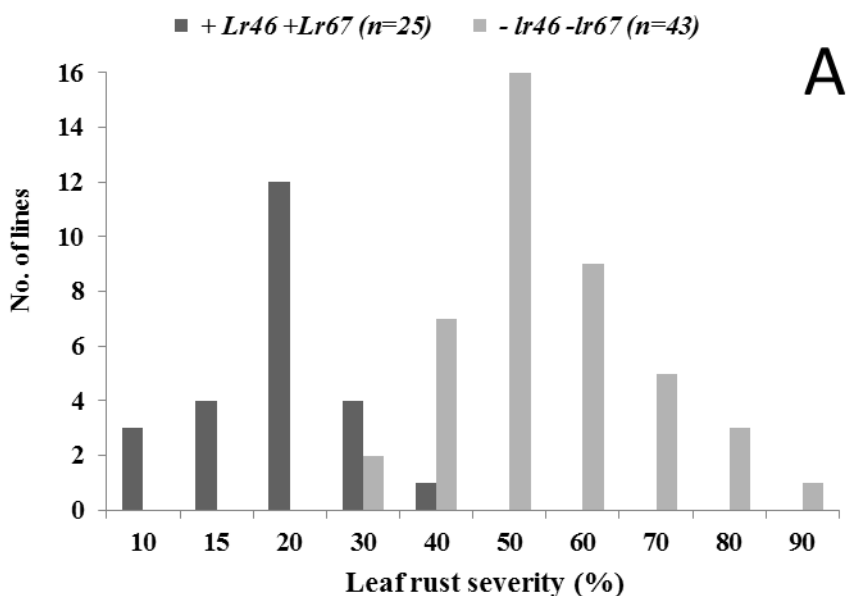
[§] Determined at Toluca in the 2012 season.

[¶] Mean of final stripe rust severity

Additivity effect between APR genes *Lr46/Yr29* and *Lr67/Yr46*

The additivity effect between the two slow-rusting APR genes *Lr46/Yr29* and *Lr67/Yr46* was investigated based on LR and YR severity data from field trials. Genotypes from closely linked molecular marker *csLV46G22*, *Xgwm165*, *Xgwm192* and *Lr67SNP-TM4* were used to determine the presence or absence of APR resistance genes. Presence of *Lr46* and *Lr67* together significantly reduced the leaf rust severity compared to RILs that carried either *Lr46* or *Lr67* alone in 2011 and 2013 crop seasons, whereas a slight LR reduction was present in 2012 but it was not significant (Table 4). Leaf rust severity ranged from 10-40% for RILs that combined both *Lr46* and *Lr67*, whereas it was 30-90% for RILs without the two resistance genes (Fig. 3A). Although slight YR severity reductions occurred when *Yr29* and *Yr46* were present together, the reduction was not

significantly different from RILs carrying a single gene with an exception in 2011 (Table 5). However, stripe rust severity was 5-50% for RILs carrying both *Yr29* and *Yr46*, whereas it ranged from 15-90% for RILs without the two genes (Fig. 3B). Low severities to LR and YR for some of the lines that lacked the two known APR genes indicated the presence of additional APR genes conferring resistance to LR and YR as indicated by genetic analyses.



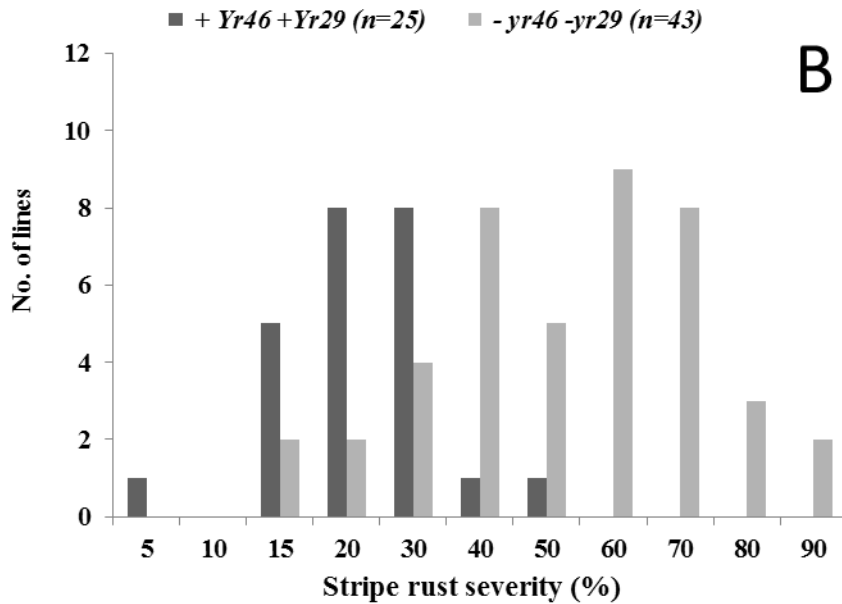


Figure 3. Frequency distribution of leaf rust severities for Avocet/NP876 recombinant inbred lines (RILs) carrying both *Lr46* and *Lr67* compared to RILs lacking them (A), and of stripe rust severities for RILs carrying both *Yr29* and *Yr46*, compared to RILs lacking them (B). The number of RILs in each categories are shown in parentheses.

Discussion

NP876 is a cultivar that shows a high level of resistance to leaf rust and stripe rust at the adult plant stage under high disease pressures in Mexican environments. Our results show that resistance to both leaf rust and stripe rust was quantitatively inherited in the Avocet/NP876 F₅ RIL population and was controlled by 3-4 and 4 genes for leaf rust and stripe rust, respectively. Among these, the pleiotropic slow-rusting APR genes *Lr46/Yr29* and *Lr67/Yr46* were identified using closely linked molecular markers. The effect of *Lr67/Yr46* was larger than *Lr46/Yr29* on both rusts in Mexican environments.

APR gene *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39/Ltn2*

Lr46 was first identified by Singh et al. (1998) on the chromosome 1BL of cultivar Pavon 76. Subsequently, William et al. (2003) found that this gene had a pleiotropic effect on stripe rust gene and designated it as *Yr29*. Lillemo et al. (2008) reported its pleiotropic effect on powdery mildew and then designated it as *Pm39*. Recently, Singh et al. (2013b) showed its effect on stem rust and designated it as *Sr58*. This pleiotropic gene is also associated with the gene *Ltn2*, which causes slight leaf tip necrosis in adult plants (Rosewarne et al., 2006; William et al., 2003). *Lr46/Yr29* gene was widely used for many years by CIMMYT and became a principal source of rust resistance due to its pleiotropic effects over several diseases (Singh et al., 1998). Lan et al. (2015) observed that environmental conditions and genetic background influenced the expression and effectiveness of this gene.

In our study, F₅ RILs that carry this APR gene alone had a reduction of 8 to 22% for LR and a reduction of 14 to 17% for YR. Similar effects were found in different genetic populations under different experimental conditions (Lan et al., 2014; Singh et al., 1998; William et al., 2003), where *Lr46/Yr29* reduced leaf rust and stripe rust severities by 29 to 54% and 16 to 39%, respectively. *Lr46/Yr29* also has been identified in many wheat lines (Basnet et al., 2013; Calvo-Salazar et al., 2015; Lan et al., 2014; Lan et al., 2015; Lillemo et al., 2008; Ren et al. 2017; Rosewarne et al., 2012; Suenaga et al., 2003; Vasistha et al., 2014; William et al., 2003).

APR gene *Lr67/Yr46/Sr55/Pm46/Ltn3*

Lr67/Yr46 was originally transferred from PI250413, a Pakistani wheat accession, to Thatcher-derived line RL6077 (Dyck and Samborski, 1979) and it was found to be tightly linked with *cfd71* marker on chromosome 4DL in RL6077 (Hiebert et al., 2010) and Sujata (Lan et al., 2015). Our study is significant because it reports for the second time the presence of *Lr67/Yr46* in an Indian cultivar. This gene has played a vital role in durable resistance to LR and YR for more than 60 years (Lan et al., 2015). *Lr67* also showed pleotropic effects on stripe rust, *Yr46* (Herrera-Foessel et al., 2011; Hiebert et al., 2010), on powdery mildew, *Pm46* (Herrera-Foessel et al., 2014) and on stem rust, *Sr55* (Herrera-Foessel et al., 2014). A mean reduction of 26% on both leaf rust and stripe rust was observed in the present study, whereas Herrera-Foessel et al. (2011) reported that *Lr67/Yr46* reduced the mean severities of 50% for leaf rust and 55% for stripe rust when this gene was the only segregating resistance gene. On the other hand, 46 and 11% of the variation for LR and YR was explained for this gene in Sujata population that also segregated for other resistance genes (Lan et al., 2015).

Interactions between the two resistance genes

Additive, dominance, and epistatic effects can all contribute to the phenotype of a quantitative trait, but the additive one plays the most important role in gene expression (Rédei, 2008). Each genotype has a slightly different quantitative value that results in a distribution of metric values in a continuous curve, this phenomenon is present in the NP876 RIL population.

Interactions between APR genes *Lr46/Yr29* and *Lr67/Yr46* played an important role in the Avocet x NP876 RIL population and resulted in improving rust resistance for

lines carrying both resistance genes. Our results also showed the presence of additional APR genes in addition to *Lr46/Yr29* and *Lr67/Yr46*. Lillemo et al. (2008) examined gene interactions between APR genes *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* and found very little evidence for strong additivity. Similarly, Dyck et al. (1994) did not find a significant additive effect between *Lr34/Yr18* and *Lr67/Yr46* (which was considered as *Lr34* before the diagnostic marker for *Lr34* identified) against leaf rust; a similar result was reported by Herrera-Foessel et al. (2014) on stem rust. In addition, Lan et al. (2014) did not detect significant additive effects between genes *Lr16* and *Lr46* in reducing leaf rust severity in field trials, but found a significant additive effect for stripe rust between *YrF* (linked to *Lr16*) and *Yr29*. These studies show the possibility of genetic backgrounds that could allow, or not allow, measuring the differences as significant even though trends of increased resistance are often seen. The presence of both genes in two old Indian varieties, Sujata and NP876, is most likely not a chance inheritance but must have resulted from beneficial phenotypic effects when present together to allow their simultaneous selection.

Conclusion

The durable resistance to LR and YR in NP876 was controlled by 3-4 APR genes, and the major determinants of resistance were the two known pleiotropic APR genes, *Lr46/Yr29* and *Lr67/Yr46*. The additive effect between the two APR genes was positive for LR and YR resistance. NP876 can be used as a multiple rusts resistance source by breeding programs to develop new, diverse rust resistant varieties.

Acknowledgments

This work was supported by The Australian Grains Research and Development Corporation (GRDC) and The Australian Cereal Rust Control Program. We are also grateful to the Secretary of Higher Education, Science, Technology and Innovation (SENESCYT-Ecuador) and to the National Institute of Agricultural and Livestock Researches (INIAP-Ecuador). We appreciate the technical editing by Julie Mollins.

References

- Basnet, B.R., R.P. Singh, S.A. Herrera-Foessel, A.M.H. Ibrahim, J. Huerta-Espino, V. Calvo-Salazar, and J. Rudd. 2013. Genetic analysis of adult plant resistance to yellow rust and leaf rust in common spring wheat Quaiu#3. *Plant Dis.* 97:728–736.
- Basnet, B.R., R.P. Singh, A.M.H. Ibrahim, S.A. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, C. Lan, and J.C. Rudd. 2014. Characterization of *Yr54* and other genes associated with adult plant resistance rust and leaf rust in common wheat Quaiu 3. *Mol. Breeding* 33:385–399.
- Bjarko, M.E., and R.F. Line. 1988. Heritability and number of genes controlling leaf rust resistance in four cultivars of wheat. *Phytopathology* 78:457–461.
- Caldwell, R.M. 1968. Breeding for general and/or specific plant disease resistance. In *Proc. 3rd Int. Wheat Genetics Symp.* (Ed. K.W. Finlay and K.W. Shephard) pp. 263-272.
- Calvo-Salazar, V., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, S. Cruz-Izquierdo, R. Lobato-Ortiz, S. Sandoval-Islas, M. Vargas-Hernández, S. German, P. Silva, B.R. Basnet, C.X. Lan, and S.A. Herrera-Foessel. 2015. Genetic analysis of resistance to leaf rust and yellow rust in spring wheat cultivar Kenya Kongoni. *Plant Dis.* 99:1153-1160.
- CIMMYT. 2006. *Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*, 3rd ed. CIMMYT, Mexico.
- Dyck, P.L., D.J. Samborski, and R.G. Anderson. 1966. Inheritance of adult-plant leaf rust resistance derived from the common wheat varieties Exchange and Frontana. *Can. J. Genet. Cytol.* 8:665-671.

- Dyck, P.L., and D.J. Samborski. 1979. Adult plant resistance in PI250413, an introduction of common wheat. *Can. J. Plant Sci.* 59:329–332.
- Dyck, P.L., E.R. Kerber, and T. Aung. 1994. An interchromosomal reciprocal translocation in wheat involving leaf rust resistance gene *Lr34*. *Genome* 37:556–559.
- Ellis, J.G., E.S. Lagudah, W. Spielmeyer, and P.N. Dodds. 2014. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Front. Plant Sci.* 641:1-13.
- Gupta, A.K., and R.G. Saini. 1993. Leaf rust resistance in wheat. In: Durability of disease resistance. Jacobs TH, Parlevliet JE (eds). Klumer Academic Publishers, pp 235-237.
- Gustafson, G.D., and G. Shaner. 1982. The influence of plant age on the expression of slow-mildewing resistance in wheat. *Phytopathology* 72:74-749.
- Herrera-Foessel, S.A., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, J. Crossa, J. Yuen, and A. Djurle. 2006. Effect of leaf rust on grain yield and yield traits of durum wheats with race-specific and slow-rusting resistance to leaf rust. *Plant Dis.* 90:1065-1072.
- Herrera-Foessel, S.A., E.S. Lagudah, J. Huerta-Espino, M.J. Hayden, H.S. Bariana, D. Singh, and R.P. Singh. 2011. New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked. *Theor. Appl. Genet.* 122:239-249.
- Herrera-Foessel, S.A., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, G.M. Rosewarne, S.K. Periyannan, L. Viccars, V. Calvo-Salazar, C. Lan, and E.S. Lagudah. 2012. *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 124: 1475–1486.
- Herrera-Foessel, S.A., R.P. Singh, M. Lillemo, J. Huerta-Espino, S. Bhavani, S. Singh, C.X. Lan, V. Calvo-Salazar, and E.S. Lagudah. 2014. *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 127:781–789.
- Hiebert, C.W., J.B. Thomas, B.D. McCallum, D.G. Humphreys, R.M. DePauw, M.J. Hayden, R. Mago, W. Schnippenkoetter, and W. Spielmeyer. 2010. An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher*6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*). *Theor. Appl. Genet.* 121:1083-1091.
- Infante, G.S., y G.P. Zárate de Lara. 1990. *Métodos Estadísticos: Un Enfoque Interdisciplinario*. 2ª ed. Trillas, México.
- Jain, K.B.L. 1994. *Wheat Cultivars in India: Names, Pedigrees, Origins, and Adaptations*. Research Bulletin No.2, 72 p. Directorate of Wheat Research, Kamal, India.

- Johnson, R. 1981. Durable resistance: definition of genetic control, and attainment in plant breeding. *APS* 71:567-568.
- Johnson, R., and C.N. Law. 1973. Cytogenetic studies in the resistance of the wheat variety Bersée to *Puccinia striiformis*. *Cereal Rusts Bul.* 1:38–43.
- Knott, D.R., and M. Padidam. 1988. Inheritance of resistance to stem rust in six wheat lines having adult plant resistance. *Genome* 30:283–288.
- Kolmer, J.A., R.P. Singh, D.F. Garvin, L. Viccars, H.M. William, J. Huerta-Espino, F.C. Ogbonnaya, H. Raman, S. Orford, H.S. Bariana, and E.S. Lagudah. 2008. Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Sci.* 48:1841-1852.
- Krattinger, S.G., E.S. Lagudah, W. Spielmeyer, R.P. Singh, J. Huerta-Espino, H. McFadden, E. Bossolini, L.J. Selter, and B. Keller. 2009. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323:1360-1363.
- Lan, C.X., G.M. Rosewarne, R.P. Singh, S.A. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, B.R. Basnet, Y.L. Zhang, and E.N. Yang. 2014. QTL characterization of resistance to leaf rust and stripe rust in the spring wheat line Francolin#1. *Mol. Breed.* 34:789–803.
- Lan, C.X., Y.L. Zhang, S.A. Herrera-Foessel, B.R. Basnet, J. Huerta-Espino, E.S. Lagudah, and R.P. Singh. 2015. Identification and characterization of pleiotropic and co-located resistance loci to leaf rust and stripe rust in bread wheat cultivar Sujata. *Theor. Appl. Genet.* 128:549-561.
- Liang, S.S., K. Suenaga, Z.H. He, Z.L. Wang, H.Y. Liu, D.S. Wang, R.P. Singh, P. Sourdille, and X.C. Xia. 2006. Quantitative trait loci mapping for adult-plant resistance to powdery mildew in bread wheat. *Phytopathology* 96:784-789.
- Lillemo, M., B. Asalf, R.P. Singh, J. Huerta-Espino, X.M. Chen, Z.H. He, and A. Bjørnstad. 2008. The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar. *Theor. Appl. Genet.* 116:1155–1166.
- McIntosh, R.A. 1992. Close genetic linkage of genes conferring adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in wheat. *Plant Pathol.* 41: 523-527.
- Moore, J.W., S. Herrera-Foessel, C. Lan, W. Schnippenkoetter, M. Ayliffe, J. Huerta-Espino, M. Lillemo, L. Viccars, R. Milne, S. Periyannan, X. Kong, W. Spielmeyer, M. Talbot, H. Bariana, J.W. Patrick, P. Dodds, R. Singh, and E. Lagudah. 2015. A recently hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* 47:1494–1498.

- Peterson, R.F., A.B. Campbell, and A.E. Hannah. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals. *Can. J. Res.* 26:496-500.
- Rédei, G.R. 2008. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*. 3 ed. Springer Science & Business Media, USA.
- Ren, Y., R.P. Singh, B.R. Basnet, C.X. Lan, J. Huerta-Espino, E.S. Lagudah, and L.J. Ponce-Molina. 2017. Identification and Mapping of adult plant resistance loci to leaf rust and stripe rust in common wheat cultivar Kundan. *Plant Dis.* 101:456-463.
- Rosewarne, G.M., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, H.M. William, S. Bouchet, S. Cloutier, H. McFadden, and E.S. Lagudah. 2006. Leaf tip necrosis, molecular markers and beta1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes *Lr46/Yr29*. *Theor. Appl. Genet.* 112:500–508.
- Rosewarne, G.M., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, S.A. Herrera-Foessel, K.L. Forrest, M.J. Hayden, and G.J. Rebetzke. 2012. Analysis of leaf and stripe rust severities reveals pathotype changes and multiple minor QTLs associated with resistance in an Avocet × Pastor wheat population. *Theor. Appl. Genet.* 124:1283–1294.
- Singh, R.P. 1992. Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat. *Phytopathology* 82:835-838.
- Singh, R.P., and S. Rajaram. 1992. Genetics of adult-plant resistance to leaf rust in “Frontana” and three CIMMYT wheats. *Genome* 35:24-31.
- Singh, R.P., A. Mujeeb-Kazi, and J. Huerta-Espino. 1998. *Lr46*: a gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88:890–894.
- Singh, R.P., J. Huerta-Espino, and S. Rajaram. 2000. Achieving near immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 35:133-139.
- Singh, R.P., J. Huerta-Espino, and H.M. William. 2005. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rust in wheat. *Turk J. Agric. For.* 29:121-127.
- Singh, R.P., J. Huerta-Espino, S. Bhavani, S.A. Herrera-Foessel, D. Singh, P.K. Singh, G. Velu, R.E. Mason, Y. Jin, P. Njau, and J. Crossa. 2011. Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. *Euphytica* 179:175–186.
- Singh, R.P., S.A. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, H.S. Bariana, U. Bansal, B.D. McCallum, C.W. Hiebert, S. Bhavani, S. Singh, C. Lan, and E.S. Lagudah. 2012. *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Bdv1/Ltn1* confers slow rusting, adult plant resistance to *Puccinia graminis tritici*. In: 13th Cereal Rust and Powdery Mildew Conference, August 28–September 1, 2012. Friendship Hotel, Beijing. p 173.

- Singh, A., R.E. Knox, R.M. DePauw, A.K. Singh, R.D. Cuthbert, H.L. Campbell, D. Singh, S. Bhavani, T. Feth, and F. Clarke. 2013a. Identification and mapping in spring wheat of genetic factors controlling stem rust resistance and the study of their epistatic interactions across multiple environments. *Theor. Appl. Genet.* 126:1951-1964.
- Singh, R.P., S.A. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, C.X. Lan, B.R. Basnet, S. Bhavani, and E.S. Lagudah. 2013b. Pleiotropic gene *Lr46/Yr29/Pm39/Ltn2* confers slow rusting, adult plant resistance to wheat stem rust fungus. In: Proceedings Borlaug Global Rust Initiative, Technical Workshop. New Delhi, India, p 17.1.
- Singh, R.P., and J. Huerta-Espino. 2013. Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. *Euphytica* 129:371-376.
- Suenaga, K., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, and H.M. William. 2003. Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology* 93:881–890.
- USDA-ERS. 2017. Wheat data: World Production, Supply and Disappearance. Table 3-- Wheat supply and disappearance. [https://www.ers.usda.gov/data-products/wheat-data/wheat-data/#World Production, Supply, and Disappearance](https://www.ers.usda.gov/data-products/wheat-data/wheat-data/#World%20Production,%20Supply,%20and%20Disappearance) (accessed 3 Jan. 2017).
- Vasistha, N.K., B. Arun, V.K. Mishra, R.P. Saxesena, A.K. Pandey, R.N. Ahirwar, R. Kumar, M.K. Singh, and P.K. Sharma. 2014. Identification and validation of leaf rust resistance Genes in spring wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell) genotypes using molecular markers. *The Bioscan* 9:1695-700.
- Vergara-Díaz, O., S.C. Kefauver, A. Elazab, M.T. Nieto-Taladriz, and J.L. Araus. 2015. Grain yield losses in yellow-rusted durum wheat estimated using digital and conventional parameters under field conditions. *The Crop J.* 3:200-210.
- Wright, S. 1968. Evolution and the genetics of populations, Vol 1. In: Genetic and biometric foundations. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- William, M., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, S. Ortiz-Islas, and D. Hoisington. 2003. Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene *Lr46* and its association with stripe rust resistance gene *Yr29* in wheat. *Phytopathology* 93:153-159.

CAPÍTULO IV. POSTULACIÓN E IDENTIFICACION DE GENES DE RESISTENCIA A ROYA DE LA HOJA Y ROYA DEL TALLO EN GERMOPLASMA MEXICANO DE TRIGO HARINERO

Autores:

Luis Ponce-Molina, Julio Huerta-Espino, Ravi Singh, Matthew Rouse, James Kolmer, Caixia Lan, Gregorio Alvarado, Jesús García-Zavala, Ricardo Lobato-Ortíz, Víctor Aguilar-Rincón*

L. J. Ponce-Molina, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP-Ecuador), Estación Experimental Santa Catalina, Panamericana Sur Km1, Quito, Ecuador, y Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México, México; J. Huerta-Espino, Campo Experimental Valle de México INIFAP, Apdo. Postal 10, 56230 Chapingo, Estado de México, México; R. P. Singh, C. Lan y G. Alvarado, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), Apdo. Postal 6-641, 56237 México, DF, México; M. Rouse y J. Kolmer, Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), Laboratorio de Enfermedades de Cereales (CDL), 1551 Calle Lindig, Saint Paul, MN 55108, EEUU; J.J. García-Zavala, R. Lobato-Ortiz y V. H. Aguilar-Rincón, Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Carretera México- Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México, México.

*Autor de Correspondencia (victorheber@gmail.com)

Artículo en revisión para ser enviado a Agrociencia

Resumen

La postulación de genes es usada para inferir los posibles genes que confieren resistencia a líneas o cultivares de trigo cultivado. Su principio se basa en la hipótesis del gen-a-gene, por lo tanto, un tipo de reacción bajo significa que una línea o cultivar lleva más de un gene. En el presente estudio, se fenotiparon 75 líneas mexicanas con 10 razas de roya de la hoja y del tallo, respectivamente. Un total de siete genes de resistencia en plántula fueron identificados en este set de germoplasma, incluyendo *Lr1*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr23* y *Lr26* presentes en 49 de las 75 líneas. Adicionalmente, *Lr27* y *Lr34* fueron identificados mediante marcadores moleculares ligados. También se postuló un gen con un tipo de infección similar a *Lr28* presente en las líneas 13, 52 y 66. En base a la evaluación con roya del tallo, se postularon los genes de plántula *Sr7a*, *Sr8a* y *Sr11* presentes en 45 de las 75 líneas, y los marcadores moleculares confirmaron la presencia de los genes de resistencia conocidos *Sr2*, *Sr12*, *Sr31* y *Sr57*, solos o en combinaciones. Estos genes de resistencia se encuentran ya sea solos o en combinación en el germoplasma en estudio. Los genes *Sr2/Lr27* y *Lr34/Sr57* presentes en este germoplasma son efectivos contra las royas de la hoja y del tallo. Las líneas de trigo de origen mexicano pueden ser usadas como fuente de genes de resistencia para generar germoplasma con resistencia durable.

Palabras clave: postulación e identificación de genes, roya de la hoja, roya del tallo, *Triticum aestivum*.

Abstract

Resistance gene postulation method was used to hypothesize which genes possibly confer resistance in wheat lines/cultivar. The principle of it was based on gene-for-gene hypothesis and the reaction will be lower when the line/cultivar carries more than one gene. In the present study, we phenotyped 75 Mexican wheat lines with 10 leaf rust and stem rust races, respectively. A total of seven leaf rust seedling resistance genes have been identified in this set germplasm, including *Lr1*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr23* and *Lr26*, present in 49 of the 75 lines. In addition, *Lr27* and *Lr34* were detected by closely linked molecular markers. Also, was postulated a gene with similar infection type to *Lr28* present in the lines 13, 52 and 66. According to stem rust test, we postulated seedling resistance genes *Sr7a*, *Sr8a* and *Sr11*, present in 45 of the 75 lines, and molecular markers confirmed the presence of known resistance genes *Sr2*, *Sr12*, *Sr31* and *Sr57*. These resistance genes either present alone or combined together in the wheat lines. The APR genes *Sr2/Lr27* y *Lr34/Sr57* present on these germplasm are effective against leaf rust and stem rust. The wheat Mexican lines can be used as a new rust resistance source to breed durable rust resistant wheat cultivars.

Keywords: gene postulation and identification, leaf rust, stem rust, *Triticum aestivum*.

Introducción

Las royas son las enfermedades más importantes que atacan al cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.), y de ellas, la roya del tallo y de la hoja son las de mayor importancia a nivel mundial, porque provocan grandes pérdidas económicas a los productores. La roya del tallo causada por el hongo *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, es la enfermedad más temida por los agricultores, ya que un cultivo aparentemente sano tres semanas antes de la cosecha puede ser reducido a un montón de tallos rotos y granos arrugados, provocando la pérdida total del cultivo (Roelfs et al., 1992). No obstante que en Estados Unidos se han reportado pérdidas del rendimiento superiores al 25%, y en el noroeste de México, en los años cincuenta, fue una de las enfermedades más destructivas (Roelfs, 1978; Singh et al., 2011). La FAO (2017) señala que esta enfermedad puede causar pérdidas superiores al 70%.

Por otra parte, la roya de la hoja causada por el hongo *Puccinia triticina* Eriks, es la enfermedad más difundida en el mundo, se encuentra en casi todas las regiones donde se cultiva trigo, y causa pérdidas entre el 10 y 60% en el rendimiento, según Roelfs et al. (1992) y Herrera-Foessel et al. (2006), respectivamente.

Para proteger el cultivo de trigo de estas enfermedades, el método más eficaz, desde el punto de vista económico y ambiental, es el uso de variedades con resistencia genética, de ahí la importancia de los programas de mejoramiento de trigo, los cuales desarrollan constantemente germoplasma con características deseables adaptados a las principales zonas de producción de cada región. Según Huerta-Espino et al. (2003) la resistencia parcial o de desarrollo lento de la roya es la más importante, porque es de tipo durable, reduce drásticamente las pérdidas en

rendimiento llegando a casi cero, y porque establece una relación de convivencia entre hospedante-patógeno, y es el tipo de resistencia más conveniente en campos de agricultores. Esta resistencia se considera como la más efectiva para el control genético de las royas del trigo.

La postulación de genes es conocer los genes de resistencia que una variedad de trigo posee. En este caso, para conocer los genes de resistencia a la roya se tienen que evaluar plántulas de las variedades o líneas cuyos genes de resistencia se desconocen junto a líneas hospedantes que poseen genes de resistencia conocidos (diferenciales), empleando aislamientos con muchos genes de avirulencia y virulencia. Para postular los genes de resistencia, se compara la reacción de infección de las líneas en estudio con la de los diferenciales a través de todos los aislamientos empleados. Una intensa reacción de infección en una línea experimental significa que esta no posee ninguno de los genes de resistencia para los cuales es avirulento el ensayo; por otra parte, cuando las líneas experimentales tienen la misma reacción y patrón de infección que una línea diferencial se postula la presencia de ese gen (Roelfs et al., 1992).

En el cultivo del trigo se han realizado diversos estudios de postulación e identificación de genes de resistencia a royas. Para la roya del tallo Luig (1983) identificó 13 genes de resistencia en germoplasma de origen mexicano, y Aktar-Uz-Zaman et al. (2017) identificaron al menos 27 genes de resistencia efectivos contra la raza Ug99. Para el caso de la roya de la hoja Singh y Rajaram (1991, 1992) y Singh (1993) postularon los genes de resistencia presentes en la mayoría de las variedades mexicanas y encontraron la presencia de 14 genes que se encuentran de manera

individual o en combinación. Por su parte, Huerta-Espino y Singh (1996) identificaron 17 genes de resistencia a roya de la hoja que aún permanecen efectivos en las zonas productivas de trigo en México.

Durante varios años el CIMMYT ha realizado colectas de germoplasma de trigo a nivel nacional con el fin de conocer la variabilidad genética de esta gramínea y los genes de resistencia que portan, aunque en parte de este germoplasma de origen mexicano aún se desconoce los genes de resistencia a roya de la hoja y del tallo que poseen.

Los objetivos de esta investigación fueron i) postular genes de resistencia a roya del tallo, ii) postular genes de resistencia a roya de la hoja, e iii) identificar genes de resistencia de planta adulta en germoplasma de trigo de origen mexicano.

Materiales y Métodos

Germoplasma

Se emplearon en total 76 líneas de trigo harinero, de las cuales 75 son líneas de origen mexicano (OMV) colectadas a nivel nacional por el CIMMYT, pero de las que no se conocen los genes de resistencia para roya del tallo y de la hoja que portan, más el testigo local McNair 701. Además se emplearon los sets de 20 diferenciales de roya de la hoja y roya del tallo.

Aislamientos de roya de la hoja y del tallo

Las razas de roya de la hoja empleadas fueron 10: KFBJG, MBDSO, MCTNB, MFJSB, MJBIG, PBLRG, TBBGS, TCRKG, TNBGJ Y TNRJJ. Los nombres de las razas fueron derivados usando la nomenclatura de razas desarrollada por Long y Kolmer (1989) para el primer, segundo y tercer set de diferenciales. El cuarto y quinto juego de diferenciales es el mismo que fue usado por Kolmer (2001) y Kolmer et al. (2006), respectivamente.

Por otro lado, las razas de roya del tallo empleadas también fueron 10: MCCFC, QFCSC, QTHJC, RCRSC, RKQQC, TKTTF, TPMKC, TRTTF, TTTTF y TTKSK (Ug99). Los nombres de las razas fueron derivados usando la nomenclatura internacional de razas desarrollada por Roelfs y Martens (1998) para el primer, segundo y tercer juego, incluyendo el cuarto y quinto juego de acuerdo con Jin et al. (2008).

Evaluación en plántula de las 76 líneas para roya de la hoja

Los ensayos se desarrollaron en el Laboratorio de Enfermedades de Cereales del Departamento de Agricultura de Estados Unidos en la Universidad de Minnesota (CDL-USDA-U of MN), entre abril y junio de 2017.

Se sembraron 10 juegos de los 76 genotipos en prueba más el set de 24 diferenciales de roya de la hoja, un juego por cada raza de roya empleada. Se usaron pequeñas macetas de plástico de unos 6 cm³ colocadas en bandejas con Vermiculita como sustrato para la siembra y se sembró cuatro genotipos en cada maceta. Se emplearon seis semillas de cada línea las cuales se colocaron en orificios de 1cm de diámetro y de profundidad en las macetas. A los siete días de la siembra se realizó la

inoculación de las 10 razas empleando una suspensión de esporas en aceite mineral (Soltrol 170). Después de secarse por al menos 30 minutos, las plántulas inoculadas se colocaron en una cámara de rocío por 16 horas, posteriormente se colocaron en el invernadero con temperaturas diarias entre 15 y 25 °C con al menos 8 horas de luz natural y 8 horas de luz artificial complementaria (10,000 lux).

La lectura de los tipos de infección (TI) se realizó a los 12 días después de la inoculación, para ello se empleó la escala de 0 a 4 descrita por Stakman et al. (1962), donde 0-2 es resistente (presencia de genes de resistencia) y 3-4 es susceptible (ausencia de genes de resistencia). Estas pruebas se realizaron en dos ocasiones o repeticiones para corroborar los datos fenotípicos en plántula.

Evaluación en plántula de las 76 líneas para roya del tallo

Los ensayos se desarrollaron en el Laboratorio de Enfermedades de Cereales del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (CDL-USDA) y en el Laboratorio de Bioseguridad (BSL3) de la Universidad de Minnesota, entre enero y abril de 2017

Se sembraron 10 juegos de los 76 genotipos más el set de 20 diferenciales de roya del tallo, un juego por cada raza de roya empleada. Para la siembra se emplearon macetas plásticas llenas con Vermiculita como sustrato, colocadas en bandejas y en cada maceta cuatro genotipos. Se usaron cinco semillas de cada línea, las cuales se colocaron en orificios de 1cm de profundidad por 1cm de diámetro, realizados con una plancha metálica en el sustrato de las macetas. La inoculación se realizó cuando emergió completamente la hoja primaria, a los 8 días después de la siembra. Las urediosporas de roya del tallo se inocularon de acuerdo con lo descrito

por Rouse et al. (2011). Después de la inoculación las plántulas se colocaron en una cámara de rocío por 16 horas, posteriormente se colocaron en el invernadero donde la temperatura se mantuvo a 22 ± 2 °C durante el día y a 18 ± 2 °C durante la noche, empleando luz complementaria durante el día y la noche para proveer un fotoperiodo de 16 horas.

La lectura del tipo de infección (TI) en las hojas primarias se realizó a los 14 días después de la inoculación, para ello se empleó la escala de 0 a 4 descrita por Stakman et al. (1962), donde 0-2 es resistente (presencia de genes de resistencia) y 3-4 es susceptible (ausencia de genes de resistencia). Estas pruebas se realizaron en dos ocasiones o repeticiones para corroborar los datos fenotípicos.

Análisis molecular

En adición a los ensayos de invernadero, en laboratorio se corrieron marcadores moleculares ligados a genes de planta adulta conocidos; para ello, se tomaron muestras de tejido de las 76 líneas en evaluación y se extrajo su ADN, empleando el método descrito por Edwards et al. (1991). Después de extraer el ADN se cuantificó su concentración empleando un Nanodrop, una vez cuantificado el ADN se homogeneizaron las muestras a 50 ng/ μ l. Se emplearon marcadores SSR (Simple Sequence Repeat) para los genes *Sr31*, *Sr38* y *Lr34/Sr57*, un marcador CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) para el gen *Sr2/Lr27*, y un marcador KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) para el gen *Sr12*.

Para el marcador lag95 (*Sr31*) se utilizó el siguiente programa de PCR: Paso 1 = un ciclo: 94°C (5 min); Paso 2 = 30 ciclos: 95°C (30 seg), 55°C (1 min), 72°C (1 min)

10 seg); y Paso 3 = un ciclo: 25°C (1 min), 72°C (10 min). El marcador Ventrinum_LN2 (*Sr38*) empleó el programa de PCR: Paso 1 = un ciclo: 94°C (45 seg); Paso 2 = 30 ciclos: 94°C (45 seg), 65°C (30 seg), 72°C (1 min); y Paso 3= un ciclo: 72°C (7 min). Para el marcador *cssfr5* (*Lr34*) se utilizó el programa de PCR denominado 'touchdown': Paso 1 = un ciclo: 94°C (2 min); Paso 2 = 30 ciclos: 94°C (30 seg), 65°C (30 seg, bajando 1°C por ciclo hasta alcanzar la temperatura final de 54°C para alineación/extensión), 72°C (50 seg); Paso 3= un ciclo: 94°C (30 seg), 54°C (30 seg), 72°C (4 min); y Paso 4= un ciclo: 72°C (1 min). Finalmente, los productos amplificados de la PCR se corrieron por una hora y media a 100 Voltios en un gel de agarosa de 1.5%.

Entre tanto que para el marcador CAPS *csSr2* (*Sr2*) se empleó el programa de PCR: Paso 1 = un ciclo: 95°C (2 min); Paso 2 = 30 ciclos: 95°C (30 seg), 60°C (40 seg), 72°C (50 seg); y Paso 3 = un ciclo: 72°C (5 min). Los productos amplificados en la PCR del marcador *csSr2* fueron digeridos en el termociclador a 37°C por una hora con la enzima BSPH I, posteriormente las muestras se corrieron por una hora y media a 100 Voltios en un gel de agarosa al 2%.

Para el caso del marcador KASP *NB-LRR3* (*Sr12*) se empleó un equipo de PCR de Tiempo Real con el programa 'touchdown': Paso 1 = un ciclo: 95°C (15 min); Paso 2 = 40 ciclos: 95°C (20 seg), 65°C (1 min, bajando 0.8°C por ciclo hasta alcanzar la temperatura final de 57°C para alineación/extensión); y Paso 3= un ciclo: 30°C (2 min). La lectura del producto de la PCR se realizó empleando el programa StepOne™Software v2.3.

Resultados

Postulación de genes Sr

Existen más de 50 genes designados en trigo que confieren resistencia a roya del tallo (McIntosh et al., 1998), en el presente estudio se identificaron siete de estos genes: en plántula *Sr7a*, *Sr8a* y *Sr11*; y empleando técnicas moleculares los genes *Sr12*, *Sr31*, *Sr2* y *Sr57*, ya sean solos o combinados (Cuadro 1). En 21 de los 75 genotipos se postuló un gene de resistencia: *Sr7a*, *Sr8a*, *Sr11*, *Sr12* o *Sr57*. Con dos genes combinados se postularon 24 genotipos: con la combinación *Sr2+Sr11* la línea 40, con la combinación, *Sr2+Sr12* las líneas 62 y 63, con la combinación *Sr2+Sr57* las líneas 1 y 55, con la combinación *Sr7a+Sr11* las líneas 12, 42 y 52, con la combinación *Sr8a+Sr11* las líneas 11, 17, 21, 22, 25, 32, 34, 65 y 72, con la combinación *Sr8a+Sr12* las líneas 19, 29 y 45, con la combinación *Sr11+Sr12* la línea 4, 36 y 43, y con la combinación *Sr12+Sr57* la línea 53. La combinación de tres genes se postuló en 17 genotipos: para la combinación *Sr2+Sr7a+Sr11* la línea 67, con la combinación *Sr2+Sr8a+Sr11* las líneas 51 y 68, con la combinación *Sr2+Sr8a+Sr12* la línea 69, con la combinación *Sr2+Sr8a+Sr57* la línea 39, para la combinación *Sr2+Sr11+Sr57* la línea 61, para la combinación *Sr7a+Sr8a+Sr11* las líneas 58 y 66, para la combinación *Sr7a+Sr11+Sr12* la línea 26, para la combinación *Sr7a+Sr11+Sr57* la línea 13, para la combinación *Sr8a+Sr11+Sr12* las líneas 16, 18, 23, 30, 41 y 71, y para la combinación *Sr8a+Sr11+Sr57* la línea 39 . También se postularon tres genotipos con combinación de 4 genes, la línea 59 con la combinación *Sr7a+Sr8a+Sr11+Sr12*, con la combinación *Sr7a+Sr8a+Sr12+Sr57* la línea 31 y con la combinación *Sr8a+Sr11+Sr12+Sr31* la línea 74. Cabe mencionar que en once genotipos no se postuló ningún gen.

Cuadro 1. Tipos de reacción de 75 genotipos de trigo de origen mexicano (*Triticum aestivum*) en respuesta a 10 razas de roya del tallo.

Línea	Razas de roya del Tallo										Genes Postulados e Identificados
	QFCSC	QTHJC	MCCFC	RCRSC	RKQQC	TKTTF	TPMKC	TRTTF	TTKSK	TTTTF	
OMV 1	0;	33+mos	1;	3+	3	3	3	3+	3+	3+3-;	Sr2, Sr57
OMV 2	0	3+	2	2	3-	;/2-	22+	3	3	3	Sr12
OMV 3	0	3 mos	;3	3+	2-	3	3	33+	3+	3+	-
OMV 4	2+2	32+	22+	33+	1-	2-	2	2/33+	3+	2	Sr11, Sr12
OMV 5	;	2	2+mos	32+	12	3	3-3	33+	3	3	Sr12
OMV 6	2 LIF	32+	3	3	12	33+	3	3+	3+	3+	Sr12
OMV 7	0;/2	33+	0;	0	13-/3	12-	0	33+	3+	;1-	Sr7a
OMV 8	0;	3+	0	0	3-	23	0	3+	3+	;1-	Sr7a
OMV 9	2	3+	2	3+	2	3	2	33+	3+	2+3	Sr12
OMV 10	0	0 1	0;	0	3-1	;1	0;1-	33-	3	3+	-
OMV 11	0	3+	0;	0	;1-	12-	0;1-	0	2	2-	Sr8a?, Sr11
OMV 12	;1	3	;12	3+	3-1/;	3-	3/3-	3-1	3	2+	Sr7a, Sr11?
OMV 13	0	31 LIF	0;	0	1	;2-	0;1-	3	3	;1-	Sr7a, Sr11, Sr57
OMV 14	0	23	0;	0;	3-1/2-	;2-	0;1-/2-	33-	3/2	3	-
OMV 15	0;	32+	;	1	2	3+	0;	3	3	3+	Sr2
OMV 16	0;	3	;1	0	2-;	22-	3 1p	2-	3+	2	Sr8a, Sr11, Sr12
OMV 17	0	3+	1	0	2-	3+	2	2-	3+	23-	Sr8a, Sr11?
OMV 18	0;	3	;1-	0;	2-;	32	2-	2-	3+	3+	Sr8a, Sr11?, Sr12
OMV 19	0	3+	;1	0	2-;	2	3-1	2-	2	23-;	Sr8a?, Sr12
OMV 20	0	2	1	0/2 1p	2-/;2-	2/3+	2-	32	3	;1	Sr7a
OMV 21	0	32	0	0	;1-	12	2-	0;	3	3	Sr8a, Sr11
OMV 22	0	32	0	0	;1-	12	2-	12-	3	3	Sr8a, Sr11
OMV 23	0;	32+	1-	0	;2-	3	2-	2-	3+	13-;	Sr8a, Sr11?, Sr12
OMV 24	0;	2	1	;/2 1p	2-	3+	-	3+	3+	3+	-
OMV 25	0;	3+	0	0	;1-	;/2-	31	12-	3-	3+	Sr8a, Sr11
OMV 26	;1	2	2	0	;1-	2-	2-	33+	3+	11+	Sr7a, Sr11, Sr12
OMV 27	;	22+	;	;1	2-	3+	;	3+	3+	3	-
OMV 28	2	22+	12	0/ 2 1p	2-	3+	2-	3+	3+	3+	Sr12
OMV 29	2	2	2	;	2-	2-	2-	12-	3+	2-	Sr8a, Sr12
OMV 30	2	2	0;	0	2-	12-	2-	0;1	3+	2-	Sr8a, Sr11, Sr12 Sr7a?, Sr8a, Sr12,
OMV 31	0;	3	0;	0;	;2-	2+	2-	12-	3+	2+	Sr57
OMV 32	0	22+	0;1-	2	;2-	32+	2-	2-	3+	3+	Sr8a, Sr11?
OMV 33	0	22+	;	0	2-;	2	2-	0;	3+	3	Sr8a
OMV 34	;	22+	;	0;	;2-	;2-	2-	0;1	3	3	Sr8a, Sr11
OMV 35	2+	22+	2	;	2	3	2-/2	33+	3	2+	-
OMV 36	2	33+	2+2	3+	2	32	2	33+	3+	2	Sr11?, Sr12

OMV 37	;	33+	;3	3+;	3-1	33+	3;	0;	3	2+3-	<i>Sr2, Sr8a?, Sr57</i>
OMV 38	0	22+	0;	01	3-1	12	;1	3	3	3	-
OMV 39	0	2	0;1	0	12	;/2-	;1-LIF/2	0	3/2-	;	<i>Sr8a?, Sr11, Sr57</i>
OMV 40	;	12	;	;	3-1	11+;	;	;/2	31"2"	2+	<i>Sr2, Sr11?</i>
OMV 41	0;	3+	1	0	2-	33+	2	0;	3+	;11+	<i>Sr8a, Sr11?, Sr12</i>
OMV 42	;	2	;1-	0;	1-;	21+	2	33+	3	;1	<i>Sr7a, Sr11</i>
OMV 43	2	3+	12	2	3-	12-	2	2/3	3	2+3-	<i>Sr11?, Sr12</i>
OMV 44	;	22+	3-mos	33+	3-	3+	2+3	33+	33+	3	-
OMV 45	2;	3 mos	3+mos	3+ mos	3-1	3+	3	0;1	3	3	<i>Sr8a, Sr12</i>
OMV 46	1	3+	0;	0	3-1/0;	2-1+	0;/3-	3	3+	;	<i>Sr7a</i>
OMV 47	1	3+	0;	;	3+	3+	;1-	33+	3+	3+	-
OMV 48	2	3	3+mos	3+ mos	12	3+	3	3+3	3+	3+/2+3	<i>Sr12</i>
OMV 49	0	22+3	0	0	3-	;/2-	0;1-	33+	3	3-	<i>Sr57</i>
OMV 50	0	3+	0	0	;2-	12-	0;1-	0;	2	;	<i>Sr8a?</i>
OMV 51	;1	3 mos	;12	32+	23-;/	3	3	23-	3+	33+	<i>Sr2, Sr8a, Sr11?</i>
OMV 52	0	3 mos	0	0	12	12-	0;1-	23	3+	;1	<i>Sr7a, Sr11</i>
OMV 53	;1-	3+	0;	;	3	2-	;1-	3+	3+	3+	<i>Sr12, Sr57</i>
OMV 54	;1-	32+	;	;1	2	33+	;	3+	3+	3+	-
OMV 55	;	2+3	;	;	2	3+	;	3+	3+	3+	<i>Sr2, Sr57</i>
OMV 56	;2-	3	32+	3+ mos	13-	3+	2+3	33+	3+	2+3	<i>Sr12</i>
OMV 57	;2-	3	32+	3+ mos	13-	33+	2+3	33+	3+	2+3	<i>Sr12</i>
OMV 58	0	3+	0	0	;2-	22-	;1-	;1	2	2-;/	<i>Sr7a, Sr8a?, Sr11?</i> <i>Sr7a, Sr8a, Sr11?,</i>
OMV 59	0;	3+	;1-	1	;2-	23	33-	;1	3+/2	23-	<i>Sr12</i>
OMV 60	33+	33+	3+	3+	3	33+	33+	3+	3+	3+/2+	<i>Sr12</i>
OMV 61	;	3 mos	;	;1	/13-	;/3-	13-;	3	3	3;/3-	<i>Sr2, Sr11, Sr57</i>
OMV 62	2	22+	32+	33-	3-	33+	3	33+	3+	3	<i>Sr2, Sr12</i>
OMV 63	2	3 mos	3	33+	3-	3	3	33+	3+	3+	<i>Sr2, Sr12</i>
OMV 64	0;	3 mos	1	3+	3-	33+	3	32	2+3?	2+3	<i>Sr2</i>
OMV 65	0	33+	0	0	;2-	12-	0;1-	0;	2	;2-	<i>Sr8a?, Sr11</i>
OMV 66	0	3	0	0	13-	12-	;1-	2	3	;1	<i>Sr7a?, Sr8a, Sr11</i>
OMV 67	;	3 mos	0	;	3-	23	;1	33+	3	23-;	<i>Sr2, Sr7a, Sr11</i>
OMV 68	;	2 lif	0	;	11+	0;1	;	11+	33-	2+3-	<i>Sr2, Sr8a, Sr11</i>
OMV 69	2	3	32+	33+mos	21	3+	2+3	2-/3+	3	3	<i>Sr2, Sr8a, Sr12</i>
OMV 70	2;	3	32+	3+ mos	3-1	3+	3	3+	3	3	<i>Sr12</i>
OMV 71	0;	3+	0;	0;	;2-	33+	33-	0;	3+	3-;	<i>Sr8a, Sr11?, Sr12</i>
OMV 72	0	3+	1	0	;2-/23-	33+	2	12-	3+	;11+	<i>Sr8a, Sr11?</i>
OMV 73	0	2	0	0/1	2	12-	0;	33+	3	3	<i>Sr57</i> <i>Sr8a, Sr11, Sr12,</i>
OMV 74	0	22+	0	2	;	1	2-	12-	3+	2-	<i>Sr31</i>
OMV 75	2	3	2	32+	32/;	3+	2-	3+	3+	3	<i>Sr12</i>
McNair	3+	3+	3+	3+	4	3+	4	3+	3+	3+	-

Escala empleada basada en Stakman et al. (1962): Tipo de Infección (TI) 0 = respuesta inmune, sin uredinias o necrosis; TI manchas (;) = manchas necróticas; TI 1 = pequeñas uredinias rodeadas por necrosis; TI 2 = pequeñas uredinias rodeadas de clorosis; TI 3 = Uredinias medianas; TI 4 = Uredinias grandes. También se empleó los signos + y – para indicar escalas intermedias para el tamaño de las uredinias. El signo / significa distinto TI en diferente plántula; por otra parte, “mos” significa mosaico. LIF son las siglas en inglés de Low Infección Frequency o baja frecuencia de infección.

La postulación de genes se realizó empleando los datos fenotípicos recolectados en plántula en invernadero. Para postular el gene *Sr7a* el genotipo tiene que ser resistente a la raza TKTTF y TTTTF, pero susceptible a las razas TTKSK y TRTTF. Para postular el gen *Sr8a* el genotipo tiene que ser resistente a la raza TRTTF y susceptible a la raza TTKSK y esto se puede comprobar usando las razas MCCFC (resistente), RCRSC (resistente), RKQQC (susceptible) y TPMKC (susceptible). El gen *Sr11* lo portan los genotipos que son resistentes a la raza TKTTF y susceptibles a la raza TTKSK y esto se comprueba con las razas RKQQC (resistente), QFCSC (resistente) y MCCFC (resistente). Para los resultados de reacción de las líneas se usó como guía la reacción de los diferenciales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tipos de reacción de las líneas isogénicas usadas como probadores o diferenciales con las 10 razas de roya del tallo (*Puccinia graminis*).

No.	Gene	QTHJC	MCCFC	QFCSC	RCRSC	RKQQC	TPMKC	TTTTF	TKTTF	TTKSK	TRTTF
1	<i>Sr5</i>	3	3	3	3+	3	3	3	3+	4	4
2	<i>Sr21</i>	3	2	3	3+	3	3	3	33+	33+	4
3	<i>Sr9e</i>	2	1-	1	2	12-	3	3	3+	3+	3+
4	<i>Sr7b</i>	2	3+	2	3	3	3	3	3+	4	3+
5	<i>Sr11</i>	3	1	2	2	12-	3	3	2-	4	4
6	<i>Sr6</i>	3	;	13	13-	3	0	3	3+	3+	3+
7	<i>Sr8a</i>	3	2	3	2	3	3	3	3+	3+	2

8	Sr9g	3+	3+2	3+	3+	2+3	3	3	4	4	4
9	Sr36	0;	0	0	3+	3+	0	3+	4	0	3+
10	Sr9b	3+	2	2	3	3	32+	3+	3+	3+	4
11	Sr30	2	2	2	2	1	2	3+	3+	3+	4
12	Sr17+13	3	22+	2+	3	2+	2+	3	2+	3	3+
13	Sr9a	2	2	3	3	3	2	3	4	3+	4
14	Sr9d	3	2	3	3	2	3+	3+	3+	3+	4
15	Sr10	3	3+	3+	3	1	3	3	3+	2	4
16	SrTmp	2	3+	2	22+	1;	3+	3	3+	2+	4
17	Sr24	2	2	2	2	2+	2	2-	2-	2-	2
18	Sr31	2	2	2	2	2-	0	2	2-	4	2-
19	Sr38	1	1	2	;13-	23	1;	3	3+	3+	4
20	SrMcN	3	3+	3+	3	3	3	3	4	4	4

Por otra parte, la identificación de los genes *Sr2/Lr27* (Figura 1), *Sr12* (Figura 4), *Sr31* (Figura 2) y *Sr57/Lr34* (Figura 3) en las líneas en estudio, se realizó empleando marcadores ligados a estos genes conocidos (Cuadro 1). También se corrió el marcador *Ventrium_LN2* ligado al gen *Sr38*; los resultados mostraron que ninguno de los genotipos en estudio es portador de este gen.

En el Cuadro 1 se puede observar el tipo de infección denominado mosaico el cual fue registrado como 'mos'; este tipo de lectura denota la presencia de genes de planta adulta (APR), siendo en la mayoría de los casos la presencia del gen *Sr2*.

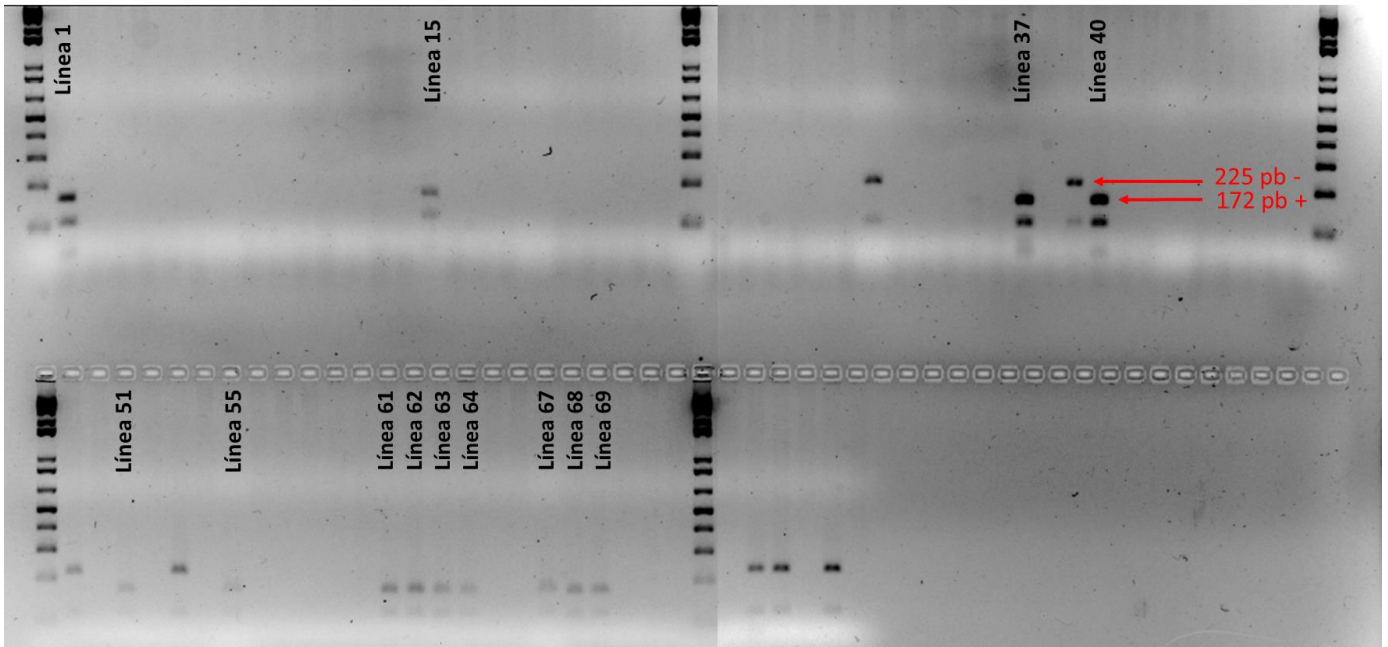


Figura 1. Identificación en líneas mexicanas del marcador CAPS *CsSr2* ligado al gen RPA *Sr2/Lr27*, corrido en un gel de Agarosa al 2% con una escalera molecular de 1kb.

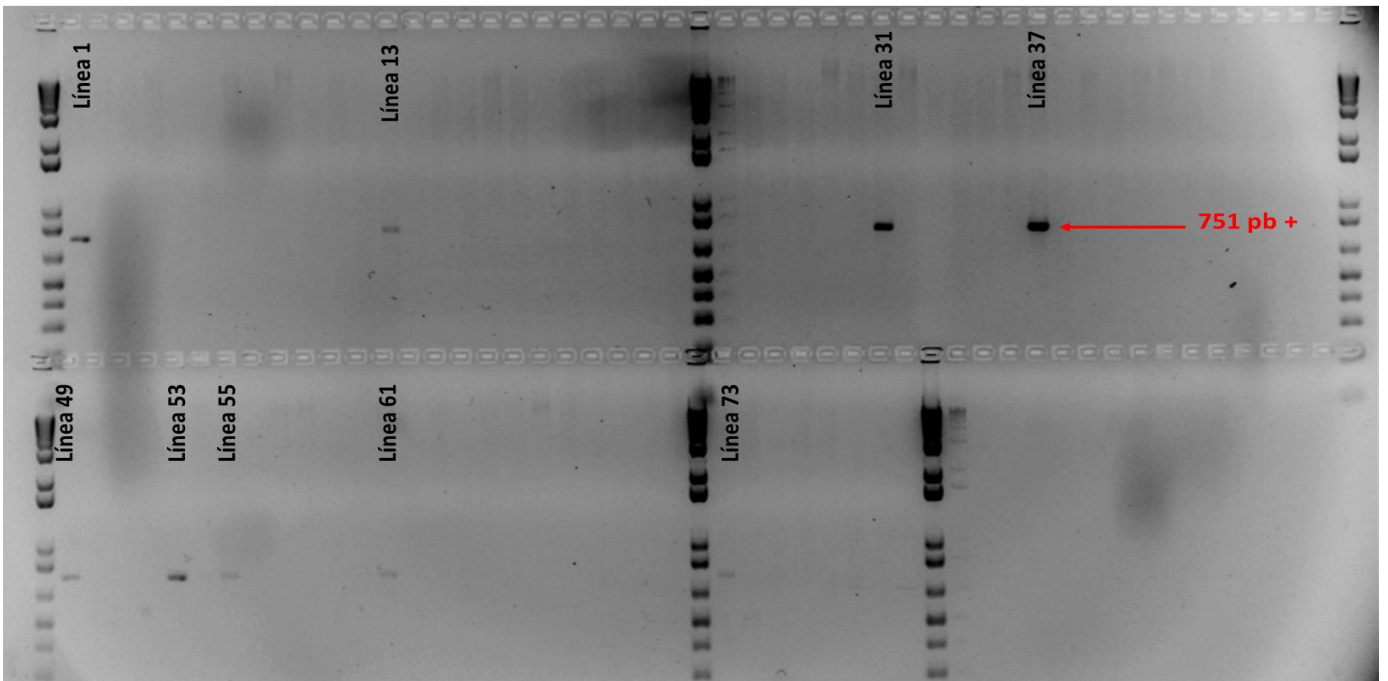


Figura 2. Identificación en líneas mexicanas del marcador SSR *cssfr5* ligado al gen RPA *Lr34/Sr57*, corrido en gel de Agarosa al 1.5% con una escalera molecular de 1kb.

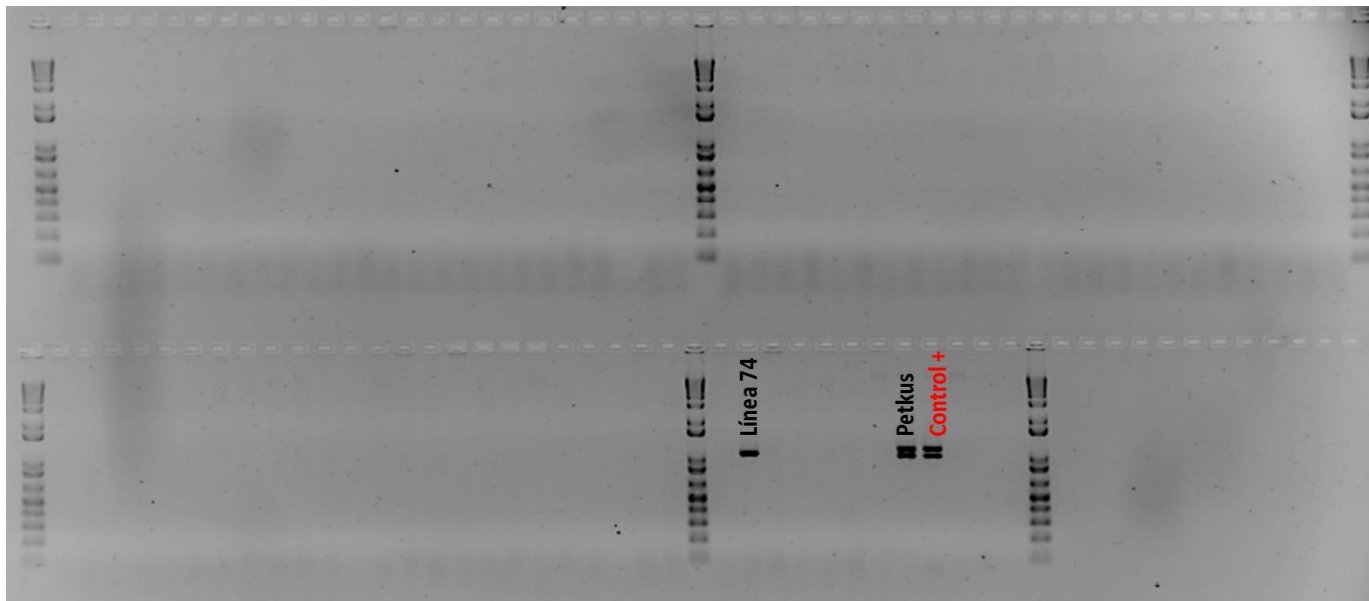


Figura 3. Identificación en líneas mexicanas del marcador SSR *lag95* ligado al gen RPA *Sr31*, corrido en un gel de Agarosa al 1.5% con una escalera molecular de 1kb.

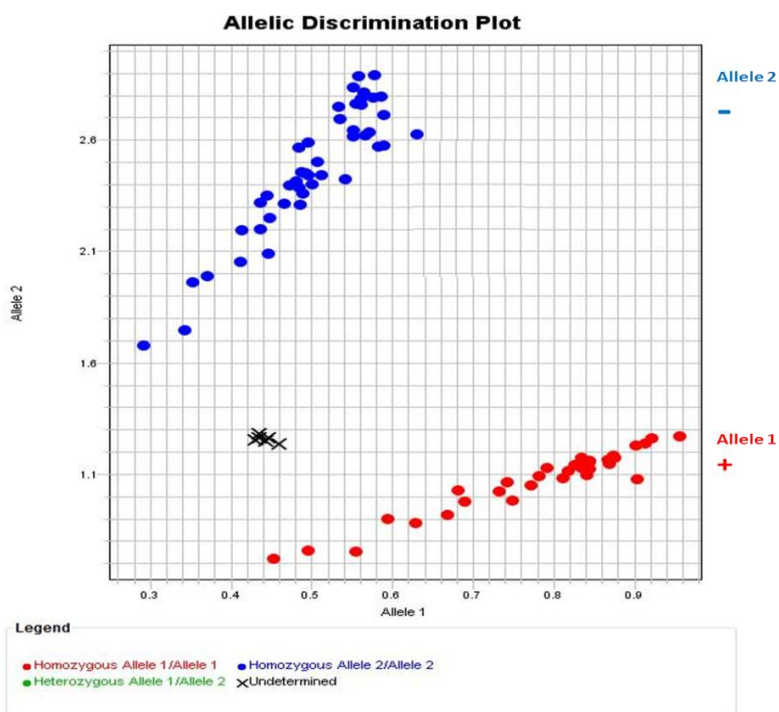


Figura 4. Discriminación alélica de las líneas de origen mexicano que llevan el gene *Sr12*, usando el marcador KASP *NB-LRR3*.

Postulación de genes Lr

Según McIntosh et al. (1998) hay más de 70 genes designados en trigo que confieren resistencia a roya de la hoja, de estos se logró identificar nueve genes: en plántula *Lr1*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr23* y *Lr26*; y empleando marcadores moleculares los genes *Lr27* y *Lr34*, solos o en combinación (Cuadro 3). En 36 genotipos se postuló un gene de resistencia: *Lr1*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr23*, *Lr26* o *Lr27*. Con dos genes en combinación se postuló 16 genotipos, con la combinación *Lr1+Lr10* la línea 35, con la combinación *Lr1+Lr14a* las líneas 20 y 33, con la combinación *Lr10+Lr14a* la línea 11, con la combinación *Lr10+Lr27* la línea 68, con la combinación *Lr10+Lr26* la línea 74, con la combinación *Lr14a+Lr27* las líneas 40, 63 y 67, con la combinación *Lr14a+Lr34* las líneas 49 y 73, con la combinación *Lr17+Lr27* la línea 15, con la combinación *Lr27+Lr34* la línea 39, con la combinación *Lr27+Lr34* las líneas 1 y 37, con la combinación *Lr?+Lr34* la línea 13, dos genotipos con *Lr26* más un gen desconocido susceptible a la raza MCTNB, (Cuadro 4). También se postuló una combinación de tres genes, la combinación *Lr1+Lr14a+Lr34* en la línea 53, la combinación *Lr17+Lr27+Lr34* en la línea 55 y la combinación *Lr14a+Lr27+Lr34* en la línea 61; y se postuló cuatro genes en la línea 31, con la combinación *Lr1+Lr16+Lr26+Lr34*. Además se identificó el tipo de infección mesotético (TI=;123 o X) en algunas líneas del germoplasma evaluado, denotando la posible presencia de genes de resistencia específica como *Lr12* o *Lr13*, o la presencia de los genes complementarios *Lr27+Lr31* (Huerta-Espino et al., 2003). Se encontraron genes desconocidos presentes en las líneas 19, 34, 36, 52, 66 y 75, los cuales no se pudieron identificar con las razas LR empleadas; y no se postuló ningún gen en 13 de las líneas en estudio.

Cuadro 3. Tipos de reacción de 75 genotipos de trigo de origen mexicano (*Triticum aestivum*) en respuesta a 10 razas de roya de la hoja.

Línea	Razas de Roya de la Hoja										Genes Postulados e Identificados
	TBBGS	MJBJG	TCRKG	KFBJG	TNBJG	TNRJJ	MFJSB	MBDSD	MCTNB	PBLRG	
OMV 1	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	<i>Lr27, Lr34</i>
OMV 2	3+	3+	3+	3;	3	3+	3+	3+	3+	3+	-
OMV 3	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	X	<i>Lr14a</i>
OMV 4	1	3+	12	1	1+	1+	3+	12	1+2	2+3	<i>Lr16?</i>
OMV 5	3+	3	3	3+;	3+	3+	2+;/12	2+3	3	3+;	-
OMV 6	3	3	3	3+	3	3+	3	2+3	3+	X	<i>Lr14a</i>
OMV 7	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+3	3+	3+	3+	-
OMV 8	3+4	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+4	3+4	-
OMV 9	1	3+	1	1	1+2	1	3+	12	12	122+	<i>Lr16?</i>
OMV 10	3	3+	3	3+	3	3	3+	3	3+	X	<i>Lr14a</i>
OMV 11	3+	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	;1-	2+3	<i>Lr10, Lr14a</i>
OMV 12	3+;	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	3+	X	<i>Lr14a</i>
OMV 13	3+	3+	3+	3+	3+	3	;1	;12	;1-	3+	<i>Lr?, Lr34</i>
OMV 14	3	3+ LIF	3	3	3LIF	3	3+	3+	3+	;1	<i>Lr14a</i>
OMV 15	;1	;1	;1	1;	;1	;1	3	3+	3;	;12	<i>Lr17, Lr27</i>
OMV 16	3+	3+	3	3+	3	3+	3+	3+	;	3+	<i>Lr10</i>
OMV 17	3+	3+	3+	3+	3+	;1	3+	3+	3+	3+	-
OMV 18	3+	3	3+	3+	3	3	2+3	3	;1	3+	<i>Lr10</i>
OMV 19	;12	;1	;12	3+	;1	12	;1	12	;	3+	?
OMV 20	3+	3	3	0;	3+	3	3+	3+	3	X	<i>Lr1, Lr14a</i>
OMV 21	3	3+	3+	0;	3+	3	3+	3+	3+	3+	<i>Lr1</i>
OMV 22	3	3 LIF	3	0;	3	3	3+	3+	3	3	<i>Lr1</i>
OMV 23	3+	3	3	0;	3	3	3+	3+	3+	3+	<i>Lr1</i>
OMV 24	3+	;12	3	0;	3+	3	3+	3+	3+	3+	<i>Lr1</i>
OMV 25	3+	3	3+	X	3+	3+	3;/1	3+	3+	3+	<i>Lr1</i>
OMV 26	3+	3+	3+	3+	3;	3+	3+	3+	3+	3	-
OMV 27	;12	;	;1-	;1	3;	X	3;	3+	3;	;1	<i>Lr17</i>
OMV 28	;1-	0;	;11+	0;	0;	12	3+	3+	3+	;	<i>Lr17</i>
OMV 29	;12	;1	3+	0;	;12	;	12	11+	33+	22+	<i>Lr26+</i>
OMV 30	;2	0;	3+	3	;12	0;	;1	1	3	;1	<i>Lr26+</i>
OMV 31	;1	12	;1-	0;	;1	;	12	;1	11+	;1-	<i>Lr1, Lr16, Lr26, Lr34</i>
OMV 32	2+3	12-	12	3+	2+3	3	;12	22+	;	3+	<i>Lr23</i>
OMV 33	3+	3+	3+	0	3+	3	3+	3+	3+	;	<i>Lr1, Lr14a</i>
OMV 34	;12	;12	;1	3;	;12	X	;1	2+3	;	X	?
OMV 35	3	3+	3	0;	3+	3	3	3+	:1-	3+	<i>Lr1, Lr10</i>

OMV 36	3	3+	0/12	1	12	1+	3+	12	;1	3+	?
OMV 37	3+	3	3+	3+	3+	3	3+	3+	3+	3+	Lr27, Lr34
OMV 38	3	3	3+	3+	3	3+	3+	3+	3	22+	Lr14a
OMV 39	;12	;1	2	;1	;1	11+	12	3	3 LIF	3+	Lr17, Lr34
OMV 40	3+	3+	3+	3+;	3+;	3+;	3+;	3+	3+;	X	Lr27, Lr14a
OMV 41	3+4	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	-
OMV 42	3	3+	3+	3	3+;	3+	3	3+	3+	;22+	Lr14a
OMV 43	3+	3+	3	123	3	123	3	3+	3+	3+	Lr1
OMV 44	3+	3+	3+	3+	3+;	3+	3+	3+	3+	X	Lr14a
OMV 45	3+	3	3+	3+	3+	3+	2+3	3	3+	3+	-
OMV 46	3	3+	3	3+	3+	3	3+	3+	3+	3	-
OMV 47	3+	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	-
OMV 48	3+	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	3+4	123	Lr14a
OMV 49	3+;	3+	3+	3+	3+	3 LIF	3+	3	3+	123	Lr14a, Lr34
OMV 50	3+	3+	3+	3+4	3+	3+	3+	3+	;1-	3+	Lr10
OMV 51	3+	3+	3+	3+	3+;	3+	3+	3+	3+	3;	Lr27
OMV 52	3+	3+	3+	3+	3 LIF	3+	X	;12	;1-	3+	?
OMV 53	3	3	3	;3	3;	3	3+	3+	3+	22+	Lr1, Lr14a, Lr34
OMV 54	;1	;1	0;	;1-	;	;1	3;	3+	3+	;1	Lr17
OMV 55	;12	;1-	;1	;1	;12	1	3	3	3	;12	Lr17, Lr27, Lr34
OMV 56	3+	3+	3+	22+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	-
OMV 57	3;	3+	3+	3+	3	3+	3+	3+	3;	;12	Lr14a
OMV 58	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	1	3+	Lr10
OMV 59	3	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	1	3+	Lr10
OMV 60	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+4	3+4	-
OMV 61	3	3+	3+	3	3+	3+	3+	3+	3	;12	Lr14a, Lr27, Lr34
OMV 62	3	3+	3	3	3	3	2+3	3+	3	3+	Lr27
OMV 63	3	3	3+	3+	3+	3+	3	3+	3+	X	Lr14a, Lr27
OMV 64	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	Lr27
OMV 65	3+	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	1-	3+	Lr10
OMV 66	3+	3+	3+	3+	3+	3	1	;12	;1	3+	?
OMV 67	3	3+	3	3+4	3+4	3+;	3+	3+	3+	;12	Lr14a, Lr27
OMV 68	3 LIF	3+	3+	3+	3+	3	3+	3+	;	3;	Lr10, Lr27
OMV 69	3	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3	3+	3+	Lr27
OMV 70	3	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	3+	X	Lr14a
OMV 71	3	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	1;	3+;	Lr10
OMV 72	3+	3+	3+	3+4	3+	2+3	3+	3+	3+	3+	-
OMV 73	3	3+	3+	3+	3+4	3+	3	3+	3+	X	Lr14a, Lr34
OMV 74	;12	0;	3	3+	;1	;1	3+	1+	;	;1-	Lr10, Lr26
OMV 75	1	11+	;2	3	12	;11+	0;	;	;1	3	?
McNair	;/3	0	0;	0;	3+	3+4	0;	;	0;	0;	Lr9

Escala empleada basada en Stakman et al. (1962): Tipo de Infección (TI) 0 = respuesta inmune, sin uredinias o necrosis; TI manchas (;) = manchas necróticas; TI 1 = pequeñas uredinias rodeadas por necrosis; TI 2 = pequeñas uredinias rodeadas de clorosis; TI 3 = Uredinias medianas; TI 4 = Uredinias grandes; TI X (;123) = uredinias de tamaño variable distribuidos al azar en una sola hoja. También se empleó los signos + y – para indicar escalas intermedias para el tamaño de las uredinias. El signo / significa distinto TI en diferente plántula. LIF son las siglas en inglés de Low Infección Frequency o baja frecuencia de infección.

La postulación de genes se realizó empleando la lectura registrada en las líneas diferenciales de roya de la hoja, descritas en el Cuadro 4, así: para el gen *Lr1* los genotipos deben ser resistentes a la raza KFBJG y susceptibles todas las otras razas; para el gen *Lr10* los genotipos deben ser resistentes a la raza MJBjG, pero susceptibles a las otras; para el gen *Lr14a* los genotipos deben ser resistentes a la raza PBLRG y susceptibles a todas las demás; para el gen *Lr16* los genotipos deben ser resistentes a todas las razas y susceptibles a la raza MJBjG; para el gen *Lr17* los genotipos deben ser resistentes a todas las razas y susceptibles a las razas MBDS, MCTNB y MFJSB; para el gen *Lr23* el germoplasma debe ser resistente a las razas TNRJJ, TCRKG, MCTNB, MFJSB y MJBjG, y susceptibles a las otras razas; mientras que para el gen *Lr26* el germoplasma debe ser susceptible a las razas KFBJG, MCTNB y MFJSB, pero resistente a todas las demás.

Para la identificación de los genes de planta adulta *Lr27/Sr2* (Figura 1) y *Lr34/Sr57* (Figura 3), se empleó la ayuda de marcadores moleculares ligados a estos genes (Cuadro 2).

Cuadro 4. Tipos de reacción de las líneas isogénicas usadas como probadores o diferenciales con las 10 razas de roya de la hoja (*Puccinia triticina*).

Razas de Roya de la Hoja												
No.	Gene	TNBGJ	TNRJJ	TBBGS	TCRKG	KFBJG	MBDSD	MCTNB	MFJSB	MJBJG	PBLRG	
1	Lr1	3+	3+	3+	3	0;	3+	3+	3	3+	3+	
2	Lr2a	3+	3+	3+	3+	3+	;	0;	0;	0;	1;	
3	Lr2c	3+	3+	3+	3+	3+	;1	;1-	;	;1	3+	
4	Lr3	3+	3+	3+	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	
5	Lr9	3+	3+	;	0	0	0;	;	0;	0	0	
6	Lr16	11+	1	11+	1	1	1	;1	12	3	22+	
7	Lr24	3	3	;	0;	3+	0;	0;	3+	3+	;	
8	Lr26	;12	;	:13	33+	3+	2+3	3+	2+3	;1	1	
9	Lr3ka	12-	3+	2+3	3+	2	22+	3+	22+	;2-	3+	
10	Lr11	2	3+	2+3	3	2+3	2	3	3+	22+	22+	
11	Lr17	13	;1	;1	;1	;1	3+	3	3	;1+	;1	
12	Lr30	12	3+	2+3	3+	2	2	3+	2	;2	22+	
13	LrB	2+c	2	22+	2c	2+3	3+	3+	3	2c	3+	
14	Lr10	3+	3	3	3	3	3	;1-	3	3	3+	
15	Lr14a	3	3	3	3+	3+	3+	3	3+	3+	;123	
16	Lr18	2+	12	2+3	3+	22+	13	2	2	22-	2+3	
17	Lr21	22+	2+3	3+	;12-	2	2+3	2+3	22+	2	22+	
18	Lr28	3	3	3	3	3	0;	0;	0	3	3+	
19	Lr41	3+	3	3	0;	0	3+	0;	0	0	;1	
20	Lr42	12-	12	;1	;12	;1	12	12	12	0 1	2	
21	Lr3bg	22+	22+	12	22+	12	3+	3+	3+	3;	3+	
22	Lr14b	3	3	3	3+	3	3+	3+	3+	3+	3+	
23	Lr20	3+;	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3	3+	
24	Lr23	33+	2+3	3+	22+	3+	3+	;1-	;2	12	3+	

Discusión

Se postuló la presencia de tres genes de resistencia a roya del tallo en estado de plántula (*Sr7a*, *Sr8a* y *Sr11*) y los genes *Sr2*, *Sr12*, *Sr31* y *Sr57* se determinaron usando marcadores moleculares, observándose fenotipos con un solo gen o hasta en 21 combinaciones distintas de hasta cuatro genes diferentes.

Luig (1983) estudió las fuentes de genes de roya del tallo en trigo procedente de diferentes partes del mundo, encontrando que en el trigo de origen mexicano se encuentran los genes, *Sr2*, *Sr5*, *Sr6*, *Sr7a*, *Sr8*, *Sr9a*, *Sr9b*, *Sr11*, *Sr15*, *Sr17*, concordando con los resultados encontrados en nuestro estudio con excepción de los genes *Sr12* y *Sr31* presentes en nuestro germoplasma.

Según Aktar-Uz-Zaman et al. (2017) al menos 27 genes, entre ellos *Sr2* (*Lr27/Yr30*), *Sr13*, *Sr21*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr27*, *Sr28*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr37*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr42*, *Sr44*, *Sr45*, *Sr46*, *Sr47*, *Sr51*, *Sr52*, *Sr53*, *Sr55* (*Lr67/Yr46/Pm46*), *Sr57* (*Lr34/Yr18/Pm38*), y *Sr58* (*Lr46/Yr29/Pm39*), son efectivos o parcialmente efectivos contra la raza Ug99, la raza más virulenta de roya del tallo en la actualidad, la cual apareció primero en Uganda en 1999, posteriormente en Kenia, Etiopía, Yemen, el Medio Este y Asia del Sur, y se estima que las pérdidas asociadas a esta alcanzan los 3 billones de dólares. De estos genes de resistencia efectivos contra la raza Ug99, el germoplasma de nuestro estudio posee los genes de planta adulta *Sr2* y *Sr57*.

Por otra parte, se postularon nueve genes de resistencia a roya de la hoja en estado de plántula (*Lr1*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr23* y *Lr26*), más los genes de planta

adulta *Lr27* y *Lr34* determinados con la ayuda de marcadores específicos, y se observaron fenotipos con un solo gen o con 16 diversas combinaciones de hasta cuatro genes.

En los años 90's Singh y Rajaram (1991, 1992) y Singh (1993) postularon los genes de resistencia presentes en la mayoría de la variedades mexicanas y encontraron la presencia de 14 genes ya sea de manera individual o en combinación, *Lr1*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr19*, *Lr23*, *Lr26*, *Lr27+Lr31* y *Lr34*. Por su parte, Huerta-Espino et al. (2002) en un estudio con variedades mexicanas de trigo encontraron 12 genes presentes en forma individual o en combinación, estos genes fueron *Lr1*, *2a*, *3*, *3bg*, *10*, *13*, *16*, *17*, *23*, *26*, *27+31*. Huerta-Espino et al. (2003) en otro estudio con líneas élite de trigo en México, encontraron nuevamente 12 genes de roya de la hoja en estado de plántula: *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr19*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr27* y *Lr31*, que estuvieron presentes solos o en combinación, y dos genes de planta adulta *Lr34* y *Lr46*. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio, a excepción de un gen desconocido con un tipo de infección muy similar a *Lr28* presente en las líneas 13, 52 y 66.

Según Huerta-Espino y Singh (1996) los genes de resistencia a roya de la hoja que aún permanecen efectivos en las zonas productivas de trigo México son: *Lr3ka*, *9*, *18*, *21*, *22a*, *25*, *29*, *32*, *33*, *34*, *35*, *39*, *40*, *41*, *42* *43* y *Lr46*. En 2003, Huerta-Espino (2003), menciona que en el noroeste de México seguían siendo efectivos en planta adulta los genes *Lr9*, *Lr19* y *Lr24*; sin embargo, esta situación no será por mucho tiempo, ya que Huerta y Singh (1994) reportaron la existencia de virulencia para *Lr24* en los estados de Coahuila, Tamaulipas y Nuevo León, así como virulencia para *Lr19*

en el centro del país. Además, en el año 2008 Huerta-Espino et al (2008) ya reporta virulencia para los genes *Lr9* y *Lr25* en México.

A partir de los resultados de este trabajo, se puede concluir que de los genes de resistencia asignados para royas en trigo, las 75 líneas de origen mexicano poseen nueve genes de resistencia para roya de hoja y siete genes de resistencia para roya del tallo, solos o combinados. Dentro de estos están los genes pleiotrópicos de planta adulta *Sr2/Lr27* y *Lr34/Sr57* los cuales son efectivos contra las royas. Además se identificó un gen desconocido con un tipo de infección muy similar a *Lr28* presente en tres de las líneas en estudio (13, 52 y 66). Aunque el trigo no es endémico de México, el germoplasma de origen mexicano posee una base genética amplia, la cual puede ser usada a través de programas de mejoramiento genético como base para desarrollar variedades con resistencia durable y/o de desarrollo lento a royas, necesarias en campos de agricultores.

Bibliografía

- Aktar-Uz-Zaman, M., M. Tuhina-Khatun, M. M. Hanafi, and M. Sahebi. 2017. Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivar: an overview. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 31:431-445.
- Edwards, K., C. Johnstone, and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*. 19:1349.
- FAO. 2017. Wheat Stem Rust - Ug99 (Race TTKSK). <http://www.fao.org/agriculture/crops/rust/stem/rust-report/stem-ug99racettksk/es/> Consultada 19 Abril 2017
- Herrera-Foessel, S. A., R. P. Singh, J. Huerta-Espino, J. Crossa, J. Yuen, and A. Djurle. 2006. Effect of leaf rust on grain yield and yield traits of durum wheats

with race-specific and slow-rusting resistance to leaf rust. *Plant Disease*. 90:1065-1072.

Huerta-Espino, J., and Singh, R.P. 1994. First report of virulence for wheat leaf rust resistance gene *Lr19* in Mexico. *Plant Disease*. 78:640.

Huerta Espino, J., R. P. Singh. 1996. Misconceptions on the durability of some adult leaf rust resistance genes in wheat. In: G. H. J. Kema, R. E. Niks, and R. A. Daamen (eds.). *Proc. 9th European and Mediterranean Cereal Rust and Powdery Mildews Conf.* Sept. 2-6, 1996. Lunteren, The Netherlands. pp: 109-111.

Huerta-Espino, J., H. E. Villaseñor-Mir, E. Espitia-Rangel, S. G. Leyva-Mir, y R. P. Singh. 2002. Análisis de la resistencia a la roya de la hoja en trigos harineros para temporal. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25:161-169.

Huerta-Espino, J., R. P. Singh, H. E. Villaseñor-Mir, E. Espitia-Rangel, y S. G. Leyva-Mir. 2003. Postulación de Genes de Resistencia a la Roya de la Hoja (*Puccinia triticina* Ericks.) en Plántula y Planta Adulta en Genotipos Élite de Trigo Harinero (*Triticum aestivum* L.). *Revista Mexicana de Fotipatología*. 21:239-247.

Huerta-Espino, J., R. P. Singh, and J. Reyna-Martinez. 2008. First detection of virulence to genes *Lr29* and *Lr25* conferring resistance to leaf rust of wheat caused by *Puccinia triticina* in Mexico. *Plant Disease*. 92:311.

Jin, Y., L. J. Szabo, Z. A. Pretorius, R. P. Singh, and R. Ward. 2008. Detection of virulence to resistance genes *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease*. 92:923-926.

Kolmer, J. A. 2001. Physiologic specialization of *puccinia triticina* in Canada in 1998. *Plant Disease*. 85:155-158.

Kolmer, J. A., D. L. Long, and M. E. Hughes. 2006. Physiologic specialization of *Puccinia triticina* on wheat in the United States in 2004. *Plant Disease*. 90:1219-1224.

Long, D. L., and J. A. Kolmer. 1989. A North American system of nomenclature for *Puccinia triticina*. *Phytopathology*. 79:525-529.

Luig, N. H. 1983. A survey of virulence genes in wheat stem rust, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. In: *Advances in Plant Breeding. Supplements 11 to Journal of Plant Breeding*. Ed: Freising W. H., and Göttingen G. R. Verlag Paul Parley, Berlin and Hamburg, Germany.

McIntosh, R. A., G. E. Hart, K. M. Devos, M. D. Gale, and W. J. Rogers. 1998. Catalogue of gene symbols for wheat. In: *Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp.*. Vol. 5, Univ. Extension Press. Univ. Saskatchewan, Saskatoon, Canada.

- Roelfs, A. P. 1978. Estimated losses caused by rust in small grain cereals in the United States: 1918–76. USDA Miscellaneous Publication, USA 1363.
- Roelfs, A. P., R. P. Singh, and E. E. Saari. 1992. The Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management. México, D.F.: CIMMYT. 81 p.
- Roelfs, A. P., y J. W. Martens. 1998. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*. 78:526-533.
- Rouse, M. N., R. Wanyera, P. Njau, and Y. Jin. 2011. Sources of resistance to stem rust race Ug99 in spring wheat germplasm. *Plant Disease*. 95:762–766.
- Singh, R. P. 1993. Resistance to leaf rust in 26 Mexican wheat cultivars. *Crop Science*. 33:633-637.
- Singh, R. P., S. Rajaram. 1991. Resistance to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in 50 Mexican bread wheat cultivars. *Crop Science*. 31:1372-1479.
- Singh, R. P., S. Rajaram. 1992. Genes for resistance to *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* in 73 Mexican Bread wheat (*Triticum aestivum*) cultivars In: F.J. Zeller and G. Fischbeck (eds.). *Cereal Rusts and Mildews. Proc. 8th European and Mediterranean Cereal Rusts and Mildews Conf.*. Sept. 8-11, 1992. Weihenstephan/Germany. *Vortr, Pflanzenzuechtg* 24: 211-213.
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino, S. Bhavani, S. A. Herrera-Fossel, D. Singh, P. K. Singh, G. Velu, R. Mason, Y. Jin, P. Njau and J. Crossa. 2011. Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. *Euphytica*. 179:175-186.
- Stakman, E. C., D. M. Steward, and W. Q. Loegering. 1962. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. USDA Agric. Res. Serv. E-617. 53 p.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se realizaron tres estudios genéticos, los cuales permitieron identificar los genes involucrados en la resistencia a royas presentes en germoplasma de trigo harinero con resistencia durable.

1. 'Chilero', un cultivar de alto rendimiento desarrollado por el CIMMYT, provee resistencia intermedia a roya de la hoja y roya amarilla en las zonas trigueras de México. La resistencia de Chilero a roya de la hoja y roya amarilla está controlada por 3-5 genes de planta adulta (RPA). Entre ellos, un QTL en el cromosoma 1B que corresponde al conocido gen de resistencia de planta adulta (RPA) *Lr46/Yr29*, mientras que el locus *QLr.cim-5DS/QYr.cim-5DS* es un nuevo co-localizado gen para ambas royas. Adicionalmente, en esta población fue mapeado un nuevo *locus* de resistencia a roya amarilla en el cromosoma 7BL. Avocet también contribuyó con dos co-localizados QTL menores, ubicados en el cromosoma 1DL y 4BS. Se encontraron tres RILs transgresivas que combinan tres QTL en los cromosomas 1BL (*Lr46/Yr29*), 1DL y 5DS con severidades muy bajas, de hasta 10%, en condiciones de campo, mientras que las severidades más bajas para roya amarilla se observaron en las RILs que llevan los QTL en los cromosomas 1BL (*Lr46/Yr29*), 5DS y 6BL. Desafortunadamente no se encontraron RILs que lleven combinados todos los *loci* de resistencia detectados debido al limitado tamaño de la población. La población para el mapeo de un solo gen con las RILs que llevan el QTL 5DS está bajo desarrollo para realizar el mapeo fino de este gen presente el Chilero. Los marcadores SNP flanqueantes de los genes de interés pueden ser convertidos en marcadores KASP

(Kompetitive Allele Specific PCR) para ser empleados en programas de mejoramiento de trigo.

2. La resistencia durable a la roya proveniente de “New Pusa 876”, germoplasma desarrollado en la India, es controlada por 3-4 genes de planta adulta APR y el mayor determinante de esta resistencia fueron los conocidos genes pleiotrópicos de planta adulta, *Lr46/Yr29* y *Lr67/Yr46*. *Lr46/Lr29* reduce 14% y 16% la severidad media de la roya de la hoja y amarilla, respectivamente, y, por su parte, el gen *Lr67/Yr46* reduce 26% la severidad de ambas royas. Un efecto aditivo positivo entre los genes de roya de la hoja *Lr46* y *Lr67* fue detectado, el cual reduce la severidad hasta un 11% adicional cuando están juntos. La aditividad para roya amarilla entre *Yr29* y *Yr46* también fue positiva pero no estadísticamente significativa, con una reducción media de la severidad de 5%. New Pusa 876 puede ser usado como una fuente múltiple de resistencia en programas de mejoramiento para el desarrollo de nuevas variedades de trigo harinero, contribuyendo con la generación de germoplasma con resistencia durable.

3. En las 75 líneas de origen mexicano se postularon e identificó un total de siete genes de resistencia a roya del tallo. Mediante el uso de 10 diferentes razas de roya del tallo se postularon los genes *Sr7a*, *Sr8a* y *Sr11* en estado de plántula, y empleando técnicas moleculares se identificaron los genes *Sr2*, *Sr12*, *Sr31* y *Sr57*, solos o en combinaciones. Además, se postuló e identificaron nueve genes de

resistencia a roya de la hoja. Los genes *Lr1*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr23* y *Lr26* se postularon en plántula usando 10 razas diferentes de roya de la hoja, y a través del uso de herramientas moleculares se identificaron los genes de planta adulta *Lr27* y *Lr34*, ya sea solos o en combinación. También se postuló en este estudio un gen desconocido con un tipo de infección muy similar a *Lr28* el cual está presente en las líneas 13, 52 y 66. Dentro de los genes identificados en este germoplasma están los genes pleiotrópicos de planta adulta *Sr2/Lr27* y *Lr34/Sr57* los cuales son efectivos contra las royas. El germoplasma de trigo origen mexicano dispone de una base genética amplia, la cual puede ser usada en programas de mejoramiento como fuente para la generación de nuevos genotipos con resistencia durable.