



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

DIAGNÓSTICO DE LA PRESENCIA DE ROYA NARANJA (*Puccinia kuehnii* (Krüger) Butler) EN CLONES COMERCIALES DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp. Híbridos) EN EL SURESTE DE MÉXICO

SET PÉREZ HERNÁNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2014

La presente tesis, titulada: **Diagnóstico de la presencia de roya naranja (*Puccinia kuehnii* Krüger Butler) en clones comerciales de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbridos) en el sureste de México**, realizado por el alumno: **Set Pérez Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____


Dr. JULIÁN PÉREZ FLORES

ASESOR: _____


Dr. APOLONIO VALDEZ BALERO

ASESORA: _____


Dra. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por el apoyo económico aportado durante mis dos años de la maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por permitir realizar mi maestría en el programa de **Producción Agroalimentaria en el Trópico** (PROPAT).

A la línea Prioritaria de Investigación 5 (LPI-5) **Biología Microbiana, Vegetal y Animal**, y a la línea Prioritaria de Investigación 2 (LPI-2) **Agroecosistemas Sustentables** del Colegio de Postgraduados por el apoyo técnico y logístico para la realización del presente trabajo.

A los integrantes de mi consejo particular: **Dr. Julián Pérez Flores, Dr. Apolonio Valdez Balero y Dra. Hilda Victoria Silva Rojas**, por sus aportaciones en la realización de mi trabajo de tesis.

Al personal del laboratorio de **Biología y Fitopatología de Semillas del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo**, a todos y a cada uno de ellos por su apoyo en la elaboración de mi trabajo de investigación y en mi formación académica.

A la **M.C. Greta Hanako Rosas Saito**, del laboratorio de **Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo** por el apoyo brindado en el análisis de las muestras.

A los líderes de las organizaciones cañeras (**CNC Y CNPR**) y a los inspectores de campo en representación de los ingenios involucrados en la investigación por el apoyo en la colecta de las muestras: Ing. Jhony Arellano Sánchez (**Santa Rosalía de la Chontalpa**), Ing. Rafael Calleja (**Presidente Benito Juárez**), Ing. Rogelio Guerrero Romero (**Azuremex**), Ing. Diego R. Benita Torres (**Huixtla**), Ing. Ignacio Grajales Utreras (**La Joya**) y al Ing. Armando Aguirre (**San Rafael de Pucté**).

DEDICATORIA

A **DIOS** por haberme bendecido dándome la salud, la fuerza, la paciencia y la oportunidad de dar un paso más en mis estudios profesionales.

A mis padres **Jonás Pérez Sánchez** y **Virginia Hernández Córdova** por su amor, cariño, comprensión, paciencia y consejo que solo un padre y una madre pueden dar a un hijo.

A todas aquellas personas hombres y mujeres que se dedican al cultivo de la caña de azúcar, esperando que un día llegue la información contenida en el presente trabajo a sus manos y esperando que les sea de gran utilidad.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo general	4
3.1.1 Objetivos particulares	4
3.2 Hipótesis	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Distribución de la roya naranja	5
4.2 Importancia económica de las royas	6
4.3 Descripción taxonómica de la roya naranja	7
4.4 Síntomas de la roya naranja	7
4.5 Ciclo biológico	8
4.6 Descripción morfológica de la roya naranja	9
4.7 Marcadores moleculares utilizados en especies vegetales	10
4.8 Los marcadores moleculares de DNA	10
4.9 Técnica molecular usada en roya naranja	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1 Fase de campo	12
5.1.1 Colecta de muestras	13
5.2 Fase de laboratorio	13
5.2.1 Extracción del DNA	13
5.2.2 Preparación de la PCR	14
5.2.3 Análisis molecular	15
5.2.4. Reacción de la secuenciación	16
5.2.5 Análisis morfológico	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17

6.1 Identificación molecular del agente causal de la roya naranja mediante la técnica de la PCR _____	17
6.2 Morfología de la roya naranja (<i>Puccinia kuehnii</i>) y roya café (<i>Puccinia melanocephala</i>) ____	22
6.3 Comparación de secuencias consenso _____	24
6.3.1 Ingenio Santa Rosalía de la Chontalpa _____	24
6.3.2 Ingenio San Rafael de Pucté _____	26
7. CONCLUSIONES _____	31
8. LITERATURA CITADA _____	34

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Clones muestreados en los diferentes ingenios del sureste de México.....	13
Cuadro 2 Iniciadores utilizados en la amplificación y secuenciación de la roya naranja	16
Cuadro 3 Numero de muestras colectadas en clones de caña de azúcar con síntomas característicos de roya naranja en los ingenios del sureste de México	17

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales países productores de caña de azúcar.....	1
Figura 2. Distribución mundial de la roya naranja (<i>Puccinia kuehnii</i>).....	6
Figura 3. Síntomas característicos (pústulas) de la roya naranja en el clon comercial (CP 72-2086) susceptible a la enfermedad	8
Figura 4. Uredospora de la roya naranja (A, B) y roya café (C, D).....	9
Figura 5. Ubicación de Ingenios en el sureste de México.....	12
Figura 6. Amplificación del agente causal de la roya naranja (<i>Puccinia kuehnii</i>), usando iniciadores específicos de roya naranja (Pk-F/Pk-R) en 25 muestras procedentes del ingenio Santa Rosalía de la Chontalpa.....	19
Figura 7. Amplificación del agente causal de la roya naranja (<i>Puccinia kuehnii</i>), usando iniciadores específicos (Pk-F/Pk-R) en muestras procedentes del ingenio Huixtla (26-29) y del ingenio Presidente Benito Juárez (30-40).....	19
Figura 8. Amplificación del agente causal de la roya naranja (<i>Puccinia kuehnii</i>), usando iniciadores específicos (Pk-F/Pk-R) en 9 muestras procedentes del ingenio San Rafael de Pucté.....	20
Figura 9. Amplificación del agente causal de la roya naranja (<i>Puccinia kuehnii</i>), usando iniciadores específicos (Pk-F/Pk-R) en 11 muestras procedentes del ingenio San Rafael de Pucté.....	20
Figura 10. Uredosporas de roya naranja <i>Puccinia kuehni</i> (a, b, c) y roya café <i>Puccinia melanocephala</i> (d, e, f).....	23
Figura 11. Árbol filogenético construido con las secuencias obtenidas mediante amplificación con los iniciadores específicos PK-F/PK-R, se usó el método estadístico de Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap.....	32

DIAGNÓSTICO DE LA PRESENCIA DE ROYA NARANJA (*Puccinia kuehnii* (Krüger) Butler) EN CLONES COMERCIALES DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp. Híbridos) EN EL SURESTE DE MÉXICO

RESUMEN

Set Pérez Hernández, M.C

Colegio de Postgraduados, 2014

La roya naranja (*Puccinia kuehnii*) es una enfermedad fungosa que afecta al cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbridos). La enfermedad afecta la capacidad fotosintética de la planta y reduce su crecimiento y desarrollo. El objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de la enfermedad de la roya naranja en clones comerciales de caña de azúcar en el sureste de México e identificar molecularmente el agente causal. En áreas de abastecimiento de los ingenios Santa Rosalía, Presidente Benito Juárez, Azuremex, Tabasco; Huixtla, Chiapas; La Joya, Campeche y San Rafael de Pucté, Quintana Roo, se colectaron hojas con síntomas y lesiones características de la roya naranja. Las hojas se cortaron en pequeñas porciones y se colocaron en bolsas herméticas etiquetadas con información del cultivar. Las bolsas fueron mantenidas en refrigeración a 7°C hasta su análisis molecular. Para la identificación molecular se utilizó la técnica de la PCR usando los iniciadores específicos para roya naranja (Pk-F/Pk-R). La extracción del DNA de roya naranja se realizó mediante el método CTAB al 2%. Para identificar el agente causal se amplificó la región del Espacio Transcripto Interno del rDNA que comprende el ITS1, el 5.8S y el ITS2. Un total de 60 muestras fueron colectadas. Los clones muestreados fueron CP 72-2086, MEX 69-290, MEX 68-P-23, MEX 79-431, ITV 92-1424, COLMEX 00-10, COLPOS CT MEX 05-223 y RD 75-11. *Puccinia kuehni* fue identificada como el agente causal de la roya naranja con un 99% y 100% de identidad en muestras analizadas de cuatro ingenios del sureste de México donde se detectó la presencia de roya naranja. Estos ingenios fueron Santa Rosalía, Presidente Benito Juárez, Huixtla y San Rafael de Pucté. En los ingenios la Joya y Azuremex no se detectó la presencia de la roya naranja.

Palabras claves: *Puccinia kuehnii*, DNA, *Saccharum* spp, Iniciadores, Agente causal.

DIAGNOSIS OF THE PRESENCE OF ORANGE RUST (*Puccinia kuehnii* (Krüger) Butler) IN TRADE SUGARCANE CLONES (*Saccharum* spp. Hybrids) IN THE SOUTHEAST OF MEXICO

ABSTRACT

Set Pérez Hernández, M.C

Colegio de Postgraduados, 2014

Orange rust (*Puccinia kuehnii*) is a fungal disease that affects the cultivation of sugarcane (*Saccharum* spp Hybrids). The disease affects the photosynthetic capacity of the plant by reducing its growth and development. The aim of the research was to determine the presence of the orange rust disease in trade sugar cane clone in the southeast of Mexico and molecularly identify the causal agent. In supply areas of sugar mills Santa Rosalia, Presidente Benito Juárez, and Azuremex Tabasco, Huixtla Chiapas, La Joya Campeche and San Rafael de Pucté Quintana Roo, leaves with characteristic symptoms and lesions of orange rust disease were collected. Leaves were cut and placed in sealed bags. Bags were labeled with information of sugarcane clone and then bag stored at 7°C until its molecular analysis. The PCR technique by using specific primers for orange rust (Pk-F/Pk-R) was used to molecular identification. Damaged tissues orange rust were used in the 2% CTAB method in order to extract DNA. The region of rDNA Internal Transcribed Space comprising the ITS1, 5.8S and ITS2 was amplified in order to identify the causal agent to orange rust. A total of 60 samples were collected. The sampled clones were CP 72-2086, MEX 69-290, MEX 68-P-23, MEX 79-431, ITV 92-1424, COLMEX 00-10, COLPOS CTMEX 05-223 and RD 75-11. *Puccinia Kuehni* was identified as the causal agent of orange rust with 99% and 100% identity in the analyzed samples from four sugar mills in the southeast of Mexico where the presence of orange rust was detected. These sugar mill were Santa Rosalia, Presidente Benito Juarez, San Rafael de Pucté and Huixtla. The presence of orange rust was not detected in La Joya and Azuremex sugar mills.

Keywords: *Puccinia kuehnii*, DNA, *Saccharum* spp, Primers, Causal agent.

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbridos) es un cultivo agroindustrial importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se cultiva en más de 90 países, por su capacidad de almacenar altas concentraciones de azúcar y, más recientemente, para la producción de etanol, un insumo muy demandado como biocombustible (Da Costa *et al.*, 2011). Los principales países productores de caña de azúcar del mundo son: Brasil, India, China, Tailandia, México, Pakistán, Indonesia, Filipinas, Australia y Argentina (Govindaraj *et al.*, 2012; SIAP, 2012) (Fig. 1).



Figura 1. Principales países productores de caña de azúcar (SIAP, 2012).

El cultivo de caña de azúcar provee cerca del 75% de la producción mundial de azúcar (Nieves *et al.*, 2007). El azúcar es uno de los productos más consumidos en el mundo por ser un importante componente en la dieta humana. En muchos países de América Latina y Asia el cultivo de la caña de azúcar genera empleos e ingresos económicos para la población (Martínez *et al.*, 2013).

En México, la producción de caña de azúcar y sus derivados es una de las agroindustrias más importante (Alejandre *et al.*, 2010). Está distribuido en 15 estados y 227 municipios del país, beneficiando a 2.5 millones de mexicanos (Martínez *et al.*, 2013). El cultivo de la caña de azúcar es uno de los cultivos con mayor eficiencia en biomasa, se adapta tanto a condiciones tropicales como subtropicales, con potencial para la producción de biomasa, azúcar, y otros productos industriales de alto valor. Sin embargo, este cultivo es afectado por agentes bióticos como hongos, bacterias, virus, fitoplasmas y nematodos, los cuales hacen que disminuya su rendimiento y calidad (Juárez *et al.*, 2000).

Los problemas fitopatológicos de mayor importancia en el cultivo de la caña de azúcar son: la roya café (*Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd.), el Carbón (*Ustilago scitaminea* Syd. o *Sporisorium scitamineum* (Syd.) M. Piepenbring, M. Stoll & Oberw.), la roya naranja (*Puccinia kuehnii* Butler), el raquitismo de las socas (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli* Davis), la escaldadura de la hoja [*Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson), el virus del síndrome de la hoja amarilla (*Sugarcane Yellow Leaf Virus*) (SCYLV), y el virus del mosaico de la caña de azúcar (VMCA) (Flores, 1997).

2. JUSTIFICACIÓN

De todas las enfermedades que afectan a la caña de azúcar (*Saccharum* spp), la roya naranja (*Puccinia kuehnii*) es una de las más importantes en la actualidad, ya que se encuentra distribuida en casi todas las regiones productoras de caña de azúcar del mundo. La roya naranja es una enfermedad que afecta principalmente al follaje de la caña de azúcar. Las uredosporas de *P. kuehnii*, se diseminan por el viento a grandes distancias. En este cultivo también se reporta la roya café (*P. melanocephala*), esta fue la primera roya reportada en caña de azúcar en Indonesia en 1884. De las dos enfermedades fungosas citadas *P. kuehnii* es la más agresiva. En Australia, la industria azucarera se vio afectada por esta enfermedad, la cual dañó severamente al clon Q124, en el año 2001 causando pérdidas de millones de dólares.

En el continente americano, *P. kuehnii* se reportó por primera vez en Florida en el año 2007, afectando el clon CP 72-2086. Este clon está ampliamente distribuido en México y como consecuencia, el cultivo de la caña de azúcar, se ve amenazado por *P. kuehnii*, además se reportó afectando a otros clones como MEX 57-1285, MEX 61-230 y Co-301 (Flores *et al.*, 2009). La industria azucarera mexicana se encuentra en peligro y puede sufrir pérdidas millonarias ante esta nueva enfermedad exótica. Por este motivo se realizó el presente trabajo de investigación, para diagnosticar a través de análisis molecular la presencia de *P. kuehnii* en los clones comerciales de caña de azúcar cultivados en el sureste del país.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de la enfermedad de la roya naranja de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.Híbridos) en el sureste de México e identificar molecularmente el agente causal.

3.1.1 Objetivos particulares

Detectar la presencia de la enfermedad de la roya naranja en los clones comerciales de caña de azúcar en las zonas productoras del sureste de México.

Identificar filogenéticamente el agente causal de la enfermedad roya naranja *Puccinia kuehnii*.

3.2 Hipótesis

Existen clones comerciales de caña de azúcar susceptibles a la roya naranja causada por *P. kuehnii* en el sureste de México.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Distribución de la roya naranja

La enfermedad de la roya naranja en caña de azúcar, causada por *Puccinia kuehnii* (Krüger) Butler (Virtudazo *et al.*, 2001), es actualmente una de las enfermedades más importantes debido al potencial de daño que causa en las variedades susceptibles (Minchio *et al.*, 2011). Fue reportado por Krüger (1890) en Java, y considerada una enfermedad de menor importancia, menos virulenta y causante de menos daños que *Puccinia melanocephala* Sydow. No obstante, en Australia una epidemia en el año 2001 causó pérdidas estimadas en 210 millones de dólares a la industria azucarera Australiana (Glynn *et al.*, 2010).

Hasta el año 2007, la roya naranja se observó en países como Papua Nueva Guinea, Indonesia, Filipinas y Australia. Sin embargo, en este último en la región de Queensland el clon Q 124, era el más cultivado con el 45% del área ocupada, se infectó y causó la epidemia más importante en la historia de la industria azucarera Australiana (Braithwaite *et al.*, 2009). En este mismo año se confirmó la presencia de roya naranja por primera vez en América, específicamente en Florida, Estados Unidos, en los clones CP 80-1743 y CP 72-2086 (Sood *et al.*, 2009; Comstock *et al.*, 2010).

Puccinia kuehnii se encuentra ampliamente distribuida en el sur de la Florida, donde ha presentado síntomas moderadamente severos en variedades que ocupan aproximadamente el 25% del área comercial, y en numerosos clones del programa de desarrollo de variedades. En el 2007 se detectó y confirmó la presencia de esta enfermedad en Guatemala (Ovalle *et al.*, 2008), Costa Rica y Nicaragua (Chavarría *et al.*, 2009); en el 2008 en México, El Salvador y Panamá (Flores *et al.*, 2009) Puerto Rico, República Dominicana y Cuba (Díaz *et al.*, 2010); en 2009 se reportó en Brasil (Barbasso *et al.*, 2010) y en 2010 en Colombia (Ángel *et al.*, 2010; Cadavid *et al.*, 2012) En ese mismo año se reportó la presencia en Camerún e isla Mauricio (Saumatally *et al.*, 2011) (Fig. 2).

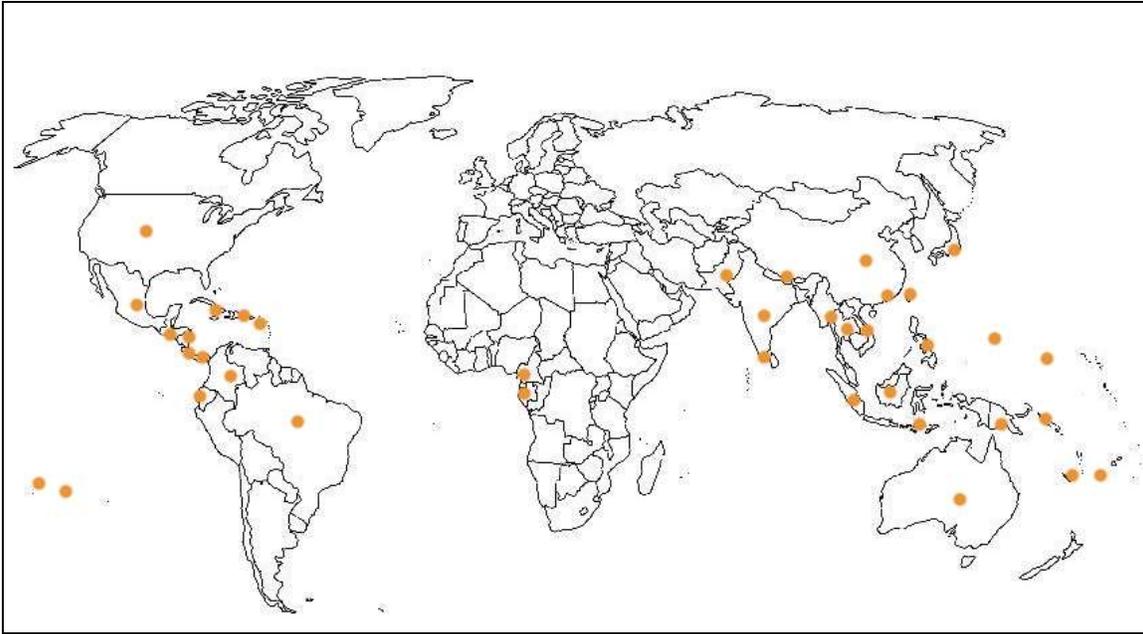


Figura 2. Distribución mundial de la roya naranja (*Puccinia kuehnii*).

En México las primeras incidencias de la roya naranja se registraron en Julio del 2008 en los municipios de Villa Comaltitlán, Tuzatán, Huehuetán, Mazatán, Huixtla y Efraín A. Gutiérrez, en el estado de Chiapas; posteriormente en Othón P. Blanco en Quintana Roo; Úrsulo Galván, Tlaxicoyan, Paso de Ovejas, Pueblo Viejo, Pánuco y El Higo en Veracruz; y San Vicente Tancuayalab en San Luis Potosí. En esos municipios se encontró afectando los clones CP 72-2086, MEX 57-1285, MEX 61-230 y Co-310 (NAPPO, 2010; SIPOVE, 2012).

4.2 Importancia económica de las royas

Las enfermedades causadas por royas son consideradas las más destructivas para las plantas. A nivel mundial causan graves daños económicos a cultivos agrícolas, forestales y a plantas ornamentales (Aime, 2006). Los agentes causales son hongos de la clase Basidiomicetos, del orden Pucciniales y familia *Pucciniaceae* (Cadavid *et al.*, 2010). Este Orden está compuesto por cerca de 7,000 especies, 160 géneros y 14 familias (Ono *et al.*, 2006; Sadravi *et al.*, 2007). Las especies del género *Puccinia* son las que causan las enfermedades más graves en los cultivos (Saba *et al.*, 2013; Park *et*

al., 2012).

Las royas son parásitos obligados (holobiótrofos) y constituyen uno de los grupos de hongos más numeroso, diverso y cosmopolita (Zuluaga *et al.*, 2010). En la caña de azúcar la presencia de enfermedades ocurre no sólo por motivos de susceptibilidad del material genético, sino también por la existencia de un entorno favorable, representado la mayoría de las veces por un clima apropiado y una condición de manejo deficiente de la plantación, que operan conjuntamente como promotores del patógeno (Chávez *et al.*, 1999).

4.3 Descripción taxonómica de la roya naranja

Según la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), la clasificación taxonómica es:

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Pucciniomycotyna

Subclase: Pucciniomicete

Orden: Pucciniales

Familia: Pucciniaceae

Género: *Puccinia*

Especie: *Puccinia kuehnii*

4.4 Síntomas de la roya naranja

Los síntomas iniciales de la roya naranja de la caña de azúcar son lesiones minúsculas, elongadas y amarillas, que forman una aureola pálida y verde amarillenta a medida que aumenta de tamaño; en esta etapa puede confundirse con otras enfermedades por su sintomatología. Cuando las lesiones crecen cambian de color naranja a naranja marrón (Fig. 3). Grupos de pústulas de roya naranja tienden a aparecer principalmente en la superficie inferior (envés) de la hoja (Ángel *et al.*, 2010). La lámina foliar es colonizada poco a poco y se afecta la capacidad fotosintética de la planta, por una menor captación de luz solar (Zhao *et al.*, 2011). El genotipo y la edad de la planta son

factores importantes para el desarrollo de ambas royas (*P. kuehnii* y *P. melanocephala*) en el cultivo de la caña de azúcar. Según el genotipo de los hospedantes, los síntomas pueden ser pústulas abundantes y bien esporuladas, presencia de puntos necróticos, hasta una ligera clorosis. Las plantas jóvenes de 2-6 meses de edad son más sensibles a la roya que las plantas maduras, por lo que la severidad de la enfermedad disminuye con la edad (Infante *et al.*, 2009).



Figura 3. Síntomas característicos (pústulas) de la roya naranja en el clon comercial (CP 72-2086) susceptible a la enfermedad.

4.5 Ciclo biológico

El ciclo de vida de las royas es uno de los más complejos de todo el reino Fungi, ya que producen hasta cinco tipos de estadios, con esporas diferentes, separado en tiempo y espacio, lo que hace difícil su conocimiento y su control. Son parásitos, ecológicamente obligados con alto poder epidémico y destructivo (Buriticá, 2001; Zuluaga *et al.*, 2008).

La germinación de las esporas ocurre dentro de un intervalo de 17 a 34°C de temperatura, pero la óptima es de 18°C y un 97% de humedad relativa. El proceso infectivo requiere de humedad, que puede provenir de la lluvia o el rocío. La dispersión de las esporas a las hojas superiores y campos adyacentes es favorecido por un ambiente seco y por el viento (Infante *et al.*, 2009).

Las uredosporas germinan sobre la superficie de la hoja, y forman apresorios, el óptimo de temperatura es de entre 15 y 30°C. Tres horas después de ser incubadas a 26°C germinan con la aparición de varios tubos germinativos en una misma uredospora, pero generalmente solo se produce un tubo germinativo (Hsieh

et al., 1977) citado por Infante *et al.* (2009).

4.6 Descripción morfológica de la roya naranja

Los cinco estadios que producen las royas son: espermacio, aecios, uredias, telias y basidias, y sus respectivas estructuras que las originan espermogonios, aecidios, uredinios, telios y basidios (Infante *et al.*, 2009).

En el cultivo de la caña de azúcar, solo se han observado las fases uredosporas y teliosporas. Las uredosporas de *Puccinia kuehnii* (Fig. 4) difieren en tamaño, forma y color de las de *P. melanocephala*. Miden 30-43 x 17-26 μm , son ovales, de color amarillo pálido, con engrosamiento apical y pobre equinulación (Virtudazo *et al.*, 2001).

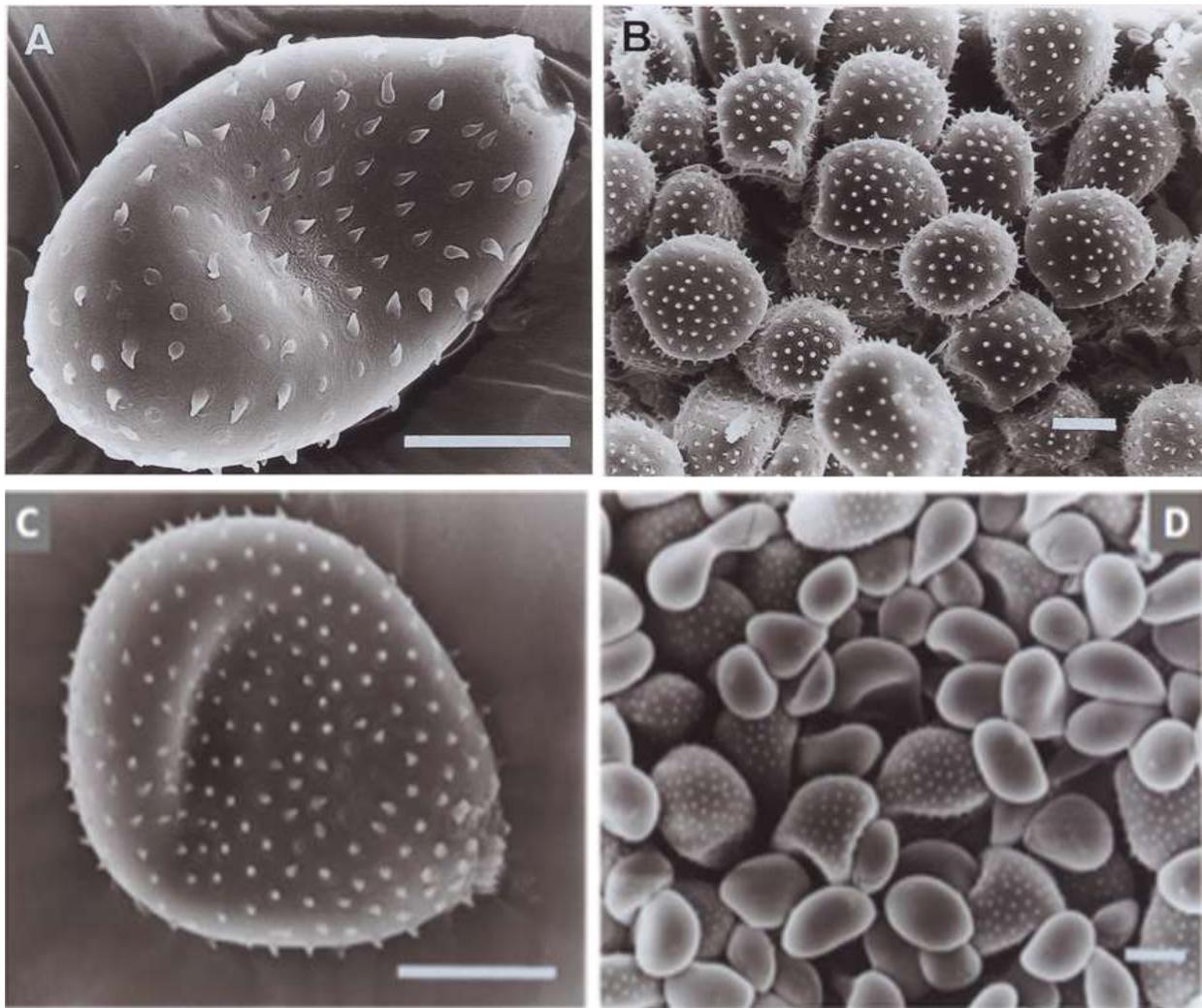


Figura 4. Uredospora de la roya naranja (A, B) y roya café (C, D) (Virtudazo *et al.*,

2001).

4.7 Marcadores moleculares utilizados en especies vegetales

El desarrollo de marcadores moleculares para la detección y exploración de polimorfismo del DNA es uno de los avances más significativos en el campo de la genética molecular (Semag *et al.*, 2006).

El uso de marcadores moleculares aporta información sobre la historia evolutiva, la ecología y el comportamiento de las especies. Son herramientas eficientes para la identificación de especies y poblaciones divergentes (Godoy, 2009).

Los marcadores genéticos representan diferencias entre individuos o especies, actúan como señales o marcas ya que se encuentran cerca de los genes de interés, la mayoría no afecta el fenotipo de la característica de interés, porque se encuentran ligados a los genes que controlan la característica. Los marcadores genéticos se utilizan en investigación vegetal básica, en mejoramiento, caracterización y conservación; etiquetado de genes; introgresión asistida de alelos favorables y protección de variedades comerciales. Existen tres tipos principales de marcadores genéticos: morfológicos, bioquímicos (isoenzimas) y de DNA (moleculares) (Gill *et al.*, 2008).

4.8 Los marcadores moleculares de DNA

Los marcadores moleculares de DNA se basan en el análisis de diferencias en pequeñas secuencias de DNA entre individuos (Azofeifa, 2006). Son fenotípicamente neutros y presentan una mayor segregación o polimorfismo, pueden ser evaluados desde que la planta está en sus primeros estados de desarrollo, usando toda la planta o parte de ella (Phillips *et al.*, 1995). Un marcador debe ser polimórfico, debe presentarse en diferentes formas para que el cromosoma que lleva los genes mutantes pueda ser distinguido del cromosoma con el gen normal por un marcador que también lo lleva (Kumar *et al.*, 2009). Los marcadores de DNA son herramientas valiosas para los estudios de genética de vegetal. El desarrollo de marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el polimorfismo de longitud de

fragmentos amplificados (AFLP), y los microsátelites, han revolucionado estas tecnologías al presentar un alto nivel de confiabilidad (Arencibia *et al.*, 2006).

4.9 Técnica molecular usada en roya naranja

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* para la síntesis de secuencias específicas de DNA. Utiliza dos iniciadores que hibridan cadenas opuestas a ambos lados del DNA que se está analizando. La técnica implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del DNA, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis a partir del iniciador de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa (Phillips *et al.*, 1995). Esta técnica utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de DNA con longitudes variables aproximadas de 6 Kb (Azofeifa, 2006). En pocas horas se pueden obtener millones de copias de la secuencia de DNA que se está analizando (McCartney *et al.*, 2003).

Esta técnica se ha utilizado con éxito en la identificación de la enfermedad de la roya naranja en caña de azúcar y de otros patógenos que afectan a este cultivo. La PCR es una técnica versátil inventada a mediados de 1980, su aplicación para diversos propósitos ha marcado nuevos rumbos en el campo de la investigación de la biología molecular (Kumar *et al.*, 2009).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en dos fases, campo y laboratorio.

5.1 Fase de campo

En esta fase se colectaron las muestras de tejidos con síntomas de roya naranja en clones comerciales de caña de azúcar susceptibles a la enfermedad. Para ello se hicieron muestreos en las regiones productoras de caña de azúcar del sureste de México (Fig. 5). Los recorridos en los cañaverales se desarrollaron en presencia y en colaboración de los técnicos de campo de cada ingenio involucrado en esta investigación. En el cuadro 1 se muestran los ingenios y clones muestreados de cada área de abastecimiento.



Figura 5. Ubicación de Ingenios en el sureste de México.

5.1.1 Colecta de muestras

Se hizo tomando en cuenta la información proporcionada por cada ingenio de los clones cultivados en sus zonas de abastecimiento (Cuadro 1). Se colectaron hojas que presentaban síntomas característicos a la roya naranja. Se cortaron en pequeñas porciones y posteriormente se colocaron en bolsas herméticas etiquetadas con información básica como fecha de colecta, localidad, clon, edad del clon, nombre del productor y nombre del ingenio. Luego se colocaron en un contenedor con hielo para su preservación hasta el procesamiento en laboratorio.

Cuadro1. Clones muestreados en los diferentes ingenios del sureste de México.

Estado	Tabasco			Chiapas	Campeche	Q. Roo
	Sta. Rosalía	Pdte. Benito Juárez	Azuremex	Huixtla	La joya	San Rafael de Pucté
Clones	CP 72-086, MEX 69-290, MEX 68 P-23, MEX 79-431, ITV 92-424, COLMEX 00-10, COLPOS CT MEX 05-223 y RD 75-11.					

5.2 Fase de laboratorio

En el laboratorio se analizaron las muestras de hojas de caña de azúcar con síntomas (pústulas) de la enfermedad roya naranja colectadas en el sureste de México. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología y Fitopatología de Semillas del Colegio de Postgraduado, Campus Montecillo.

5.2.1 Extracción del DNA

La extracción de DNA de tejido foliar con lesiones típicas (pústulas) de roya naranja se realizó mediante el método de CTAB al 2% (Doyle and Doyle, 1990). El CTAB previamente calentado a 65°C, se agregó 1 mL a tubos Eppendorf de 2 mL previamente etiquetados. Posteriormente, se agregó 100 mg de tejido foliar con pústulas de roya a un mortero y polivinilpirrolidona (PVP). Inmediatamente, se añadió nitrógeno líquido y se maceró la muestra. La muestra macerada se incorporó en un

tubo de 2 mL con CTAB y se mezcló. Los tubos se incubaron a 65°C durante 90 min, mezclando con vortex a intervalos de 10 min. Luego se le añadió 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Luego los tubos se sometieron a agitación por inversión durante 10 min, a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3600 rpm durante 10 min. Posteriormente se separó la fase acuosa (parte superior), en la cual está contenido el DNA, y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Seguidamente se añadió 500 µL de cloroformo alcohol isoamílico, y se agitó durante 10 min por inversión a temperatura ambiente, se centrifugo a 3600 rpm durante 10 min. Concluido lo anterior, se separó la fase acuosa, parte superior y se pasó a un tubo nuevo de 1.5 mL. Se le añadió ½ volumen de etanol al 100%, se dejó a -20 °C toda la noche. Después, se centrifugó a 3600 rpm por 30 min, para obtener la pastilla de DNA. Posteriormente se decantó el etanol con residuos de material orgánico como proteínas, dejando la pastilla en la parte inferior. Posteriormente, se lavó la pastilla con isopropanol al 70 % y se centrifugó a 3600 rpm durante 5 min. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente durante 1 hora o hasta que no se detecten residuos de isopropanol. Finalmente, se hidrató la pastilla con 50 µL de Elution Buffer.

5.2.2 Preparación de la PCR

Se amplificó una parte de la región del espacio transcrito interno1 (ITS1), el 5.8S del rDNA, y una parte del espacio transcrito interno 2 (ITS2) (Glynn *et al.*, 2010), que amplifica un fragmento aproximado de 600 pares de bases (bp). La mezcla de reacción de la PCR se preparó con un volumen final de 25 µL conteniendo: buffer de la enzima 1X *Taq* DNA polimerasa, 2.5 mM deoxinucleosido trifosfatos (2.5 mM cada uno), 100 ng DNA, 4 pmol de cada iniciador específico (Pk-F/Pk-R) y 2 unidades de *GoTaq* DNA (Promega, USA). Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 56°C por 30 s, y una extensión a 72°C por 30 s; finalmente un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México), las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de

agarosa al 1.5% preparado con 1x TAE buffer (Tris Acetate-EDTA) y corrido a 110 V cm^{-3} durante 70 min. El gel se tiñó con una solución de Gel red (Biotium, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Infinity 3000 Vilber Lourmat, Germany).

Los productos amplificados se limpiaron con el kit de purificación Wizard SV gel and PCR Clean up System (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, los productos de PCR se cuantificaron en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Wilmington, USA) y se prepararon para la reacción de secuenciación usando BigDye terminator v. 3.1 (Applied Biosystem, USA). Estos productos se secuenciaron en ambas direcciones en un Genetic Analyzer modelo 3130 de Applied Biosystems (Applied BioSystems, USA); para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas.

5.2.3 Análisis molecular

Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso para cada uno de los aislamientos. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000).

Para la reconstrucción filogenética se alinearon las secuencias correspondientes a la región del ITS con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1984) incluido en el Mega 6.05 (Tamura *et al.*, 2013), se usó el método estadístico de máxima parsimonia. Este análisis se efectuó mediante el Close Neighbour Interchange (CNI), con la opción (n=1), los espacios o datos faltantes se consideraron como completas deleciones. Para conocer los valores de confianza para cada uno de los clados en el árbol resultante se consideró un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsestein, 1985). Las secuencias de *P. Kuehnii* FJ708570 de Australia, GQ281584 de México, EU543434 de Guatemala, GU564411 de Jamaica, GU564413 de Filipinas, GU564408 de China, EU176009 de USA y FJ708549 de Nueva Guinea se utilizaron para comparación y

fueron obtenidas de la base de datos de GenBank – NCBI. La accesión GU564436 de *P. melanocephala* se usó como fuera de grupo.

5.2.4. Reacción de la secuenciación

La reacción se realizó con los iniciadores específicos utilizados en la reacción de la PCR (Cuadro 2). Los productos se resolvieron en un Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA) de cuatro capilares.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la amplificación y secuenciación de la roya naranja.

Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Especie	Tamaño (pb)
Pk-F	AAGAGTGCACTTAATTGTGGCTC	<i>P. kuehnii</i>	527
Pk-R	CAGGTAACACCTTCCTTGATGTG	<i>P. kuehnii</i>	527

Los fragmentos secuenciados fueron ensamblados con el software Bioedit para obtener la secuencia consenso, la cual se comparó con las depositadas en el Gen Bank con la opción BlastN.

5.2.5 Análisis morfológico

Las muestras se procesaron en el área de Microscopia Electrónica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo para su análisis morfológico.

Se cortaron pequeños fragmentos de tejido conteniendo pústulas de roya naranja y roya café en caña de azúcar de aproximadamente 5x5 mm para la observación de sus estructuras, las muestras se fijaron en glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfato Sorensen's 0.1M pH 7.2 durante 12 hr. Posteriormente se realizaron tres lavados seriados con el amortiguador citado, 5 min. en cada cambio. Los fragmentos se deshidrataron en una serie de etanoles graduales (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 90%) por 45 min en cada concentración.

Las muestras se secaron en una secadora de punto crítico (Sandri-780A). Posteriormente se colocaron sobre porta muestras usando cinta doble adhesiva de

carbón y se recubrieron con oro durante 4 minutos en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat).

Posteriormente las muestras se observaron y fotografiaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390) operando a 10 Kv.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron un total de 60 muestras con síntomas característicos de la roya naranja en las áreas de abastecimientos de los ingenios del sureste de México (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de muestras colectadas de clones de caña de azúcar con síntomas característicos de roya naranja en los ingenios del sureste de México.

Clones	Ingenios					
	Sta. Rosalía	Pdte. Benito Juárez	Azuremex	Huixtla	La joya	San Rafael de Pucté
CP 72-086	16	3	0	4	0	10
MEX 69-290	1	1	0	0	0	6
MEX 68 P-23	4	2	0	0	0	1
MEX 79-431	4	2	0	0	0	0
ITV 92-424	0	0	0	0	0	2
COLMEX 00-10	0	0	0	0	0	1
COLPOS CT						
MEX 05-223	0	3	0	0	0	0
RD 75-11	0	0	0	0	0	0
Total por ingenio	25	11	0	4	0	20

6.1 Identificación molecular del agente causal de la roya naranja mediante la técnica de la PCR

Como resultado de la PCR al realizar la amplificación del ITS del rDNA se obtuvieron bandas de aproximadamente 527 pares de bases (pb), basándose en el marcador de peso molecular 1 kb.

Así mismo, Atkins *et al.* (2004), mencionan que en la actualidad los ITS son uno de los fragmentos que más se amplifican para establecer relaciones filogenéticas entre planta y

hongos ya que tienen una región de alta variabilidad, esto permite diferenciar individuos relacionados genéticamente.

En la figura 6, 7, 8 y 9, se observan los resultados obtenidos del análisis realizado a muestras de tejido de caña de azúcar con síntomas de roya naranja procedentes de los ingenios del sureste de México (Cuadro 3).

Del total de 60 muestras analizadas solo 35 amplificaron con los iniciadores específicos (Pk-F/Pk-R) diseñados para roya naranja. Las muestras restantes debieron haber sido otro tipo de patógeno que afectan a la caña de azúcar. Los iniciadores utilizados solo amplifican para *Puccinia kuehnii* (Glynn *et al.*, 2010), y por consiguiente no identifican a otro patógeno.

De acuerdo con los resultados obtenidos la roya naranja está presente en áreas de abastecimiento de los ingenios Santa Rosalía de la Chontalpa, Presidente Benito Juárez, Huixtla y San Rafael de Pucté. En las áreas de abastecimiento de los ingenios Azuremex y La Joya no se encontraron síntomas de la enfermedad, esto puede deberse a que las condiciones climáticas no han sido favorables para que se desarrolle la enfermedad ya que este patógeno necesita de humedad.

De las muestras del ingenio Santa Rosalía de la Chontalpa, se obtuvieron 10 bandas amplificadas (Fig.6), con los iniciadores utilizados.

De igual manera para las muestras de los ingenios Huixtla y Presidente Benito Juárez, solo amplificaron 6 bandas (Fig.7), con los iniciadores específicos utilizados en el análisis molecular.

Estos resultados a su vez corroboran la presencia de *P. kuehnii* en áreas de abastecimiento del ingenio Huixtla y coinciden con lo reportado por Flores *et al.* (2009) en donde menciona que *P. kuehnii* se encontró afectando a los clones MEX 57-1285, MEX 61-230 y Co-301 en áreas de abastecimiento del ingenio antes mencionado.

De igual manera los resultados obtenidos de la PCR confirman la presencia de *P. kuehnii* en áreas de abastecimiento del ingenio San Rafael de Pucté (Figs. 8 y 9). En este ingenio se encontró a la roya naranja afectando nuevos clones comerciales (MEX 69-290, ITV 92-1424 y COLMEX 00-10) aparte de los ya mencionados por Flores *et al.* (2009). Los resultados antes descritos coinciden con los reportados por NAPPO (2010); DGSV-CNRF

(20011) SINAVEF (2013).

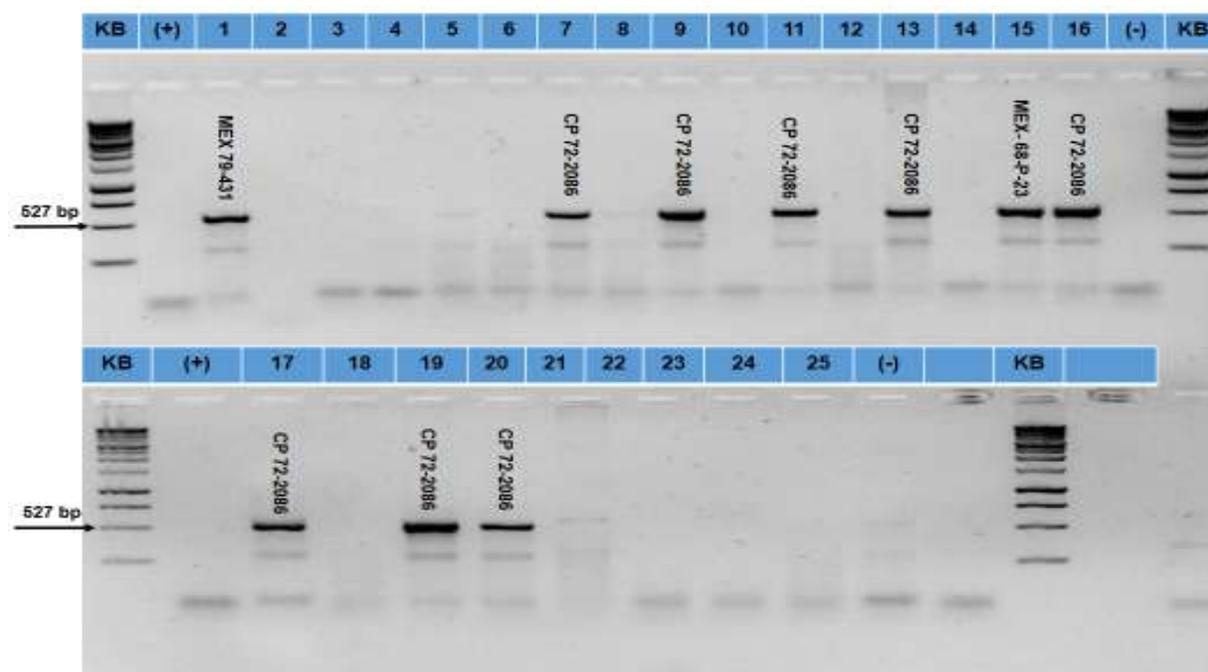


Figura 6. Amplificación del agente causal de la roya naranja (*Puccinia kuehnii*), usando iniciadores específicos de roya naranja (Pk-F/Pk-R) en 25 muestras procedente del ingenio Santa Rosalía de la Chontalpa.

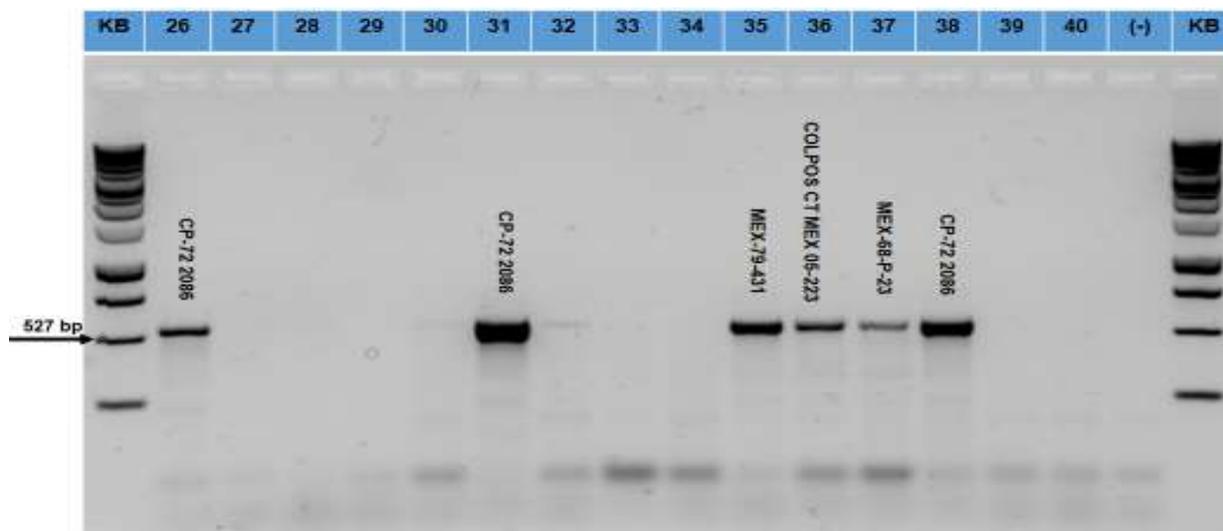


Figura 7. Amplificación del agente causal de la roya naranja (*Puccinia kuehnii*), usando iniciadores específicos (Pk-F/Pk-R) en muestras procedentes del ingenio Huixtla (26-29) y del ingenio Presidente Benito Juárez (30-40).

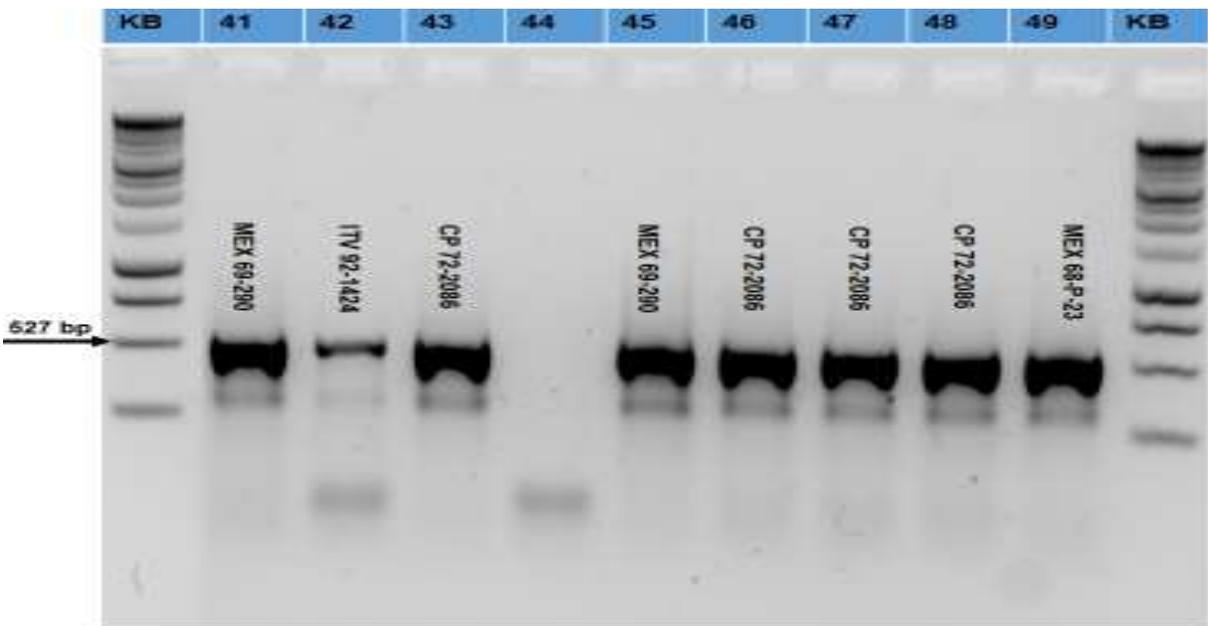


Figura 8. Amplificación del agente causal de la roya naranja (*Puccinia kuehnii*), usando iniciadores específicos (Pk-F/Pk-R) en 9 muestras procedentes del ingenio San Rafael de Pucté

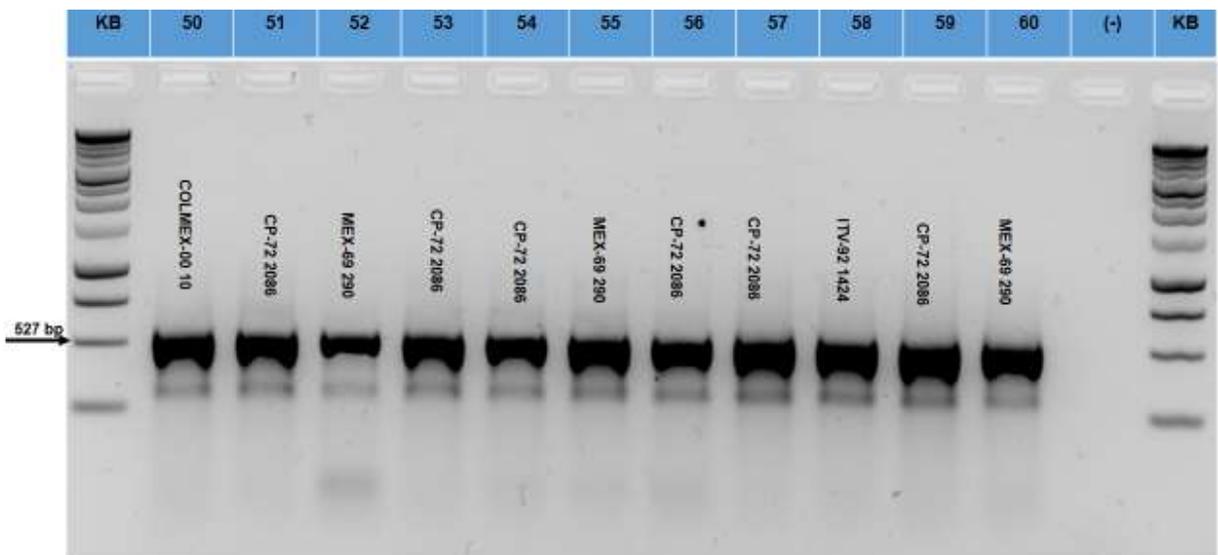


Figura 9. Amplificación del agente causal de la roya naranja (*Puccinia kuehnii*), usando iniciadores específicos (Pk-F/Pk-R) en muestras procedentes del ingenio San Rafael de Pucté.

Los iniciadores ITS1-F e ITS-4, se han utilizado para amplificar ITS1, 5.8S e ITS2 del rDNA de Basidiomycetes de tejido de plantas que contienen hongos (Borneman *et al.*, 2000). En los hongos y en muchos eucariotes, el rDNA está localizado tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial. En el caso del rDNA nuclear, este se encuentra organizado en unidades repetidas en tándem de aproximadamente 8-12 kb. Las unidades están conformadas por tres genes ribosomales: la subunidad 18S (SSU), la subunidad grande 28S (SLU) y 5.8S y por dos regiones intergénicas: ITS1 e ITS2 (Internal Transcribed Spacer) (Álvarez, 2012).

Las regiones de ITS del rDNA de hongos son secuencias altamente variables de gran importancia para distinguir especies de hongos a través del análisis de PCR (Martin *et al.*, 2005).

La técnica de la PCR demuestra ser muy eficiente en la identificación de especies de organismos fitopatógenos al amplificar los ITS del rDNA en combinación con el uso de iniciadores diseñados para organismos específicos.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, amplificando el ITS1, 5.8S e ITS2 del rDNA, de muestras de caña de azúcar con síntomas característicos de roya naranja, fueron muy similares con los obtenidos por Chavarría *et al.* (2009) y Flores *et al.* (2009) que de igual forma amplificaron las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del rDNA en muestras con síntomas de la roya naranja, detectando a *P. kuehnia* como el agente causal. Sin embargo comparados con los resultados obtenidos por Ovalle *et al.* (2008) y Comstock *et al.* (2008) son similares pero con la diferencia de que estos también amplificaron la subunidad larga 28S del rDNA, de igual forma detectaron a *P. kuehnia* como el agente causal de la roya naranja.

En nuestra investigación se utilizaron iniciadores específicos y se amplificó el ITS1, 5.8S e ITS2 del rDNA obteniendo fragmentos de aproximadamente 527 pb. Estos fragmentos fueron más pequeños que los obtenidos por Virtudazo *et al.* (2001a) que amplificaron el ITS, 5.8S y la región D1/D2 del LSU del rDNA de muestras de *P. kuehnia* utilizando los iniciadores universales (ITS-1F/ITS-4) (NL1/NL4); como resultado de la amplificación del ITS, 5.8S mediante la técnica de PCR obtuvieron fragmentos de aproximadamente 605 pb y en la amplificación de la región D1/D2 obtuvieron fragmentos de aproximadamente 620

pb. La diferencia entre el tamaño de los fragmentos reportado por Virtudazo *et al.* (2001a) y los encontrados en el presente trabajo puede atribuirse a que los iniciadores específicos utilizados solo amplifican el ITS1, 5.8S e ITS2 del rDNA. No obstante la diferencia en el tamaño no impidió identificar a *P. kuehni* como el agente causal de la roya naranja.

Virtudazo *et al.* (2001b) amplificaron el ITS1 e ITS2 del rDNA de *Puccinia kuehni* utilizando los iniciadores universales ITS1F-ITS-4, ellos obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 704pb. Sin embargo, comparado con los resultados obtenidos en la presente investigación tienen similitud ya que el rDNA que se amplificó fue de *Puccinia kuehni*, no así en los productos de la PCR ya que estos fueron de próximamente de 704pb y lo obtenido en nuestra investigación fueron de 527pb.

6.2 Morfología de la roya naranja (*Puccinia kuehni*) y roya café (*Puccinia melanocephala*)

Las lesiones de roya naranja y roya café en hoja de caña de azúcar se examinaron por microscopía electrónica de barrido (MEB).

Los resultados muestran diferencias claras entre ambas especies (Fig.10), así como lo mencionó Virtudazo *et al.* (2001). La roya naranja no presenta parafisas, tiene espinas dorsales más largas y dispersas, la uredospora presenta equinulación moderada y son de color brillante anaranjado en clones CP 72-2086. Por otra parte la roya café presentó uredosporas equinuladas más densa, presenta parafisas, espinas dorsales más cortas y abundantes y son color café o marrón. Los resultados antes mencionados coinciden con los descrito por Virtudazo *et al.* (2001); Braithwaite *et al.* (2009); Dixon *et al.* (2010); Cadavid *et al.* (2010); Ángel *et al.* (2010).

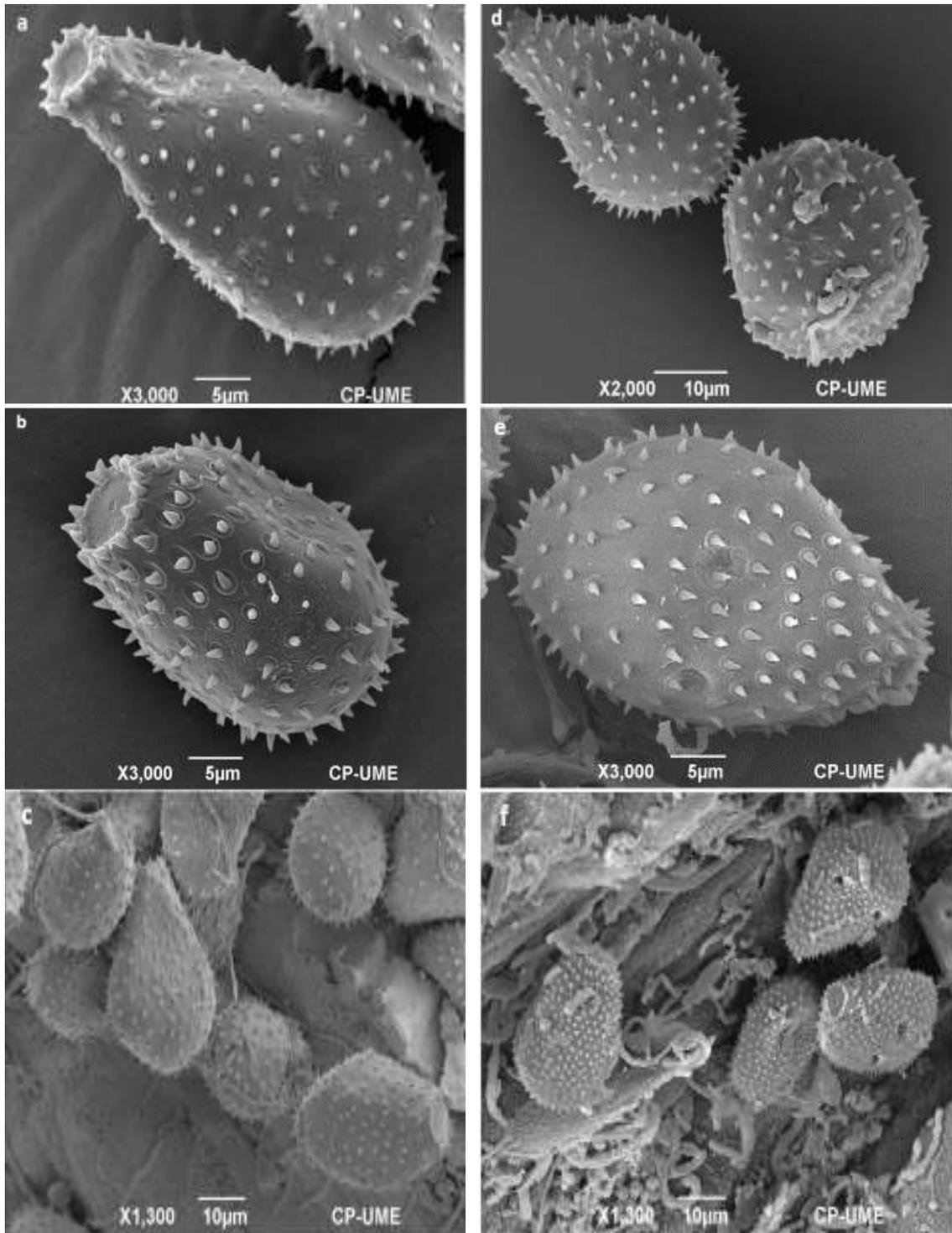


Figura 10. Uredosporas de roya naranja *Puccinia kuehnii* (a, b, c) y roya café *Puccinia melanocephala* (d, e, f).

6.3 Comparación de secuencias consenso

6.3.1 Ingenio Santa Rosalía de la Chontalpa

Secuencias de nucleótidos del ITS1, 5.8S e ITS2 del rDNA de *P. kuehni*, obtenidas de hojas con lesiones de roya naranja colectadas en clones susceptibles de caña de azúcar en diferentes localidades del área de influencia del Ingenio Santa Rosalía de la Chontalpa.

MEX 79-431 (Poblado C-29 Cárdenas, Tab.)

```
TCATTATTAACAAGGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATTT  
TAACCACATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTTAATAAATATATAACTTTT  
ACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGT  
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTT  
TGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTATGA  
ATTTTTAACATTTTTAAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTTAATTGCTCACTTTAA  
ATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAAT  
AATTAATAAAAAAAAAAAAA
```

CP 72-2086 (Sargento López, Comalcalco, Tab.)

```
ATAAATATATATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATTTCGATGAAGAAC  
ACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTT  
GAACGCACCTTGCACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGA  
AACCTTACTCATTTTATGAATTTTTAACATTTTTAAAATGGATGTTGAGTGTTGCAA  
TTTTTTAATTGCTCACTTTAAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTAACATTATGTTT  
GGATTGACTTGATGTGTAATAATTAATAAAAAAAAAAAAAATCACATCAAGGAAGG
```

CP 72-2086 (Monterrey, Cunduacán, Tab.)

```
GAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATT  
GAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGT  
GTCATGAAAACCTTACTCATTTTATGAATTTTTAACATTTTTAAAATgGATGTTGAGT  
GTTGCAATTTTTTAATTGCTCACTTTAAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACA  
TTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAATAATTAATAAAAAAAAAAAAAATCACATCAAGGAA  
GG
```

CP 72-2086 (Huimanguillo, Tab.)

```
CCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATT  
TTAACCACATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTTAATAAATATATAACTTTT  
TAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAG  
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTT
```

TTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTTATG
AATTTTTAACATTTTTTAAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTTAATTGCTCACTTTA
AATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGATTGACTTGATGTGTAA
TAATTAATAAAAAAAAAAATCAC

CP 72- 2086 (Casa blanca, Cunduacán, Tab.)

CCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATT
TTAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTTAATAAATATATATAACTTT
TAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTT
TTGGTATTCCAAGAAGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTTATG
AATTTTTAACATTTTTTAAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTTAATTGCTCAC

CP 72-2086 (Huimanguillo, Tab.)

TATGGGGGAAACCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCC
CCCCTAAATATTTTTAACACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTTAATAAA
TATATATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTG
AAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGC
ACCTTGCACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTT
ACTCATTTTTATGAATTTTTAACATTTTTTAAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTAA
TTGCTCACTTTAATAATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGATTGA
CTTGATGTGTAATAATTAATAAAAA

CP 72-2086 (Santa Rosalía, Cárdenas, Tab.)

CCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATT
TTAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTTAATAAATATATATAACTTT
TAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTT
TTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTTATG
AATTTTTAACATTTTTTAAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTTAATTGCTCACTTTA
AATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGATTGACTTGATGTGTAA
TAATTAATAAAAAAAAAA

CP 72-2086 (Huimanguillo, Tab.)

CCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATT
TTAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTTAATAAATATATATAACTTT
TAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTT
TTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTTATG
AATTTTTAACATTTTTTAAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTTAATTGCTCACTTTA
AATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGATTGACTTGATGTGTAA
TAATTAATAAAAAAAAAA

CP 72-2086 (Zaragoza, Cunduacán, Tab.)

CTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATTT
TAACCACATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAATATATATAACTTTT
ACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTT
TGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTTATGA
ATTTTAAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTAAATTGCTCACTTTAA
ATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAAT
AATTAATAAAAAAAAAA

6.3.2 Ingenio San Rafael de Pucté

Secuencias de nucleótidos del ITS1, 5.8S e ITS2 del rDNA de *Puccinia kuehni*, obtenidas de hojas con lesiones de roya naranja colectadas en clones susceptibles de caña de azúcar en diferentes localidades del área de influencia del Ingenio San Rafael de Pucté.

MEX 69-290 (Cocoyol, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

TCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATTTT
AACCACATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAATATATATAACTTTT
ACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTTT
GTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTTATGAAT
TTTTAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTAAATTGCTCACTTTAAAT
ATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAATAA
TTAAAAAAAAAAAAATC

CP 72-2086 (Cacao, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

GGGGGAAACCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCC
CTAAATATTTTAAACCACATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAATATA
TATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATcGATGAAGAACACAGTGAAAT
GTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCT
TGCACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTC
ATTTTATGAATTTTAAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTAAATTGC
TCACTTTAAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTAACATTATGTTTGGATTGACTTG
ATGTGTAATAATTAATAAAAAAAAAA

MEX 69-290 (Cocoyol, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

TATGGGGGAAACCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAAATTCTTTTATAACATTATCC
CCCCTAAATATTTTAACCATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAA
TATATATAACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTG
AAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGC
ACCTTGACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTT
ACTCATTTTATGAATTTTAAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAA
TTGCTCACTTTAAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGA
CTTGATGTGTAATAATTAATAAAAAAAAAAAT

CP 72-2086 (Cocoyol, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

TATGGGGGAAACCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAAATTCTTTTATAACATTATCC
CCCCTAAATATTTTAACCATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAA
TATATATAACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATTGATGAAGAACACAGTG
AAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGC
ACCTTGACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTT
ACTCATTTTATGAATTTTAAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAA
TTGCTCACTTTAAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGA
CTTGATGTGTAATAATTAATAAAAAAAAAAAT

CP 72-2086 (San Francisco Bote, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

ACCTCATTATTAACAACAAGTATATGGTTATAAATTCTTTTATAACATTATCCCCCTA
AATATTTTAACCAATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAATATATA
TAACCTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGT
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTG
CACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTACTCAT
TTTATGAATTTTAAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAAATTGCTC
ACTTTAAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGAT
GTGTAATAATTAATAAAAAAAAAA

CP 72-2086 (Cocoyol, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

ATTATTAACAAGTATATGTTATAAATTCTTTTATAACATTATCCCCCTAAATATTTTAA
CCACATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAATATATATAACTTTTAA
AATGGATCTCTAGGCTCTCACATTGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGACCTTTTGG
TATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTACTCATTTTATGAATTT
TTAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAAATTGCTCACTTTAAATAT
ATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAATAAT
AAAAAAAAA

MEX 68-P-23 (Sacxa, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

TCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATTTT
AACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTAAATAAATATATATAACTTTTA
ACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATcGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTTTG
GATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTTATGAAT
TTTTAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTTAATTGCTCACTTTAAAT
ATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAATAA
TTAAAAAAAAAAAAA

COLMEX-0010 (Sacxa, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

CTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATTTT
TAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTAAATAAATATATATAACTTTT
ACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGT
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTT
TGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTTATGA
ATTTTAAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTTAATTGCTCACTTTAA
ATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAAT
AATTAATAAAAAAAAAA

CP 72-2086 (Sacxa, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

TATGGGGGAACCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCC
CCCTAAATATTTTAAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTAAATAAAT
ATATATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGA
AATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCA
CCTTGCACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTA
CTCATTTTTATGAATTTTTAACATTTTTAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTTAAAT
TGCTCACTTTAAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGAC
TTGATGTGTAATAATTAATAAAAAAAAAA

MEX 69-290 (Carlos Madrazo, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

CCTCATTATTAACAAGTATATGTTCTAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATT
TTAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTAAATAAATATATATAACTTTT
TAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTT
TTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTCATGAAAACCTTACTCATTTTTATG
AATTTTTAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTTGCAATTTTTTAATTGCTCACTTTA
AATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAA
TAATTAATAAAAAAAAAA

CP 72-2086 (Sabidos, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

AATATGGGGGAAACCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTAT
CCCCCCTAAATATTTTAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTAAATA
AATATATATAACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAG
TGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAAC
GCACCTTGCACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAAC
CTTACTCATTATGAATTTTAAACATTTTAAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTT
TAATTGCTCACTTTAAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGAT
TGACTTGATGTGTAATAATTAATAAAAAAAAAAAAA

CP 72-2086 (Sergio Butrón Casas, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

CTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATTT
TAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTAAATAAATATATAACTTTT
ACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATcGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTTT
GGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTACTCATTTTATGAA
TTTTTAACATTTTAAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAAATTGCTCACTTTAAA
TATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAATA
ATTAATAAAAAAAAAAAAA

MEX 69-290 (El palmar, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

ATGGGGGAAACCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCC
CCCTAAATATTTTAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTAAATAAAT
ATATATAACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATTGATGAAGAACACAGTGA
AATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCA
CCTTGCACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTA
CTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATT
TTAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTAAATAAATATATAACTTTT
TAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTT
TTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTACTCATTTTATG
AATTTTAAACATTTTAAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAAATTGCTCACTTTA
AATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTA
AATAATAAAAAAAAAAAAA

CP 72-2086 (Álvaro Obregón, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

CCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATT
TTAACCACATATATGAAAATGAATGTAATAGAAATTTTAAATAAATATATAACTTTT
TAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTT
TTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTACTCATTTTATG
AATTTTAAACATTTTAAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAAATTGCTCACTTTA
AATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTA
AATAATAAAAAAAAAAAAA

CP 72-2086 (Sabidos, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

TATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATTTTAACCACATATATGAAA
ATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAATATATATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAG
GCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTTTGGTATTCCAAGAGGT
ACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTACTCATTTTATGAATTTTAAACATTTTAA
AATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAAATTGCTCACTTTAAATATATTCAAGTTCCT
CCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAATAATTAATAAAAAAAAAA
A

ITV 92-1424 (Sabidos, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

ACCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATAT
TTTAACCACATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAATATATATAACTT
TTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAA
GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCT
TTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTACTCATTTTAT
GAATTTTAAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAAATTGCTCACTTT
AAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTA
ATAATTAATAAAAAAAAAA

CP 72-2086 (Pucté, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

GGGGGAAACCTCAATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCC
CCTAAATATTTTAACCACATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAATAT
ATATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATcGATGAAGAACACAGTGAAA
TGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACC
TTGCACCTTTTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTACT
CATTTTATGAATTTTAAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAAATTG
CTCACTTTAAATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTT
GATGTGTAATAATTAATAAAAAAAAAA

MEX 69-290 (Álvaro Obregón, Othón P. Blanco, Quintana Roo)

CCTCATTATTAACAAGTATATGTTATAATTCTTTTATAACATTATCCCCCCTAAATATT
TTAACCACATATATGAAAATGAATGTAAATAGAAATTTTAAATAAATATATATAACTTT
TAACAATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTT
TTGGTATTCCAAGAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTTACTCATTTTATG
AATTTTAAACATTTTAAATGGATGTTGAGTGTGCAATTTTAAATTGCTCACTTTA
AATATATTCAAGTTCCTCCTCCCCCTTAACATTATGTTTGGATTGACTTGATGTGTAA
TAATTAATAAAAAAAAAAATC

De acuerdo con los resultado del BLASTN estas secuencias tienen una máxima identidad de 99% y 100% con las accesiones GU564409 a la GU564421 de *P. kuehni*, reportada por Sugarcane Field Station, USDA-ARS, Canal Point, USA. Así como también con las accesiones GQ283004 a la GQ283009 de Agriculture Research Service, Systematic Mycology and Microbiology Lab, United States Department of Agriculture, USA. Este resultado se corroboró con el árbol filogenético (Fig. 5) que mostró que los aislamientos mexicanos tienen un 100 % de máxima identidad con la secuencia de Florida, USA ubicada en el clado I y la secuencia con 99% en el clado II. En el clado I también se agruparon las secuencias procedentes de Australia, Centroamérica y el Caribe quienes mostraron la misma identidad con la accesión GU564416 de Japón, estas secuencias son diferentes a la procedente de USA (Clado II) y Nueva Guinea (Clado III).

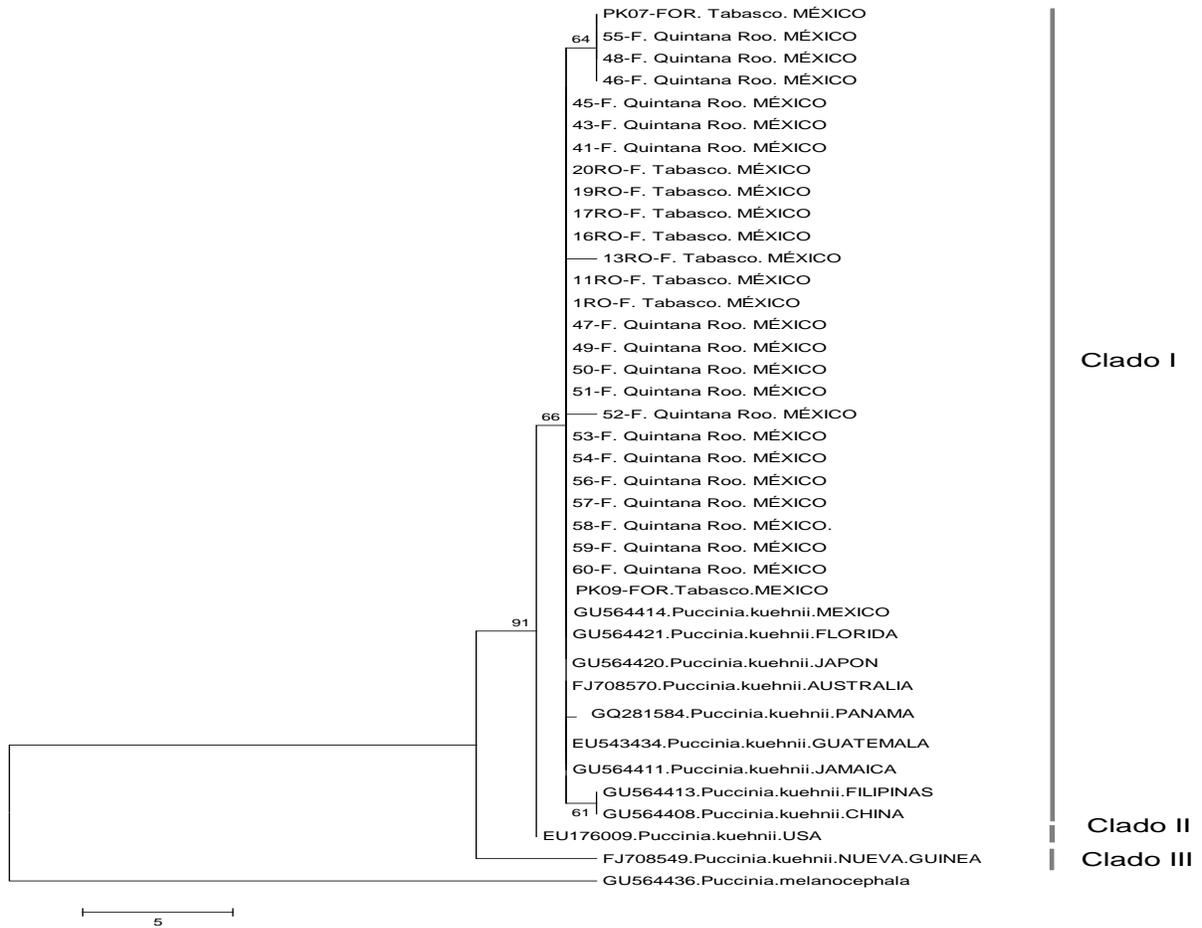


Figura 11. Árbol filogenético construido con las secuencias obtenidas mediante amplificación con los iniciadores específicos PK-F/PK-R, se usó el método estadístico de Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones bootstrap

7. CONCLUSIONES

La roya naranja se encuentra presente en áreas de abastecimiento en 4 de 6 Ingenios del sureste de México; Santa Rosalía de la Chontalpa, Presidente Benito Juárez en Tabasco; Huixtla en Chiapas y San Rafael de Pucte en Quintana Roo.

Se detectó la presencia de la roya naranja en los clones comerciales CP 72-2086, MEX 79-431, MEX 68-P-23, ITV 92-1424, COLMEX 00-10, MEX 69-290 y COLPOS CT MEX 05-223.

Los iniciadores específicos utilizados Pk-F/Pk-R identificaron a *P. kuehnii* con un 99% y 100% de identidad comparadas con las secuencias depositadas en el Gen Bank.

8. LITERATURA CITADA

- Aime C. M. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience*.47:112-122.
- Álvarez L. C. L. 2012. Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Facultad de Ciencias. Colombia. Pp 173.
- Alejandre R. J. A., Galindo T. M. E., Lee E. H. E., Alvarado G. O. G. 2010. Variabilidad genética en 22 variedades híbridas de caña de azúcar (*Saccharum* spp. Híbrido) *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 79: 87-94.
- Arencibia A., Delgado M., Jorge H., Coto O., Jorge I., García H. 2006. Caracterización molecular de variedades cubanas de caña de azúcar (*Saccharum* spp) mediante AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29:19-25.
- Ángel S. J. C., Cadavid O. M., Victoria K. J. I. 2010. Presencia de la roya (*Puccinia kuehnii*) en el valle del río Cauca, Colombia. *Carta Trimestral. Cenicaña*. 32: 24-29.
- Azofeifa D. A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Rev. Agronomía Mesoamericana*.17:221-242.
- Atkins S., Clark I. 2004. Fungal molecular diagnostic: A mini review. *Journal of Applied genetics*. 45:3-15.
- Barbasso D., Jordão, H., Maccheroni W., Boldini J., Sanguine A. 2010. First report of *Puccinia kuehnii* causal agent of orange rust of sugarcane, in Brazil. *Plant Disease*. 94:1170.
- Braithwaite K. S., Croft B. J., Magarey R. C., Scharaschkin T. 2009. Phylogenetic placement of the sugarcane orange rust pathogen *Puccinia kuehnii* in a historical and regional context. *Australasian Plant Pathology*. 38: 380-388.
- Borneman J., Hartin R. J. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*.66: 4356-4360.
- Buriticá C. P. 2001. Descubriendo ancestros de los Uredinales. *Revista Académica Colombiana de Ciencia*. 25: 395-401.

- Cadavid O. M., Ángel S. J. C., Victoria K. J. 2010. Método de diferenciación en campo y laboratorio de los agentes causales de la roya café (*Puccinia melanocephala*) y la roya naranja (*Puccinia kuehnii*) en caña de azúcar. Carta trimestral. Cenicaña. 32: 30-36
- Cadavid M., Ángel J. C., Victoria J. I. 2012. First Report of Orange Rust of Sugarcane Caused by *Puccinia kuehnii* in Colombia. Plant Disease. 96:143.
- Chavarria E., Subiros F., Vega J., Ralda G., Glynn N. C., Comstock J. C., Castlebury L. A. 2009. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Costa Rica and Nicaragua. Plant Disease. 93: 425.
- Chávez M., Durán J. R. 1999. Actualidad de las enfermedades que afectan la caña de azúcar en Costa Rica. Participación de DIECA en el XI Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. San José, Costa Rica. LAICA-DIECA.
- Comstock J. C., Glynn N. C., Davidson W. 2010. Sugarcane rusts in Florida. International Society of Sugar Cane Technologists Proceedings. 27:1-9.
- Comstock J. C., Sood S. G., Glynn N. C., Shine Jr. J. M., McKemy J. M., Castlebury L. A. 2008. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in the United States and Western Hemisphere. Plant Disease. 92:175.
- Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF). 2011. Roya anaranjada de la caña de azúcar (*Puccinia kuehni* Kruguer) SAGARPA-SENASICA México, D.F.
- Dixon L. J., Castlebury L. A., Aime M. C., Glynn N. C., Comstock J. C. 2010. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. Mycol Progress. 9: 459-468.
- Da Costa M. L. M., Barbosa A. L. L., Onofre A. V. C., Tavares de M. L. J. O., de Oliveira M. B. M., de Carvalho R., Benko I. A. M. 2011. Assessment of genetic diversity in contrasting sugarcane varieties using inter-simple sequence repeat (ISSR) Markers. American Journal of Plant Sciences. 2: 425-432.
- Díaz A. O., Medina B. F. J., Díaz M.F., Martín T. E. L., Pérez V. L., Alfonso T. I., Pérez M. J., Barroso M. J. 2010. Presencia de la roya naranja *Puccinia kuehnii* (krüger) Butler en áreas experimentales de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) de la región central de Cuba. Fitosanidad. 14:83-89.

- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from of fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.
- Felsenstein, J .1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Flores C. S. 1997. Las Enfermedades de la Caña de Azúcar en México. Pp. 143-147.
- Flores R. C., Loyo J. R., Ojeda R. A., Rangel O. C. A., Cerón F. A., Márquez W., Guerra-Moreno A. S., Hernández-Ibarra H. M., González R. E., Castlebury L. A., Dixon L. J., Glynn N. C., Comstock J. C., Flynn J., Amador J. 2009. First report of orange rust of sugarcane caused by *Puccinia kuehnii* in Mexico, El Salvador, and Panama. *Plant Disease*. 93: 1347.
- Gill L. H. R., Mayek P. N. 2008. Los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26:164-176.
- Glynn N. C., Dixon L. J., Castlebury L. A., Szabo L. J., Comstock J. C. 2010. PCR assays for the sugarcane rust pathogens *Puccinia kuehnii* and *P. melanocephala* and detection of a SNP associated with geographical distribution in *P. kuehnii*. *Plant Pathology*. 59:703–711.
- Govindaraj P., Ramesh R., Appunu C., Swapna S., Priji P. J. 2012. DNA fingerprinting of subtropical sugarcane (*Saccharum* spp) genotypes using sequence tagged microsatellites sites (STMS) markers. *Plant Archives*. 12: 347-352.
- Godoy J. A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especie. *Revista Ecosistemas*. 18: 23-33.
- Juárez L. J., Valdez B. A. 2000. Resistencia varietal a la enfermedad de la roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala*). Programa nacional de variedades del FOCYTCAÑA. 84 p.
- Kumar P., Gupta V. K., Misra A.K., Modi D. R., Pandey B. K. 2009. Potential of molecular of marker in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*. 2: 141-162.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.

- Infante D., Martínez B., González E., González N. 2009. *Puccinia kuehnii* (KRÜGER) BUTLER y *Puccinia melanocephala* H. SYDOW Y P. SYDOW. en el cultivo de la caña de azúcar. *Revista Protección Vegetal*. 24: 22-28.
- McCartney H. A., Foster S. J., Fraaije B. A., Ward E. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*. 59:129-142.
- Martin K. J., Rygiewicz P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*. 5: 1-11.
- Martínez T. D. R., Landeros S. C., Soto E. A., López R. G., Vela L. B., Moreno S. J. C. 2013. Agroindustrial evaluation of sugarcane varieties in the central zone of Veracruz, México. *Journal of Agricultural Science*. 5: 147-153.
- Minchio C. A., Canteri M. G., Rocha J. A. 2011. Germinação de uredósporos de *Puccinia kuehnii* submetidos a diferentes temperaturas e tempos de incubação. *Summa Phytopathologica*. Botucatu. 37: 211-214.
- NAPPO. 2010. North American Plant Protection Organization. (<http://www.pestalert.org/espanol/bykeyword.cfm>).
- Nieves N., Cid M., Pina D., Lezcano Y., Torne J. M. 2007. Efecto del tiosulfato de plata sobre la embriogénesis somática y la semilla artificial de caña de azúcar. *Revista Agronomía Costarricense*. 31: 87-94.
- Ono Y., Aime M.C. 2006. Recent advances in rust systematics. *Mycoscience*.47:111.
- Ovalle W., Comstock J. C., Glynn N. C., Castlebury L. A. 2008. First report of *Puccinia kuehnii*, causal agent of orange rust of sugarcane, in Guatemala. *Plant Disease*. 92: 973.
- Park P. F., Wellings C. R. 2012. Somatic hybridization in the Uredinales. *Phytopathology*. 50: 219-39.
- Philips M. W., Rodríguez H., Fritz P. J. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Unidad de biotecnología. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. Pp176.
- Saba M., Khalid A. N. 2013. Species Diversity of genus *Puccinia* (Basidiomycota, Uredinales) parasitizing Poaceous hosts in Pakistán. *International Journal of*

- Agriculture & Biology. 15:580-584.
- Sadravi M., Ono Y., Pei M., Rahnama K. 2007. Fourteen rusts from northeast Irán. *Journal of Plant Pathology*. 89:191-202.
- Saumtally A. S., Viremouneix T. Ahondokpè R., B., Girard J.C. R., Castlebury L. A., L. Dixon, Glynn N. C., Comstock J. C. 2011. First report of orange rust of sugarcane Caused by *Puccinia kuehnii* in Ivory Coast and Cameroon. *Plant Disease*. 95: 357.
- SCOPE. 2011. Reporte de la Campaña contra Roya Anaranjada, 10 de enero de 2011. SCOPE-SINAVEF-CNRF-SENASICA.
- Semag K., Bjørnstad A., Ndjioudjop M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*. 5: 2540-2568.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF). 2013. Ficha técnica roya naranja de la caña de azúcar *Puccinia kuehnii* (Krüger). Dirección general de sanidad vegetal. Centro de referencia nacional fitosanitaria. México D.F. 16 p.
- SIAP. 2012. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, con información de las Delegaciones de la Sagarpa, avance de siembras y cosechas, resumen nacional por estado (Perennes) 2012; Riego+Temporal.
- Sood S. G., Comstock J. C., Glynn N. C. 2009. Leaf whorl inoculation method for screening sugarcane rust resistance. *Plant Disease*. 93:1335-1340.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673-4680.
- Virtudazo E. V., Nojima H., Kakishima M. 2001. Taxonomy of *Puccinia* species causing rust diseases on sugarcane. *Mycoscience*. 42:167-175.
- Virtudazo E. V., Nakamura H., Kakishima M. 2001a. Ribosomal DNA-ITS sequence polymorphism in the sugarcane rust, *Puccinia kuehnii*. *Mycoscience*. 42: 447-453.

- Virtudazo E. V., Nakamura H., Kakishima M. 2001b. Phylogenetic analysis of sugarcane rusts of ITS, 5.8s rDNA and D1/D2 regions of based on sequences LSU rDNA. *Journal Genetics Plant Pathology*. 67: 28-36
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7: 203-214.
- Zhao D., Glynn N. C., Glaz B., Comstock J. C., Sood S. 2011. Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. *Plant Disease*. 95: 640-647.
- Zuluaga C., Buriticá P., Marín M. 2008. Generalidades de los Uredinales (Fungi: Basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. *Acta Biológica Colombiana*.14: 41-56.
- Zuluaga C., Buriticá P., Marín M. 2010. Filogenia de hongos roya (Uredinales) en la zona andina colombiana mediante el uso de secuencias del ADN ribosomal 28S. *Revista Biología Tropical*. 59: 517-540.