



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA**

**IDENTIFICACION DE REGIONES GENOMICAS (QTLs) EN LA POBLACIÓN DE
TRIGO HARINERO F₅ KENYA KONGONI**

VIOLETA CALVO SALAZAR

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

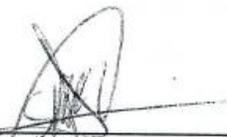
2014

La presente tesis titulada: **Identificación de regiones genómicas (QTLs) en la población de trigo harinero F₅ Kenya Kongoni**, realizada por la alumna: **Violeta Calvo Salazar** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENETICA

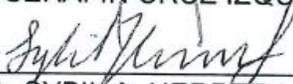
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. SERAFIN CRUZ IZQUIERO

DIRECTORA DE TESIS



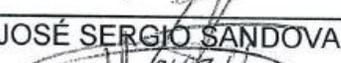
DRA. SYBIL A. HERRERA-FOESSEL

ASESOR



DR. RICARDO LOBATO ORTIZ

ASESOR



DR. JOSÉ SERGIO SANDOVAL ISLAS

ASESOR



DR. MATEO VARGAS HERNANDEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril 2014

RESUMEN

La variedad 'Kenya Kongoni' muestra niveles altos de resistencia de planta adulta (RPA) a roya de la hoja (LR) y roya amarilla (YR), causada por *Puccinia triticina* y *P. striiformis*, respectivamente, en el campo. El objetivo de este estudio fue identificar las regiones genómicas asociadas con la resistencia a LR y YR en una población de 138 líneas endogámicas recombinantes generadas por el cruzamiento de 'Kenya Kongoni' con Avocet-YrA. Los experimentos de campo para RPA de LR se llevaron a cabo en México durante el año 2011 en El Batán, y 2012 y 2013 en la Cd. Obregón y en La Estanzuela, Uruguay, durante 2012 y 2013. La caracterización fenotípica de RPA a YR se evaluó en Toluca, México, durante 2012 y 2013. Los experimentos de campo en México estuvieron bajo epidemias inducidas artificialmente con las razas prevalentes. El mapa de ligamiento se construyó con 438 DArT y 16 marcadores SSR, utilizando el software IciMapping 3.3. Los análisis genéticos mostraron que la resistencia a ambas enfermedades está determinada por 4 a 5 genes de RPA, incluyendo *Lr46/Yr29* y *Sr2/Lr27/Yr30*. El análisis de *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) indicó que los loci pleiotrópicos de RPA (PAPR), *QYL.cim-1BL* y *QYL.cim-7BL*, explican 5-57% de la varianza para LR y 12-35 % de la varianza para YR. Estos *loci*, en combinación con los QTLs *QLr.cim-2BL* y *QLr.cim-1DS* para resistencia a LR y *QYr.cim-2BS* y *QYr.cim-5BL* para resistencia a YR confieren alto nivel de resistencia a ambas royas en México y Uruguay.

ABSTRACT

The Kenyan variety 'Kenya Kongoni' exhibits high levels of adult plant resistance (APR) to leaf rust (LR) and stripe rust (YR), caused by *Puccinia triticina* and *P. striiformis*, respectively, in the field. The objective of this study was to investigate the genomic regions associated with LR and YR resistance in a population of 138 recombinant inbred lines generated by crossing 'Kenya Kongoni' with susceptible Avocet-YrA. Field experiments for APR to LR were conducted in Mexico during 2011 in El Batán, and 2012 and 2013 in Cd. Obregón and in La Estanzuela, Uruguay during 2012 and 2013. Phenotypic characterization for APR to YR was evaluated in Toluca, Mexico during 2012 and 2013. Field experiments in Mexico were established under artificially induced epidemics with prevalent races. The linkage map was constructed with 438 DArT and 16 SSR markers by IciMapping 3.3 software. Genetic analyses showed that the resistance to both diseases was determined by 4 to 5 APR genes, including *Lr46/Yr29* and *Sr2/Lr27/Yr30*. Quantitative trait loci (QTL) analysis indicated that pleiotropic APR (PAPR) loci, *QYL.cim-1BL* and *QYL.cim-7BL*, explain 5-57% of the LR variance and 12-35% of the YR variance. These PAPR loci in combination with QTLs *QLr.cim-2BL* and *QLr.cim-1DS* for LR resistance and QTLs *QYr.cim-2BS* and *QYr.cim-5BL* for YR resistance conferred high level of resistance to both rust diseases in Mexican and Uruguayan environments.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduado, Campus Montecillo por darme la oportunidad de aprender en crecer intelectualmente.

Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) por haberme dado la posibilidad de llevar a cabo esta investigación.

A la Dra. Sybil A. Herrera Foessel por su magnífica dirección de la tesis, por la exhausta revisión del escrito, por sus consejos, por su ayuda y por haber confiado en mí.

Al Dr. Serafín Cruz Izquierdo por haberme apoyado a concluir mis estudios de Maestría.

Al Dr. Ricardo Lobato por su valiosa y desinteresada ayuda.

Al Dr. José Sergio Sandoval Islas por brindarme su apoyo.

Al Dr. Mateo Vargas por apoyarme y enseñarme en el transcurso de mi carrera profesional.

A todo el personal del Laboratorio de Biotecnología por su apoyo y ayuda incondicional, pero sobre todo por enseñarme y orientarme a lo largo de mi estancia en la Institución.

DEDICATORIAS

A mis padres Yolanda Salazar Razo y Víctor Manuel Calvo Torres, quienes siempre se han preocupado y ocupado por mi formación, por ser el más claro ejemplo de entrega y generosidad, por su inmenso amor, dedicación, apoyo y comprensión.

A mi hermano Víctor Calvo Salazar por brindarme lo mejor de él, por su entrega y por compartir generosamente el logro de cada uno de los integrantes de esta familia.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS.....	V
INDICE DE FIGURAS	VI
I. INTRODUCTION	1
1.1.-OBJETIVOS	2
1.2.-HIPOTESIS	2
II.- REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1.-El trigo.....	3
2.2.-Las royas	4
2.3.-Tipos de resistencia	4
2.3.1.-Resistencia especifica a la raza	5
2.3.2.-Resistencia no especifica a la raza	5
2.4.-Genes de resistencia mas usados para resstencia de planta adulta (RPA).....	5
2.4.1.-Gen <i>Lr34/Yr18</i>	5
2.4.2.-Gen <i>Lr46/Yr29</i>	6
2.4.3.-Gen <i>Yr36</i>	6
2.4.4.-Gen <i>Lr67/Yr46</i>	7
2.4.5.-Gen <i>Lr68</i>	7
2.5.-Mapeos geneticos	7
2.5.1.-Mapeo genético o de ligamiento	8
2.5.2.-Mapeo físico.....	8
2.6.-Construccion de mapas de ligamiento	9
2.6.1.- Frecuencia de recombinación	9
2.6.2.- Ligamiento.....	9
2.6.3.- Distancias genéticas y funciones de mapeo	10
2.6.4.- Grupos y mapas de ligamiento.....	10

2.7.- Analisis de QTL.....	11
2.7.1.- Tipo de poblaciones (F2,DH,RIL)	12
2.7.2.- Tamaño de las poblaciones	13
2.7.3.- Marcadores moleculares	13
2.7.4.- Analisis de un solo marcador	14
2.7.5.- Analisis de mapeo por intervalo simple.....	14
2.7.6.- Analisis de mapeo por intervalo compuesto (CIM)	15
2.8.- Software	15
III.- MATERIALES Y METODOS	16
3.1.- Material Vegetal	16
3.2.- Evaluación de campo	16
3.3.- Análisis molecular y mapas de ligamiento	17
3.4.- Análisis genético y estadístico	17
IV.- RESULTADOS	19
4.1.- Evaluación fenotípica	19
4.2.- Mapeo molecular y análisis de QTLs	22
4.3.- Mapas de QTL con resistencia a roya de la hoja y roya amarilla	24
4.4.- Mapas de QTL con resistencia a roya de la hoja	25
4.5.- Mapas de QTL con resistencia a roya de la hoja	25
V. DISCUSIÓN.....	28
VI. CONCLUSIÓN	31
VII.- LITERATURA CITADA	32

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1.-	
Resumen de la última lectura tomada para roya de la hoja y roya amarilla en la población F ₅ Avocet/Kenya Kongoni.	19
Cuadro 2.-	
Estimación del número de genes de resistencia a roya de la hoja y roya amarilla basado en el análisis de segregación Mendeliana para la población F ₅ Avocet/Kenya Kongoni.	20
Cuadro 3.-	
Correlaciones fenotípicas para la severidad final de roya de la hoja (El Batán, 2011; Ciudad Obregón 2012, 2013; Uruguay 2012, 2013) y roya amarilla (Toluca, 2011, 2012) en la población F ₅ Avocet / Kenya Kongoni.	21
Cuadro 4.-	
Posición y efecto de <i>loci</i> con efecto cuantitativo (QTLs) detectados para resistencia de planta adulta (RPA) a roya de la hoja y roya amarilla, utilizando el área bajo la curva (AUDPC) y lectura final de la severidad de la enfermedad (FDS) en todos los entornos utilizando mapeo por intervalo compuesto (ICIM) por IciMapping 3.3 en la población F ₅ Avocet / Kenya Kongoni.	23

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.-	22
<p>Frecuencia de distribución de la última lectura tomada para la severidad de la enfermedad en la población F₅ Avocet / Kenya Kongoni para roya de la hoja en los campos experimentales El Batan 2011 y Ciudad Obregón 2012, 2013 (Fig.1A), Uruguay 2012, 2013 (Fig.1A) y para roya amarilla en Toluca 2011, 2012 (Fig. 1C).</p>	
Figura 2.-	27
<p>Mapas de QTLs para la resistencia de planta adulta (RPA) a roya de la hoja en los cromosomas 1BL (Fig. 2A), 7BL (Fig. 2B), 3BS (Fig. 2C), 1DS (Fig. 2D) y 2BL (Fig. 2E), y para la roya amarilla en los cromosomas 1BL (Fig. 2A), 7BL (Fig. 2B), 2BS (Fig. 2F) y 5BL (Fig. 2G), identificados con IciMapping 3.3 en la población F₅ Avocet / Kenya Kongoni. El umbral de LOD fue detectada en base a 1.000 permutaciones. Posiciones (cM) de los marcadores moleculares a lo largo de los cromosomas se muestran en el eje vertical; se muestran las leyendas de LR 11, LR12 y LR13 para roya de la hoja que representan los datos fenotípicos en El Batán 2011, Uruguay 2012, y Ciudad Obregón durante 2011-2012 y 201-2013 , respectivamente; YR11 y YR12, datos fenotípicos para roya amarilla en Toluca en 2011 y 2012 , y las leyendas LR11A , LR12A, LR13A , YR11A y YR12A, que representan el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC).</p>	

I.- INTRODUCCIÓN GENERAL

La Roya de la hoja (LR) y roya amarilla (YR), causadas por *Puccinia triticina* y *P. striiformis*, respectivamente, son importantes enfermedades foliares de trigo (*Triticum aestivum* L.) en el mundo (Roelfs *et al.*, 1992). El uso de variedades resistentes es la forma más eficaz de controlar estas enfermedades debido a que no genera daños al ambiente y por el bajo costo para los agricultores. Para lograr un alto nivel de resistencia, dos tipos de resistencia son utilizados: la primera es específica para las razas o también llamada resistencia en plántulas (cualitativa), que se rige por los genes dominantes únicos con efectos mayores (Johnson, 1981). El segundo tipo de resistencia es raza no específica o la resistencia de planta adulta (RPA), cuantitativamente heredado, controlado por varios genes menores de efecto aditivo. (Johnson 198, Lagudah, 2010). La resistencia cuantitativa se postula ser más duradera que la resistencia cualitativa debido a que el agente patógeno tarda más en superar la resistencia generada por los genes de resistencia (McIntosh *et al.*, 1995).

Recientes estudios de mapeo molecular han identificado *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) para la resistencia a LR y YR. Entre estos *loci* se encuentran los genes *Lr34/Yr18* (Spielmeyer *et al.*, 2005), *Yr36* (Uauy *et al.*, 2005), *Lr46/Yr29* (Williams *et al.*, 2006), *Lr67/Yr46* (Herrera- Foessel *et al.*, 2011), *Lr68* (Herrera- Foessel *et al.*, 2012), *Yr54* (Basnet *et al.*, 2013). Los genes RPA juegan un papel importante en el mejoramiento para resistencia duradera a LR y YR en trigo.

“Kenya Kongoni” (KK) (CI8154 / 2 * FR / / 3 * ROM/4/WIS245/II50.17 / / CI8154 / 2 * FR/3/TOB66) es una línea de trigo de primavera derivado del CIMMYT. Fue lanzado en 1981 en Kenia por el National Plant Breeding, en el Centro de Investigación (KARI). KK muestra altos niveles de resistencia a LR y YR en entornos mexicanos y uruguayos y una fuerte necrosis en la punta de la hoja (NH). Sin embargo, KK no posee el gen RPA *Lr34* en base a la prueba de marcadores moleculares con *csLV34* (Kolmer *et al.*, 2008) y el marcador nombre desarrollado en base del mismo gen (Lagudah *et al.*, 2009).

1.1- Objetivos

Localizar las regiones genómicas de carácter cuantitativo asociadas a la resistencia de roya de la hoja y roya amarilla en la población F₅ Avocet / Kenya Kongoni.

1.2.- Hipótesis

La resistencia a royas (roya de la hoja, roya amarilla y roya del tallo) en la población F₅ Avocet / Kenya Kongoni es regulada por genes menores desconocidos.

II. – REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- El trigo

Hace aproximadamente 12,000 años antes de la actualidad (a.a) en Mesopotamia se inició el cultivo de trigo (*Triticum aestivum*). Estudios con marcadores moleculares han mostrado que todas las formas cultivadas tienen su origen en las montañas del sureste de Turquía, posteriormente se distribuyó a lo largo de toda la cuenca mediterránea, hasta llegar a Italia y España alrededor del año 7000 a.a. (Mac Key, 2005).

Los trigos comerciales actuales pertenecen a las especies *Triticum aestivum* (hexaploide, $2n=42$, genoma AABBCC) y *Triticum durum* (tetraploide, $2n=28$, genoma AABB), el primero considerado trigo panadero, trigo harinero o trigo blando utilizado básicamente en la producción de harina para pan, galletas y repostería. La segunda especie (*Triticum durum*) es considerado como trigo duro o trigo semolero cuyo principal producto comercial son las pastas y sus derivados (Carrillo, 2006).

En el 2013 la producción mundial de trigo fue de 656.44 millones de toneladas teniendo como principales países productores a la Unión Europea con 142,896.0, China: 122,000.0 y la India: 92,460.0 (FAO, 2013).

2.2.- Las royas

Una de las principales enfermedades que amenaza a la producción de trigo son las royas, dentro de las que se encuentran la roya del tallo o negra (causada por *Puccinia graminis tritici*), roya de la hoja o café (*P. triticina*) y la roya lineal, estriada o amarilla (*P. striiformis*), continúan siendo una amenaza potencial en la mayoría de las regiones trigueras en el mundo. La causa de este comportamiento es principalmente la habilidad del patógeno para mutar y multiplicarse rápidamente, por el efecto del eficiente mecanismo de dispersión en forma aérea de un campo a otro y además su habilidad para desplazarse a grandes distancias. La roya del tallo se desarrolla en climas cálidos,

mientras que la roya amarilla o lineal se desarrolla en climas más fríos y en climas más templados encontramos la roya de la hoja (Huerta-Espino y Singh, 2000).

Se han desarrollado variedades de trigo resistentes a royas utilizando los dos tipos de resistencia existentes: resistencia específica a la raza y resistencia no específica a la raza que se describen adelante. En CIMMYT la mayoría de las variedades son generadas por resistencia no específica a la raza, con la interacción de genes de efectos menores efectuando un desarrollo lento a la enfermedad

2.3.-Tipos de resistencia

En 1963 Vanderplank estableció teóricamente las bases y conceptos de dos tipos de resistencia vegetal, las cuales llamo vertical y horizontal, donde la primera es efectiva a un solo genotipo del patógeno mientras que la horizontal por definición es efectiva contra todos los genotipos del patógeno.

2.3.1.-Resistencia específica a la raza

La resistencia específica también llamada resistencia vertical o resistencia de plántula confiere una protección completa contra el patógeno, se basa en un simple gen mayor o una combinación de genes mayores, se detecta fácilmente con patotipos específicos, es decir, individuos que enferman a algunas variedades del hospedante, también llamadas razas del patógeno y que comúnmente se presenta en estado de plántula. Los genes mayores son vulnerables a la variación patogénica, y su longevidad es corta. (Singh *et al.*, 2001)

2.3.2.-Resistencia no especifica a la raza

La resistencia horizontal también llamada durable, poligénica, de patogenia lenta o de planta adulta (RPA) se caracteriza por un desarrollo lento de la enfermedad a pesar de un tipo de infección susceptible, se basa en interacciones de genes con efectos de acción génica pequeños a intermedios. Un solo gen de resistencia parcial causa pequeña a moderada reducción en el progreso de la enfermedad, pero la combinación de genes de efecto aditivo causa alto nivel de resistencia (3-5 genes resulta un nivel de resistencia alto). Estos genes al combinarse reducen el progreso de la enfermedad a niveles tan bajos que solo se pueden observar cuando hay una presión muy alta del patógeno. Este nivel de resistencia es considerado de tipo durable y no especifica. La expresión de la resistencia se reduce cuando más genes de resistencia parcial están presentes y juntos, es decir, la estabilidad de la resistencia se incrementa con la presencia de más genes (Singh *et al.*, 2003)

2.4.- Genes de resistencia más usados para resistencia en planta adulta (RPA)

La incorporación acumulada de 3 a 4 genes menores que confieren resistencia duradera a royas continúa siendo el instrumento más utilizado para el control de los patógenos causantes de enfermedades en México, el efecto aditivo de la combinación de genes se puede medir a través de un análisis de interacción, la identificación y el estudio de la interacción de genes a sido fundamental para la sustentabilidad de la producción en trigo (Singh *et al.*, 2003).

2.4.1- Gen *Lr34/Yr18*

El gen de planta adulta *Lr34* localizado en el cromosoma 7DS confiere resistencia de desarrollo lento a todas las razas de roya de la hoja que han existido y que aún existen en México (Huerta *et al.*, 2002) por lo que es la base de la resistencia de muchas variedades mexicanas (Singh y Rajaram, 1992b). Singh (¿??) identificó la presencia y

ausencia de este gen en los genotipos “Jupateco 73R” (*Lr34* presente) y “Jupateco 73S” (*Lr34* ausente) en variedades Mexicanas derivadas de cruzas del CIMMYT.

Krattinger demostró que el gen *Lr34* está totalmente ligado al gen *Yr18*, el cual confiere resistencia de enroscamiento lento a roya lineal. La resistencia de enroscamiento lento basado en el gen *Yr18* protege pérdidas en el rendimiento en un rango del 36 al 58% dependiendo del año y de la fecha de siembra (Krattinger *et al.*, 2009)

La variedad de trigo Sudamericana “Frontana” es considerada como una de las mejores fuentes de resistencia durable a roya de la hoja (Roelfs, 1998). Esta variedad fue usada primeramente por el programa cooperativo de México y la Fundación Rockefeller en la década de los 50. El análisis genético de “Frontana” y otros cultivares de trigo producidos por el CIMMYT que poseen excelentes niveles de resistencia parcial a nivel mundial ha indicado que la resistencia de planta adulta está basada en los efectos aditivos de *Lr34* y de dos a tres genes de resistencia de enroscamiento lento adicionales, comúnmente conocido como el complejo *Lr34*.

2.4.2.- Gen *Lr46/Yr29*

Otro de los genes involucrado que confiere enroscamiento lento a roya de la hoja es el gen de “Pavon 76”, *Lr46*, que se localiza en el cromosoma 1BL (Singh *et al.*, 1998). Este gen tiene un ligamiento con el gen *Yr29* para roya amarilla el cual fue identificado en la craza “Avocet S/Pavon 76”. William *et al.* (2003) identificaron el gen *Yr29* que está ligado al gen *Lr46*, ambos confieren resistencia durable a la enfermedad.

2.4.3.- Gen *Yr36*

El gen *Yr36* que confiere resistencia parcial y de amplio espectro a *P. striiformis* fue clonado por mapeo posicional en trigo gracias al empleo de una población segregante de 4.500 individuos lo que permitió identificar marcadores moleculares estrechamente ligados a este locus. El gen *Yr36* provee una resistencia parcial en las plantas adultas

cuando crecen en temperaturas altas y es muy útil porque protege contra todas las razas conocidas de la roya lineal amarilla (Uauy *et al.*, 2005).

2.4.4.- Gen *Lr67/Yr46*

En una población desarrollada a partir de una cruce entre “RL6077” y “Avocet”, el gen *Lr67/Yr46* fue localizado en el cromosoma 4DL teniendo características fenotípicas similares a *Lr34/Yr18*, incluyendo necrosis en la hoja (NH) y resistencia a la roya lineal. Este gen puede ser utilizado en combinación con otros genes de desarrollo lento para alcanzar niveles de durabilidad a roya de la hoja y roya lineal del trigo (Herrera-Foessel *et al.*, 2011).

2.4.5.- Gen *Lr68*

Lr68 es un gen de resistencia de planta adulta (RPA) que confiere resistencia a roya de la hoja causada por *P. triticina*, utilizando una línea recombinante de “Avocet-YrA×Parula” se ubicó el gen en el cromosoma 7B, este gen se asocia con una ligera necrosis de la hoja que podría indicar que *Lr68* y *Lr34* comparten un mecanismo de defensa común (Herrera-Foessel *et al.*, 2012).

2.5.- Mapeo

El mapeo genético se define como un diagrama descriptivo de los genes en cada cromosoma. Existen dos variantes fundamentales de mapas: los genéticos, definidos mediante unidades de frecuencia de recombinación, y los físicos, en los que las distancias entre loci se expresan en unidades de distancia en nucleótidos (Collard *et al.*, 2005).

2.5.1.- Mapeo genético o de ligamiento

Un mapa genético o de ligamiento es una representación de la posición relativa de los genes o marcadores dentro de un cromosoma o grupo de ligamiento (Patterson 1996; Collard *et al.*, 2005).

Los mapas de ligamiento están basados en el principio de que los genes (marcadores o *loci*) segregan vía recombinación de los cromosomas durante la meiosis, permitiendo así su análisis en la progenie, de esta manera los mapas de ligamiento permiten realizar un análisis completo de los genotipos, descomponer características complejas en sus componentes mendelianos, localizar regiones genómicas que controlan caracteres de importancia agronómica, además de cuantificar el efecto de estas regiones (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.5.2.- Mapeo físico

Los mapas físicos son capaces de medir la distancia real entre puntos de los cromosomas. Las técnicas más avanzadas combinan robótica, informática y uso de láser para calcular la distancia entre marcadores genéticos conocidos. En los mapas físicos, la mayoría de los marcadores son estrechamente agrupados para representar la ubicación de los genes. En 1994 Gill propuso una estrategia de mapeo para analizar las regiones ricas de genes de trigo. Esta técnica se conoce como una asignación de Ladder citogenético (CLM, siglas en inglés) donde no sólo identifica de manera eficiente los grupos de genes, sino también mapas (Gill *et al.*, 1996; Faris *et al.*, 2000).

2.6.- Construcción de mapas de ligamiento

2.6.1.-Frecuencia de Recombinación

La construcción de un mapa genético implica la estimación de la distancia genética o distancia entre dos *loci*, esta distancia se define como el valor de recombinación entre dos genes, es decir, la proporción en que se forman nuevas asociaciones entre dos pares de genes con respecto al número total de asociaciones. La distancia entre marcadores es un valor relativo para cada cruzamiento puesto que depende de los marcadores que se consideren, su valor mínimo es 0 y el máximo 0.5, este último valor representa la independencia genética de un *loci* (Kearsey y Pooni, 1998; Nuez, 2000; De Vienne, 2003b).

2.6.2.- Ligamiento

Newton Morton en 1955 ideó el concepto de LOD score ("puntuación LOD") representado por la letra Z que es el \log_{10} del cociente de verosimilitudes. Un cociente de verosimilitudes = 1000 equivale a un LOD score igual a 3 ($Z=3$), valor mínimo de Z que se requiere para poder afirmar que existe ligamiento significativo entre dos *loci* (Morton, 1955).

Una vez calculados los valores de recombinación entre *loci*, hay que definir la significancia de éstos, es decir, la probabilidad de que dos *loci* estén ligados con el valor calculado frente a la probabilidad de que sean independientes con la misma segregación. Un $LOD > 3$ es equivalente a decir que la hipótesis alternativa (ligamiento) es 1000 veces más probable que la hipótesis nula (independencia) (Kearsey y Pooni, 1996; Nuez, 2000; De Vienne, 2003b).

2.6.3.- Distancias genéticas y funciones de mapeo

Para la construcción de un mapa de ligamiento es necesario desarrollar una población y marcadores polimórficos para esta población. De este modo, a partir de la frecuencia de recombinación entre los marcadores se puede inferir su posición relativa y la distancia en centiMorgan (cM) que es la unidad de distancia genética entre dos loci y equivale a una frecuencia de recombinación del 1% de individuos recombinantes. (Semagn *et al.*, 2006)

Se debe de tener en cuenta que existen diferentes factores como los maternos, nutricionales o genotípicos que pueden distorsionar las frecuencias de recombinación y en consecuencia, las distancias obtenidas.

Tres funciones de mapeo son comúnmente usadas:

Kosambi: Cuando se considera un cierto grado de interferencia

Haldane: Cuando no se considera interferencia.

Morgan: Se considera interferencia completa y distancias pequeñas (Semagn *et al.*, 2006)

2.6.4.- Grupos y mapas de ligamiento

Un grupo de ligamiento incluye todos los genes que pueden conectarse, directa o indirectamente, por relaciones de ligamiento. Los genes que están muy próximos entre si muestran ligamiento directo mientras que los están a más de 50 cM se dice que segregan independientemente. Los marcadores ligados son agrupados en grupos de ligamiento (GL), el número de grupos de ligamiento es igual al número de cromosomas. (Collard *et al.*, 2005).

Un mapa de ligamiento es el diagrama descriptivo de los genes en cada cromosoma y su uso más importante es la identificación de loci de carácter cuantitativo (QTL, siglas en inglés) asociados con rasgos de interés, estos mapas se denominan mapas de QTLs, basados en el principio de la detección de la asociación entre marcadores fenotípicos y genotípicos (Collard *et al.*, 2005).

2.7.- Análisis QTL

El mapeo de características cuantitativas a través de la identificación de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL, *Quantitative Trait Loci*) conceptualmente puede ser influenciado por un grupo amplio de genes o pocos genes que generan un gran efecto sobre el rasgo de interés (Gelderman, 1975).

Estudios de QTLs se han reportado en diversos cultivos como maíz, arroz, trigo, jitomate entre otros para diversos rasgos como componentes de rendimiento, enfermedades y resistencia, mejorando su producción a nivel mundial, por tanto, se considera una herramienta importante dentro del mejoramiento genético de plantas (Cerón-Rojas y Sahagún-Castellanos, 2007).

El análisis QTLs está basado en la detección de una asociación entre el fenotipo y genotipo de una población, se debe tener en cuenta que para la realización de un mapa QTL se necesita una población segregante como F_2 o retrocruzas, además de métodos biométricos que muestren si el marcador está relacionado con el rasgo fenotípico y detectar los parámetros de los QTL detectados (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

2.7.1.- Tipo de poblaciones (F_2 , DH, RIL)

La selección de la población de mapeo es crítico para el éxito del mapa de ligamiento genético. Existen varios tipos de poblaciones. Una población F_2 , es desarrollada por la autopolinización de un híbrido F_1 derivado del cruzamiento de dos parentales, mientras que una población BC (*Back-Cross*), es producida por el cruzamiento de la F_1 con uno de sus parentales llamado parental recurrente, si este retrocruzamiento se repite de seis a siete generaciones, se obtiene una BC6 el cual tendrá más de 99% del genoma del padre recurrente (Babu, 2004), si esta BC6 es autopolinizada se obtiene una BC6S1 en las cuales las líneas están en estado de homocigosis, estas líneas se denominan líneas isogénicas o (NILs).

Otro tipo de población son las RILs (*Recombinant Inbred Lines*) las cuales se desarrollan a través de una estrategia SSD (*Single Seed Descent*), en la cual sólo una semilla de cada línea avanza a la siguiente generación desde F_2 -n. La base del desarrollo de una población RILs es, seleccionar dos parentales con características diferentes, obtener una F_1 mediante el cruzamiento de los parentales, luego el híbrido es autopolinizado obteniendo una F_2 , de cada uno de los individuos F_2 se toma una semilla la cual pasa a la siguiente generación, esto se repite de seis a ocho generaciones.

Un tipo de población muy utilizada es la población DH (*Double Haploid*), la cual es producida por el doblamiento de gametos de una población F_1 o F_2 . Las plantas son generadas utilizando técnicas de cultivo de tejidos después de la inducción del doblamiento de cromosomas de granos de polen o embriones haploides los cuales resultan de cruas entre especies (Semagn, 2006).

2.7.2.- Tamaño de las poblaciones

Otro factor importante a considerar, es el tamaño de la población. Estudios de simulaciones utilizando diferente número de individuos, desde 50 a 1000 en poblaciones F_2 , BC, RILs y DHs, han mostrado que el tipo y el tamaño de la población puede ejercer influencia sobre la exactitud del mapa genético (Ferreira, 2006).

Según Mohan (1997), los estudios de mapas genéticos preliminarmente requieren de 50 a 250 individuos para lograr un mapa de alta resolución. Las poblaciones con número muy bajo de individuos proveen varios grupos de ligamientos fragmentados e inexactos en el orden de los *loci*. La mayor exactitud en los mapas ha sido obtenida por poblaciones F_2 , DH y RIL, utilizando marcadores codominantes. Por otro lado, a mayor número de individuos se ha obtenido mayor precisión en los mapas de ligamiento (Ferreira, 2006).

2.7.3.- Marcadores moleculares

Un marcador genético es cualquier carácter heredable que muestra variabilidad o polimorfismo en los individuos de estudio. Para la elección del tipo de marcadores moleculares a utilizar, es necesario tener en cuenta que el marcador cumpla con herencia codominante, interacción nula con el medio o con otros genes, elevado polimorfismo, expresión en cualquier tejido o estado de desarrollo, rapidez, simplicidad en la detección y bajo costo (Phillips, 1995)

Existen diferentes tipos de marcadores genéticos empezando por los primeros que fueron los morfológicos, proteicos y los que están basados en polimorfismo del ADN, actualmente los marcadores moleculares más utilizados son los SSRs (*Simple Sequence Repeats*), también conocidos como microsatélites que son regiones de secuencias pequeñas (de 2 a 10 pares de bases) repetidas las cuales se asume que están distribuidas por todo el genoma, son marcadores muy polimórficos, codominantes y con una alta reproducibilidad (Phillips, 1995).

Los DArT (Diversity Array Technology) es una tecnología reciente con alto grado de automatización capaz de detectar centenas de polimorfismos en un solo análisis (Jacoud, 2001). Para realizar este análisis es necesario disponer previamente de una colección de fragmentos de ADN representativos de la especie, cada uno de los fragmentos generados por restricción son clonados identificando así los clones polimórficos. Los fragmentos de los clones polimórficos se inmovilizan en una matriz y se marca con fluorescencia para ser hibridados. El polimorfismo se detecta en forma de presencia/ausencia y responde a cambios de una sola base, deleciones o inserciones en la secuencia de ADN (Wenzl *et al.*, 2004).

2.7.4.- Análisis de un solo marcador

Este método no requiere un mapa de ligamiento completo y puede desarrollarse con un “software” estadístico básico. Sin embargo, tiene la desventaja que entre más lejano este el QTL del marcador, la probabilidad para identificarlo será menor y por lo tanto se subestima la magnitud del efecto del QTL, entre los parámetros estadísticos usados para el análisis de un solo marcador se incluye la prueba – t, el análisis de varianza (ANOVA) y la regresión lineal (Tanksley, 1993).

2.7.5.-Análisis de mapeo por intervalo simple

Este método considera dos marcadores moleculares adyacentes y ligados a lo largo de los cromosomas, por lo tanto, se considera estadísticamente más confiable comparada con el análisis de un solo marcador (Lander y Bostein, 1989; Liu, 1998).

2.7.6.-Análisis de mapeo por intervalo compuesto (CIM)

La combinación de regresión lineal y mapeo por intervalo permite a este método aumentar la eficiencia de detección y posicionamiento de QTLs importantes aun con efectos menores (Jansen, 1993; 1996; 2003 y Zeng, 1994).

2.7.-Software

En el estudio de las bases genéticas con especial referencia a su aplicación en el mejoramiento, se desarrollan y aplican distintas herramientas de análisis de QTL. Los programas estadísticos más utilizados para el mapeo e identificación de QTLs son GenStart 13th (VSN International, 2010), QTL Cartographer (Basten *et al.*, 1994, 2001), MapManager QTX (Manly *et al.*, 2001), QGene (Nelson, 1997; Jaehanes y Nelson, 2008), PLABQTL (Utz y Melchinger, 1996), ICMapping 3.3 (Wang *et al.*, 2012). Estos programas estadísticos están especialmente diseñados para el estudio genético que nos permite analizar datos llevándonos a resultados confiables.

III.-MATERIALES Y METODOS

3.1.-Material vegetal

El germoplasma utilizado como progenitor susceptible fue “Avocet-YrA” que cruzado con el progenitor resistente “Kenya Kongoni” derivó una población de 138 líneas endogámicas recombinantes (RIL). El avance generacional de plantas F₂ a F₅ se realizó mediante la descendencia de una sola semilla, utilizando muestras voluminosas. Los padres y RILs se multiplicaron y se utilizaron para todos los ensayos en México y Uruguay.

3.2.-Evaluación de campo

Los padres y los RILs de “Avocet / Kenya Kongoni” se evaluaron para LR en tres años (2011, 2012, 2013) en dos estaciones mexicanas (El Batán y Valle de Yaqui, Cd. Obregón) y dos años en La Estanzuela, Uruguay (2012, 2013). YR se evaluó en Toluca, México durante el 2011 y 2012. Un ensayo no replicado en la población se utilizó para el primer año de evaluación en ambas enfermedades, en la segunda y tercera evaluación, se utilizó un diseño aumentado de bloques completos utilizando la repetición de 28 RILs y la duplicación de los padres.

Las parcelas de campo fueron de aproximadamente 60 plantas que incluyeron dos filas paralelas de 0.7. El cultivar altamente susceptible 'Morocco' se plantó en un lado de cada parcela con 0.5m de separación y alrededor de la zona experimental.

En México se crearon epidemias artificiales utilizando una mezcla de las razas de *P. triticina* MCJ/SP y MBJ/SP, y para YR una mezcla de las razas de *P. striiformis* Mex 96.11 y Mex08. Las inoculaciones se realizaron mediante suspensión de urediniosporas en aceite Soltrol usando un atomizador. En Uruguay se utilizó epidemia natural, las filas separadoras era una mezcla de Morocco, Thatcher y Little Club.

La severidad de la enfermedad (DS, siglas en inglés) se anotó 2-3 veces según la escala modificada de Cobb cuando “Avocet-YrA” alcanzó la máxima severidad (Pearson *et al.*, 1984). Estos datos se utilizaron para calcular el área bajo la curva (AUDPC). El AUDPC y lecturas finales de la severidad de la enfermedad (FDS, siglas en inglés) se dividieron en tres clases HPTR (homocigotos parentales tipo resistente) HPTS (homocigotos parentales tipo susceptible) y otros (líneas intermedias entre HPTR y HPTS) en cada año y se utilizaron para hacer el análisis de QTL.

3.3.-Análisis molecular y mapas de ligamiento

La extracción de ADN de los padres y de cada uno de los RILs se hizo a través del método de CTAB (bromuro de alquiltrimetilamonio).

El genotipo de la población se realizó a través de DArTs (Triticarte, Australia) así como la utilización de 16 marcadores SSR, un marcador STS (Sitios con Marca de Secuencia) y un CAPs (Secuencia polimórfica amplificada y cortada) para identificar la asociación de los genes *Lr46* (Lagudah, com. Pers.¹) y *Sr2* (Spielmeyer *et al.*, 2003), respectivamente.

El mapa de ligamiento fue generado por QTL IciMapping 3.3 (Wang *et al.*, 2012) y fue gráficamente visualizado con el software Mapchart (Voorrips 2002).

3.4.- Análisis genético y estadístico

Los análisis estadísticos: distribución fenotípica, coeficiente de correlación, el análisis de varianza (ANOVA), y la regresión marcador - fenotipo se realizaron con el software SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, NC).

¹ Evans S. Lagudah CSIRO Plant Industry GPO Box 1600, Canberra ACT 2601, Australia e-mail: evans.lagudah@csiro.au

Para el cálculo de la heredabilidad (h^2) se utilizó el método de componentes de varianza como: $h^2 = \sigma^2g/\sigma^2p$, donde, $\sigma^2g = (MSG - MSGE) / r$, y $\sigma^2p = \sigma^2g + \sigma^2ge / r$, siendo σ^2g = varianza genética, σ^2p = varianza fenotípica, σ^2ge = varianza atribuida a la interacción entre los experimentos y los genotipos (lo que es equivalente, la varianza error total en este análisis), r = número de repeticiones (el número de experimentos en este análisis), msg = cuadrado de líneas de media y $MSGE$ = cuadrado de líneas y de interacción experimento media. Estos análisis sólo pudieron llevarse a cabo en los años 2012 y 2013 debido a que en estos años el diseño experimental fue un diseño aumentado.

Los datos genotípicos de los marcadores SSR y los DARTs se utilizaron para construir mapas de ligamiento genético con el software IciMapping 3.3. Los marcadores fueron asignados al grupo de ligamiento con un LOD mínimo de 3.0, las distancias del mapa se calcularon sobre la base de la función de mapeo Kosambi y la detección de QTLs se hizo con el análisis de 1000 permutaciones.

La estimación del número de genes segregantes para roya de la hoja y roya amarilla se estimó mediante el análisis de segregación mendeliana tradicional (Singh y Rajaram, 1992) con los análisis de *chi*-cuadrado (X^2) calculada con la función "PRUEBA CHI" en Microsoft Office 12 Excel.

IV.- RESULTADOS

4.1.- Evaluación fenotípica

El progenitor resistente “Kenya Kongoni” mostro valores del 5% para LR y YR en la última lectura tomada, mientras que el progenitor susceptible “Avocet-YrA” mostró valores del 70 - 90% para LR y el 80 - 90% para YR, la media para los 138 RILs varió entre 41-63% y 37-47% para LR y YR respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1: Resumen de la última lectura tomada para roya de la hoja y roya amarilla en la población F₅ Avocet / Kenya Kongoni.

Categoría	Roya de la hoja			Roya de la hoja Uruguay		Roya amarilla	
	2011	2012	2013	2012	2013	2011	2012
Avocet	90	90	70	90	80	90	80
Kenya Kongoni	10	5	5	5	5	5	5
Media de la población	52	41	42	51	63	47	37
Rango menor	10	5	1	0	5	5	5
Rango mayor	100	100	90	99	99	100	90
(σ^2_g)	–	578.5	272.4	–	–	–	331.5
(σ^2_e)	–	34.8	26	–	–	–	31.9
Heredabilidad (h^2)	–	0.94	0.91	–	–	–	0.91

El análisis X² indicó la presencia de cuatro a cinco genes que confieren resistencia a planta adulta (RPA) para LR y YR, el análisis se basa en la suposición de que los genes de resistencia actúan de manera aditiva (Cuadro 2).

Cuadro 2: Estimación del número de genes de resistencia a roya de la hoja y roya amarilla basado en el análisis de segregación Mendeliana para la población F₅ Avocet / Kenya Kongoni

Categoría	No. de RILs (planta adulta)						
	Roya de la hoja (México)			Roya de la hoja (Uruguay)		Roya amarilla (México)	
	2011	2012	2013	2012	2013	2011	2012
HPTS	6	8	6	8	6	2	2
HPTR	2	1	2	1	2	2	2
Otro	139	138	135	138	135	143	142
Error	1	1	5	1	5	1	2
Total	148	148	148	148	148	148	148
No. de genes	4	4	4	4	4	5	5
<i>P- evaluada</i> ^f	0.32	0.09	0.35	0.09	0.35	0.92	0.92

^f P- evaluada es para la prueba de χ^2 . La relación esperada para los grupos de RILs: HPTR, HPTS, y otros OTHER son 0.037:0.037:0.926, 0.016:0.016:0.968 para la segregación de 4 y 5 genes que se heredan de forma independiente en la generación F₅.

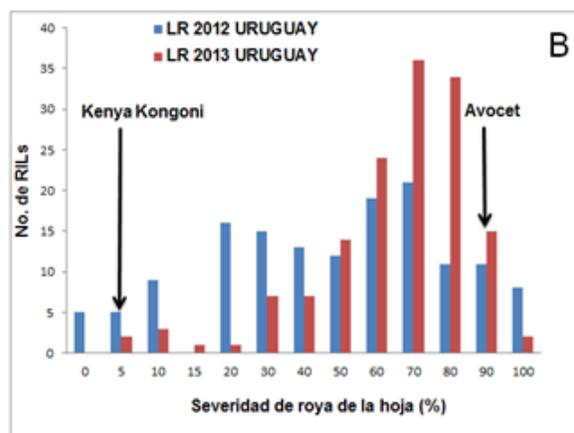
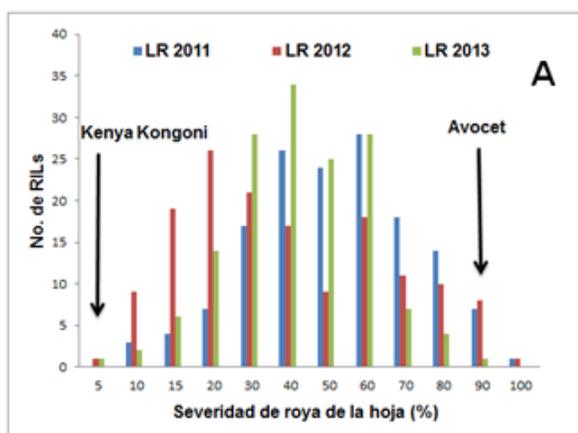
Con las ultimas lecturas obtenidas para la severidad de la enfermedad se hizo la correlación de Pearson obteniendo un rango de 0,37 - 0,8 ($p < 0,0001$) para roya de la hoja y un rango de 0.82 ($P < 0,0001$) para roya amarilla. Se encontraron relaciones significativas entre LR y YR en los diferentes ambientes con un rango de 0,61-0,64, ($P < 0,0001$). (Cuadro 3)

Cuadro 3: Correlaciones fenotípicas para la severidad final de roya de la hoja (El Batán, 2011; Ciudad Obregón 2012, 2013; Uruguay 2012, 2013) y roya amarilla (Toluca, 2011, 2012) en la población F₅ Avocet / Kenya Kongoni.

Ambiente	LR2011	LR2012	LR2013	URU2012	URU2013	YR2011
LR2012	0.75 ^{***a}					
LR2013	0.72 ^{**}	0.8 ^{**}				
URU2012	0.66 ^{**}	0.62 ^{**}	0.65 ^{**}			
URU2013	0.43 ^{**}	0.37 ^{**}	0.55 ^{**}	0.66 ^{**}		
YR2011	0.53 ^{**}	0.61 ^{**}	0.57 ^{**}	0.35 ^{**}	0.22 ^{**}	
YR2012 ^g	0.56 ^{**}	0.64 ^{**}	0.64 ^{**}	0.36 ^{**}	0.27 ^{**}	0.82 ^{**}

^a**P<0.0001

Se graficaron las ultimas lecturas tomadas para la severidad de la enfermedad y se determinó la frecuencia de distribución. El comportamiento fue una segregación transgresiva en el cual la progenie posee la característica de obtener rangos mayores a los de ambos padres (Fig. 1).



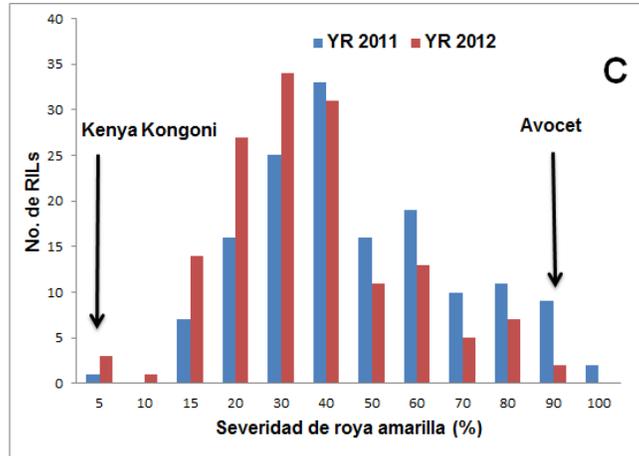


Fig. 1: Frecuencia de distribución de la última lectura tomada para la severidad de la enfermedad en la población F₅ Avocet / Kenya Kongoni para roya de la hoja en los campos experimentales El Batan 2011 y Ciudad Obregón 2012, 2013 (Fig.1A), Uruguay 2012, 2013 (Fig.1A) y para roya amarilla en Toluca 2011, 2012 (Fig. 1C).

4.2.- Mapeo molecular y análisis de QTLs

Veintiún grupos de ligamiento se construyeron con 455 marcadores moleculares polimórficos a través de análisis de QTL, se obtuvo una representación de cada cromosoma. Los mapas de ligamiento se utilizaron para el análisis QTL y se reportan solo los QTLs significativos.

El marcador *csLV46G22* asociado al gen de resistencia (RPA) *Lr46/Yr29* para roya de la hoja y roya amarilla, y el marcador *csSr2* asociado al gen *Sr2* para roya del tallo se incluyeron en el análisis para detectar la presencia de estos genes dando una respuesta positiva en el cromosoma 1BL y 3BL, respectivamente.

El análisis identificó varios QTL de resistencia asociados con LR y YR en la población “Avocet-Yra/ Kenya Kongoni”. La variación fenotípica (PVE) osciló entre 5-57 % y 5-34 % para la hoja y roya amarilla respectivamente (Cuadro 4). En total, seis regiones cromosómicas confieren resistencia a LR en México y cuatro en Uruguay, que se encuentra en los cromosomas 1BL (*Lr46/Yr46*), 1DS, 2BL, 2DL, 3BS y 7BL. Para

YR cinco regiones cromosómicas confieren resistencia a esta enfermedad en los cromosomas 1BL, 2AS, 2BS, 5BL y 7BL.

Cuadro 4: Posición y efecto de loci con efecto cuantitativo (QTLs) detectados para resistencia de planta adulta (RPA) a roya de la hoja y roya amarilla, utilizando el área bajo la curva (AUDPC) y lectura final de la severidad de la enfermedad (FDS) en todos los entornos utilizando mapeo por intervalo compuesto (ICIM) IciMapping 3.3 en la población F₅ Avocet / Kenya Kongoni.

Ambiente	QTL ^h	Posición ⁱ	Marcador izquierdo	Marcador derecho	LOD ^k	PVE (%) ^j	Add ^l
LR11 FDS	<i>QLr.cim-1BL</i>	12	wPt-1770	csLV46G22	14	24	-10
	<i>QLr.cim-1DS</i>	0	wPt-3738	rPt-4471	4	6	-5
	<i>QLr.cim-2BL</i>	0	wPt-6174	wPt-8548	12	21	-9
	<i>QLr.cim-5AC</i>	36	wPt-3187	wPt-7769	3	5	4
LR11 AUDPC ^a	<i>QLr.cim-1BL</i>	12	wPt-1770	csLV46G22	16	28	-34
	<i>QLr.cim-1DS</i>	0	wPt-3738	rPt-4471	5	7	-17
	<i>QLr.cim-2BL</i>	0	wPt-6174	wPt-8548	12	20	-28
	<i>QLr.cim-2DL</i>	12	wPt-668017	wPt-666518	3	5	-14
	<i>QLr.cim-5AC</i>	37	wPt-3187	wPt-3884	4	5	15
LR12 FDS	<i>QLr.cim-1BL</i>	22	csLV46G22	wPt-729773	20	51	-20
	<i>QLr.cim-3BS</i>	5	wPt-5209	csSr2	3	5	-6
	<i>QLr.cim-7BL</i>	12	wPt-9925	wPt-0194	3	6	-7
LR12 AUDPC ^b	<i>QLr.cim-1BL</i>	23	csLV46G22	wPt-729773	25	57	-111
	<i>QLr.cim-3BS</i>	5	wPt-5209	csSr2	6	8	-41
	<i>QLr.cim-7BL</i>	12	wPt-9925	wPt-0194	4	7	-38
LR12URUGUAY ^c	<i>QLr.cim-1BL</i>	24	csLV46G22	wPt-729773	5	12	-11
	<i>QLr.cim-1DS</i>	0	wPt-3738	rPt-4471	11	21	-14
	<i>QLr.cim-3BS</i>	2	wPt-5209	csSr2	5	10	-10
	<i>QLr.cim-3BS</i>	65	wPt-664393	tPt-1366	3	5	7
	<i>QLr.cim-7BL</i>	32	wPt-8938	wPt-9013	7	13	-12
LR13 FDS	<i>QLr.cim-1BL</i>	11	tPt-6091	wPt-1770	9	24	-10
	<i>QLr.cim-7BL</i>	0	wPt-8981	wPt-2273	3	5	-5
LR13 AUDPC ^d	<i>QLr.cim-1BL</i>	13	wPt-1770	wPt-734314	13	31	-63
	<i>QLr.cim-2BL</i>	1	wPt-6174	wPt-8548	3	6	-28
	<i>QLr.cim-2DL</i>	32	wPt-2781	barc159	3	6	-27

	<i>QLr.cim-6BS</i>	8	wPt-743200	wPt5234	3	6	28
LR13URUGUAY FDS	<i>QLr.cim-3BS</i>	5	wPt-5209	wPt- 7984	3	6	-7
LR13URUGUAY							
AUDPC ^e	<i>QLr.cim-3BS</i>	5	wPt-5209	wPt- 7984	4	10	-38
YR11 FDS	<i>QYr.cim-1BL</i>	12	wPt-1770	csLV46G22	17	35	-13
	<i>QYr.cim-2AS</i>	0	barc124	wPt-1722	3	5	-5
	<i>QYr.cim-2BS</i>	15	wPt-1813	wPt-4613	4	7	-6
	<i>QYr.cim-5BL</i>	135	barc59	wPt-3922	4	8	-6
YR11 AUDPC ^f	<i>QYr.cim-1BL</i>	13	wPt-1770	csLV46G22	15	32	-142
	<i>QYr.cim-2AS</i>	0	barc124	wPt-1722	3	6	-59
	<i>QYr.cim-2BS</i>	9	wPt-1813	wPt-4613	5	8	-71
	<i>QYr.cim-5BL</i>	135	barc59	wPt-3922	3	6	-64
YR12 FDS	<i>QYr.cim-1BL</i>	11	tPt-6091	csLV46G22	10	25	-11
	<i>QYr.cim-2BS</i>	21	wPt-6158	wPt-5188	4	8	-6
	<i>QYr.cim-7BL</i>	12	wPt-9925	wPt-744632	5	12	-8
YR12 AUDPC ^g	<i>QYr.cim-1BL</i>	11	tPt-6091	csLV46G22	14	34	-143
	<i>QYr.cim-2BS</i>	29	wPt-3949	wPt-8072	5	12	-86
	<i>QYr.cim-7BL</i>	11	wPt-9925	wPt-0194	6	12	-85

^a AUDPC para roya de la hoja en el 2011, Batán; ^b AUDPC roya de la hoja 2011-2012, Obregón; ^c LR12URUGUAY roya de la hoja 2012 Uruguay; ^d AUDPC roya de la hoja 2012-2013 Obregón; ^e AUDPC roya de la hoja 2012-2013 Uruguay; ^f AUDPC roya amarilla 2011 Toluca; ^g AUDPC roya amarilla 2012 Toluca; ^h QTL que se extiende a través de los intervalos de confianza; ⁱ Posición en centi-Morgans desde el primer marcador ligado al grupo correspondiente; ^j Logaritmo de las poblaciones (LOD) basado en 1,000 permutaciones; ^k PVE proporción de la varianza fenotípica del QTL; ^l Efecto aditivo de cada QTL

4.3.- Mapas de QTL con resistencia a roya de la hoja y roya amarilla

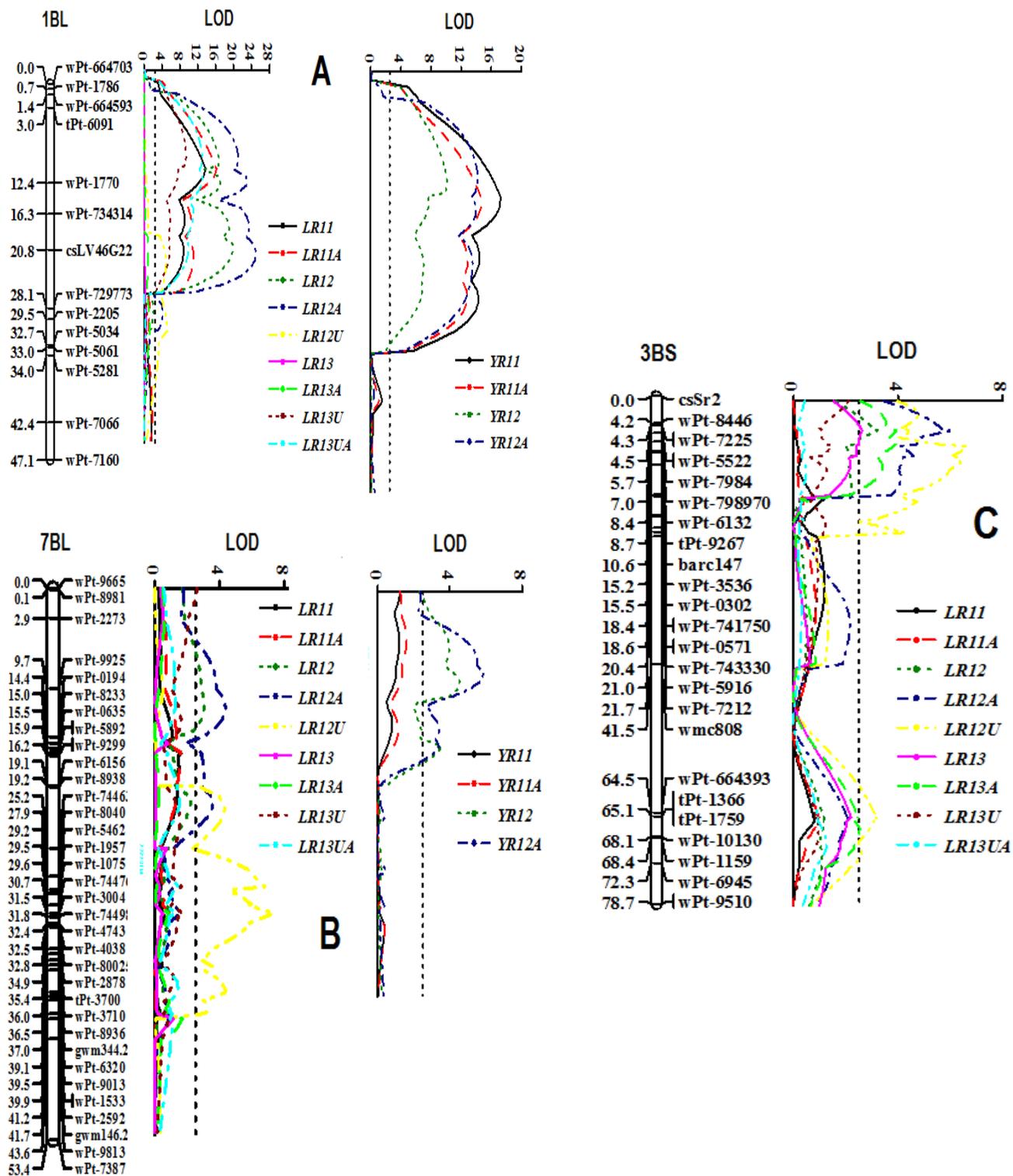
Uno de las principales QTL significativos para ambas enfermedades fueron: *QLr.cim-1BL* y *QYr.cim-1BL* (*Lr46/Yr29*), con un PVE que varió desde 12 hasta 57% y 25-35%, respectivamente y un LOD de 9-25 para LR y 10-15 para YR, asociada a los marcadores moleculares *wPt-1770* y *csLV46G22* (Fig. 2, A). Otros QTLs importantes para estas enfermedades son *QLr.cim.7BL* y *QYr.cim.7BL* ubicado entre los marcadores *wPt-9925* y *wPt-8938* con un LOD de 3-7 y 5-6, y un PVE de 5-13% para LR y 10% para YR. (Fig. 2, B).

4.4.- Mapas de QTL con resistencia a roya de la hoja

Un QTL con menor efecto para LR fue *QLr.cim-3BS*, ubicado entre los marcadores *wPt-5209* y *csSr2* que explica el 5-10% de PVE y un LOD de 3-6 (Fig 2. C). Otro QTL fue el *QLr.cim-1DS* con un LOD de 3-5 y 6-21% del PVE, entre los marcadores *wPt-3738* y *rPT-4471* (Fig. 2. D). Finalmente el *QLr.cim-2BL* que sólo fue significativo en México 2011 entre los marcadores *wPt-6174* y el *wPt-8548*, explicó el 20% de PVE y con un LOD de 12 (Fig. 3.E).

4.-5.- Mapas de QTL con resistencia a roya amarilla

Para YR un QTL con menor efecto fue localizado en el cromosoma 2BS en los marcadores *wPt-1813* y el *wPt-8072*. El *QYr.cim-2BS* mostró consistencia durante los dos años de evaluación con un LOD y PVE de 4-5 y 7-12 y%, respectivamente (Fig. 4, F). Así mismo se ubicó el *QYr.cim.5BL* entre los marcadores *Xbarc59* y *wPt-3922* con un rango de 6-8% para PVE y un LOD de 3-4 (Fig. 4, G).



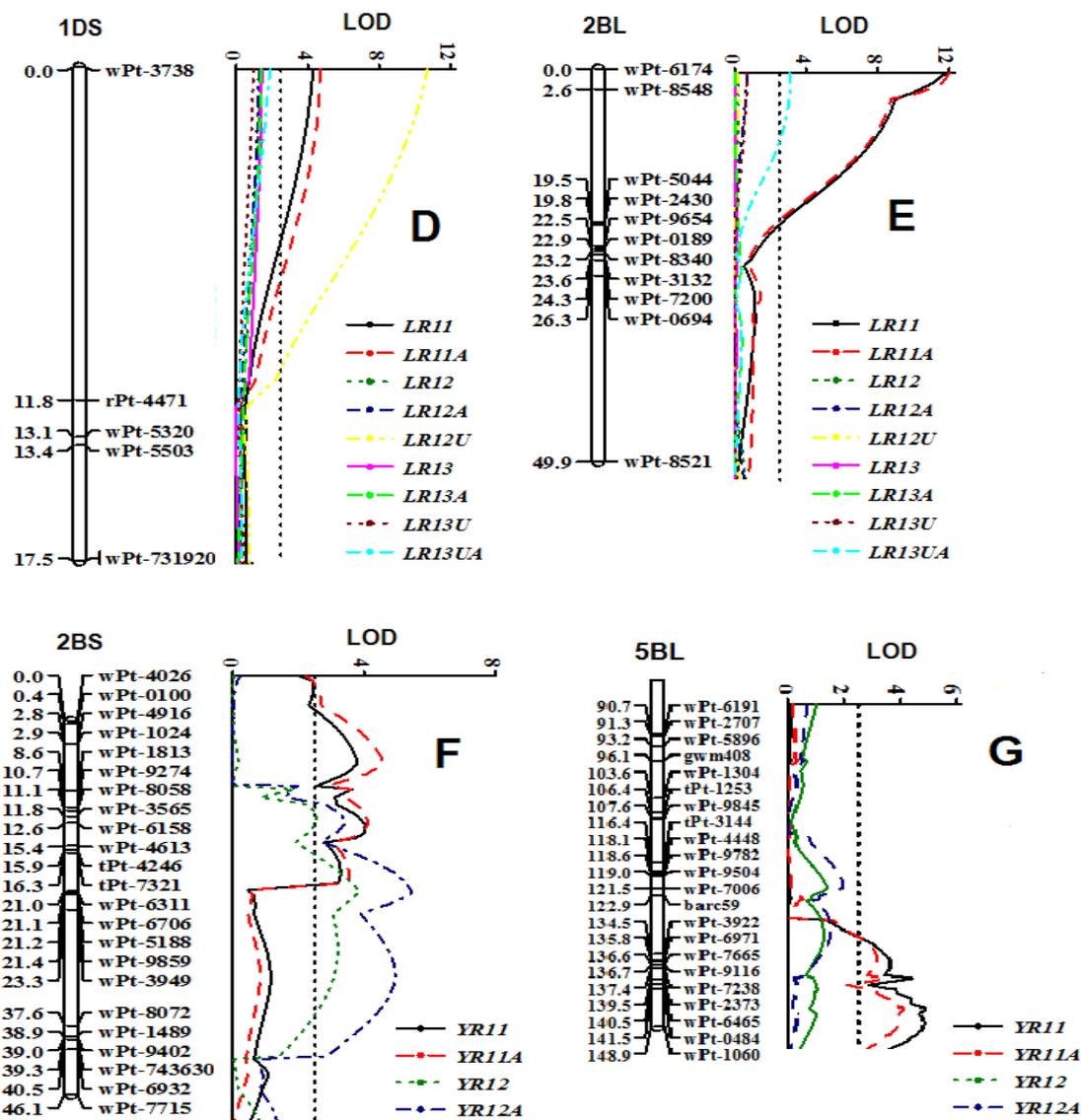


Fig 2: Mapas de QTLs para la resistencia en planta adulta (RPA) a roya de la hoja y roya en los cromosomas 1BL (Fig. 2A), 7BL (Fig. 2B), 3BS (Fig. 2C), 1DS (Fig. 2D) y 2BL (Fig. 2E), y para la roya amarilla en los cromosomas 1BL (Fig. 2A), 7BL (Fig. 2B), 2BS (Fig. 2F) y 5BL (Fig. 2G), identificados con IciMapping 3.3 en la F₅ Avocet / Kenya Kongoni. El umbral de LOD fue detectada en base a 1.000 permutaciones. Posiciones (cM) de los marcadores moleculares a lo largo de los cromosomas se muestran en el eje vertical; se muestran las leyendas de LR 11, LR12 y LR13 para roya de la hoja que representan los datos fenotípicos en El Batán 2011, Uruguay 2012, y Ciudad Obregón durante 2011-2012 y 201-2013 , respectivamente ; YR11 y YR12, datos fenotípicos para roya amarilla en Toluca en 2011 y 2012 , y las leyendas LR11A , LR12A, LR13A , YR11A y YR12A, que representan el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC).

V.- DISCUSIÓN

Se identificaron varias regiones cromosómicas con efecto significativo de resistencia para LR y YR de los cuales se encontraron dos genes de resistencia conocidos de la hoja y la roya lineal que son *Lr46/Yr29* y *Sr2/Yr30*, con base en marcadores moleculares ligados. (Singh *et al.*, 1998 y Mago *et al.*, 2010)

El gen *Lr46/Yr29* (Singh *et al.*, 1998) proporciona niveles relativamente altos de protección para ambas enfermedades en todos los ambientes y explica la expresión de NH en la población.

El QTL *QLr.cim-3BS* detectado en la población Avocet-Yra/Kenya Kongoni se asoció con el gen *Sr2/Yr30*. Estudios anteriores identificaron QTL para LR en 3BS (Singh *et al.*, 2000b, Suenaga y col. 2003, Khlestkina *et al.*, 2007, Dedryver *et al.*, 2009 y Rosewarne *et al.*, 2012) utilizando el marcador CAPS *csSr2* (Mago *et al.*, 2010) el cual representa el 100% de confiabilidad en los resultados. Este QTL es significativo en México y Uruguay siendo constante en diferentes años de evaluación.

Otro QTL asociados con la resistencia de LR y YR se encuentra en el cromosoma 7BL entre los marcadores *wPt-9925* y *wPt- 8938*. Crossa *et al.*, (2007) menciona que el marcador *wPt-9925* puede estar asociado al gen *Yr39*. Lin y Chen *et al.*, (2007), en su estudio, trabajaron con diferentes marcadores para identificar *Yr39* en el cultivar de trigo “Alpowa” y un marcador asociado es el *Xgwm131*, este marcador se utilizó en los padres, Avocet-Yra y Kenia Kongoni dando una respuesta de ausencia del gen. Herrera- Foessel *et al.*, (2012) en el cultivar “Parula” detecta el nuevo gen de enroscamiento lenta (RPA) *Lr68* ubicado en el cromosoma 7BL. *Lr68* está situado a una distancia de 7,5 cM del marcador *Xgwm146* y está altamente ligado al gen *Lr14b*, un gen de resistencia específica. Se utilizaron en los padres los marcadores SSR *Xgwm344* y *Xgwm146* asociado al gen obteniendo una distancia de 27,32 y 32,05 cM, de nuestro QTL por lo que se concluye que esta región probablemente sea nueva y que deberá ser confirmada en el futuro.

Para el *QLr.cim.2BL* significativo en LR ubicado entre los marcadores *wPt - 6174* y *wPt -8548* en estudios anteriores han demostrado QTL para la misma región, esto indica que estas regiones son sitios importantes para la resistencia de desarrollo lento a roya. El cromosoma 2BL es de interés en este estudio debido a que mostró un LOD y PVE de 3-13 y 6-20 %, respectivamente. Rosewarne *et al.*, (2008) encontró un importante QTL en el cromosoma 2BL para YR derivado de 'Avocet-S' entre los marcadores SSR *Xgwm1027* y *Xgwm619*, es difícil de explicar la relación entre este dos QTL debido a que no tienen ningún marcador molecular en común, pero es una región interesante para analizar en el futuro

Para LR también se encontraron QTLs en el cromosoma 1DS, *QLr.cim.1DS*, en los marcadores *wPt - 3738*, *rPt- 4471*, fue más significativo en Uruguay, con un límite de detección de 10 y PVE de 10 %. En 2011, en México se encontró un QTL asociado a los mismos marcadores, pero con un límite de detección menor. El marcador *wPt -3738* se asoció con el rendimiento de grano (Crossa *et al.*, 2007) y el gen de resistencia específico *Lr42*. El gen fue flanqueado por los marcadores *Xwmc432* y *Xcdf15* y mapeados en el cromosoma 1DS (Sun *et al.*, 2010). Basnet *et al.*, (2013) también encontraron *Lr42* en cultivar trigo "Quaiu 3", que está estrechamente vinculado al marcador SSR *Xwmc432*. Este marcador se utilizó en esta investigación y los resultados mostraron la ausencia de este gen.

El QTL asociado con la resistencia a YR (*QYr.cim-2BS*) entre los marcadores *wPt-1813* y *wPt-6158* con un LOD de 3-5 y un PVE 6-10% una región es rica en genes mayores de resistencia , por ejemplo, el gen de resistencia a específica *Yr31* (Singh *et al.*, 2003) y *Yr27* (Wellings *et al.*, 1992), ambos genes muestran un tipo de infección intermedio contra patotipos no virulentas en plántulas y también confiere niveles moderados de resistencia cuando está presente solo en plantas adultas. Sobre la base de pruebas en plántula (resultados no mostrados) se llega a la conclusión de que los genes *Yr27* y *Yr31* no está presente en la población Avocet-Yra / Kenia Kongoni, dando una infección de tipo de 7 y 6, respectivamente.

Otro QTL significativo para YR fue identificado en el cromosoma 5BL (*QYr.cim - 5BL*) entre los marcadores *Xbarc59* y *wPt-3922*. E Chu *et al.*, 2009 identifico un gen de RPA para LR en este cromosoma situado en el intervalo de los marcadores SSR *Xgdm116* y *Xbarc59* y que explicaba el 7% de la variación fenotípica. En nuestro estudio la variación fenotípica tiene un rango del 5-9%, la misma relación con el marcador *Xbarc-59* y un efecto un efecto similar, por lo que podría considerarse una zona de interés para estudios posteriores.

VI.-CONCLUSIONES

La población “Avocet-YrA/Kenya Kongoni” muestra resistencia a roya de la hoja y roya amarilla en los sitios de campo para México y Uruguay. La resistencia ha demostrado ser controlada en base al análisis X^2 por una combinación de 4 y 5 genes de enroscamiento lento para roya de la hoja y roya amarilla. Entre estos genes de resistencia de planta adulta identificados bajo el uso de marcadores moleculares, se encuentran los genes *Lr46/Yr29* y *Sr2/Lr27/Yr30* ubicados en el cromosoma 1BL y 3BS respectivamente. El QTL que se encuentra en el cromosoma 7BL es considerado importante porque fue significativo y constante para ambas enfermedades y podría ser un nuevo gen candidato que confiere resistencia a planta adulta. Los QTLs *Q_{Lr.cim.2BL}* y *Q_{Lr.1DS}* también son significativos en este estudio y pueden ser de igual forma nuevos genes candidatos. Los QTLs para roya amarilla en 2BS y 5BL (*Q_{Yr.cim-2BS}* y *Q_{Yr.cim-5BL}*) no están asociados con ningún gen de resistencia específica y pueden ser considerados en el futuro.

VII. - LITERATURA CITADA

- Babu Rivandra E., Sudha, K., Nair, B., Prasanna, B.M, Gupta, H.S. (2004). Integrating marker assisted selection in crop breeding - Prospects and Challenges. *Current Science* 87: 607-619.
- Basnet BR, Singh RP, Herrera-Foessel SA, Ibrahim AMH, Huerta-Espino J. Calvo-Salazar V, Rudd JC. (2013) Genetic analysis of adult plant resistance to yellow rust and leaf rust in common spring wheat "Quaiu". *Plant Disease* pp. 728-736.
- Carrillo, J.M; Vázquez, J.F.; Rodríguez de Quijano, Marta; Ruzi, M. (2006). Mejora de la calidad del trigo. En: *Mejora genética de la calidad de plantas*, G., Yacer, M.J. Díez, J.M. Carrillo y M.L. Badenes (eds.). Universidad Politécnica de Valencia, 129-164.
- Cerón-Rojas, J.J. y J. Sahagún-Castellanos. (2007). Estimating QTL biometrics parameters in F2 populations: a new approach. *Agrociencia* 41:57-73.
- Chu CG, Friesen TL, Xu SS, Faris JD, Kolmer JA. (2009) Identification of novel QTLs for seedling and adult plant leaf rust resistance in wheat doubled haploid population. *Theoretical and Applied Genetics* 119:263-269.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Collard B C Y, Jahufer M Z Z, Brouwer J B, Pang e C K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
- Crossa, J., J. Burgueño, S. Dreisigacker, M. Vargas, S.A. Herrera-Foessel, M. Lillemo, R.P. Singh, R. Trethowan, M. Warburton, J. Franco, M. Reynolds, J.H. Crouch and R. Ortiz. (2007). Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics* 177: 1889–1913
- Dedryver F, Paillard S, Mallard S, Robert O, Trottet M, Negre S, Verplancke G, Jahier J. (2009). Characterization of genetic components involved in durable resistance to stripe rust in the bread wheat "Renan". *Phytopathology* 99:968-967.

- De Vienne D. (2003a). Introduction In: Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Editor: Dominique de Vienne. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. pp 1-2.
- De Vienne D. (2003b). Construction of genetic linkage maps. In: Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Editor: Dominique de Vienne. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. pp 47-80.
- De Vienne D., Santoni S., Falque M. (2003). Principal sources of molecular markers. In: Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Editor: Dominique de Vienne. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. pp 3-46.
- De Vienne D., Causse M. (2003). Mapping and characterizing quantitative trait loci. In: Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Editor: Dominique de Vienne. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA. pp 89-124.
- FAO. (2011). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, siglas de Food and Agriculture Organization). Italia. Disponible desde internet en: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
- Faris, J.D., K.M. Haen, and B.S. Gill. (2000). Saturation mapping of a gene-rich recombination hotspot region in wheat. *Genetics*. 154:823–835
- Ferreira M, Grattapaglia D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA Brasil. 220p.
- Ferreira A, Da Silva Mf, Da Costa E Silva L, Cruz CD. (2006). Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet. Mol. Biol.* 29: 182-192.
- Geldermann, H. (1975). Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by genes markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 46:310-330.
- Gill KS, Gill BS, Endo TR, Boyko EV. (1996a). Identification of high density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. *Genetics* 143: 1001-1012.
- Gill KS, Gill BS, Endo TR, Taylor T. (1996b). Identification and high density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. *Genetics* 144: 1883-1891.
- Herrera-Foessel, S. A., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., William, H. M., Garcia, V., Djurle, A., and Yuen, J. (2008). Identification and molecular characterization of leaf rust resistance gene *Lr14a* in durum wheat. *Plant Dis.* pp:469-473.

- Herrera-Foessel SA, Lagudah ES, Huerta-Espino J, Hayden MJ, Bariana HS, Singh D, Singh RP. (2011) New slow rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked. *Theoretical and Applied Genetics* 122:239-249
- Herrera-Foessel SA, Singh RP, Huerta-Espino J, Rosewarne GM, Periyannan SK, Viccars L, Calvo-Salazar V, Lan CX, Lagudah ES. (2012) *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 124:1475-1486.
- Huerta-Espino, J. y Singh, R.P. (2000). Las royas del trigo. pp. 231-251 En: *El Trigo de Temporal en México*. H.E. Villaseñor-Mir y E. Espitia-Rangel (eds.). Libro técnico No. 1. Chapingo, Edo. de México. SAGAR, INIFAP, CIRCE, CEVAMEX. 315 p.
- Huerta, E. J., H. E. Villaseñor M., E. Espitia R., S. G. Leyva M., y R. P. Singh. (2002). Análisis de la resistencia a la roya de la hoja en trigos harineros para temporal. *Rev. Fitotec. Mex.* 25: 161-169.
- Huerta-Espino, Singh. R. P., Villaseñor-Mir, H.E., Espitia-Rangel, E., Leyva-Mir. S.G. (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.). pp. 239-247. 60
- INFOAGRO. El cultivo del trigo. España. Disponible desde internet en (<http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/trigo2.htm>)
- Jansen R. (1993). Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics Resources of Phaseolus Beans* 135: 205–211.
- Jansen R, Stam P. (1994). High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447-1455.
- Johnson. R. (1981). Durable disease resistance. In: *Strategies for control of cereal diseases*. pp. 567-568
- Kearsey MJ, Pooni HS (1996). *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Chapman and Hall: London. pp. 1-381
- Khlestkina EK, Roder MS, Unger O, Meinel A, Borner A. (2007). More precise map position and origin of a durable non-specific adult plant disease resistance against stripe rust (*Puccinia striiformis*) in wheat. *Euphytica* 153:1–10

- Kolmer, J.A., R.P. Singh, D.F. Garvin, L. Viccars, H.M. William, J.H. Huerta-Espino, F.C. Obonnaya, H. Raman, S. Orford, H.S. Bariana, and E.S. Lagudah. (2008b). Analysis of the *Lr34/Yr18* rust resistance region in wheat germplasm. *Crop Sci.* 48:1841–1852.
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B. (2009). A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* pp: 1360–1363
- Lagudah E S, Krattinger SG, Herrera-Foessel S, Singh RP, Huerta-Espino J, Spielmeier W, Brown-Guedira G, Selter LL, Keller B. (2009). Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics* 119:889-898
- Lagudah E. S. (2010). Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat. BGRI 2010 Technical Workshop, St Petersburg, Russia pp. 1-14.
- Lander, E. & D. Botstein. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–199.
- Lin, F., and Chen, X. M. (2007). Genetics and molecular mapping of genes for race-specific all-stage resistance and non-race specific high-temperature adult-plant resistance to stripe rust in spring wheat cultivar Alpowa. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1277-1287.
- Liu, B.H. (1998). *Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 611.
- Mac Key, J. (2005). Wheat: Its concept, evolution, and taxonomy. En: *Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies*, C. Royo, M.M.MNachit, N. DiFonzo, J.L. Araus, W.H. Pfeiffer, G.A. Slafer (eds.) vol. 1, The Haworth Press, Inc., New York, pp. 3-61.
- Mago R, Brown-Guedira G, Dreisigacker S, Breen J, Jin Y, Singh R, Appels R, Lagudah ES, Ellis J, Spielmeier W. (2010). An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene *Sr2* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 122:735-744
- Martínez-gómez, P., R. Sánchez-Pérez, M. Rubio, F. Dicenta, T.M. Gradziel Y G.O. Sozzi. (2005). Application of recent biotechnologies to *Prunus* tree crop genetic improvement. *Cien. Inv. Agr.* 32:73-96.

- 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
- McNeal FH, Konzak CF, Smith EP, Tate WS, Russell TS. (1971). A uniform system for recording and processing cereal research data. *USDA-ARS Bull*, Washington, pp34-121.
- Mohan M, Nair S, Bhagwat a, Krishna T, Yano M. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol. Breed.* 3: 87-103.
- Morton, N.E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics.* 7:277-318.
- Nuez F. (2000). Introducción al análisis del ligamiento y cartografía de marcadores simples. En: *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. Editores F. Nuez y J.M. Carrillo. I.S.B.N.: 84-7721-945-1. pp 153-292.
- Nuez F., Carrillo J.M. (2000). *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. Universidad Politécnica de Valencia. 579 pp.
- Nuez F., Carrillo J.M., de Ron A.M. (2000). Introducción. En: *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. Editores F. Nuez y J.M. Carrillo. I.S.B.N.: 84-7721-945-1. pp 1-22.
- Paterson AH. (1996). Making genetic maps. In: Paterson AH (ed.) *Genome mapping in plants*, San Diego, California: Academic Press, Austin, Texas, pp. 23–39.
- Phillips, W; FRITZ, P. (1995). Cacao y marcadores de ADN en el CATIE. *Mejoramiento genético y desarrollo de los cultivos tropicales*. Turrialba, CR, CATIE. p 25.
- Rajaram S, Singh RP, Torres E. (1988) Current CIMMYT approaches in breeding wheat for rust resistance. In: Simmonds NW, Rajaram S (eds) *Breeding strategies for resistance to the rust of wheat*. CIMMYT, Mexico, D.F., pp101-118
- Roelfs AP, Singh RP, Saari EE. (1992). *Rust diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*. CIMMYT, Mexico, D.F. pp 1-81
- Rosewarne GM, Singh RP, Huerta-Espino J, Herrera-Foessel SA, Forrest KL, Hayden MJ, Rebetzke GJ. (2012). Analysis of leaf and stripe rust severities reveals pathotype changes and multiple minor QTLs associated with resistance in Avocet ×Pastor wheat population. *Theoretical and Applied Genetics*124:1283:1294.

- Rosewarne GM, Singh RP, Huerta-Espino J, Rebetzke GJ. (2008) Quantitative trait loci for slow rusting resistance in wheat to leaf rust and stripe rust identified with multi-environment analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 116:1027-1034.
- Semagn k, Bjornstad A, Skinnes H, Maroy A.G, Tarkegne T, William M. (2006). Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49: 545–555.
- SAS Institute Inc. (2008). SAS/STAT Software, Version 9.2 for Windows, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Singh RP, Rajaram S. (1992). Genetics of adult-plant resistance to leaf rust in "Frontana" and three CIMMYT wheats. *Genome* 35:24-31.
- Singh, R.P. (1992a). Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. *Crop Sci.* 32: 874-878.
- Singh, R.P. (1992b). Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat. *Phytopathology* 82: 835-838.
- Singh RP, Mujeeb-Kazi A, Huerta-Espino J. (1998). *Lr46*: A gene conferring slow-rusting to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88:890-894
- Singh, R. P., Huerta-Espino, J., and Rajaram, S. (2000). Achieving near immunity to leaf rust and stripe rust in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica* 35:133-139.
- Singh RP, Nelson JC, Sorrells ME. (2000). Mapping *Yr28* and other genes for resistance to stripe rust in wheat. *Crop Sci* 40:1148–1155
- Singh R. P., Espino J. H. and William M. (2001). Slow rusting genes based resistance to leaf and yellow rust in wheat: Genetics and Breeding at CIMMYT. In: *Proceeding 10th Assembly of the Wheat Breeding Society of Australia*, Mildura, Australia. Wheat Breeding Society of Australia Inc., Australia. pp 103–108.
- Singh R P, J Huerta-Espino, M William (2003). Resistencia durable a roya de la hoja y roya amarilla del trigo: Genética y mejoramiento en el CIMMYT. In: *Estrategias y Metodologías Utilizadas en el Mejoramiento de Trigo*. M M Kohlí, M Díaz, M Castro (eds). Seminario Internacional, La Estanzuela, Uruguay. CIMMYT-INIA. pp:109-118

- Spielmeier W, Sharp PJ, Lagudah ES. (2003), Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Science* 43:333–336.
- Suenaga K., Singh R.P., Huerta-Espino J. and William H.M. (2003). Tagging of slow rusting genes for leaf rust, *Lr34* and *Lr46*, using microsatellite markers in wheat. *JIRCAS Research Highlights pp 8-9*.
- Sun X, Bowden R, Caver BF, Bai G. (2010). Molecular mapping of wheat leaf rust resistance gene *Lr42*. *Crop Science* 50:59-66.
- Tanksley S. (1993). Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27:205-233.
- Uauy C., Brevis J. C., Chen X., Khan I., Jackson L., Chicaiza O., Distelfeld A., Fahima T., Dubcovsky J. (2005). High-temperature adult-plant (HTAP) stripe rust resistance gene *Yr36* from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* is closely linked to the grain protein content locus *Gpc-B1*. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 97-105
- Wenzl, P., J. Carling, D. Kudrna, D. Jaccoud, E. Huttner, A. Kleinhofs, and A. Kilian. (2004). Diversity Arrays Technology (DArT) for whole genome-profiling of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101(26): 9915-9920.
- William M., Singh R. P., Huerta-Espino J., Ortiz Islas S., y Hoisington D. (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.
- William HM, Singh RP, Huerta-Espino J, Palacios G, Suenaga K. (2006). Characterization of genetic loci conferring adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in spring wheat. *Genome* 49:977-990.
- Zeng, Z.-B., (1993). Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10972–10976.
- Zeng, Z.-B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457–1468.