



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD**

GENÉTICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE GENES DE RESISTENCIA A ROYAS, DE ENANISMO Y LIGAMIENTO ENTRE LOS GENES *Lr67* Y *Rht-D1* EN TRIGO HARINERO

MAGDA KARINA MOEDANO MARIANO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

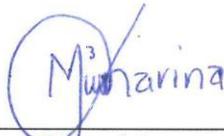
2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Mc. Magda Karina Moedano Mariano, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Ignacio Benítez Riquelme, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Caracterización molecular y fenotípica de genes de resistencia a royas, de enanismo y ligamiento entre los genes Lr67 y Rht-D1 en trigo harinero.

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 16 de Noviembre de 2018



Firma del
Alumno (a)



Dr. Ignacio Benítez Riquelme
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Caracterización molecular y fenotípica de genes de resistencia a royas, de enanismo y ligamiento entre los genes *Lr67* y *Rht-D1* en trigo harinero** realizada por la alumna **Magda Karina Moedano Mariano**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



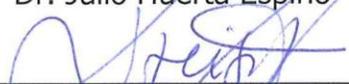
Dr. Ignacio Benítez Riquelme

DIRECTOR DE TESIS



Dr. Julio Huérta Espino

ASESORA



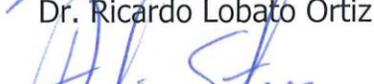
Dra. Susanne Dreisigacker

ASESOR



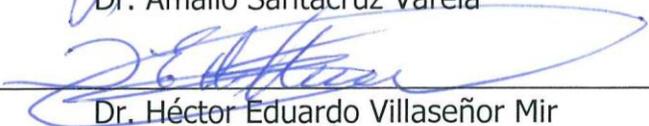
Dr. Ricardo Lobato Ortiz

ASESOR



Dr. Amalio Santacruz Varela

ASESOR



Dr. Héctor Eduardo Villaseñor Mir

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2018

Caracterización molecular y fenotípica de genes de resistencia a royas, de enanismo y ligamiento entre los genes *Lr67* y *Rht-D1* en trigo harinero

Magda Karina Moedano Mariano, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La producción del trigo puede ser afectada por factores bióticos y abióticos y dentro de los bióticos, son las enfermedades fungosas, causadas en su mayoría por hongos del género *Puccinia* las más importantes. El encuentro de nuevas fuentes de resistencia genética a las royas y el estudio de combinaciones piramidales de genes de resistencia específica mediante la genética molecular ha sido fundamental para la creación del nuevo germoplasma resistente a royas y la incorporación de genes de enanismo. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar fenotípica y molecularmente 15 genotipos de trigo harinero con diferentes genes y niveles de resistencia a royas y genes de enanismo, además de determinar el posible ligamiento entre el gen *Lr67* y el de enanismo *Rht-D1*. Con base en los resultados de la inoculación en plántula de roya de la hoja y amarilla se encontró en el análisis fenotípico que sólo el genotipo 'Sujata' mostró resistencia a roya amarilla en estado de plántula. Los 14 genotipos restantes fueron susceptibles tanto a la roya de la hoja como a la roya amarilla. En el análisis molecular, y el uso de marcadores de Polimorfismo de Nucleótido Individual (SNP) asociados con los genes de resistencia a roya de la hoja (Lr) *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* y *Lr68* permitió identificar estos alelos en los genotipos evaluados. Los marcadores asociados a los genes de enanismo *Rht-B1* y *Rht-D1*, permitió determinar los alelos de enanismo. Se encontró que el genotipo 'Parula' fue positivo (presenta el alelo favorable) para los marcadores asociados con los genes de resistencia *Lr34*, *Lr46*, *Lr68* y positivo para el marcador asociado al alelo favorable de enanismo *Rht-D1*. Los genotipos 'Marroqui 588', 'Sujata', 'Yaqui 50' fueron positivos para *Lr46* y *Lr67*; 'RL6077', 'Constitución' y 'Chapingo 53' lo fueron para el alelo de resistencia *Lr67*; mientras que 'Tordo' resulto positivo para *Lr34*, *Lr46* y *Rht-D1*. Los Genotipos: 'Nasma', 'Sonalika', 'Kanchan' y 'Pavon' fueron positivos para *Lr46* y *Rht-D1*. 'Yecora 70' se asoció con *Lr46*, *Rht-B1* y *Rht-D1*, mientras que 'Lalbahadur', solo con los genes de enanismo *Rht-B1* y *Rht-D1*, y 'Apav', también solo con el gen de enanismo *Rht-B1*. No se encontraron las combinaciones de los alelos favorables *Lr34/Lr67*, y *Lr67* con alguno de los alelos de enanismo *Rht-B* ó *Rht-D*. Con base en familias F₃ de la craza 'Nasma' × 'Marroqui 588' y utilizando las frecuencias de recombinación de los resultados de los SNP para los alelos favorables *Lr67* y *Rht-D1*, se encontró una distancia entre ambos genes de 22 cM y de 27 cM con el mapa genético de ligamiento para el cromosoma 4DL. Este resultado muestra que la distancia es suficientemente grande como para que exista recombinación genética entre ambos genes y se puedan conjuntar en un mismo genotipo.

PALABRAS CLAVE: *Triticum aestivum* L., resistencia a *P. tritricina*, *P. striiformis*, distancias genéticas, pleiotropía, proteómica.

Molecular and phenotypic characterization of resistance to rust and dwarfism genes, and linkage between the *Lr67* and *Rht-D1* genes in bread wheat

Magda Karina Moedano Mariano, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The production of wheat could be affected by biotic and abiotic factors and within the biotic, are fungal diseases, caused mostly by fungi of the genus *Puccinia* are the most important. The search for new sources of resistance gene to the rusts and the study of pyramidal combinations of genes of specific resistance by molecular markers has been critical to the creation of the new rust-resistant germplasm and the incorporation of dwarfism genes. The objective of the present study was to characterize molecularly and phenotypically 15 genotypes of wheat with different genes and levels of resistance to rust and genes for dwarfism, as well as determining the possible linkage between the *Lr67* gene and dwarfism *Rht-D1*. Based on the results of the inoculation on seedling leaf and yellow rust was found in phenotypic analysis that only 'Sujata' genotype showed resistance to yellow rust in seedling stage. The 14 remaining genotypes were susceptible to leaf rust and yellow rust. In the molecular analysis, the use of polymorphism of single nucleotide (SNP) markers associated with the (Lr) leaf rust resistance genes *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* and *Lr68*, allowed the determination of the presence of these alleles. The markers associated with dwarfism *Rht-B1* and *Rht-D1* genes were useful too. It was found that the genotype 'Parula' was positive (presents favorable allele) for the markers associated with genes the resistance genes: *Lr34*, *Lr46*, *Lr68* and positive for the marker associated with the favorable allele of dwarfism *Rht-D1*. The genotypes 'Marroqui 588', 'Sujata', 'Yaqui 50' were positive for the *Lr46* y *Lr67* markers whereas; 'RL6077', 'Constitucion' and 'Chapingo 53' were for *Lr67* resistance allele 'Tordo' turned out positive for *Lr34*, *Lr46*, and *Rht-D1*. 'Nasma' and 'Sonalika', 'Kanchan' and 'Pavon' were positive for *Lr46* and *Rht-D1*. 'Yecora 70' was associated with *Lr46*, *Rht-B1* and *Rht-D1*, while 'Lalbahadur', only with genes for dwarfism *Rht-B1* and *Rht-D1*, and 'Apav', also only with dwarfism *Rht-B1* gene. Combinations of favorable alleles *Lr34/Lr67*, and *Lr67* not met with any of the alleles of dwarfism *Rht-B* or *Rht-D*. Based on F3 families from the cross 'Nasma' × 'Marroqui 588' and using the frequencies of recombination of the results of the SNP for the favorable alleles *Lr67* and *Rht-D1*, was found a distance between both genes of 22 cM and 27 cM with the genetic map of par linkage to chromosome 4DL. This result shows that the distance is large enough as to allow genetic recombination between both genes and can come together in the same genotype.

KEY WORDS: *Triticum aestivum* L., resistance to *P. triticina*, *P. striiformis*, genetic distances, pleiotropy, proteomics

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que obtuve para poder realizar mis estudios de Doctorado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por las bases de mi formación profesional.

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado, en especial al posgrado de Genética, por todo el apoyo brindado en mi estancia.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en especial al Programa de Mejoramiento de Trigo y Avena por el apoyo brindado en mi formación profesional y la realización de la investigación en campo.

Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), al Programa de Trigos Harineros y al Programa de laboratorio de Mejoramiento Genético Molecular (BMW) por todas las facilidades otorgadas para la realización de la investigación.

Al Dr. Julio Huerta Espino por su tiempo, apoyo, motivación que siempre me brindo, sus conocimientos compartidos, la conducción del trabajo de investigación y por su amistad.

Al Dr. Ignacio Benítez Riquelme por su tiempo, apoyo, paciencia y por sus observaciones siempre acertadas y la guía para mi formación académica.

Al Dr. Héctor Eduardo Villaseñor Mir por todo el apoyo brindado en la realización de la investigación, por su tiempo, sus acertadas sugerencias y su amistad.

Al Dra. Susanne Dreisigacker por aceptar ser parte de esta investigación, por su tiempo, observaciones y permitirme ser parte de su equipo de trabajo en el CIMMYT.

Al Dr. Ricardo Lobato Ortiz por su valiosa colaboración en esta investigación y sus conocimientos compartidos.

Al Dr. Amalio Santacruz Varela por aceptar ser parte de este equipo de trabajo, su apoyo y sus conocimientos compartidos.

A la Dra. María del Carmen Mendoza Castillo por ser la Sinodal de este proceso de titulación. Por su amistad.

Al Dr. Amor Yahyaoui por la oportunidad y el apoyo brindado en la realización de la estancia.

Al Dr. Mario Velasco por su gran apoyo y motivación en la estructura y desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Carmen Gabriela Mendoza Mendoza por todo su apoyo, porque siempre me motivó y se preocupó por mi, por ser una gran amiga.

Al Dr. Francisco Javier Sánchez por todo su apoyo, por ser un gran amigo.

A la Dra. Ma. Florencia Rodríguez García por todo el apoyo otorgado en la trabajo de campo e invernadero y laboratorio, por su motivación y ser una gran amiga.

Mc. Estela Martínez Soriano que a pesar del tiempo y la distancia siempre me ha motivado y apoyado y por ser mi amiga.

Mc. Yaneli I. Montalvo Mendoza por su apoyo y motivación y por ser mi amiga.

Al Dr. Daniel Bárcenas Santana por su apoyo en laboratorio y su amistad.

Al Personal de campo del programa de Trigo y Avena del INIFAP-CEVAMEX al Sr. José Arteaga, Sr. Adrián y el Sr. Héctor por todo el apoyo brindado durante la investigación y por su amistad.

A los Dr. Eduardo Espitia Rangel, Dr. Eliel Martínez y Dr. Rene Hortelano por todo su apoyo brindado en este trabajo de investigación y su amistad.

Al Personal de laboratorio de Mejoramiento Genético Molecular (BMW) del CIMMYT: la Sra. Baci Luna Garrido, Adriana E. Reyes, Claudia Núñez, Al Sr. Silverio, Yolo, Alma Yuyu, Sr. Pablo, Liz por su gran amistad sincera, todos esos buenos momentos que me permitieron ser parte de su equipo, su apoyo y conocimientos compartidos en este trabajo de investigación.

Al Sr. Javier Segura y Toñita por su gran amistad y apoyo.

Gracias a todas aquellas personas que de alguna manera me apoyaron en la realización de este trabajo de investigación.

Sinceramente
Magda Karina Moedano

...

DEDICATORIA

A Dios y a la Madre Naturaleza por permitirme poder llegar aquí y disfrutar de esta hermosa vida.

A los varones de mi vida: mi amado hijo Dante Velasco y mi esposo-amigo Mario Velasco que son mis motores para salir siempre adelante. Los amo.

A mis Adorados Padres: Emilia Mariano y Salustio Moedano que siempre me han apoyado y motivado, por todo su amor. Los amo

A mis hermanos Heri, Martin y Luis por todo su amor y apoyo incondicional.

A mi querida hermana de corazón Ilse Gabriela Vázquez Martínez, por llegar a mi vida y siempre apoyarme, orientarme, motivarme.

A mis sobrinos Adamary, Erick y José Martin por alegrar nuestras vidas y ser un motivo más para seguir siempre adelante.

A mis abuelitos Martin Mariano, Cirenía Marañón, Juana Marín y Cleofás Moedano por su amor y darme a mis padres.

A la Familia Sánchez Mendoza por todo su apoyo incondicional, amistad sincera, no necesitamos llevar la misma sangre para volvernos familia.

A la Familia Castro Marín por su cariño incondicional y formar parte de nuestra familia.

A la Familia Alvarado Narváez, en especial a la Sra. Hortencia Alvarado por todo su apoyo y cariño.

A mis tíos y tías por todo su cariño y siempre motivarme.

A mis primos y primas por su cariño y apoyo.

Sinceramente
Magda Karina Moedano

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Importancia.....	1
Genoma del trigo	2
Las royas del trigo	3
Gen de Resistencia a roya de la hoja <i>Lr67</i>	5
Genes de enanismo <i>Rht-B1</i> y <i>Rht-D1</i>	6
Genes independientes y genes ligados.....	7
Implicaciones de genes en fase de repulsión	8
Método para medir la magnitud del ligamiento	9
Objetivos.....	10
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos	11
Hipótesis	11
LITERATURA CITADA.....	12
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE GENOTIPOS DE TRIGO HARINERO CON DIFERENTES GENES DE RESISTENCIA A ROYAS Y DE ENANISMO	16
RESUMEN.....	16
ABSTRACT	17
1.1 INTRODUCCIÓN	18
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	21
1.2.1 Material genético	21
1.2.2 Evaluación en plántula.....	21
1.2.3 Inoculación del patógeno en plántula	22
1.2.4 Evaluación de la reacción en plántula.....	23

1.2.5	Evaluación en planta adulta	23
1.2.6	Inoculación del patógeno en planta adulta	23
1.2.7	Evaluación de la reacción en planta adulta	24
1.2.8	Análisis molecular.....	25
1.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
1.4	CONCLUSIONES	34
1.5	LITERATURA CITADA.....	35
CAPÍTULO II. RELACIÓN ENTRE EL GEN <i>Lr67</i> DE ROYA DE LA HOJA Y EL GEN DE ENANISMO <i>Rht-D1</i> DEL TRIGO		41
	RESUMEN.....	41
	ABSTRACT	42
2.1	INTRODUCCIÓN	42
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS	46
2.2.1	Material genético	46
2.2.2	Análisis molecular.....	46
2.2.3	Mapa genético	47
2.2.4	Análisis estadístico.....	48
2.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
2.3.1	Análisis molecular de los progenitores.....	49
2.3.2	Análisis de independencia	49
2.3.3	Mapa genético de ligamiento cromosoma 4D.....	53
2.4	CONCLUSIONES	55
2.5	LITERATURA CITADA.....	55
DISCUSIÓN GENERAL.....		60
CONCLUSIONES GENERALES		65

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Respuesta de 15 genotipos a la roya de la hoja raza MBJ/SP y roya amarilla raza Mex14.191 en estado de plántula en el invernadero y planta adulta en el campo	28
Cuadro 2. Marcadores de Polimorfismo de Nucleótido Individual (SNP) encontrados positivos en los diferentes genotipos de trigo evaluados	31
Cuadro 3. Prueba de χ^2 (Ji-cuadrada) para los loci <i>Rht-D1</i> y <i>Lr67</i> .	50
Cuadro 4. Prueba de χ^2 (ji-cuadrada) considerando independencia entre los loci <i>Rht-D1</i> (A) y <i>Lr67</i> (B)	52
Cuadro 5. Prueba de χ^2 (ji-cuadrada) considerando una $r = 0.22$ entre los loci <i>Rht-D1</i> (A) y <i>Lr67</i> (B)	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama esquemático de las relaciones entre los genomas del trigo con historia de poliploidización y genealogía	3
Figura 2. A) Siembra en charolas, B)Inoculación de plántulas, C)Acondicionamiento de cámara húmeda con humidificador y D)Generación de rocío.	22
Figura 3. A) Siembra en campo (1surco/1 metro), B)Inoculación artificial con atomizador manual C) Borde de genotipo susceptible de roya amarilla como inóculo	24
Figura 4. A) Extracción de ADN B) Sedimento de ADN C) Cuantificación y calidad de ADN con espectrómetro NanoDrop 8000 y D) Lector de placas fluorescentes BMG Pherastar Plus	26
Figura 5. Caracterización de resistencia a roya de la hoja en plántula	29
Figura 6. Caracterización de resistencia a roya amarilla en plántula.	29
Figura 7. Visualización geográfica de los resultados en los 15 genotipos	32
Figura 8. Amplificación de los marcadores csLV67 y DF/MR2, marcador de peso molecular PhiØ174. A) Gen <i>Lr67</i> control positivo en 'RL6077' y en el progenitor 'Marroqui 588'. B) Gen <i>Rht-D1</i> , control positivo en la variedad 'Parula' y el progenitor 'Nasma'. C) Complemento del marcador dominante DF/MR2 para el gen <i>Rht-D1</i> , control negativo en la variedad 'Tonichi' y en el progenitor 'Marroqui 588'	49
Figura 9. Visualización geográfica de datos genotípicos en una población F3 de Nasma*Marroqui588, A) <i>Rht-D1</i> (<i>Rht-D1_SNP</i>): color rojo 'Nasma', azul 'Marroqui 588' y verdes heterocigotos; y B) <i>Lr67</i> (<i>csSNP856</i>): color rojo 'Marroqui 588', color azul 'Nasma' y verde heterogocigotes.	51
Figura 10. Mapa genético de la región del brazo largo del cromosoma 4D, usando una población F3 de Nasma/Marroqui 588, las distancias genéticas se muestran en cM. Los marcadores de color rojo indican la ubicación de los genes de interés <i>Lr67</i> y <i>Rht-D1</i>	54

INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia

El trigo (*Triticum* spp.) es uno de los cultivos más importantes del mundo, ya que es el segundo alimento de mayor demanda, sólo después del arroz, alimenta a más del 30 % de la población humana (IWGSC, 2014). Para cubrir esta demanda, la superficie global sembrada es de 222 millones de hectáreas, con una producción total de 749 millones de toneladas (FAO, 2016).

En México se siembran 723 mil ha y se producen 3.8 millones de toneladas, en más de 20 estados. De esta superficie, el 60 % de la producción se concentra en la región Noroeste (Sonora, Baja California, Baja California Sur, y norte de Sinaloa). A su vez, el ciclo otoño-invierno (O-I) en condiciones de riego, representa aproximadamente 60 % del total nacional y agrupa a los estados de Baja California, Sonora, Sinaloa, Guanajuato, Jalisco y Michoacán (SIAP, 2016; Peña *et al.*, 2008). El resto se produce en la región Centro y Altiplano, durante el ciclo Primavera-Verano (P-V) en condiciones de temporal. Esta producción de temporal es importante porque se localiza cerca de la zona de proceso de molienda y panificación industrial, hecho que permite reducir costos de transportación, que son elevados cuando el trigo se traslada de sitios lejanos (Villaseñor, 2000).

Según las proyecciones, la demanda mundial de trigo aumentará un 60 % para 2050, debido al aumento esperado de la población, la cual ascenderá a 9 mil millones de personas en el mundo. El trigo al ser un alimento principal, deberá aumentar el rendimiento promedio mundial para satisfacer esta demanda (WHEAT, 2013).

Genoma del trigo

El trigo harinero tiene un genoma de 17,000 millones de pares de bases (17Gb), comparado con otros cultivos importantes, el genoma del trigo es de tamaño muy grande (IWGSC, 2014; Shi *et al.*, 2018).

El genoma grande del trigo puede deberse a su origen múltiple, ya que se originó cuando dos especies diploides se cruzaron *Triticum urartu* ($2n=2x=14$; genoma AA) con *Aegilops speltoides* ($2n=2x=14$; genoma SS) y dieron origen a una especie tetraploide, que en la actualidad es el trigo duro (*Triticum turgidum*) ($2n = 4x = 28$; genoma AABB). El trigo tetraploide se cruzó con un zacate diploide (*T. Tauschii*) ($2n=2x$; genoma DD), lo que dio origen al trigo harinero hexaploide (*Triticum aestivum* L.) ($2n = 6x = 42$, AABBDD) (Figura 1.) (IWGSC, 2014). La resultante de este proceso fue el trigo harinero con 21 pares de cromosomas, que es estructuralmente un poliploide con tres conjuntos homólogos de siete cromosomas en cada uno de los sub genomas A, B y D; cada uno de los sub-genomas es de un tamaño aproximado de 5.5 Gb. La aparición de abundantes repeticiones y transposones también complican la genómica del trigo, está compuesto en su mayoría del 80 a 90 % por secuencias repetitivas, lo que ha dificultado su secuenciación. Se tienen identificados entre 94,000 y 96,000 genes. Estudios recientes han permitido el desarrollo de marcadores tipo SNPs (Single Nucleotide Polimorphism); sin embargo, aún se desconoce la posición y distribución exacta de los genes en cada uno de los cromosomas. El Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma de Trigo (IWGSC, 2014) ha identificado 124,201 genes y ha posicionado 75, 000 a lo largo de los 21 cromosomas.

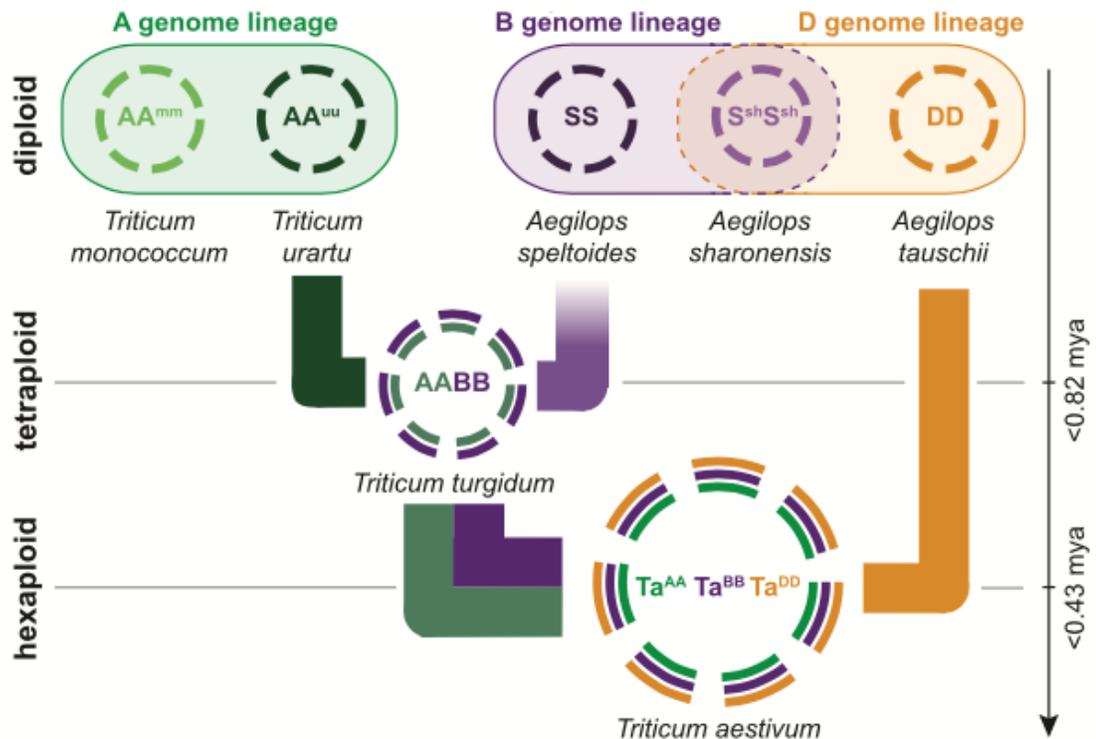


Figura 1. Diagrama esquemático de las relaciones entre los genomas del trigo con historia de poliploidización y genealogía. Los nombres y la nomenclatura para los genomas se indican dentro de círculos, que proporcionan una representación esquemática del complemento cromosómico para cada especie. Mya: millones de años (Figura tomada de IWGSC (2014)).

Las royas del trigo

Las tres especies del género *Puccinia* causantes de royas constantemente amenazan la producción de trigo en el mundo, la roya de la hoja (*P. triticina*) es la enfermedad con mayor adaptación a diversos ambientes y ampliamente distribuida en el mundo de las tres royas de trigo, las pérdidas son menos dañinas que las de la roya del tallo (*P. graminis* var. *tritici*) o roya amarilla (*P. striiformis*), pero las pérdidas anuales son mayores, causando reducción en el rendimiento debido a un menor peso del grano

(Huerta-Espino *et al.*, 2011).

La roya del tallo, que era el factor limitante para la producción del trigo en México durante la década de 1940, se logró controlar con la liberación de la variedad 'Yaqui 50' en 1950 (Roelfs y MacVey, 1972); sin embargo, existe la amenaza potencial de una raza identificada como *Ug99* o TTKS encontrada inicialmente en Uganda, que se ha dispersado en África y parte de Asia y que tiene virulencia que involucra a *Sr31* y *Sr24* y para otros genes de resistencia usados en la mayoría de los programas de mejoramiento de México y el mundo (Singh *et al.*, 2006); además, la roya amarilla puede llegar a ser tan importante como la de la hoja porque su prevalencia en zonas productoras ha aumentado (Huerta-Espino y Singh, 2000).

Las royas son una enfermedad fungosa que históricamente ha causado grandes pérdidas económicas, a pesar de la búsqueda de la resistencia de los genotipos y el uso de productos químicos (Singh *et al.*, 2016). La introducción de la resistencia genética en los cultivares es la medida más económica y ambientalmente segura para el control de las royas en el trigo. Hasta la fecha, más de 77 genes de resistencia a roya de la hoja (*Lr*), 78 a roya amarilla (*Yr*) y 59 a roya del tallo (*Sr*) han sido identificados y catalogados en diferentes especies del género *Triticum* (McIntosh *et al.*, 2017).

Singh *et al.* (2014) mencionan que la vida eficaz de los genes con resistencia a razas específicas se puede prolongar mediante el uso de combinaciones de genes, que consiste en implementar las variedades que poseen resistencia de la planta adulta (APR) basada en combinaciones de genes con resistencia parcial; sin embargo,

cuando éstos se presentan solos, los genes no confieren una resistencia adecuada, especialmente bajo presión alta de la enfermedad; sin embargo, las combinaciones de 4 o 5 genes menores pueden dar "casi inmunidad" o un alto nivel de resistencia (Singh *et al.*, 2000).

Gen de Resistencia a roya de la hoja *Lr67*

El gen *Lr67* confiere resistencia a roya de la hoja en planta adulta, fue identificado en la accesión PI 250413 y se ubica en el cromosoma 4DL del trigo. Este gen muestra efectos pleiotrópicos pues provee resistencia a roya amarilla (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*), designado como *Yr46*, a la roya del tallo (*Puccinia graminis*) nombrado *Sr55* y resistencia a cenicienta polvoriento (*Blumeria graminis*), denominado *Pm46* y a otras enfermedades foliares, incluido el carácter quemadura de la punta de la hoja *Ltn3*. También es fenotípicamente similar al gen de resistencia a roya de hoja *Lr34* en la resistencia parcial de plantas adulta (APR) (Hiebert *et al.*, 2010).

La base del mecanismo de la resistencia a múltiples patógenos es en gran parte desconocida. Trabajos realizados por Moore *et al.* (2015) mediante la genómica comparativa, mutagénesis y el aislamiento del gen *Lr67*, identificaron el gen de resistencia de *Lr67*, el cual codifica a un transportador de hexosa (*Lr67res*) y en comparación con la forma susceptible difiere de dicha proteína por dos aminoácidos (*Lr67sus*). Los ensayos de captación de azúcar muestran que *Lr67sus* y las proteínas relacionadas codificadas por alelos homólogos funcionan como transportadores de glucosa de alta afinidad, en contraste con *Lr67res* que ejerce un efecto dominante negativo con estos transportadores funcionales, reduciendo la captación de glucosa; es decir, las alteraciones en el transporte de hexosa en las hojas infectadas pueden

explicar su capacidad para reducir el crecimiento de múltiples patógenos biotróficos.

Genes de enanismo *Rht-B1* y *Rht-D1*

Los genes de enanismo fueron de suma importancia durante la revolución verde a finales del Siglo XX, contribuyendo al aumento de los rendimientos del trigo; esto se logró cuando se introdujo el genotipo Japonés 'Norin 10' que portaba los genes de enanismo *Rht-B1* y *Rht-D*, a diferencia de otras variedades que no presentaban estos genes, eran más altas (150 cm), y las variedades originadas de la cruce con 'Norin 10' que portaban los genes de altura reducida se redujeron a 60-110 cm de altura. Norman E. Borlaug comenzó a cruzar variedades semi-enanas con las variedades mexicanas y la progenie de trigo semi-enana mexicana comenzó a distribuirse a nivel nacional, nombró dos de las variedades más exitosas, Sonora 64 y Lerma Rojo 64, y fueron estas dos variedades las que llevaron a la revolución verde en India, Pakistán y otros países (Lumpkin, 2015).

Los genes de enanismo de altura reducida, denominados *Rht* por su nombre en inglés *Reduced height* disminuyen la sensibilidad de los tejidos reproductivos y somáticos a la giberelina, dando como resultado una disminución en la longitud del entrenudo y una altura reducida de la planta (Sial *et al.*, 2002). Las mutaciones de *Rht-D1* están asociadas con un cambio de un solo par de bases que conduce a un codón de terminación UAG poco después del inicio de la traducción (Peng *et al.*, 1999). Estas mutaciones reducen la capacidad de la planta para responder al ácido giberélico (GA). Los genes de enanismo se clasifican según su sensibilidad a las giberelinas. Los genes *Rht-B1* y *Rht-D1* son genes insensibles a GA, los alelos que confieren el fenotipo enano son *Rht-B1b* y *Rht-D1b* y los alelos de tipo silvestre son *Rht-B1a* y *Rht-D1a*.

Ellis *et al.* (2002) desarrollaron marcadores moleculares para estos genes de enanismo basados en PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para identificar entre el gen *Rht-B1b* y *Rht-D1b* (enanos) y sus alelos silvestre *Rht-B1a* y *Rht-D1a* (alto).

El gen de altura reducida denominado *Rht-B1*, anteriormente conocido como *Rht1*, se localiza en el cromosoma 4B, por lo cual tiene asignado B1, también es el caso para el gen *Rht-D1* conocido como *Rht2*, y D1 porque se localiza en el cromosoma 4D.

Genes independientes y genes ligados

Los genes independientes son aquellos que se encuentran en diferente cromosoma o muy separados en el mismo cromosoma y segregan bajo la proporción 9:3:3:1 en la F₂; suponiendo la cruce, AaBb × AaBb daría cuatro fenotipos en una proporción 9 AB: 3 Ab: 3 aB: 1 ab. Caso contrario ocurre con los genes ligados, si dos pares de genes que se encuentran localizados cerca uno del otro, en un mismo cromosoma, se dice que están ligados; dependiendo de su cercanía, estos se heredan juntos de una generación a la siguiente, por la reducida probabilidad de presencia de entrecruzamiento entre ellos, mismo que limita la presencia de individuos recombinantes.

Bajo esta condición, una población segregante para dos pares de genes (Aa; Bb) también produce cuatro clases de gametos (AB, Ab, aB, ab) y 9 clases genotípicas, donde se tienen que diferenciar los heterocigotos dobles, si están en fase de acoplamiento (AB/ab) o en fase de repulsión (Ab/aB) (Molina, 1992).

Una población, no obstante que sus genes estén ligados, llegará al equilibrio, aunque para ello se requiera de un número mayor de generaciones de apareamiento aleatorio que en el caso de genes independientes; de hecho, entre más estén ligados los genes, mayor tiempo requerirá la población para alcanzar el equilibrio.

Implicaciones de genes en fase de repulsión

Se dice que dos genes están en estado de repulsión cuando el alelo dominante de un locus y el alelo recesivo de otro ocupan el mismo cromosoma (Allard, 1980).

Se sabe que el ligamiento reduce la frecuencia de gametos recombinantes, mas ligamiento menos recombinación, pero también depende de la fase en que se encuentren, cuando están en repulsión la frecuencia es mucho más baja comparado con los resultados de genes independientes, si se desea tener los homocigotos en un individuo se tendría que analizar una población muy grande. Por lo anterior, su determinación genética puede no ser precisa cuando no se considera esta condición en fase de repulsión.

En relación con el mapeo genético, se construyen a partir de la información de las frecuencias de recombinación, proveen información de la ubicación de los genes, el orden de los genes, la posición relativa y la distancia genética entre dos genes. Los genes en fase de repulsión presentan frecuencia baja de recombinación, y si la distancia genética entre dos genes se define como la frecuencia de recombinación, entonces la construcción del mapa genético de los genes ligados en fase de repulsión es laborioso y se requiere de una población grande para encontrar los individuos recombinantes.

En mejoramiento genético, hay implicaciones debido al bajo número de recombinantes y por la alteración en las frecuencias genotípicas esperadas bajo independencia (9:3:3:1), la selección se hace difícil para obtener individuos con los genes o características de interés, lo que tendería a disminuir la variabilidad genética. El desconocer este fenómeno lleva a evaluar población de tamaño pequeño, y consecuentemente no se logran identificar los genes de interés combinados en un mismo individuo, por lo que, con ligamento y para el mejoramiento genético, se requieren poblaciones lo suficientemente grandes para encontrar los genes combinados en un individuo.

Método para medir la magnitud del ligamiento

El grado de ligamiento se calcula con las frecuencias de recombinación entre los dos genes ligados usando la información de una población segregante; es decir, contando las proporciones en la F_2 de un cruzamiento entre los heterocigotos de la F_1 (Strickberger, 1976).

La frecuencia de recombinación proporciona una estimación o aproximación de la distancia física. Se puede decir que dos genes con una frecuencia de recombinación grande están probablemente más separados, mientras que con una frecuencia de recombinación pequeña probablemente están más juntos.

El grado de ligamiento se puede determinar siguiendo los pasos siguientes, considerando que el ligamiento sólo afecta la proporción de gametos producidos por los genotipos heterocigotos dobles, dependiendo de si se encuentran en las fases de acoplamiento o repulsión:

1. Se asignan los valores a_1 , a_2 , a_3 y a_4 a las cifras de las cuatro categorías de fenotipos de la F_2 de la siguiente forma:

$$\begin{array}{c}
 F_1 \times F_1 \\
 \downarrow \\
 F_2: AB(a_1):Ab(a_2):aB(a_3):ab(a_4)
 \end{array}$$

2. Si los heterocigotos de la F_1 estuviesen en fase acoplamiento, $AB/ab \times AB/ab$, calculándose la relación

$$\frac{a_2 \times a_3}{a_1 \times a_4}$$

3. Si los heterocigotos de la F_1 estuviesen en fase repulsión, $Ab/aB \times Ab/aB$, calculándose la relación:

$$\frac{a_1 \times a_4}{a_2 \times a_3} = Z$$

4. Se obtiene el valor de Z estimado en los pasos 2 y 3; posteriormente, mediante tablas se determina el porcentaje de recombinación de ese valor particular de Z según se haya utilizado la fase de acoplamiento o de repulsión, esto propuesto por Fisher y Balmukand (1928).

Objetivos

Objetivo general

- Caracterizar fenotípicamente y molecularmente de genotipos de trigo harinero a genes de resistencia a royas y de enanismo, con diferente nivel de resistencia a royas y estimar el ligamiento entre los genes *Lr67* y *Rht-D1*.

Objetivos específicos

- Caracterización molecular de la resistencia a roya de la hoja (*Puccinia triticina* E.), roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) y sus genes de enanismo *Rht-B1* y *Rh-D1* en 15 genotipos de trigo.
- Determinar la presencia o ausencia de los genes conocidos que confieren resistencia de planta adulta mediante marcadores moleculares y transferir el gen de resistencia a la roya de la hoja *Lr67* en genotipos de trigo susceptibles y que poseen el gen de enanismo *Rht-D1*.
- Determinar si existe algún impedimento genético para combinar los genes *Lr67* y el de enanismo *Rht-D1*.

Hipótesis

- Existirán genotipos de trigo que presentan resistencia a royas y genes de enanismo.
- La distancia genética entre el gen *Lr67* y el gen *Rht-D1* en el cromosoma 4DL es suficientemente grande para permitir la recombinación entre ambos genes.

LITERATURA CITADA

- Allard P. W. (1980) Principios de la Mejora Genética de las Plantas. 4ª ed. Omega. Barcelona, España. 498 p.
- Ellis M. H., W. Spielmeyer, K. R. Gale, G. J. Rebetzke and R. A. Richards (2002) “Perfect” markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 105:1038-1042, doi: 10.1007/s00122-002-1048-4
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016) FAOSTAT. Cultivos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma, Italia. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (Febrero 2018).
- Fisher, A. and Bhai Balmukand (1928) The estimation of linkage from the offspring of selfed heterozygotes. *Journal Genetics*. 20 : 79-92.
- Hiebert C. W., J. B. Thomas, B. D. McCallum, D. G. Humphreys, R. M. DePauw, M. J. Hayden, R. Mago, W. Schnippenkoetter and W. Spielmeyer (2010) An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher*6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*). *Theoretical and Applied Genetics* 121: 1083-1091, doi: [10.1007/s00122-010-1373-y](https://doi.org/10.1007/s00122-010-1373-y)
- Huerta, E. J. y R. P. Singh (2000) Las royas del trigo. *In*: El Trigo de Temporal en México. H. E. Villaseñor M., y E. Espitia R. (eds.). Libro Técnico Núm. 1. SAGAR. Campo Experimental Valle de México, CIRCE, INIFAP. Chapingo, Estado de México. pp: 231-251.

- Huerta-Espino J., R. P. Singh, S. Germán, B. D. McCallum, R. F. Park, W. Q. Chen, S. C. Bhardwaj and H. Goyeau (2011) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica* 179:143-60. [doi: 10.1007/s10681-011-0361-x](https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x)
- IWGSC, International Wheat Genome Sequencing Consortium (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345:1251788. doi: 10.1126/science.1251788
- Lumpkin T. A. (2015) How a gene from Japan revolutionized the world of wheat: CIMMYT's quest for combining genes to mitigate threats to global food security. *In: Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*. Y. Ogihara, S. Takumi and H. Handa (eds.). Springer. Tokyo. pp:13-20, doi: 10.1007/978-4-431-55675-6_2
- McIntosh R. A., J. Dubcovsky, W. J. Rogers, C. Morris and X. C. Xia (2017) MacGene 2017: catalogue of gene symbols for wheat. KOMUGI-Wheat Genetic Resource Database. National Bioresource Project. Kyoto, Japan. <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2017.pdf> (Noviembre 2018).
- Molina Galan J. D. (1992) Introducción a la genética de poblaciones y cuantitativa (algunas implicaciones en genotecnia). AGT editor, México. 349 p.
- Moore J. W., S. Herrera-Foessel, C. Lan, W. Schnippenkoetter, M. Ayliffe, J. Huerta-Espino, M. Lillemo, L. Viccars, R. Milne, S. Periyannan, X. Kong, W. Spielmeier, M. Talbot, H. Bariana, J. W. Patrick, P. Dodds, R. Singh and E. Lagudah (2015) A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* 47: 1494-1498, doi: 10.1038/ng.3439

Peng J., D. E. Richards, N. M. Hartley, G. P. Murphy, K. M. Devos, J. E. Flintham, J. Beales, L. J. Fish, A. J. Worland, F. Pelica, D. Sudhakar, P. Christou, J. W. Snape, M.D. Gale and N. P. Harberd (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400:256-261.

Peña B. R. J., P. Pérez H., H. E. Villaseñor M., M. M. Gómez V., M. A. Mendoza L. (2008) Calidad de la Cosecha de Trigo en México. Ciclo Primavera-Verano 2006. Publicación Especial. CONASIST-CONATRIGO. México, D.F. 28 p.

Roelfs A. P. and D. V. McVey (1972) Wheat stem rust races in the Yaqui Valley of Mexico during 1972. *Plant Disease Report* 56:1038-1039.

Shi Xiaoli, Hong-Qing Ling (2018) Current advances in genome sequencing of common wheat and its ancestral species. *The Crop Journal* 6:15-21, doi.org/10.1016/j.cj.2017.11.001.

Sial M. A., M. A. Arain, M. A. Javed and K. D. Jamali (2002) Genetic impact of dwarfing genes (Rht_1 and Rht_2) for improving grain yield in wheat. *Asian Journal of Plant Sciences* 1: 254-256.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2016) Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. Ciudad de México. http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp (Enero 2018)

Singh R. P., P. K. Singh, J. Rutkoski, D. P. Hodson, X. He, L. N. Jørgensen, M. S. Hovmøller and J. Huerta Espino (2016) Disease impact on wheat yield potential

and prospects of genetic control. Annual Review of Phytopathology 54:303-322,
[doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-095835](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095835)

Singh, R. P., J. Huerta Espino and S. Rajaram (2000) Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. 35: 133-139.

Singh R. P., D. P. Hodson, Y. Jin, J. Huerta-Espino, M. G. Kinyua, R. Wanyera, P. Njau and R. W. Ward (2006) Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 2006 1:1-13.

Singh R. P., S. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, S. Singh, S. Bhavani, C. Lan and B. R. Basnet (2014) Progress towards genetics and breeding for minor genes based resistance to Ug99 and other rusts in CIMMYT high-yielding Spring wheat. Journal of Integrative Agriculture 13:255-261, doi: 10.1016/S2095-3119(13)60649-8

Strickberger M. W. (1976) Genética. Omega. Barcelona, España. 847 p.

Villaseñor, M. H. E. 2000. Importancia del trigo. *In*: Villaseñor, M. H. E., y R. E. Espitia (eds). El Trigo de Temporal en México. Chapingo, Estado de México, México, SAGAR, INIFAP, CIRCE, CEVAMEX. Libro Técnico Núm. 1. pp: 7-22.

WHEAT, CGIAR Research Program on Wheat (2013) Wheat: vital grain of civilization and food security. CGIAR Research Program Wheat 2013 Annual Report. Consultative Group on International Agricultural Research. Mexico, D.F. 28p.

CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE GENOTIPOS DE TRIGO HARINERO CON DIFERENTES GENES DE RESISTENCIA A ROYAS Y DE ENANISMO

RESUMEN

Los genes de resistencia a royas con efectos pleiotrópicos son muy valiosos para el mejoramiento de la resistencia a enfermedades del cultivo del trigo harinero (*Triticum aestivum* L.). Los genes *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* y *Lr68* confieren resistencia parcial a todas las razas de roya de la hoja (*Puccinia triticina* E.), roya amarilla o lineal (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) y cenicilla polvorienta (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Este efecto combinado de genes es conocido como resistencia parcial, de planta adulta (APR), resistencia de raza no específica o durable y puede alcanzar casi inmunidad. Por otro lado, los genes de enanismo *Rht-B1* y *Rht-D1* fueron de suma importancia en la revolución verde, de tal forma que cuando se incorporaron a la planta del trigo, se lograron grandes avances en el desarrollo de variedades semi-enanas. El objetivo de este estudio fue determinar la resistencia a royas en 15 genotipos, mediante lecturas visuales de reacción en plántula, planta adulta y con marcadores moleculares de polimorfismo de nucleótido individual (SNP) asociados con los genes que confieren resistencia de planta adulta a roya de la hoja, roya amarilla y dos genes de enanismo (*Rht-B1* y *Rht-D1*). En estado de plántula el genotipo 'Sujata' fue resistente, el resto fueron susceptibles a ambas royas. En la evaluación molecular para los genes de resistencia a royas el genotipo 'Parula' fue positivo (presenta el alelo favorable) para tres genes de resistencia, 'Marroqui 588', 'Sujata', 'Yaqui 50' y 'Tordo' fueron positivos para al menos dos genes, 'Constitución', 'RL6077', 'Chapingo 53', 'Nasma', 'Yecora 70', 'Sonalika', 'Kanchan' y 'Pavon' uno. Los genotipos susceptibles 'Lalbahadur' y 'Apav' fueron negativos (no presentaron alelos favorables). En la evaluación para los genes de enanismo los genotipos 'Yecora 70' y 'Lalbahadur' fueron positivos para los dos genes *Rht-B1* y *Rht-D1*. Los genotipos que fueron positivos para el gen *Lr67* fueron negativos para los genes de enanismo y los genotipos que fueron positivos para *Lr46* fueron también positivos para el gen *Rht-D1*.

Palabras clave: *Triticum aestivum*, pleiotropismo, resistencia a royas, genes de enanismo

MOLECULAR AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF BREAD WHEAT WITH DIFFERENT LEVELS OF RUST RESISTANCE AND PLANT HEIGHT

ABSTRACT

The genes for resistance to rusts with pleiotropic effects are very valuable for the improvement of resistance to diseases of the wheat crop (*Triticum aestivum* L.). The resistance genes Lr34, Lr46, Lr67, and Lr68 confer partial resistance to all races of leaf rust (*Puccinia triticina* E.), linear or yellow rust (*Puccinia striiformis* f. SP. *tritici*), stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) and powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). This combined effect of genes is known as partial resistance, (APR), resistance, race non-specific or durable adult plant and can reach almost immunity. On the other hand, dwarfism Rht-B1 and Rht-D1 genes were important in the green revolution, so when they were introgressed onto the wheat plant, great advances in the development of semi-dwarf varieties were achieved. The objective of this study was to determine the resistance to rusts in 15 genotypes, through Visual readings of reaction in seedling, plant molecular markers of polymorphism, single nucleotide (SNP) associated with the genes that confer and adult resistance of adult plant rust leaf, stripe rust and two genes for dwarfism (Rht-B1 and Rht-D1). At seedling stage genotype 'Sujata' was tough, the rest were susceptible to both rusts. In the molecular evaluation for rust resistance genes 'Parula' genotype was positive (presents favorable allele) to three resistance genes, 'Marroqui 588', 'Sujata', 'Yaqui 50' and 'Tordo' were positive for at least two genes, 'Constitucion', 'RL6077', 'Chapingo 53', 'Nasma', 'Yecora 70', 'Sonalika', 'Kanchan' and 'Pavon' for one. The susceptible genotypes 'Lalbahadur' and 'Apav' were negative (not presented favorable alleles). In the evaluation for dwarfism genes 'Yecora 70' and 'Lalbahadur' genotypes were positive for two Rht-B1 and Rht-D1 genes. The genotypes that were positive for the gene Lr67 were negative for dwarf genes and genotypes that were positive for Lr46 were positive for the gene Rht-D1.

Key words: *Triticum aestivum*, pleiotropismo, rust resistance, dwarfism genes

1.1 INTRODUCCIÓN

En el cultivo de trigo las enfermedades causadas por hongos son las más comunes, dentro de las cuales, las royas son las de mayor distribución e importancia en el mundo, ya que provocan pérdidas en el rendimiento y calidad del grano (Singh *et al.*, 2016). La mayoría de las razas han evolucionado a través de mutaciones y la migración, que a través de las corrientes de aire y debido a los cambios de temperatura por el cambio climático han favorecido su diversidad patógena en todo el mundo (Huerta-Espino *et al.*, 2011a).

Se conoce una gran diversidad genética para la resistencia a la roya, donde la selección fenotípica y las nuevas técnicas moleculares han permitido obtener una resistencia más duradera y lograr una mayor y mejor producción del trigo (Singh *et al.*, 2016). La resistencia a las royas se puede clasificar en resistencia de raza específica, que regularmente es conferida sólo por un gen y se hereda de forma Mendeliana, y la resistencia de raza no específica, que es conferida por múltiples genes, en general de efectos aditivos, y la herencia del carácter es similar a una herencia cuantitativa (Li *et al.*, 2016).

Cuando un solo gen es responsable de los efectos fenotípicos en caracteres distintos se le da el nombre de efectos pleiotrópicos (Stansfield, 1984). Herrera-Foessel *et al.* (2014) y Moore *et al.* (2015) mencionan que los genes individuales que generan resistencia a múltiples patógenos; es decir, genes con efectos pleiotrópicos, son muy valiosos para el mejoramiento de la resistencia del trigo, como es el caso de los genes con distinta denominación *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Stb1/Ltn1*, *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39/Ltn2*, y *Lr67/Yr46/Sr55/Pm46/Ltn3*, que en combinaciones presentan resistencia parcial a todas las razas de roya de la hoja (*Puccinia triticina* E.), roya amarilla o lineal (*Puccinia*

striiformis f. sp. *tritici*), roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) y cenicilla polvorienta (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). El efecto de estos genes y en combinaciones de ellos, es también conocido como resistencia en planta adulta (APR), resistencia de raza no específica o resistencia durable. Otro ejemplo de efectos pleiotrópicos es el del gen *Sr2* de resistencia a la roya del tallo con efectos en roya amarilla (*Yr30*) y roya de la hoja, y ligado al gen que produce resistencia a la gluma negra de la espiguilla (*Pbc*) (Singh *et al.*, 2000b).

Dyck (1987) describió por primera vez el gen *Lr34*, designado anteriormente como *LrT2*, localizado en el cromosoma 7D en el cultivar 'Frontana'. El gen *Lr34* ha sido de gran importancia desde la revolución verde, ha permanecido durable por más de 50 años, se ha utilizado ampliamente en la desarrollo de nuevas variedades de trigo y fue el primer gen de APR clonado, lo que ha permitido desarrollar marcadores de ADN específicos y de diagnóstico que son usados para la selección asistida por marcadores (MAS) en trigo, permitiendo combinar *Lr34* con otros genes de interés (Singh y Huerta-Espino, 2003; Krattinger *et al.*, 2009 y 2011).

El gen *Lr46* es uno de los pocos genes con un fenotipo similar a *Lr34*, este gen se localiza en el cromosoma 1BL y fue reportado por primera vez en el genotipo 'Pavon 76' y ha sido efectivo desde su introducción en 1976 (Singh *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2001; Navabi *et al.*, 2003). El gen *Lr67* fue identificado en la accesión PI 250413 y se ubica en el cromosoma 4DL del trigo, también es fenotípicamente similar al gen de resistencia a roya de hoja *Lr34* (Hiebert *et al.*, 2010). Moore *et al.* (2015), mediante genómica comparativa, mutagénesis y la clonación del gen *Lr67*, identificaron el gen de resistencia *Lr67*, el cual codifica para un transportador de hexosa (*Lr67res*) y en

comparación con la forma susceptible, difiere de dicha proteína por dos aminoácidos (*Lr67sus*).

El genotipo 'Parula' presenta un alto nivel de resistencia a las royas en planta adulta, posee los genes *Lr34* y *Lr46*, además se ha identificado un gen desconocido al que se denominó *Lr68*, ubicado en el cromosoma 7BL (Herrera-Foessel *et al.*, 2012).

La combinación de diferentes genes de resistencia puede mejorar significativamente la resistencia a las royas (Li *et al.*, 2012; Randhawa *et al.*, 2018), e incluso casi alcanzar la inmunidad (Singh *et al.*, 2000a).

Durante la Revolución verde, los incrementos en el rendimiento se lograron por la introducción de los alelos de enanismo *Rht-B1* y *Rht-D*, así como de resistencia a enfermedades. En México los alelos favorables que proporcionan el enanismo *Rht-B1b* y *Rht-Db* están presentes en algunas variedades mexicanas semi-enanas, que desde los 1960s han permitido la producción de variedades con alto potencial de rendimiento y la resistencia a enfermedades (Huerta-Espino *et al.*, 2011b).

El mejoramiento genético convencional de trigo ha sido un método muy eficiente y amigable con el medio ambiente, en los últimos años se ha complementado para mejorar su eficacia y precisión con las estrategias biotecnológicas, las cuales permiten enfoques multifacéticos del mejoramiento. Al respecto, los marcadores moleculares son una herramienta para el análisis genético rápido y preciso de las plantas; en trigo permiten caracterizar los genotipos como progenitores potenciales para un cruzamiento más estratégico y enriquecer las poblaciones con alelos deseables (Dreisigacker *et al.*, 2016b; Lan *et al.*, 2017). La existencia de marcadores moleculares de diagnóstico como son los asociados con los genes *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* y *Sr2* permiten la selección

asistida para incorporar genes de resistencia a las royas, independientemente de los esquemas de cruzamiento utilizados, pero de manera más eficaz cuando se desea obtener combinaciones de genes que confieren resistencia de raza específica con genes que confieren resistencia de raza no específica o genes de resistencia efectivos en todas las etapas de crecimiento con aquellos que sólo confieren resistencia de planta adulta. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivos 1) determinar el tipo de resistencia a roya de la hoja y roya amarilla en 15 genotipos de trigo y 2) determinar la presencia o ausencia de los genes conocidos que confieren resistencia de planta adulta y los genes de enanismo mediante marcadores moleculares.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Material genético

En el ciclo primavera-verano 2015 se evaluaron los genotipos de trigo harinero 'Constitución', 'Marroqui 588', 'Sujata', 'RL6077', 'Yaqui 50', 'Chapingo 53', 'Yecora 70', 'Lalbahadur', 'Sonalika', 'Kanchan', 'Apav', 'Pavon 76', 'Parula', 'Tordo Deriv' y 'Nasma' en el Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades de Cereales (LANAREC) y el campo experimental del INIFAP-CEVAMEX, con respecto a su resistencia a roya de la hoja (*Puccinia triticina*) y roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*).

1.2.2 Evaluación en plántula

La semilla de cada uno de los 15 genotipos de trigo se sembró en charolas de plástico de 30 × 20 × 6 cm, con sustrato de una mezcla 1:1 de tierra y peat moss. Con una plancha de acero se marcaron 48 orificios de 1 cm de diámetro × 2 cm de profundidad. De cada genotipo se colocaron 4 semillas; después de etiquetadas las

charolas, se colocaron en invernadero a una temperatura de 18 ± 2 °C durante la noche y 20 ± 2 °C en el día (Figura 2).



Figura 2. A) siembra en charolas, B) inoculación de plántulas, C) acondicionamiento de cámara húmeda con humidificador y D) Generación de rocío.

1.2.3 Inoculación del patógeno en plántula

Las plántulas se inocularon 10 días después de la siembra mediante aspersión foliar; la primera charola se asperjó con la suspensión de urediniosporas en aceite mineral Sotrol®170 de la raza MEX14.191 de roya amarilla; la segunda charola con la raza MBJ/SP de roya de la hoja (Figura 2 B); posteriormente, se dejaron secar las plántulas por 20 min y se colocaron en cámara húmeda acondicionada con un humidificador por 16 horas a 100 % de humedad relativa para generar punto de rocío (Figura 2C y 2D). Después, las plántulas se trasladaron al invernadero donde se mantuvieron entre 20 y 24 °C, hasta la aparición de los signos de la enfermedad.

1.2.4 Evaluación de la reacción en plántula

Cuando se presentó la roya de 9 a 10 días después de la inoculación se realizaron lecturas visuales para evaluar la reacción en estado de plántula utilizando las escalas propuestas por Roelfs *et al.* (1992) de 0 a 4 para la roya de la hoja y de 0 a 9 para roya amarilla (McNeal *et al.*, 1971).

1.2.5 Evaluación en planta adulta

Se sembró por separado un ensayo para roya de la hoja y otro para roya amarilla, cada ensayo estuvo integrado por un surco de 1 metro para cada genotipo sin repetición; en los bordes de cada ensayos se sembró una mezcla de genotipos susceptibles para cada roya con el fin de tener una fuente de inóculo (Figuras 3A y 3C).

1.2.6 Inoculación del patógeno en planta adulta

Se realizaron tres inoculaciones artificiales en el campo, asperjados con un atomizador manual por medio de una suspensión de urediniosporas de los aislamientos en aceite mineral Sotrol[®]170 con la raza MBJ/SP de roya de la hoja en el primer ensayo con su fórmula de avirulencia/virulencia 3bg, 10, 11,15, 17, 23, 27+31/ 2a, 2b, 2c, 18, 26, 28 (Villaseñor-Espín *et al.*, 2003) y la raza MEX14.191 de roya amarilla para el segundo ensayo con la siguiente fórmula de avirulencia/virulencia: Yr1, P0ll/Yr2, 6, 7, 8, 9, 17, 27, 31, 32, A (Huerta-Espino, Com. Pers.)¹ (Figura 3B).

¹ Julio Huerta Espino, Fitomejorador, Programa de trigo, CEVAMEX, INIFAP.

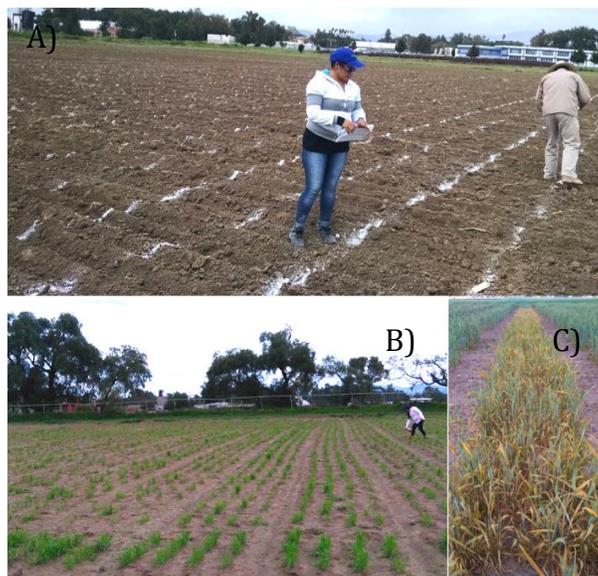


Figura 3. A) siembra en campo (1surco de 1 m), B) inoculación artificial con atomizador manual, C) borde de genotipo susceptible de roya amarilla como inoculo

1.2.7 Evaluación de la reacción en planta adulta

Se evaluó la respuesta a la resistencia en planta adulta cuando algunos de los genotipos mostraron altos niveles de infección ($\geq 80\%$). Para la lectura de la severidad de roya de la hoja en planta adulta se utilizó la escala modificada de Cobb (Peterson *et al.*, 1948) y roya amarilla de acuerdo con Masahiro *et al.* (2018, Com. Pers.)². La reacción en planta adulta tanto a roya de la hoja como a roya amarilla fue de acuerdo con Roelfs *et al.* (1992). Dónde: R = Resistente, MR = Moderadamente resistente, M = MRMS Moderadamente resistente a moderadamente susceptible, MS= Moderadamente susceptible y S = Susceptible.

² Masahiro Kishii's, Investigador, Centro Intenacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT.

1.2.8 Análisis molecular

El análisis molecular se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología del programa de Mejoramiento Molecular del Trigo en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Los 15 genotipos se evaluaron con los marcadores tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Lr34_TCCIND para el gen *Lr34*, Lr47-1 para el gen *Lr46*, csSNP856 para el gen *Lr67* y el marcador Lr68-2 para el gen *Lr68*; para los genes de enanismo los marcadores fueron Rht-B1_SNP para el gen *Rht-B1* y Rht-D1_SNP para *Rht-B1* (Dreisigacker *et al.*, 2016a).

Se colectaron pequeñas porciones del tejido foliar y se colocaron en tubos de 1.1 mL en placas de 96 pozos llenando sólo la mitad de cada tubo; posteriormente, se almacenaron en un congelador a -80 °C por 3 h y se transfirieron a un liofilizador (Labconco®) manteniendo la temperatura a -50 °C y un nivel de vacío de 0.0 a 0.120 mbar por 48 horas; se procedió a moler el tejido colocando balines de 4 mm y utilizando un molino (GenoGrinder 2010®) por 2 o 3 min hasta obtener el tejido en polvo. La extracción (Figura 4A y 4B), cuantificación y valoración de la calidad del ADN (Figura 4 C) se realizó de acuerdo con los protocolos de laboratorio y aplicaciones para trigo descritos por Dreisigacker *et al.* (2016a).

Se utilizó la tecnología de genotipificación Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system (KASPar™; LGC Genomics), integrada por dos componentes, la KASP Assay Mix, que es específica para cada SNP y la KASP Master Mix, donde se utilizaron dos muestras control para los siguientes subcomponente: FAM (alelo resistente), VIC (alelo susceptible), HET (heterocigotos) y dos muestras de agua (NTC), se ejecutó con la temperatura de amplificación más favorable de acuerdo con las

condiciones de cada SNP (Dreisigacker *et al.*, 2016a). La lectura de las placas del producto de PCR se realizó en lector de placas fluorescentes BMG Pherastar Plus (Figura 4D); para la visualización geográfica de datos genotípicos (cluster plots) se utilizó el Software KlusterCaller™(LGCGenomics), se designan como positivo a los datos genotípicos que portan el alelo de favorable para resistencia a roya o enanismo y como negativos a los datos genotípicos que no portan el alelo.

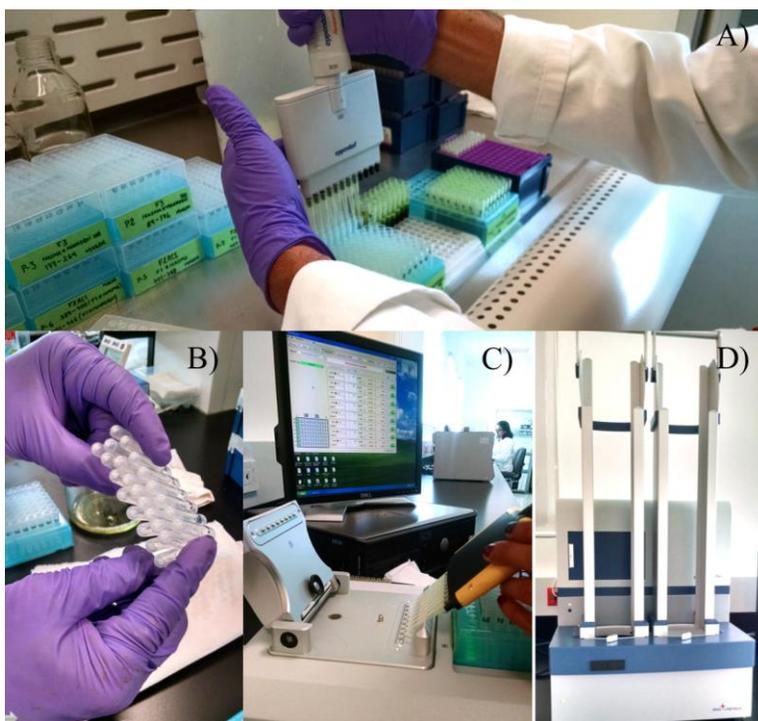


Figura 4. A) extracción de ADN, B) sedimentación de ADN, C) cuantificación y calidad de ADN con espectrómetro NanoDrop 8000, y D) lector de placas fluorescentes BMG Pherastar Plus.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los genotipos evaluados fueron susceptibles a roya de la hoja en estado de plántula y con el valor máximo de la escala 0 a 4 (Cuadro 1; Figura 5), lo que significa no expresión génica o ausencia de genes que posean resistencia en plántula en

ninguna de las variedades evaluadas. Con respecto a roya amarilla, excepto el genotipo 'Sujata' que fue resistente en estado de plántula con un valor escalar entre 1 y 2, el resto de los genotipos tuvo valores entre 7 y 9; es decir, altamente susceptibles a la raza MEX14.191 (Figura 6). Este resultado explica los altos niveles de resistencia que esta variedad muestra en condiciones de campo. Lan *et al.* (2015) encontraron resistencia en etapa de plántula y planta adulta en el genotipo 'Sujata' e identificaron el gen *YrSuj* de resistencia a roya amarilla en la posición cromosómica QLr.cim-7BL; sin embargo, co-localizaron en el mismo cromosoma cuatro genes de resistencia, *Yr39*, *Yr52*, *Yr59* y *Yr67*, donde el tipo de infección de *YrSuj* es similar a *Yr67*, por lo que el efecto de resistencia puede deberse a efectos pleiotrópicos sobre la roya de la hoja u otro gen que esté estrechamente ligado. Estos mismos autores mencionan que 'Sujata' es resistente a roya de la hoja y amarilla en etapa adulta, debido a que posee dos genes APR con efectos pleiotrópicos *Lr46/Yr29* y *Lr67/Yr46*.

Los SNP's asociados a los genes *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* y *Lr68* permitieron identificar los genotipos con el gen de resistencia a roya de la hoja y los genes de enanismo. En el caso particular del genotipo 'Parula', los marcadores para *Lr34*, *Lr46*, *Lr68* y *Rht-D1* fueron positivos (Cuadros 1 y 2, Figura 7 A-C); la combinación de esto tres genes dieron como resultado un genotipo casi inmune a las tres royas. Con respecto a 'Parula', Herrera-Foessel *et al.* (2012) encontraron que éste posee un alto nivel de resistencia en planta adulta (APR), debido a la presencia de los genes *Lr34*, *Lr46* y *Lr68*, localizados en los cromosomas 7DS, 1BL y 7BL, respectivamente. El genotipo 'Tordo' fue positivo para los marcadores asociados con *Lr34*, *Lr46* y *Rht-D1* (Cuadro 2, Figura 7A y B).

Cuadro 1. Respuesta de 15 genotipos a la roya de la hoja raza MBJ/SP y roya amarilla raza MEX14.191 en estado de plántula en el invernadero y planta adulta en el campo

Genotipo	Roya de la hoja (Lr)		Roya de amarilla (Yr)	
	Plántula	Planta adulta	Plántula	Planta adulta
Parula	4	5R	7	5M
Marroqui 588	4	5R	7	10R
Sujata	4	0	2	0
Yaqui 50	4	10R	7	20M
Tordo	4	5MS	7	10M
Constitucion	4	20MR	7	40MS
RL6077	4	10MR	7	5M
Chapingo 53	4	0	7	20M
Nasma	4	50S	7	40MS
Yecora 70	4	60S	7	80S
Sonalika	4	80S	7	60S
Kanchan	4	10R	7	20M
Pavon 76	4	10R	8	20M
Apav	4	80S	7	100S
Lalbahadur	4	90S	7	60M

Tipos de infección de plántula a roya de la hoja con base a la escala de Roelfs *et al.* (1992); y roya amarilla de acuerdo con McNeal *et al.* (1971). La lectura de planta adulta de roya de la hoja utilizando la escala modificada de Cobb (Peterson *et al.*, 1948) y roya amarilla de acuerdo con Masahiro *et al.*, 2018 (comunicación personal)². La reacción en planta adulta tanto a roya de la hoja como a roya amarilla es de acuerdo con Roelfs *et al.* (1992), donde: R = resistente, MRMS = moderadamente resistente a

moderadamente susceptible, MR = moderada resistencia, MS = moderada susceptibilidad y S = susceptible.

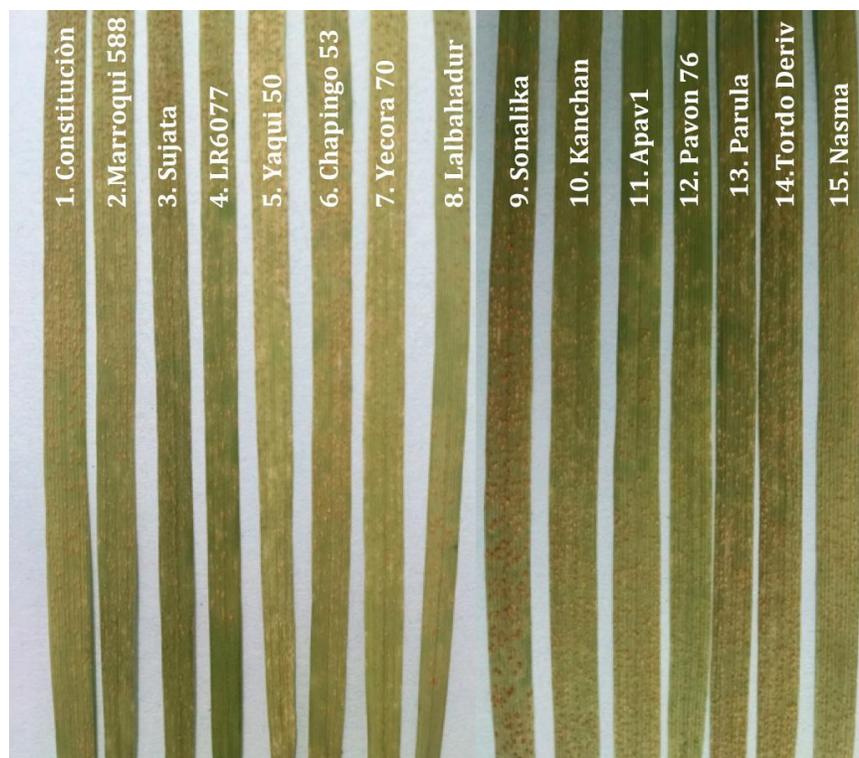


Figura 5. Caracterización de resistencia a roya de la hoja en plántula

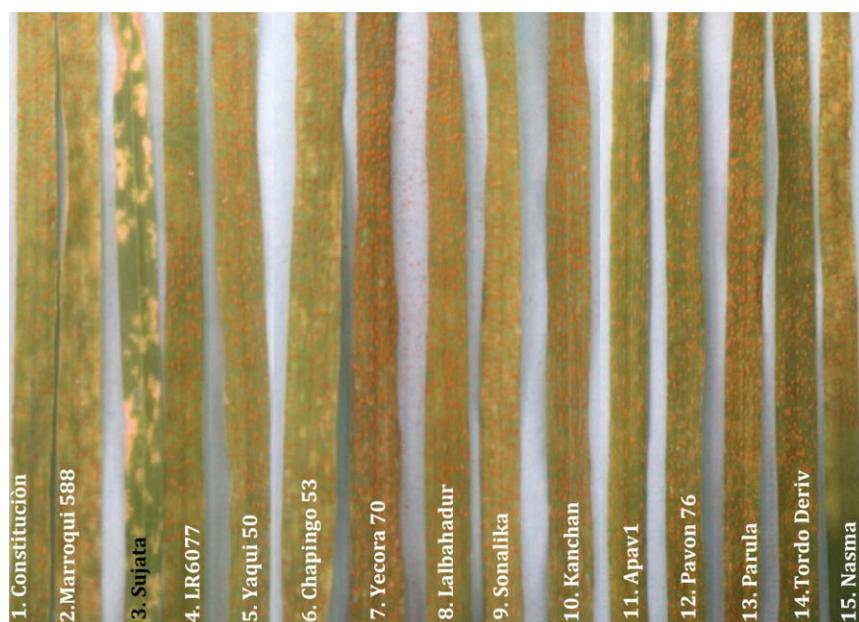


Figura 6. Caracterización de resistencia a roya amarilla en plántula

Los genotipos 'Marroqui 588', 'Sujata' y 'Yaqui 50' fueron positivos para los marcadores asociados con los genes *Lr67* y *Lr46* y no presentan ningún gen de enanismo (Cuadro 2, Figura 7 B y C). Por otro lado, los genotipos 'Constitución', 'RL6077' y 'Chapingo 53' fueron positivos al marcador asociado con el gen *Lr67* y no presentaron ninguna combinación con genes de enanismo (Cuadro 2, Figura 7 C), la presencia de este alelo ha proporcionado una reducción promedio del 41% en la severidad de la roya del tallo en comparación con las variedades que carecen de este alelo (Herrera-Foessel *et al.*, 2014), mientras que 'Nasma', 'Sonalika', 'Kanchan' 'Pavon' y 'Yecora 70' fueron positivos para el marcador asociado con el gen *Lr46*, los primeros cuatro portan el alelo *Rht-D1* y sólo 'Yecora 70' fue positivo para los dos genes de enanismo *Rht-B1* y *Rht-D1* (Cuadro 2, Figura 7 B). 'Lalbahadur' fue positivo para los dos genes de enanismo y 'Apav' sólo el gen *Rht-B1*, pero fueron negativos para todos los marcadores de roya de la hoja, lo que concuerda con su alta susceptibilidad a la roya de la hoja (Cuadros 1 y 2); sin embargo, 'Lalbahadur' no es 100% susceptible a la roya amarilla, lo que indica que esta variedad posee un gen de resistencia de raza específica (*Yr60*) con niveles intermedios. Herrera-Foessel *et al.* (2015) mencionan que cuando el testigo susceptible Avocet alcanza niveles de 90-100% de infección a roya amarilla, *Yr60* muestra severidades que van de 20 a 60% en el campo, dependiendo de lugar, año y el tiempo cuando se determinan los niveles de infección.

De acuerdo con los marcadores moleculares, el alelo de mayor frecuencia entre las variedades fue *Lr46* (10 de 15 genotipos) esto puede deberse a la asociación imperfecta del marcador con el carácter (Kankwatsa *et al.*, 2017), por lo que puede dar

falsos positivos con excepción de 'Parula', seguido por *Lr67* (6 de 15 genotipos), *Lr34* (2 de 15 genotipos) y *Lr68* (1 de 15 genotipos) (Cuadro 2, Figura 7 A-D). La combinación *Lr34/Lr67* no fue identificada en ninguno de los genotipos y hasta ahora no se ha reportado esta combinación en ninguna variedad cultivada en México o en el mundo. No se tuvo ninguna combinación (*Rht-B1b/Lr67res*, *Rht-D1b/Lr67res* o *Rht-B1b/Rht-D1b/Lr67res*) de los genotipos que portara alguno de los alelos de enanismo con el gen de resistencia a roya de la hoja *Lr67* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Marcadores de Polimorfismo de Nucleótido Individual (SNP) encontrados positivos en los diferentes genotipos de trigo evaluados

Genotipo	Marcadores de SNP específicos					
	Lr34_TCCIND	Lr47-1	csSNP856	Lr68-2	Rht-B1	Rht-D1
Parula	<i>Lr34</i>	<i>Lr46</i>	-	<i>Lr68</i>	-	<i>Rht-D1</i>
Marroqui 588	-	<i>Lr46</i>	<i>Lr67</i>	-	-	-
Sujata	-	<i>Lr46</i>	<i>Lr67</i>	-	-	-
Yaqui 50	-	<i>Lr46</i>	<i>Lr67</i>	-	-	-
Tordo	<i>Lr34</i>	<i>Lr46</i>	-	-	-	<i>Rht-D1</i>
Constitucion	-	-	<i>Lr67</i>	-	-	-
RL6077	-	-	<i>Lr67</i>	-	-	-
Chapingo 53	-	-	<i>Lr67</i>	-	-	-
Nasma	-	<i>Lr46</i>	-	-	-	<i>Rht-D1</i>
Yecora 70	-	<i>Lr46</i>	-	-	<i>Rht-B1</i>	<i>Rht-D1</i>
Sonalika	-	<i>Lr46</i>	-	-	-	<i>Rht-D1</i>
Kanchan	-	<i>Lr46</i>	-	-	-	<i>Rht-D1</i>
Pavon 76	-	<i>Lr46</i>	-	-	-	<i>Rht-D1</i>
Apav	-	-	-	-	<i>Rht-B1</i>	-
Lalbahadur	-	-	-	-	<i>Rht-B1</i>	<i>Rht-D1</i>

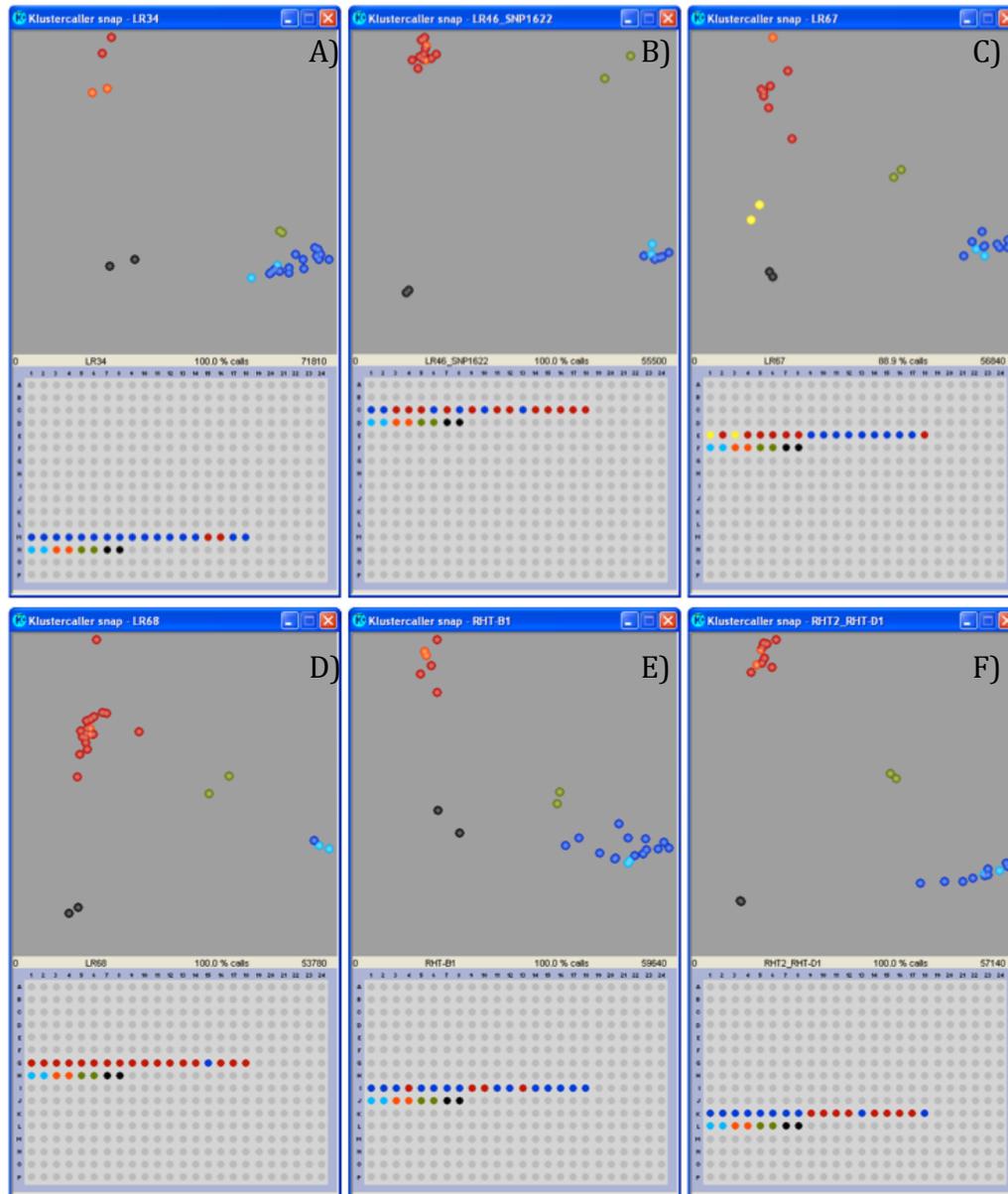


Figura 7. Visualización geográfica de los resultados en los 15 genotipos A) KASP Assay Lr34_TCCIND los puntos coloreados en rojo portan el alelo de resistencia a *Lr34*, en azul portan el alelo susceptible, en verde son heterocigóticas y los puntos negros representan NTC, B) KASP Assay Lr47-1 los puntos coloreados en rojo portan el alelo de resistencia a *Lr46*, en azul portan el alelo susceptible, en verde son

heterocigóticas y los puntos negros representan NTC, C) KASP Assay csSNP856 los puntos coloreados en rojo portan el alelo de resistencia a *Lr67*, en azul portan el alelo susceptible, en verde son heterocigóticas, los puntos negros representan NTC y los puntos en amarillo no amplificaron, D) KASP Assay Lr68-2 los puntos azules portan el alelo de resistencia a *Lr68*, los punto rojos portan el alelo susceptible, en verde son heterocigóticas y los puntos negros representan NTC, E) KASP Assay Rht-B1 los puntos rojos portan el alelo de enanismo *Rht-B1*, el punto azul no portan el alelo de enanismo, en verde son heterocigóticas y los puntos negros representan NTC y E) KASP Assay Rht-D1 los puntos rojos portan el alelo de enanismo *Rht-D1*, los puntos azules no portan el alelo de enanismo, en verde son heterocigóticas y los puntos negros representan NTC.

La caracterización de los genotipos de este estudio permitió conocer la presencia o ausencia de los alelos favorables de resistencia de planta adulta (APR); contar con esta información es de gran valor, ya que asegura la creación de genotipos con una resistencia confiable y duradera contra las royas; a su vez, genera información para establecer un programa de mejoramiento genético para obtener variedades con resistencia a royas.

Es posible incrementar el nivel de resistencia en las futuras variedades de trigo y alcanzar casi inmunidad si, por ejemplo, se usa el progenitor 'Parula' que posee los genes *Lr34*, *Lr46* y *Lr68* con cualquiera de las líneas que poseen *Lr67* y si no existe impedimento entre el *Lr67* y *Rht-D1b*, con estos cuatro genes y otros de efectos más pequeños se podría alcanzar casi inmunidad, como lo indican Singh *et al.* (2000a) y se

podría asegurar la presencia de estos cuatro genes en un mismo genotipo mediante la selección asistida por marcadores moleculares.

Por otra parte, la utilización de marcadores moleculares tiene grandes ventajas, una de ellas es obtener resultados rápidos. En el presente estudio, en el cual se analizaron 15 genotipos, se pudo corroborar la importancia de la combinación entre el mejoramiento convencional y el asistido por marcadores moleculares, al identificar genotipos con los alelos favorables de resistencia a royas y enanismo y reducir considerablemente el tiempo de análisis, ya que el estudio molecular permitió caracterizar los genotipos en estado de plántula, lo cual fue consistente con la resistencia que mostraron en planta adulta. Aun cuando una de las limitantes es el alto costo de la selección asistida con marcadores, el estudio realizado por Kuchel *et al.* (2005) con un enfoque genético y económico, mencionan que la incorporación de estas herramientas no sólo incrementan la ganancia genética, sino que reduce el costo general en un 40% obteniendo resultados confiables y rápidos.

1.4 CONCLUSIONES

En la evaluación en plántula de roya de la hoja todas las variedades fueron susceptibles, lo que indica que la resistencia a esta raza es de planta adulta. En la evaluación para roya amarilla en plántula sólo el genotipo 'Sujata' fue resistente. Ningún cultivar presentó juntos los cuatro genes de resistencia APR (*Lr34/Lr46/Lr67/Lr68*); 'Parula' presentó la combinación *Lr34/Lr46/Lr68*; 'Marroqui 588', 'Sujata', 'Yaqui 50' (*Lr34/Lr67*) y 'Tordo' (*Lr34/Lr46*); 'Constitución', 'RL6077', 'Chapingo 53' (*Lr67*), 'Nasma', 'Yecora 70', 'Sonalika', 'Kanchan' y 'Pavon' (*Lr46*). 'Yecora 70' y 'Lalbahadur' fueron positivos para los dos alelos de enanismos *Rht-B1* y *Rht-D1*, los

genotipos que sólo presentaron *Lr46* fueron positivos para el alelo *Rht-D1*. Ninguno de los genotipos positivos para el gen *Lr67* presentó algún alelo de enanismo.

El uso de herramientas moleculares en trigo permite realizar la caracterización de los genotipos y posibilita el uso de la selección asistida con marcadores moleculares en el proceso de mejoramiento.

1.5 LITERATURA CITADA

- Dreisigacker S., D. Sehgal, A. E. Reyes J., B. Luna G., S. Muñoz Z., C. Núñez R., J. Mollins and S. Mall (2016a) CIMMYT Wheat Molecular Genetics: Laboratory Protocols and Applications to Wheat Breeding. CIMMYT. Mexico, D. F. 142 p.
- Dreisigacker S., S. Sukumaran, C. Guzmán C., X. He, C. Lan, D. Bonnett and J. Crossa (2016b) Molecular marker-based selection tools in Spring bread wheat improvement: CIMMYT experience and prospects. *In: Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement*. Vol. 11. Sustainable Development and Biodiversity, V. Rajpal, S. Rao and S. Raina (eds.). Springer International Publishing. Cham, Switzerland. pp: 421-474, [doi: 10.1007/978-3-319-27090-6_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27090-6_16)
- Dyck P. L. (1987) The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Genome* 29:467-469, doi: 10.1139/g87-081
- Herrera-Foessel S. A., R. P. Singh, J. Huerta-Espino, G. M. Rosewarne, S. K. Periyannan, L. Viccars, V. Calvo-Salazar, C. Lan and E. S. Lagudah (2012) *Lr68*: a

new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 124:1475-1486, doi: 10.1007/s00122-012-1802-1

Herrera-Foessel, S. A., R. P. Singh, M. Lillemo, J. Huerta-Espino, S. Bhavani, S. Singh, C. Lan, V. Calvo-Salazar and E. S. Lagudah (2014) *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 127: 781-789, doi: 10.1007/s00122-013-2256-9

Herrera-Foessel S. A., R. P. Singh, C. X. Lan, J. Huerta-Espino, V. Calvo-Salazar, U. K. Bansal, H. S. Bariana and E. S. Lagudah (2015) *Yr60*, a gene conferring moderate resistance to stripe rust in wheat. *Plant Disease* 99:508-511, doi: 10.1094/PDIS-08-14-0796-RE

Hiebert C. W., J. B. Thomas, B. D. McCallum, D. G. Humphreys, R. M. DePauw, M. J. Hayden, R. Mago, W. Schnippenkoetter and W. Spielmeyer (2010) An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher*6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*). *Theoretical and Applied Genetics* 121:1083-1091, doi: [10.1007/s00122-010-1373-y](https://doi.org/10.1007/s00122-010-1373-y)

Huerta-Espino J., R. P. Singh, S. Germán, B. D. McCallum, R. F. Park, W. Q. Chen, S. C. Bhardwaj and H. Goyeau (2011a) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica* 179:143-60, doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x

Huerta-Espino J., H. E. Villaseñor-Mir, E. Espitia-Rangel, E. Solis-Moya and M. van Ginkel. (2011b) History of wheat breeding in Mexico. *In: The World Wheat Book. Vol. 2. A History of Wheat Breeding.* A. P. Bonjean, W. J. Angus and M. van Ginkel (eds.). Lavoisier Publishing. Paris. pp:275-308.

Kankwatsa, P., D. Singh, P. C. Thomson, E. M. Babiker, J. M. Bonman, M. Newcomb,

- R. F. Park (2017) Characterization and genome-wide association mapping of resistance to leaf rust, stem rust and stripe rust in a geographically diverse collection of spring wheat landraces. *Molecular Breeding* 37: 113. doi.org/10.1007/s11032-017-0707-8
- Krattinger S. G., E. S. Lagudah, W. Spielmeyer, R. P. Singh, J. Huerta-Espino, H. McFadden, E. Bossolini, L. L. Selter and B. Keller (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323:1360-1363, doi: 10.1126/science.1166453
- Krattinger S. G., E. S. Lagudah, T. Wicker, J. M. Risk, A. R. Ashton, L. L. Selter, T. Matsumoto and B. Keller (2011) *Lr34* multi-pathogen resistance ABC transporter: molecular analysis of homoeologous and orthologous genes in hexaploid wheat and other grass species. *The Plant Journal* 65:392-403, doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04430.x
- Kuchel H., G. Ye, R. Fox and S. Jefferies (2005) Genetic and economic analysis of a targeted marker-assisted wheat breeding strategy. *Molecular Breeding* 16:67-78, doi: 10.1007/s11032-005-4785-7
- Lan C., M. S. Randhawa, J. Huerta-Espino and R. P. Singh (2017) Genetic analysis of resistance to wheat rusts. *In: Wheat Rust Diseases Methods and Protocols*. S. Periyannan (ed.). Humana Press. New York. pp:137-149, doi: 10.1007/978-1-4939-7249-4
- Lan C., Y. Zhang, S. A. Herrera-Foessel, B. R. Basnet, J. Huerta-Espino, E. S. Lagudah and R. P. Singh (2015) Identification and characterization of pleiotropic

- and co-located resistance loci to leaf rust and stripe rust in bread wheat cultivar Sujata. *Theoretical and Applied Genetics* 128:549-561, doi: 10.1007/s00122-015-2454-8
- Li T., G. H. Bai and S. L. Gu (2012) A combination of leaf rust resistance gene *Lr34* and lesion mimic gene *lm* significantly enhances adult plant resistance to *Puccinia triticina* in wheat. *Chinese Science Bulletin* 57:2113-2119, doi: 10.1007/s11434-012-5001-x
- Li H., S. Singh, S. Bhavani, R. P. Singh, D. Sehgal, B. R. Basnet, P. Vikram, J. Burgueno-Ferreira and J. Huerta-Espino (2016) Identification of genomic associations for adult plant resistance in the background of popular South Asian wheat cultivar, PBW343. *Frontiers in Plant Science* 7:1674, doi: 10.3389/fpls.2016.01674
- Martinez F., R. E. Nicks, R. P. Singh and D. Rubiales (2001) Characterization of *Lr46*, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas* 135:111-114.
- Moore J. W., S. Herrera-Foessel, C. Lan, W. Schnippenkoetter, M. Ayliffe, J. Huerta-Espino, M. Lillemo, L. Viccars, R. Milne, S. Periyannan, X. Kong, W. Spielmeyer, M. Talbot, H. Bariana, J. W. Patrick, P. Dodds, R. Singh and E. Lagudah (2015) A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* 47: 1494-1498. doi:10.1038/ng.3439
- McNeal F. H., C. F. Konzak, E. P. Smith, W. S. Tate and T. S. Russell (1971) A Uniform System for Recording and Processing Cereal Research Data. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. Washington, D. C. 42 p.
- Navabi A., R. P. Singh, J. P. Tewari and K. G. Briggs (2003) Genetic analysis of adult-

- plant resistance to leaf rust in five spring wheat genotypes. *Plant Disease* 87:1522-1529.
- Peterson R. F., A. B. Campbell and A. E. Hannah (1948) A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Canadian Journal of Research* 26c:496-500, doi: 10.1139/cjr48c-033
- Randhawa M. S., C. Lan, B. R. Basnet, S. Bhavani, J. Huerta-Espino, K. L. Forrest, M. J. Hayden and R. P. Singh (2018) Interactions among genes *Sr2/Yr30*, *Lr34/Yr18/Sr57* and *Lr68* confer enhanced adult plant resistance to rust diseases in common wheat (*Triticum aestivum* L.) line 'Arula'. *Australian Journal of Crop Science* 12:1023-1033, doi: 10.21475/ajcs.18.12.06.PNE1305
- Roelfs A. P., R. P. Singh y E. E. Saari (1992) *Las Royas del Trigo: Conceptos y Métodos para el Manejo de esas Enfermedades*. CIMMYT. México, D.F. 81 p.
- Singh R. P., A. Mujeeb-Kazi and J. Huerta-Espino (1998) *Lr46*: a gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88:890-894.
- Singh R. P. and J. Huerta-Espino (2003) Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. *Euphytica* 129:371-376, doi: [10.1023/A:102221632793](https://doi.org/10.1023/A:102221632793)
- Singh, R. P., J. Huerta Espino and S. Rajaram (2000a) Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 35: 133-139.
- Singh R. P., J. C. Nelson and M. E. Sorrells, (2000b) Mapping of *Yr28* and other genes for resistance to stripe rust in wheat. *Crop Science* 40(4):1148–1155.

Singh R. P., P. K. Singh, J. Rutkoski, D. P. Hodson, X. He, L. N. Jørgensen, M. S. Hovmøller and J. Huerta-Espino. (2016) Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control. *Annual Review of Phytopathology* 54:303-322. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-095835

Stansfield W. D. (1984) Teoría y problemas de genética. Segunda edición, Ed. McGraw-Hill Inc., U.S.A. 405 p.

Villaseñor-Espín. O. M., J. Huerta-Espino, S. G. Leyva-Mir, E. VillaseñorMir y E. Espitia-Rangel (2003) Análisis de virulencia de la roya de la hoja (*Puccinia triticina* Eriks.) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en los Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:56-62.

CAPÍTULO II. RELACIÓN ENTRE EL GEN *Lr67* DE ROYA DE LA HOJA Y EL GEN DE ENANISMO *Rht-D1* DEL TRIGO

RESUMEN

El gen *Lr67*, localizado en el cromosoma 4D confiere resistencia a la roya de la hoja causada por *Puccinia triticina* E. Este gen fue común en las variedades de trigo de porte alto liberadas en México hasta antes de 1960, no así en las variedades semi enanas liberadas desde esa fecha hasta el presente. Las variedades semi enanas de trigo liberadas en México poseen el alelo de enanismo *Rht-B1b*, localizado en el cromosoma 4B o el alelo *Rht-D1b*, localizado en el cromosoma 4D. Con el fin de investigar la existencia de algún impedimento genético que no permita tener los alelos favorables *Lr67* y *Rht-D1* en la misma variedad de trigo, se procedió a caracterizar genóticamente la F₃ de la cruce entre la variedad 'Nasma' que posee el alelo *Rht-D1* con la variedad 'Marroqui 588' poseedora del alelo *Lr67*. Mediante pruebas de Ji-cuadrada y marcadores moleculares de diagnóstico en el cromosoma 4D, se encontró que la distancia genética entre ambos genes, con análisis de ligamiento es de 22 cM y con el análisis molecular de 27 cM. Estas distancias son lo suficientemente grandes para que exista recombinación genética, por lo que no hay ningún impedimento genético para obtener genotipos recombinantes que combinen la resistencia a roya de la hoja (*Lr67*) con el porte bajo de planta (*Rht-D1*), mismos que en los progenitores se encuentran en fase de repulsión.

Palabras clave: distancia genética, recombinación, *T. aestivum*.

RELATIONSHIP BETWEEN THE LEAF RUST RESISTANCE GENE *Lr67* THE DWARFING GENE *Rht-D1*

ABSTRACT

The gene *Lr67*, located on chromosome 4D, confers resistance to leaf rust caused by *Puccinia triticina* E. This gene was common in tall wheat varieties released in Mexico before 1960, but not in semi-dwarf varieties released from that date to the present. Semi-dwarf wheat varieties released in Mexico carry the dwarfing allele *Rht-B1b*, located on chromosome 4B or the allele *Rht-D1b*, located on chromosome 4D. In order to investigate whether there is a genetic impediment that does not allow having the *Lr67* and *Rht-D1b* alleles in the same variety of wheat, we proceeded to genetically characterize the F₃ generation of the cross 'Nasma' which carries the *Rht-D1* gene and 'Marroqui 588' which carries the *Lr67* gene. Through Chi-square tests and diagnostic molecular markers on chromosome 4D, a genetic distance of 22 cM between both genes was found by using linkage analysis, and 27 cM using molecular markers. Such genetic distances are large enough for genetic recombination; therefore, there is no genetic impediment to obtain recombinant genotypes that combine leaf rust resistance gene (*Lr67*) with low height plant gene (*Rht-D1*), which in the parents are in repulsion phase.

Keywords: genetic distance, recombination, *T. aestivum*.

2.1 INTRODUCCIÓN

La producción mundial de trigo es afectada por plagas y enfermedades que reducen

el rendimiento y la calidad del grano, entre las enfermedades, las royas causadas por hongos son las que históricamente han causado grandes pérdidas económicas, a pesar de los esfuerzos de obtener cultivares con resistencia genética y del uso intenso de productos químicos (Singh *et al.*, 2016).

De las tres royas que atacan al trigo: roya de la hoja (*Puccinia triticina* E.) del tallo (*P. graminis* f. sp. *tritici*) y amarilla (*P. striiformis* f. sp. *tritici*), la primera es la enfermedad con mayor adaptación a diversos ambientes y está ampliamente distribuida en el mundo; su presencia reduce el rendimiento debido a que provoca un menor peso de grano (Huerta-Espino *et al.*, 2011a).

La resistencia que presentan comúnmente los genotipos de trigo es conocida como de raza específica; sin embargo, los patógenos causantes de estas enfermedades pueden vencer la resistencia, por su continua evolución hacia nuevos biotipos o razas fisiológicas, además de su rápida reproducción y capacidad de moverse a distancias muy grandes (Singh *et al.*, 2016). También se ha buscado la resistencia en planta adulta (APR por sus siglas en inglés), que a menudo es de raza no específica y su uso y aplicación se considera una estrategia más confiable y duradera para combatir esta enfermedad (Li *et al.*, 2016).

Singh *et al.*, (2014) mencionan que a pesar de la vida corta en la eficacia de los genes que confieren resistencia de raza específica, esta resistencia se puede prolongar hasta alcanzar la etapa de planta adulta mediante combinaciones de genes; es decir, para generar variedades que posean genes APR que confieren resistencia parcial (Niederhauser *et al.*, 1954), se requiere sumar en el genotipo a varios genes, mismos

que por sí solos no confieren la resistencia adecuada, especialmente bajo una presión alta de la enfermedad, cuando juntos y en combinaciones piramidales de 4 o 5 genes pueden conferir "casi inmunidad" o un alto nivel de resistencia (Singh *et al.*, 2000).

Entre los genes que confieren resistencia de raza no específica a la roya de la hoja del trigo, se han identificado cuatro con efectos significativos, mismos que también muestran efectos pleiotrópicos, ya que el mismo gen confiere resistencia a otras enfermedades. Los conocidos como *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Stb1/Ltn1*, *Lr46/Yr29/Sr58/Pm39/Ltn2*, *Sr2/Yr30/Lr27/Pbc1* y *Lr67/Yr46/Sr55/Pm46* confieren resistencia a múltiples enfermedades como roya de la hoja, roya amarilla y cenicilla polvorienta, causada esta última por *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Herrera-Foessel *et al.*, 2014).

El gen *Lr67*, que confiere resistencia a roya de la hoja en planta adulta, fue identificado en Canadá a partir de la introducción PI 250413 de Pakistán (Dyck y Samborski 1979) y se ubica en el cromosoma 4DL del trigo (Hiebert *et al.*, 2010); además, provee resistencia a la roya amarilla, designado como *Yr46* (Herrera-Foessel *et al.*, 2011), a la roya del tallo, nombrado *Sr55* y resistencia a la cenicilla polvorienta denominado *Pm46* (Herrera-Foessel *et al.*, 2014) y a otras enfermedades foliares. También es fenotípicamente similar al gen de resistencia a roya de hoja *Lr34* (Hiebert *et al.*, 2010).

El gen *Lr67* es muy común en variedades de porte alto liberadas en México y desarrolladas hasta antes de los años 1970s; sin embargo, no se ha encontrado en variedades semi-enanas modernas, tanto en las que poseen el alelo de enanismo *Rht1*

o *Rht-B1b* ni en las que poseen *Rht2* o *Rht-D1b*. En México estos alelos de enanismo están presentes en variedades mexicanas semi-enanas, que desde los años 1970s han permitido la producción de variedades con alto potencial de rendimiento y la resistencia a enfermedades (Huerta-Espino *et al.*, 2011b). Las variedades de trigo liberadas para el Noroeste de México poseen el alelo de enanismo *Rht-B1b*; mientras que *Rht-D1b* fue más común entre las variedades liberadas para El Bajío (Huerta-Espino *et al.*, 2011b). Todas las variedades actuales liberadas en México poseen ya sea *Rht-B1b* o *Rht-D1b*, pero no ambos, excepto la variedad Oasis F86 liberada en 1986 (Sayre *et al.*, 1997).

De todas las variedades de trigo harinero liberadas en México hasta la fecha, no se ha encontrado una variedad que combine a los alelos *Lr67* y *Rht-D1*. El hecho de que no existan estas variedades sugiere un impedimento genético posiblemente ocasionado por ligamiento cromosómico.

La ubicación de los genes *Lr67* y *Rht-D1* en el genoma del trigo es para ambos en el cromosoma 4DL. Por su ubicación en el mismo cromosoma y mismo brazo, se supone entonces que ambos genes no son independientes y que, por el origen de los progenitores, ambos genes están en fase de repulsión; sin embargo, y no obstante el posible ligamiento, la distancia física entre ambos genes en el cromosoma es suficiente para permitir la recombinación entre ellos. Por consiguiente, el objetivo de esta investigación fue determinar la magnitud del ligamiento y por tanto conocer la posibilidad para obtener el arreglo recombinante de la resistencia que otorga el alelo *Lr67* con el de enanismo *Rht-D1*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material genético

Se eligió como fuente de germoplasma a las variedades ‘Nasma’ portadora del alelo de enanismo *Rht-D1b* y ‘Marroqui 588’ portadora del alelo de resistencia a roya de la hoja *Lr67*. Para Obtener la generación F₁ se realizaron cruzamientos entre ambas variedades en el ciclo de cultivo de Primavera/Verano 2014, en el Campo Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CEVAMEX). La semilla de tres plantas F₁ se sembró en el Campo Experimental Bajío en el ciclo de cultivo Otoño/Invierno 2014-2015, donde se cosecharon plantas individuales que generaron 296 familias F₃, mismas que fueron evaluadas en el ciclo de cultivo Primavera/Verano 2015 en el INIFAP-CEVAMEX.

2.2.2 Análisis molecular

Los progenitores ‘Nasma’ y ‘Marroqui 588’ y cada familia de la generación F₃ se evaluaron con los marcadores KASP para el gen *Lr67* (csSNP856) y el gen de enanismo *Rht-D1B* (Rht-D1_SNP). Simultáneamente, los progenitores se evaluaron con marcadores STS (Sitios de secuencia etiquetada), usando el marcador csLV67 para el gen *Lr67* (Moore *et al.*, 2015) y DF/MR2 para *Rht-D1b* (Ellis *et al.*, 2002), con el propósito de determinar la presencia de los genes de interés en ambos progenitores. Para el análisis de ADN se colectaron pequeñas porciones del tejido foliar y se colocaron en tubos de 1.1 mL en placas de 96 pozos llenando sólo la mitad de cada tubo; posteriormente, se almacenaron en un congelador a -80°C por 3 h y se transfirieron a un liofilizador (Labconco®) manteniendo la temperatura a -50°C y un nivel de vacío de 0.0 a 0.120 mbars por 48 horas. Posteriormente, se procedió a moler

el tejido colocando balines de 4 mm y utilizando un molino (GenoGrinder 2010[®]) por 2 o 3 min hasta obtener el tejido en polvo. La extracción, cuantificación y valoración de la calidad del ADN se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos por Dreisigacker *et al.* (2016a). El programa PCR se ejecutó con la temperatura de amplificación más favorable de acuerdo con los protocolos de laboratorio y aplicaciones para Mejoramiento de Trigo (Dreisigacker *et al.*, 2016a). La lectura de las placas del producto de PCR se realizó en un lector de placas fluorescentes (BMG Pherastar Plus), para la visualización gráfica de datos genotípicos se utilizó el Software (KlusterCaller[™]).

2.2.3 Mapa genético

El ADN de los progenitores se utilizó para detectar nueve marcadores tipo SSR (Simple Sequence Repeat), para determinar el polimorfismo en la población F₃. La información sobre las temperaturas de hibridación apropiadas para cada marcador se obtuvo de la base de datos GrainGenes (<https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>). Se utilizaron los marcadores SSR polimórficos para genotipar toda la población. El producto de PCR se cargó en geles de acrilamina 12% (29:1) Las bandas se detectaron usando tinción con nitrato de plata (Dreisigacker *et al.*, 2016a).

Los resultados de los marcadores polimórficos se representaron como 0, 2, 1 y -1 para 'Nasma', 'Marroqui588', hetero y faltante, respectivamente. Una vez sistematizados, los resultados de los marcadores, se construyó un mapa genético utilizando el software QTL IciMapping V4.1. (Li *et al.*, 2008).

Se estableció un logaritmo mínimo de probabilidades (LOD) de que dos genes se encuentren ligados de 4.5 y una frecuencia máxima de recombinación de 0.30 para

formar los grupos de ligamiento, y se utilizó la función de mapeo de Kosambi (1944) para convertir las frecuencias de recombinación en unidades mapa (cM) (Li *et al.*, 2008).

2.2.4 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Ji-cuadrada (χ^2) para comparar la relación de segregación de las familias F₃ derivadas de plantas F₂ para dos pares de genes, cada par generando tres clases genotípicas: la homocigótica dominante, la segregante o heterogénea derivada de plantas F₂ heterocigóticas y la homocigótica recesiva, en una proporción esperada de 1:2:1, respectivamente. Las pruebas de hipótesis fueron dos: 1) independencia entre ambos pares de genes y 2) la segregación 1:2:1 por separado para cada *locus*.

El valor de tablas y la significancia se determinó de acuerdo con la χ^2 que se obtuvo de las proporciones de cada clase genotípica. Para el valor de tablas se usaron $n-1$ grados de libertad, donde n es el número de clases genotípicas (Infante y Zárate, 2012); la probabilidad de la prueba de χ^2 fue de $P \leq 0.05$.

Se determinó el porcentaje de recombinación con el método ideado por Fisher y Balmuka (1928). Se sumaron las familias F₃ observadas en cuatro clases: dominante-dominante (a_1), dominante-recesiva (a_2), recesiva-dominante (a_3) y doble recesiva (a_4) (Immer y Henderson, 1943; Strickberger, 1976). Con estos datos y considerando que los genes *Rht-D1* y *Lr67* están en fase de repulsión, se determinó un valor de Z mediante la ecuación $(a_1 \times a_4)/(a_2 \times a_3)$, para posteriormente, mediante tablas, determinar el porcentaje de recombinación (Fisher y Balmuka, 1928).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Análisis molecular de los progenitores

Con el marcador csLV67 se logró determinar la presencia del gen de resistencia a roya de a hoja *Lr67* en el progenitor ‘Marroqui 588’ y en el control ‘RL6077’. De igual forma, se confirmó la presencia del alelo de enanismo *Rht-D1b* en el progenitor ‘Nasma’ con el marcador DF/MR2, al igual que en el control ‘Parula’, de acuerdo con los procedimientos descritos por Dreisigacker *et al.* (2016a) (Figura 8).

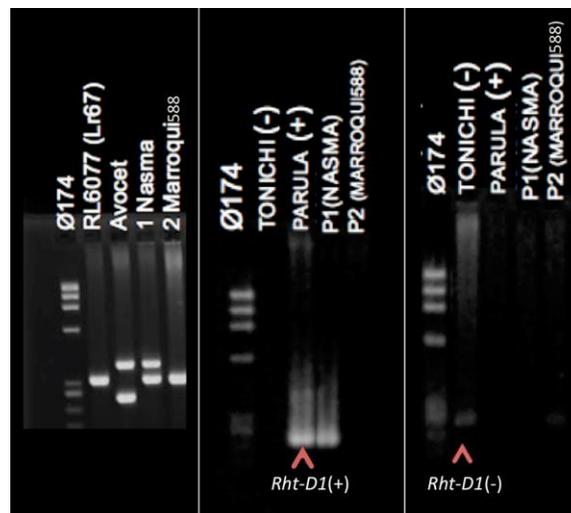


Figura 8. Amplificación de los marcadores csLV67 y DF/MR2, marcador de peso molecular PhiØ174. A) Gen *Lr67* control positivo en ‘RL6077’ y en el progenitor ‘Marroqui 588’. B) Alelo *Rht-D1b* control positivo en la variedad ‘Parula’ y el progenitor ‘Nasma’. C) Complemento del marcador dominante DF/MR2 para el alelo *Rht-D1a*, control negativo en la variedad ‘Tonichi’ y en el progenitor ‘Marroqui 588’.

2.3.2 Análisis de independencia

En el Cuadro 3 se presentan las pruebas de χ^2 para cada uno de los dos *alelos*; en ambos casos, los datos genotípicos esperados se ajustaron a los esperados ($P \leq 0.05$), indicando una segregación normal mendeliana. Para la segunda prueba (Cuadro 4), los

resultados mostraron que ambos *alelos* no son independientes ($P \leq 0.05$) y por tanto, y combinando los resultados de ambas pruebas (Cuadros 3 y 4), tal y como lo postulan Immer y Henderson (1943) y Strickberger (1976), se concluye que hay ligamiento entre los genes *Rht-D1* y *Lr67*. Por los datos observados (Cuadro 4 y Figura 9), de 294 familias F_3 , sólo se obtuvieron tres familias con la presencia de los alelos *Rht-D1* y *Lr67* en mismo genotipo y en forma homocigótica y también tres familias homocigotas con la ausencia de ambos alelos; lo que significa un número relativamente bajo de estas clases recombinantes.

Cuadro 3. Prueba de χ^2 (Ji-cuadrada) para los alelos *Rht-D1* y *Lr67*.

	<i>Alelo Rht-D1b (A)</i>				<i>Alelo Lr67 (B)</i>			
	AA	Aa	aa	Total	BB	Bb	bb	Total
Proporción	0.25	0.5	0.25		0.25	0.5	0.25	
Esperados (E)	74	148	74	296	74	148	74	296
Observados (O)	73	148	73	294	68	158	68	294
(O-E) ² /E	0.014	0	0.014	0.027	0.486	0.676	0.486	1.649

Alelo Rht-D1, χ^2 calculada = 0.027; χ^2 de tablas $(0.05, 2gl) = 5.99$. *Alelo Lr67*, χ^2 calculada = 1.649; χ^2 de tablas $(0.05, 2 gl) = 5.99$.

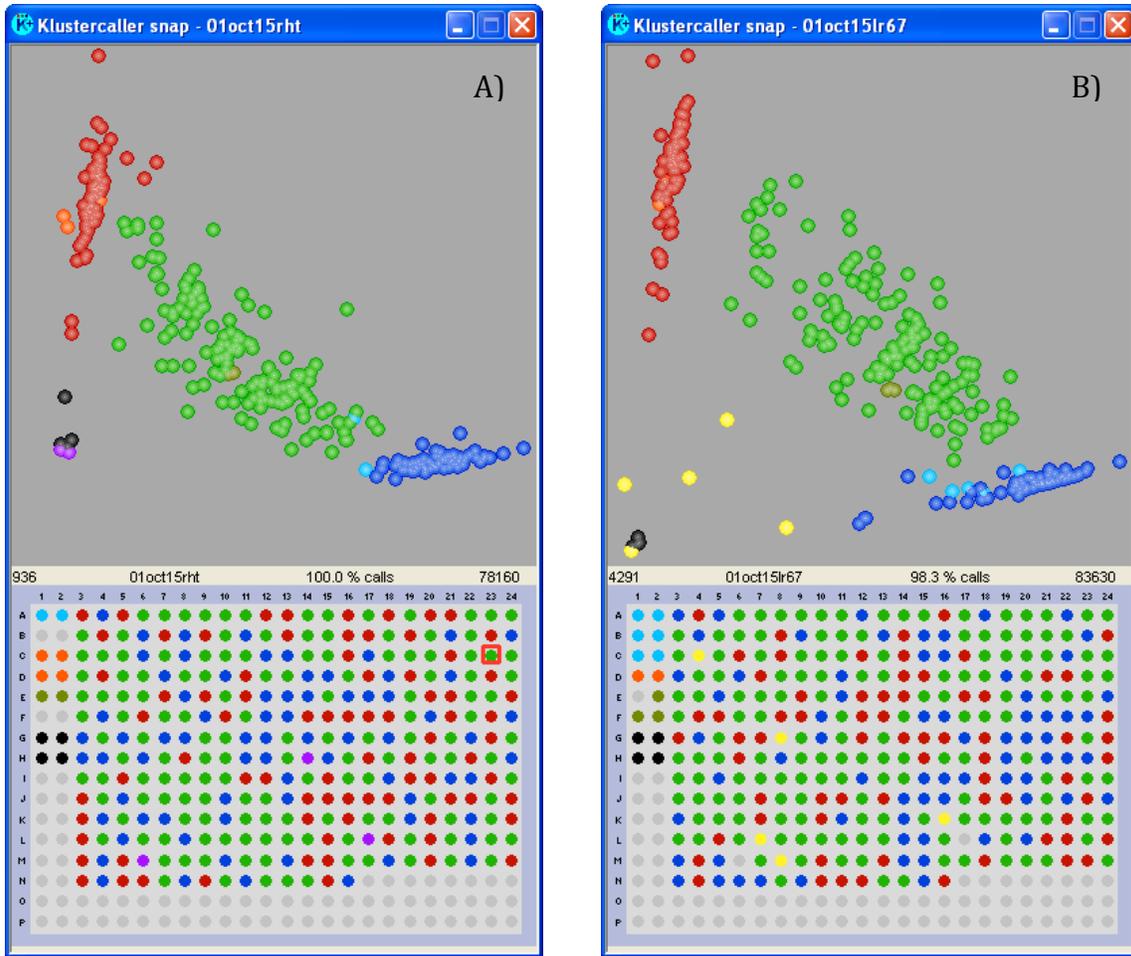


Figura 9. Visualización gráfica de datos genotípicos en una población F_3 de Nasma \times Marroqui 588, A) *Rht-D1b* (*Rht-D1_SNP*): color rojo 'Nasma', azul 'Marroqui 588' y verdes heterocigotos; y B) *Lr67* (*csSNP856*): color rojo 'Marroqui 588', color azul 'Nasma' y verde heterocigotos.

Cuadro 4. Prueba de χ^2 (ji-cuadrada) considerando independencia entre los alelos *Rht-D1* (A) y *Lr67* (B)

Genotipo	Proporción	Esperados (E)	Observados (O)	(O-E) ² /E	
AABB	(1/16)	0.0625	18.5	3	12.98
AABb	(2/16)	0.125	37	28	2.18
AaBB	(2/16)	0.125	37	17	10.81
AaBb	(4/16)	0.25	74	108	15.62
AAbb	(1/16)	0.0625	18.5	42	29.85
Aabb	(2/16)	0.125	37	23	5.29
aaBB	(1/16)	0.0625	18.5	48	47.04
aaBb	(2/16)	0.125	37	22	6.08
aabb	(1/16)	0.0625	18.5	3	12.98
Total			296	294	

χ^2 calculada= 142.86; χ^2 tablas (0.05, 8 gl)= 15.51.

El valor de $Z = (156 \times 3) / (65 \times 70)$ fue de 0.1028, mismo que en tablas de Fisher y Balmuka (1928) da como resultado una frecuencia de recombinación (r) de 22 cM.

Con $r = 0.22$ y considerando la fase de repulsión entre los alelos *Lr67* y *Rht-D1*, se calcularon nuevamente las frecuencias genotípicas esperadas de familias F_3 para compararse con las obtenidas (Cuadro 5). La prueba de Ji-cuadrada, mostró una alta concordancia ($P \leq 0.05$) entre lo postulado con $r = 0.22$ y lo obtenido con el análisis de ligamiento; indicando nuevamente que el bajo número de familias con genotipos homocigotos recombinantes se debe a la baja frecuencia de entrecruzamiento entre los alelos *Lr67* y *Rht-D1*. Así, un posible aumento en el número de familias recombinantes homocigotas en F_3 podría lograrse aumentando el tamaño de muestra; esto es, tomando un mayor número de plantas F_2 para derivar sus correspondientes familias F_3

(Dreisigacker *et al.*, 2016b); o bien, esperar a generaciones más avanzadas para dar oportunidad de recombinación entre los heterocigotos remanentes.

Cuadro 5. Prueba de χ^2 (ji-cuadrada) considerando una $r = 0.22$ entre los alelos *Rht-D1* (A) y *Lr67* (B).

Genotipos	Proporción	Esperados (E)	Observados (O)	$(O-E)^2/E$
AABB	0.012	3.6	3	0.09
AABb	0.086	25.5	28	0.25
AaBB	0.086	25.5	17	2.81
AaBb	0.328	97.1	108	1.23
AAbb	0.152	45.0	42	0.20
Aabb	0.086	25.5	23	0.24
aaBB	0.152	45.0	48	0.20
aaBb	0.086	25.5	22	0.47
aabb	0.012	3.6	3	0.09
TOTAL		296.0	294	5.57

χ^2 Calculada= 5.57; χ^2 de tablas (0.05, 8 gl)= 15.51.

2.3.3 Mapa genético de ligamiento cromosoma 4D

De los 20 marcadores tipo SSR y 10 tipo SNP, nueve mostraron polimorfismo en la población F₃ (Nasma/Marroqui588), cuatro SSRs (*wmc52*, *wmc720*, *cfid23*, *wmc331*) y cinco tipo SNPs (*BS00099053*, *BS00102783*, *BS00023258*, *csSNP856* y *Rht-D1_SNP*). De los marcadores mapeados, *BS00099053* se posicionó en la parte más distal del cromosoma, a 72.17 cM de éste se ubicó el marcador *Rht-D1_SNP* (ligado al gen *Rht2* o *Rht-D1*), entre los marcadores *BS00102783* a 36.24 y a 20.83 cM *wmc331*; por su parte, el marcador *csSNP856* (ligado al gen *Lr67*) se ubicó a 99.77 cM flanqueado por

los marcadores *wmc331* a 6.77cM y *cfD23* a 8.16cM, esto significó que la distancia entre el gen *Rht-D1* y *Lr67* fue de 27.6 cM (Figura 10).

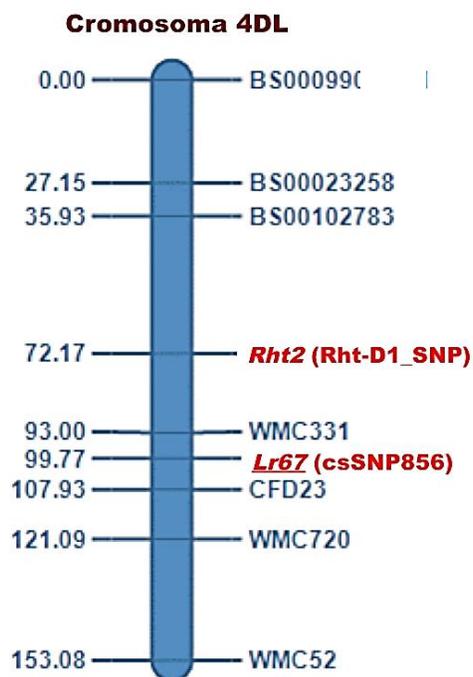


Figura 10. Mapa genético de la región del brazo largo del cromosoma 4D, usando una población F₃ de Nasma/Marroqui 588, las distancias genéticas se muestran en cM. Los marcadores de color rojo indican la ubicación de los genes de interés *Lr67* y *Rht-D1*.

Como mencionan Somers *et al.* (2004) y Forrest *et al.* (2014), la baja densidad de marcadores para el cromosoma 4D y el bajo nivel de polimorfismo de los genotipos se ven reflejados en el desarrollo puntual de mapas de ligamiento para el cromosoma 4D. En esta población de estudio se obtuvieron pocos marcadores ligados a los genes de interés, pero se logró estimar una distancia genética semejante a la reportada por Liu *et al.* (2014), quienes en un estudio de marcadores asociados a varios genes de interés en trigo en el cromosoma 4D, reportaron una distancia aproximada de 26 cM entre los genes *Rht-D1b* y *Lr67/Yr46*.

2.4 CONCLUSIONES

La distancia genética entre el alelo de resistencia a roya de la hoja *Lr67* y el alelo de enanismo *Rht-D1*, con datos del análisis de ligamiento es de 22 cM y con el mapa de ligamiento de 27 cM; distancia que es suficientemente grande para que exista recombinación genética. Con esta distancia no existe ningún impedimento genético para obtener genotipos recombinantes que combinen la resistencia a roya de la hoja (*Lr67*) con el porte bajo de planta (*Rht-D1*), mismos que en los progenitores se encuentran separados y en fase de repulsión.

2.5 LITERATURA CITADA

- Dreisigacker S., D. Sehgal, A. E. Reyes J., B. Luna G., S. Muñoz Z., C. Núñez R., J. Mollins and S. Mall (2016a) CIMMYT Wheat Molecular Genetics: Laboratory Protocols and Applications to Wheat Breeding. CIMMYT. Mexico, D.F. 142 p.
- Dreisigacker S., S., Sukumaran, C. Guzmán C., X. He, C. Lan, D. Bonnett and J. Crossa (2016b) Molecular marker-based selection tools in Spring bread wheat improvement: CIMMYT experience and prospects. *In: Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement*. Vol. 11. Sustainable Development and Biodiversity. V. Rajpal, S. Rao and S. Raina (eds.). Springer. Cham, Switzerland. pp:421-474, [doi: 10.1007/978-3-319-27090-6_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27090-6_16)
- Dyck P. L. and D. J. Samborski (1979) Adult-plant leaf rust resistance in PI 250413, an

introduction of common wheat. Canadian Journal of Plant Science 59:329-332, doi.org/10.4141/cjps79-053

Ellis M., W. Spielmeyer, K. Gale, G. Rebetzke and R. Richards (2002) "Perfect" markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. Theoretical and Applied Genetics 105:1038-1042, doi: [10.1007/s00122-002-1048-4](https://doi.org/10.1007/s00122-002-1048-4)

Fisher, A. and Bhai Balmukand (1928) The estimation of linkage from the offspring of selfed heterozygotes. Journal Genetics. 20 : 79-92.

Forrest F., V. Pujol, P. Bulli, M. Pumphrey, C. Wellings, S. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, R. Singh, E. Lagudah, M. Hayden and W. Spielmeyer (2014) Development of a SNP marker assay for the *Lr67* gene of wheat using a genotyping by sequencing approach. Molecular Breeding 34:2109-2118, doi: [10.1007/s11032-014-0166-4](https://doi.org/10.1007/s11032-014-0166-4)

Herrera-Foessel S. A., E. S. Lagudah, J. Huerta-Espino, M. J. Hayden, H. S. Bariana, D. Singh and R. S. Singh (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, doi: [10.1007/s00122-010-1439-x](https://doi.org/10.1007/s00122-010-1439-x)

Herrera-Foessel, S. A., R. P. Singh, M. Lillemo, J. Huerta-Espino, S. Bhavani, S. Singh, C. Lan, V. Calvo Salazar and E. S. Lagudah (2014) *Lr67/Yr46* confers adult plant resistance to stem rust and powdery mildew in wheat. Theoretical and Applied Genetics 127:781-789, <http://doi.org/10.1007/s00122-013-2256-9>

- Hiebert C. W., J. B. Thomas, B. D. McCallum, D. G. Humphreys, R. M. DePauw, M. J. Hayden, R. Mago, W. Schnippenkoetter and W. Spielmeyer (2010) An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher*6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*). *Theoretical and Applied Genetics* 121:1083-1091, [doi: 10.1007/s00122-010-1373-y](https://doi.org/10.1007/s00122-010-1373-y)
- Huerta Espino J, R. P. Singh, S. Germán, B. D. McCallum, R. F. Park, W. Q. Chen, S. C. Bhardwaj and H. Goyeau (2011a) Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica* 179:143-160, [doi: 10.1007/s10681-011-0361-x](https://doi.org/10.1007/s10681-011-0361-x)
- Huerta-Espino J., H. E. Villaseñor-Mir, E. Espitia-Rangel, E. Solis-Moya and M. van Ginkel (2011b) The history of wheat breeding in Mexico. *In: The World Wheat Book. A History of Wheat Breeding. Vol. 2.* A. P. Bonjean, W. J. Angus and M. van Ginkel (eds.). Lavoisier Publishing. Paris, France. pp:275-308.
- Immer F. R. and M. T. Henderson (1943) Linkage studies in barley. *Genetics* 28:419-440.
- Infante G. S. y G. P. Zárate L. (2012) *Métodos Estadísticos Un enfoque interdisciplinario*. 3a ed. Mundi-Prensa. México, D. F. 610 p.
- Kosambi D. D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* 12:172-175
- Li H., J. M. Ribaut, Z. Li and J. Wang (2008) Inclusive composite interval mapping (ICIM) for digenic epistasis of quantitative traits in biparental populations. *Theoretical and Applied Genetics* 116:243-260, [doi: 10.1007/s00122-007-0663-5](https://doi.org/10.1007/s00122-007-0663-5)

- Li H., S. Singh, S. Bhavani, R. P. Singh, D. Sehgal, B. R. Basnet, P. Vikram, J. Burgueno-Ferreira and J. Huerta-Espino (2016) Identification of genomic associations for adult plant resistance in the background of popular South Asian wheat cultivar, PBW343. *Frontiers in Plant Science* 7:1674, [doi: 10.3389/fpls.2016.01674](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01674)
- Liu, S., J. C. Rudd, G. Bai, S. D. Haley, A. M. H. Ibrahim, Q. Xue, D. B. Hays, R. A. Graybosch, R. N. Devkota, and P. S. Amand (2014) Molecular markers linked to important genes in hard Winter wheat. *Crop Science* 54:1304-1321, [doi: 10.2135/cropsci2013.08.0564](https://doi.org/10.2135/cropsci2013.08.0564)
- Moore J. W., S. Herrera-Foessel, C. Lan, W. Schnippenkoetter, M. Ayliffe, J. Huerta-Espino, M. Lillemo, L. Viccars, R. Milne, S. Periyannan, X. Kong, W. Spielmeier, M. Talbot, H. Bariana, J. W. Patrick, P. Dodds, R. Singh and E. Lagudah (2015) A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* 47:1494-1498, doi: 10.1038/ng.3439
- Niederhauser J. S., J. Cervantes and L. Servin (1954) Late blight in Mexico and its implications. *Phytopathology* 44:406-408.
- Sayre K. D., S. Rajaram and R. A. Fisher (1997) Yield potential progress in short bread wheats in Northwest Mexico. *Crop Science* 37:36-42, <https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700010006x>
- Singh R. P., S. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, S. Singh, S. Bhavani, C. Lan and B. R. Basnet (2014) Progress towards genetics and breeding for minor genes based

resistance to Ug99 and other rusts in CIMMYT high-yielding Spring wheat. *Journal of Integrative Agriculture* 13:255-261, [doi: 10.1016/S2095-3119\(13\)60649-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60649-8)

Singh, R. P., J. Huerta-Espino and S. Rajaram (2000) Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 35:133-139.

Singh R. P., P. K. Singh, J. Rutkoski, D. P. Hodson, X. He, L. N. Jørgensen, M. S. Hovmøller, and J. Huerta Espino (2016) Disease Impact on Wheat Yield Potential and Prospects of Genetic Control. *Annual Review of Phytopathology* 54:303-322, [doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-095835](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095835)

Somers D. J., P. Isaac and K. Edwards (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109:1105-1114, [doi: 10.1007/s00122-004-174](https://doi.org/10.1007/s00122-004-174)

Strickberger M. W. (1976) *Genética*. New York, USA. 847 p.

DISCUSIÓN GENERAL

En el presente estudio se analizaron fenotípicamente y molecularmente 15 genotipos recientes y antiguos de trigo harinero para determinar los genes de resistencia a royas y de enanismo que poseen. Dentro de este conjunto de genotipos también se determinó que no existen variedades actuales que presenten simultáneamente el alelo de resistencia *Lr67* y el de enanismo *Rht-D1*. Además, se observó que no existen genotipos que contengan la combinación de los genes de resistencia *Lr34* y *Lr67*.

La variedad 'Marroqui 588' (Florence/Aurore) es una cruce realizada en 1920 en Francia y liberada como variedad en Marruecos y Túnez (Jlibene y Nsarellah, 2011). Se incluyeron tres variedades antiguas, liberadas en los años 1950s: 'Constitución', 'Yaqui 50' y Chapingo 53; seis variedades liberadas en los 1970s: 'Yecora 70', 'Pavón 76', 'Lalbahadur', 'Sonalika'; 'Sujata' y 'Tordo'; cuatro liberadas en los 1980s: 'Kanchan', 'Parula', 'Nasma' y 'RL6077' y una liberada en 2013: 'Apav', para revisar la construcción piramidal de los genes de resistencia a roya y de los alelos que producen enanismo. Los resultados muestran de manera clara que los alelos de enanismo identificados mediante los marcadores (*Rht-B1_SNP* y *Rht-D1b_SNP*), y que fueron incorporados en las variedades liberadas a principios de los años 1960s, prevalecen en el germoplasma de trigo harinero desde esa fecha; sin embargo, de las dos fuentes incorporadas, *Rht-B1* sólo se encontró en un genotipo: 'Apav'; la doble combinación (*Rht-D1* y *Rht-B1*), en las variedades 'Yecora 70' y 'Lalbahadur', liberadas en la década de los 1970s, y sólo prevalece en los materiales posteriores a 1980, el alelo *Rht-D1*, que fenotípicamente produce una altura media de 90 cm.

Previo a la incorporación de los alelos de enanismo, en todo el germoplasma antiguo caracterizado (seis de 15 genotipos) se identificó la presencia del alelo *Lr67*, mismo

que confiere resistencia a roya de la hoja, pero no en el germoplasma posterior, particularmente poseedor del alelo *Rht-D1b*; es decir, no se encontró la combinación *Lr67res/Rht-D1b* en el germoplasma liberado posterior a 1962. Es altamente probable que durante los programas de mejoramiento genético para incorporar en el germoplasma de porte alto a los alelos de enanismo, el énfasis fue principalmente detectar segregantes F₂ de porte bajo de planta; como estos alelos están ligados, tal combinación difícilmente podría presentarse en poblaciones pequeñas y ésta podría ser la razón de que haya quedado ignorado y no incorporado en el germoplasma antiguo e incorporarlo al germoplasma moderno fue uno de los propósitos cumplidos de la presente investigación, al igual que conocer las causas genéticas de su ausencia en el germoplasma moderno. Dos ejemplos de esta observación ocurren en las variedades portadoras de *Rht-D1* 'Nasma' y 'Kanchan'; en la primera, uno de los progenitores es 'Marroquí 588' (=Florence/Aurore C) portadora del alelo *Lr67* y de porte alto, mientras que el segundo progenitor es una variedad enana (Jlibene y Nsarellah, 2011). En el caso de 'Kanchan', uno de los progenitores es una variedad enana (UP 301) y el segundo progenitor es la variedad 'Sujata' (= C306) de porte alto y portadora del alelo *Lr67*. La cruce de los progenitores 'Marroquí 588' × 'Nasma', antiguo el primero y portador del alelo *Lr67* y moderno el segundo, portador del alelo *Rht-D1*, dio como resultado un heterocigoto en fase de repulsión. La segregación de plantas F₂ y la toma de ellas para formar familias F₃ demostró, con el análisis segregacional y el mapa genético, que el nivel de ligamiento entre estos dos genes es de 22 a 27 cM y ambos están ubicados en el brazo corto del cromosoma 4 del genoma D. Con esta distancia genética y con el manejo de sólo 296 familias, se lograron obtener tres familias

segregantes con la combinación homocigótica inédita *Lr67res/Rht-D1b*. El análisis de ligamiento utilizando la metodología derivada de los métodos teóricos ideados por Fisher estimó una distancia genética muy similar a la obtenida mediante el mapa genético de ligamiento. Si bien es cierto que las nuevas metodologías moleculares pueden acortar el tiempo de estudio, el análisis segregacional sigue siendo una herramienta bastante asertiva a falta de marcadores moleculares.

Con base en los resultados del análisis molecular para genes de resistencia a royas presentes en el germoplasma, se encontró una construcción piramidal de genes hasta identificar en 'Parula' tres de los cuatro genes estudiados. El patrimonio genético para resistencia a royas en el germoplasma estudiado fue: con cero alelos de resistencia en las variedades, Lalbahadur desarrollada en los 1970s donde el objetivo fue obtener plantas doble enanas y Apav, en 2013 donde el objetivo fue identificar líneas con cero alelos de resistencia a las tres royas del trigo. Con un solo alelo (*Lr46*) fueron ocho variedades, 'Nasma', 'Yecora 70', 'Sonalika', 'Kanchan' y 'Pavon 76', mientras que en 'Constitución', 'RL6077' y 'Chapingo 53' se identificó *Lr67*; con dos alelos fueron cuatro variedades, Tordo de los años 1970s con la combinación *Lr34/Lr46*, y 'Marroquí 588', 'Yaqui 50' y 'Sujata' con la combinación *Lr46/Lr67*; sólo una variedad de los años 1980s presentó tres alelos, 'Parula' con *Lr34/Lr46/Lr67*. Finalmente, ninguna de las variedades presentó los cuatro alelos de resistencia *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* y *Lr68*. Se encontró que las variedades más antiguas poseen de 1 a 2 alelos, las medianamente antiguas de 0 a 1 alelo y las más modernas entre 0 y 3 alelos. De acuerdo con el comportamiento anterior, es evidente que no existe relación entre las épocas de mejoramiento con la presencia o ausencia de los alelos de resistencia, esto puede

deberse a los objetivos para los cuales fueron desarrolladas estas variedades. Potencialmente este trabajo de investigación provee de información útil para el mejoramiento del trigo en la resistencia a royas y la condición de enanismo, pues las familias F₃ homocigotas con la combinación *Lr67res/Rht-D1b* obtenidas con el análisis segregacional y molecular, pueden ser usadas como progenitores, en particular con aquellos genotipos portadores del alelo de enanismo *Rht-D1b*, lo cual permite seguir con el piramido de genes de resistencia a royas, para completar la inmunidad con la presencia de los cuatro genes, y además con plantas de porte bajo, característica conferida por el alelo *Rht-D1b*. Tal sería el caso de un proyecto de mejoramiento iniciando con los progenitores 'Parula' × F₃ homocigota para *Lr67res/Rht-D1b*, el primero posee los genes *Lr34*, *Lr46* y *Lr68*, los cuales le confieren un alto nivel de resistencia en planta adulta (Herrera-Foessel *et al.*, 2012), con 9.7% de severidad (Ledesma-Ramírez *et al.*, 2018) y el segundo tendría *Lr67* y un alelo de porte bajo. Teóricamente, esto da la posibilidad de crear genotipos *Lr34/Lr46/Lr68/Lr67/Rht-D1b*. Con esta combinación de diferentes genes de resistencia se puede mejorar significativamente la resistencia a royas e incluso se puede alcanzar la inmunidad, como lo sugiere Singh *et al.* (2000), además las plantas tendrán una altura promedio de 90 cm.

Literatura citada

- Herrera-Foessel S. A., R. P. Singh, J. Huerta-Espino, G. M. Rosewarne, S. K. Periyannan, L. Viccars, V. Calvo-Salazar, C. Lan and E. S. Lagudah (2012) *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 124:1475-1486. DOI 10.1007/s00122-012-1802-1
- Jlibene M. and N. Nsarellah (2011) Wheat breeding in Morocco, a historical perspective. *In: The World Wheat Book. A History of Wheat Breeding. Vol. 2. A. P. Bonjean, W. J. Angus and M. van Ginkel (eds.). Lavoisier Publishing. Paris, France. pp: 425-442.*
- Ledesma-Ramírez L., E. Solis-Moya, J. G. Ramírez-Pimentel, S. Dreisigacker, J. Huerta-Espino, C. L. Aguirre-Mancilla, and L. A. Mariscal-Amaro (2018) Relationship between the number of partial resistance genes and the response to leaf rust in wheat genotypes. *Chilean Journal of Agricultural Research* 78:400-408, doi:10.4067/S0718-58392018000300400
- Singh, R. P., J. Huerta Espino and S. Rajaram (2000) Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 35: 133-139.

CONCLUSIONES GENERALES

- ✚ Todos los genotipos evaluados en estado de plántula mostraron susceptibilidad a roya de la hoja, mientras que para roya amarilla únicamente el genotipo 'Sujata' mostró resistencia, los demás genotipos fueron susceptibles.
- ✚ En la evaluación con marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia de planta adulta a roya de la hoja *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* y *Lr68*, no se obtuvo ningún genotipo que presentara los cuatro genes, sólo el genotipo 'Parula' presentó tres de los cuatro genes bajo estudio (*Lr34*, *Lr46* y *Lr68*), 'Marroqui 588', 'Sujata', 'Yaqui 50' presentaron al menos dos genes de resistencia *Lr46* y *Lr67* y 'Tordo' presentó *Lr34* y *Lr46*, 'Constitución', 'RL6077', 'Chapingo 53' presentaron sólo el gen *Lr67* y 'Nasma', 'Yecora 70', 'Sonalika', 'Kanchan' y 'Pavon' con un gen de resistencia *Lr46* y 'Lalbahadur' y 'Apav' no presentaron ningún gen. La combinación *Lr34/Lr67* no fue identificada en ninguno de los genotipos.
- ✚ Ninguno de los 15 genotipos evaluados con los marcadores moleculares para los alelos de enanismo presentó la combinación del alelo de resistencia a roya de la hoja *Lr67* con alguno de los alelos de enanismo *Rht-B1b* o *Rht-D1b*. Sólo los genotipos 'Yecora 70' y 'Lalbahadur' fueron positivos para los alelos y seis de los genotipos fueron positivos para el alelo *Rht-D1b* y sólo 'Apav' presentó el alelo *Rht-B1b*.

✚ En la determinación de la distancia genética entre *Rht-D1* y *Lr67*, la magnitud del ligamiento con el análisis segregacional fue una distancia genética de 22 cM, mientras que con el mapa genético de ligamiento de 27 cM. Distancia suficientemente grande para que ocurra la recombinación genética; es decir, no hay ningún impedimento genético para obtener un genotipo recombinante con la presencia de los alelos *Lr67res/Rht-D1b*. Con este estudio se logró identificar tres familias que poseen la combinación *Lr67res/Rht-D1b*, útiles para el mejoramiento genético del trigo.