



## INTROGRESIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA A LA ROYA DEL TALLO Sr 47 EN LA VARIEDAD DE TRIGO CIRNO C2008

### INTROGRESSION OF STEM RUST RESISTANCE GENE *Sr47* IN THE WHEAT VARIETY CIRNO C2008

Daniel Bárcenas-Santana<sup>1</sup>, Julio Huerta-Espino<sup>2\*</sup>, Héctor Eduardo Villaseñor-Mir<sup>2</sup>, José Sergio Sandoval-Islas<sup>3</sup>, Santos Gerardo Leyva-Mir<sup>4</sup>, Luis Antonio Mariscal-Amaro<sup>5</sup>, Alejandro Michel-Aceves<sup>6</sup> y Susanne Dreisigacker<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Universidad Estatal de Sonora, Unidad Académica Navojoa, Navojoa, Sonora, México. <sup>2</sup>Instituto de Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle de México, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, México. <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Fitosanidad-Fitopatología, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. <sup>4</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Chapingo, Estado de México, México. <sup>5</sup>INIFAP, Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, México. <sup>6</sup>Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Cocula, Guerrero, México. <sup>7</sup>Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, El Batán, Texcoco, Estado de México, México.

\*Autor de correspondencia (j.huerta@cgjar.org)

#### RESUMEN

La roya del tallo, causada por *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* E. & H., es una amenaza para la producción de trigo en la mayoría de las áreas de cultivo de este cereal en el mundo. El gen de resistencia *Sr47*, identificado en *Aegilops speltoides* y transferido al trigo cristalino, confiere resistencia no sólo a Ug99 y razas derivadas, sino también a otras razas de roya del tallo presentes en México y otras partes del mundo, incluida la raza Siciliana, identificada recientemente como TTTTF. En un cultivar resistente, la introgresión del gen *Sr47* se puede rastrear mediante selección asistida por marcadores moleculares como *Xwms501* (monogénico dominante), *Xgwm47* (dominante en repulsión), *Xrws38* y *Xgpw4165* (codominantes). Convencionalmente, cuando se utiliza un cultivar susceptible, la presencia del gen de resistencia podría diagnosticarse por la respuesta a la raza RTR de la roya del tallo en el caso de México; sin embargo, Cirno C2008 es resistente a Ug99 (TTKSK), RTR y a otras razas de roya del tallo presentes en México. El análisis molecular de 141 familias derivadas de BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> de la cruce DAS15 × Cirno C2008 utilizando los marcadores moleculares *Xwms501*, *Xgwm47*, *Xrws38* y *Xgpw4165* permitió identificar familias con la inserción del gen *Sr47*.

**Palabras clave:** *Aegilops speltoides*, *Puccinia graminis*, *Triticum turgidum*, roya del tallo.

#### SUMMARY

Stem rust, caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* E. & H., is a threat to wheat production in most wheat growing areas in the world. The *Sr47* resistance gene, identified in *Aegilops speltoides* and transferred to crystalline wheat, confers resistance not only to Ug99 and derived races, but also to other stem rust races present in Mexico and other parts of the world, including the Sicilian race, recently identified as TTTTF. In a resistant cultivar, introgression of the *Sr47* gene can be tracked by selection assisted by molecular markers such as *Xwms501* (monogenic dominant), *Xgwm47* (dominant in repulsion), *Xrws38* and *Xgpw4165* (codominant). Conventionally, when a susceptible cultivar is used, the presence of the resistance gene could be diagnosed by the response to the RTR race of stem rust in the case of Mexico; however, Cirno C2008 is resistant to Ug99 (TTKSK), RTR and other stem rust races present in Mexico. Molecular analysis of 141 BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub>-derived families from the DAS15 ×

Cirno C2008 cross using the molecular markers *Xwms501*, *Xgwm47*, *Xrws38* and *Xgpw4165* allowed the identification of families with the insertion of the *Sr47* gene.

**Index words:** *Aegilops speltoides*, *Puccinia graminis*, *Triticum turgidum*, stem rust.

#### INTRODUCCIÓN

La roya del tallo, causada por el hongo *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, es una enfermedad que reduce el rendimiento del cultivo de trigo hasta en 70 % (Pardey *et al.*, 2016). En los últimos años, esta enfermedad ha aumentado su importancia por la presencia de la raza TTKSK (Ug99), debido a su virulencia para la mayoría de los genes de resistencia a la roya del tallo, incluido el gene *Sr31* (Pretorius *et al.*, 2000., Singh *et al.*, 2006). El reciente brote de roya del tallo en trigo cristalino en 2016 en Italia, causado por la raza TTTRF, que no está relacionada con el grupo Ug99, representa una seria amenaza para la producción de trigo harinero y trigo duro en el área mediterránea y otras áreas de producción de trigo (Institut for Agroøkologi, 2017). Su importancia llamó la atención de los científicos, debido al resurgimiento de la roya del tallo en algunos países europeos, incluidos el Reino Unido, Alemania e Italia (Bhattacharya, 2017; Lewis *et al.*, 2018; Saunders *et al.*, 2019). El control químico de esta enfermedad es costoso y de alto riesgo ambiental para los humanos; es por ello, que el uso de variedades resistentes es la forma más económica y ecológica de controlar la enfermedad (Singh *et al.*, 2016). Por lo tanto, el mejoramiento para incorporar resistencia a la roya del tallo es una tarea continua en la mayoría de los programas de mejoramiento de trigo en todo el mundo, incluido el programa de mejoramiento del CIMMYT (Singh *et al.*, 2016).

La liberación de variedades con resistencia monogénica combinada con la ganancia en virulencia para este tipo de genes, por la coevolución del patógeno causante de la roya, reduce simultáneamente la vida de estas variedades en los campos de los agricultores (Singh *et al.*, 2006; 2015). El método convencional de mejoramiento genético del trigo se basa en la incorporación de un solo gen de resistencia dentro de un genotipo; sin embargo, la combinación de varios genes de resistencia a razas diferentes de *P. graminis*, donde cada uno confiere una eficacia parcial o total, proporcionará una resistencia más duradera y estable (Singh *et al.*, 2016).

Los parientes silvestres del trigo poseen genes de resistencia útiles para combatir enfermedades como la roya. Existen más de 80 genes de resistencia a la roya del tallo; de éstos, al menos 20 provienen de parientes silvestres, han sido transferidos al trigo cultivado (McIntosh *et al.*, 1995; Mondal *et al.*, 2016). En su mayor parte, los genes *Sr* se caracterizan por las reacciones de las plántulas a la raza TTKSK (Pretorius *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2006; Wanyera *et al.*, 2006). Los genes de resistencia a la roya del tallo *Sr2*, *13*, *14*, *15*, *22*, *25*, *26*, *27*, *28*, *29*, *32*, *33*, *35*, *37*, *39*, *40*, *42*, *43*, *44*, *45*, *46*, *47*, *48*, *50*, *51*, *52*, *53*, *55*, *56*, *57* y *58* siguen siendo efectivos contra Ug99 (Singh *et al.*, 2015); por lo tanto, la caracterización e introgresión de estos genes de resistencia en variedades de alto potencial de rendimiento es una alternativa para mejorar la resistencia a Ug99 y otras razas importantes de roya del tallo en las principales áreas productoras de trigo del mundo.

La adopción de herramientas moleculares como complemento al enfoque convencional de mejoramiento de cultivos puede facilitar la selección de genotipos resistentes, especialmente si se utiliza el enfoque de pirámida de genes, lo cual no es posible detectar en invernadero o en campo. La selección asistida por marcadores permite una detección rápida y eficaz de un gen de resistencia a la roya del tallo utilizando loci de rasgos cualitativos (QTL).

Cirno C2008 es la variedad de trigo duro cultivado predominante en el noroeste de México desde 2011. Tiene un potencial de rendimiento muy alto, de 7.7 a 12.0 t ha<sup>-1</sup>, desde 1950 ninguna otra variedad con atributos agronómicos sobresalientes se ha obtenido (Muñoz, 2014). Cirno C2008 es resistente a las razas de roya del tallo RTR que existen en México y también a Ug99, pero se ha informado que es susceptible a la raza de Sicilia (TTTFT) en el sur de España (Aoun *et al.*, 2019).

El gen *Sr47* de resistencia se derivó de la línea de adición PI 369590 del pariente silvestre *Aegilops speltoides*, y se transfirió al trigo cultivado mediante recombinación homóloga inducida por *ph1b* en la línea DAS15 de trigo duro.

El segmento de introgresión se localiza en el cromosoma T2BL-2SL-2SS. El telómero de 2BL comprende por lo menos el 10 % del brazo largo (Faris *et al.*, 2008). Se sabe que el segmento de *A. speltoides* contiene los genes de resistencia *Sr39* y *Sr9*. El gen *Sr9* pasó a llamarse *Sr47* (Klindworth *et al.*, 2012) y es muy efectivo contra la raza TTKSK de roya del tallo (Faris *et al.*, 2008) y RTR en México (ver los resultados de este estudio), de ahí la importancia de la introgresión de *Sr47* en Cirno C2008. Klindworth *et al.* (2012) desarrollaron tres líneas recombinantes sintéticas: RWG35, RWG36 y RWG37. Como cada línea posee el gen *Sr47* en diferentes puntos de translocación, es recomendable utilizar diferentes marcadores moleculares para detectar su presencia. En el presente estudio el objetivo fue llevar a cabo la introgresión del gen de resistencia *Sr47* en la variedad Cirno C2008 utilizando selección asistida por marcadores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

La variedad de trigo duro Cirno C2008 y la línea IIA.2342 (línea donadora del gen *Sr47*, derivada de DAS15) se sembraron en la Estación Experimental del INIFAP, en Chapingo, México, para cruzarlos. La semilla F<sub>1</sub> obtenida de la cruce fue sembrada en diciembre de 2012 en el Campo Experimental CEVAMEX en la localidad mencionada. En marzo de 2013, se retrocruzaron 20 espigas de la cruce IIA.2342/Cirno C2008 con Cirno C2008. La semilla de BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> se sembró en dos hileras dobles de 11 m de largo durante el ciclo verano-otoño de 2013. Un total de 141 plantas individuales BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> se cosecharon por separado y se sembraron durante el ciclo otoño-invierno 2013-2014 para obtener la generación BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub>.

Las 141 familias BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> y los testigos Cirno C2008 gen *Sr47* (-) e IIA.2342 gen *Sr47* (+) se sembraron en campo e invernadero durante el ciclo primavera-verano de 2014. En el campo, se sembraron separadas para obtener ADN de plantas individuales evitando mezclas.

### Extracción de ADN

En julio de 2014 se recolectaron en tubos muestras de hojas cosechadas en campo, las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas con hielo para mantener frescas las muestras (Micro Tube Strips de 8 adjuntas de 1.1 mL marca Micro Pack) dispuestos en juegos de 96 muestras (colección Microtubos Cracked 10 × 96), a continuación se los puso en congelación por 2 d, para posteriormente liofilizar y extraer el ADN con la técnica de Saghai-Marooof *et al.* (1984), con algunas modificaciones señaladas en los Protocolos de Laboratorio Molecular utilizados en el Centro

Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) (<http://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/3221>). El ADN se cuantificó en un NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). La verificación de la introgresión del gen *Sr47* se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los marcadores utilizados fueron *Xwms501*, *Xgwm47* (Faris *et al.*, 2008), *Xrwgs38*, *Xgpw4165*, *Xwmc332* y *Xwmc627* (Klindworth *et al.*, 2012). El primer marcador es dominante, el segundo es dominante en repulsión y los otros marcadores son codominantes. La mezcla de reacción para PCR consistió en 2.05  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 2.0  $\mu$ L buffer 5X T6, 0.6  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.8 mL de dNTPs, 2.5  $\mu$ L de cada iniciador, 0.05  $\mu$ L Taq polimerasa y 3  $\mu$ L de ADN de cada muestra para un volumen total de 10  $\mu$ L. A continuación, las muestras se colocaron en 384 pocillos de microplacas Midsci PCR para iniciar la PCR en un termociclador (Applied Biosystems 9700, Foster City, California, EUA). Las condiciones en las que se realizó la amplificación de los marcadores fueron con los programas SSR50 (1 ciclo de 94 °C por 2 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y 1 una extensión final a 72 °C por 5 min), SSR52, SSR54, SSR55, SSR56 y SSR60, donde sólo varía la temperatura de alineamiento según el programa (<http://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/3221>). La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa 2 % y acrilamida 12 %. Después de la migración, los geles se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador UV (BioDoc-It® 220 Imaging System, UVP Inc., Upland, California, EUA) para verificar la generación de productos esperada.

### Evaluación de la resistencia a enfermedades

Las 141 familias y los progenitores (IIA.2342 y Cirno C2008), junto con Noio (trigo duro susceptible), se cultivaron en bandejas de plástico de 20 × 30 × 5 cm, sobre una mezcla de tierra y turba (60 y 40 %, respectivamente). Ocho semillas de cada línea, sus progenitores y el testigo susceptible se sembraron en charolas de plástico y se mantuvieron en invernadero a una temperatura entre 20 y 25 °C. Las plantas se inocularon con la raza de roya del tallo RTR que tiene la siguiente fórmula avirulencia/virulencia: 7a, 9e, 10, 12, 13, 14, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 35, Dp2, H, Gt, Wld, W3560, Agi/ 5, 6, 7b, 8a, 8b, 9a, 9b, 9d, 9f, 9g, 11, 15, 17, 21, 28, 34, 36 y Peliss (Singh, 1991). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero desde la siembra e inoculación, se siguió el procedimiento propuesto por Jin *et al.* (2007). La inoculación consistió en asperjar urediniosporas suspendidas en aceite mineral (Soltrol 70; Conoco-Phillips Inc., Houston, Texas, EUA) en plántulas de 9 a 10 días de edad. Las plántulas permanecieron en una cámara de rocío durante 12 h y luego se llevaron a un invernadero mantenido a una temperatura entre 20 y 24 °C. Los tipos de infección (IT) se

calificaron 14 días después de la inoculación utilizando la escala de 0 a 4 (Stakman *et al.*, 1962). Las plantas con IT igual o inferior a 2 se consideraron resistentes y las plantas con IT igual o superior a 3 se consideraron susceptibles.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración promedio de ADN fue de 430 ng mL<sup>-1</sup>, y su pureza fue de 1.87 de acuerdo con la relación A260/A280, indicando que el ADN extraído tuvo buena calidad e integridad (Tapia-Tussell *et al.*, 2006; Valadez y Khal, 2005), considerándose un intervalo aceptable de 1.8 a 2.0.

Con los marcadores dominantes (*Xwms501* y *Xgwm47*) fue posible distinguir familias sin la inserción del gen *Sr47*. Con el marcador dominante *Xwms501* se realizó la amplificación de una banda de 109 pares de bases (pb) en aquellas plantas donde fue posible identificar la inserción del gen *Sr47* (Figura 1); sin embargo, con el marcador dominante *Xgwm47* (en repulsión) se muestran dos bandas de 165 pb en aquellas familias sin el gen *Sr47* (Figura 1); *Xgwm47* y *Xwms501* son marcadores complementarios para verificar la presencia del gen *Sr47*. Estos resultados concuerdan con los presentados por Faris *et al.* (2008) y Klindworth *et al.* (2012), quienes obtuvieron las mismas amplificaciones de los marcadores *Xwms501* y *Xgwm47*, pero el comportamiento del gen *Sr47* fue diferente entre genotipos, ya que el gen *Sr47* puede translocarse en diferentes regiones, por lo que es indispensable considerar varios marcadores debido a que todos tienen algunas limitaciones (Klindworth *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2015); sin embargo, Klindworth *et al.* (2012) propusieron los controles *Sr47-1*, *Sr47-2* y *Sr47-3* (RWG35, RWG36 y RWG37) para diferenciar plantas o familias portadoras del gen *Sr47*. En este estudio, se utilizó *Sr47-1* como control resistente.

La amplificación de polimorfismos en marcadores codominantes se reportó en *Xgpw4165* y *Xrwgs38* (Klindworth *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2015), lo que permitió la discriminación de plantas heterocigóticas y homocigóticas. Tal como lo mencionan Klindworth *et al.* (2012), es complicado diferenciar plantas heterocigóticas de las homocigóticas dominantes, en este caso se tomó como referencia a los controles Cirno C2008 y *Sr47-1*. La Figura 1 muestra que con el marcador *Xrwgs38* las plantas presentaron dos bandas, una de 187 y otra de 175 pb para las plantas heterocigóticas, estos resultados concuerdan con lo reportado por Klindworth *et al.* (2017); por otra parte, coincide que el porcentaje de plantas homocigóticas es muy bajo o nulo; sin embargo, en este estudio se lograron obtener plantas homocigóticas dominantes. En estudios previos, utilizando como control a DAS15, se encontraron resultados similares (Faris *et al.*, 2008; Klindworth *et al.*, 2012; 2017; Yu *et al.*, 2015); las plantas a las cuales se

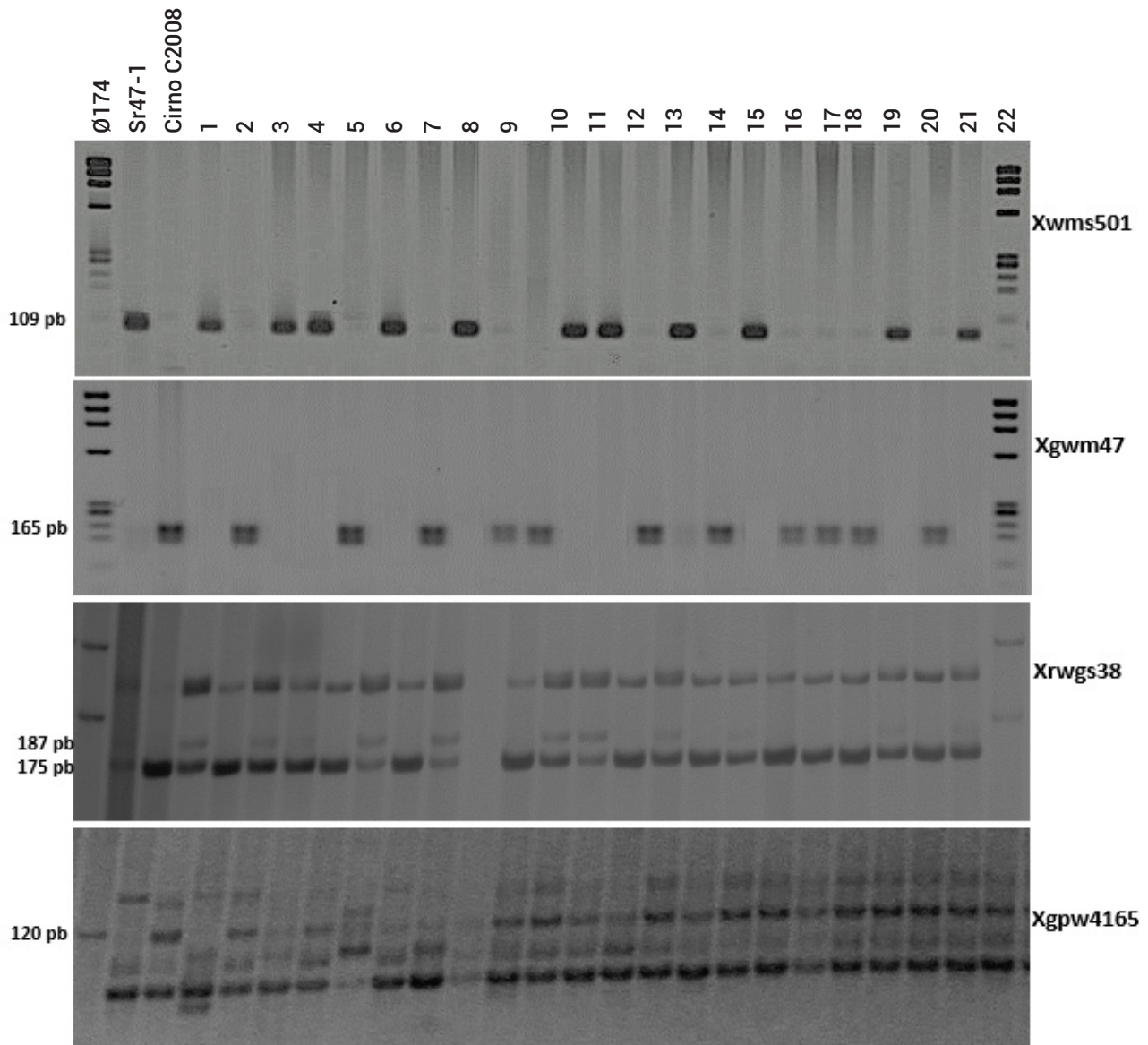


Figura 1. Patrón de bandeo de los marcadores *Xwms501*, *Xgwm47*, *Xrwgs38* y *Xgpw4165* en 22 familias de la población  $BC_1F_3$ . El marcador *Xwms501* amplificó una banda de 109 pb en familias que portan el gen. Con el marcador de repulsión dominante (*Xgwm47*), las familias sin el gen tuvieron dos bandas de 165 pb. Usando *Xrwgs38* y *Xgpw4165* se logra la diferenciación y las plantas heterocigóticas y homocigóticas muestran la presencia de bandas ubicadas en 194 y 120 pb, respectivamente.

logró insertar el gen *Sr47* presentaron una banda de 187 pb, tal como se puede observar en la Figura 2. El marcador polimórfico *Xgpw4165* amplificó una banda de 120 pb ligada al gen *Sr47*, en este estudio se usó como referencia para la diferenciación de familias heterocigóticas y homocigóticas y se tomó como control *Sr47-1* (Figura 1).

Con los cuatro marcadores fue posible separar familias homocigóticas con el gen *Sr47*, tal fue el caso de las

familias 1, 3, 8, 12 y 14 que presentaban una banda de 109 pb para el marcador *Xwms501* y para *Xgwm47* la ausencia de bandas; no obstante, con el marcador *Xgpw4165* no se presentó la banda de 120 pb, estos resultados se obtuvieron tomando como referencia los controles Cirno C2008 y *Sr47-1*.

Considerando los avances que se tienen y la perfección de los marcadores moleculares, en específico con el



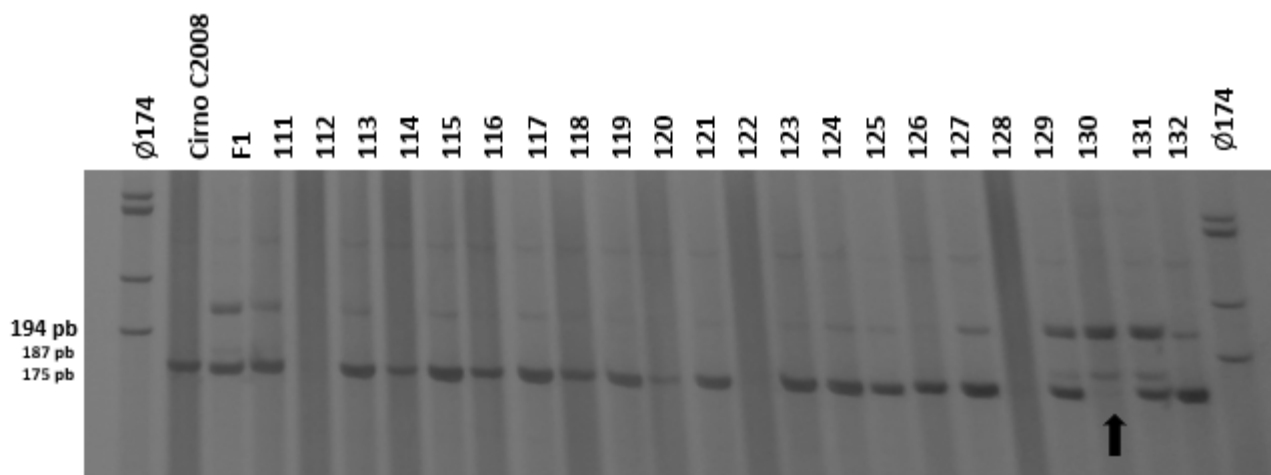


Figura 2. Amplificación del marcador molecular *Xrws38* en familias de la población BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub>. Se observa la amplificación en la familia 130 de la banda de 187 pb, tal como se reporta en DAS15.

marcador *Xrws38*, las familias que poseen el gen presentan las dos bandas (Figura 1) y sólo la familia 131 es homocigótica dominante al presentar sólo la banda de 187 pb. Las familias homocigóticas sin el gen *Sr47* (2, 5, 7, 9, 10, 13, 15, 17, 18, 19 y 21) sólo amplificaron para *Xgwm47* las dos bandas situadas en los marcadores dominantes de 165 pb y la banda *Xgpw4165* de 120 pb, pero no mostraron presencia de la banda del marcador *Xrws38* de 194 pb (Figura 1). Las bandas heterocigóticas en las familias 4, 6, 11, 16, 20 y 22 se mostraron con los marcadores *Xwms501* (banda de 109 pb) y *Xgpw4165* (banda de 120 pb), pero no con *Xgwm47* (ausencia de las bandas de 165 pb).

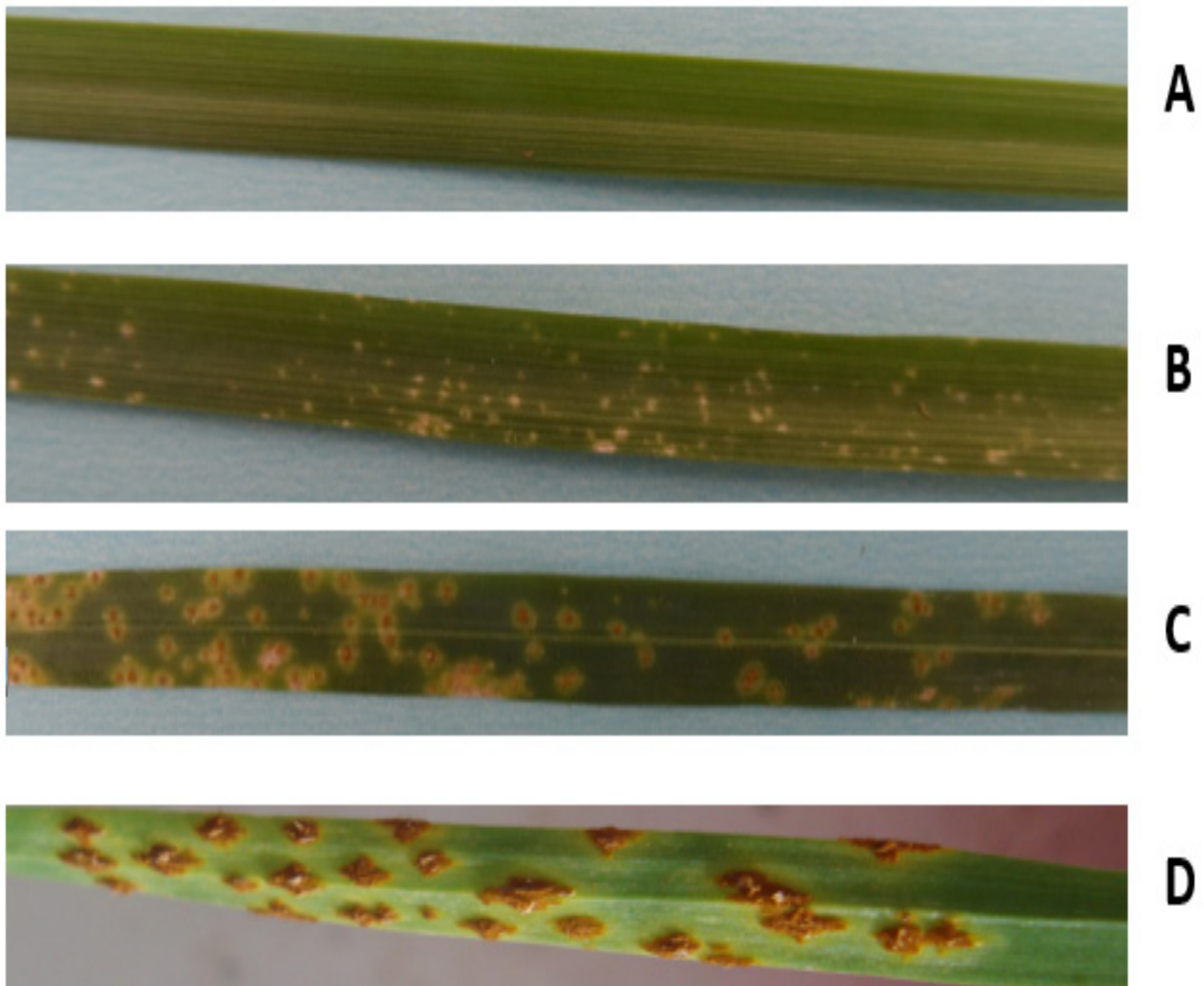
Los marcadores *Xwmc627* y *Xwmc332* no presentaron amplificaciones estables al utilizar los programas SSR, por lo que no ayudaron a diferenciar la variación genética entre las familias BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub>. Klindworth *et al.* (2017) mencionaron que estos marcadores pueden ser afectados por múltiples factores, y que a mayor número de ciclos se amplifican otras bandas, por lo que no fueron considerados en el presente estudio.

#### Análisis de resistencia de plántulas

Este análisis mostró que las 141 familias inoculadas y los progenitores (Cirno C2008 y IIA.2342) fueron resistentes a la raza RTR, de acuerdo con la escala 0-4 (Stakman *et al.*, 1962). Las plantas resistentes mostraron infección tipo 0 (sin presencia de uredinias), Fleck ',' (manchas cloróticas o necróticas sin presencia de uredinias) y 1 (uredinias pequeñas rodeadas de necrosis) (Figuras 3A, B y C), mientras que el testigo susceptible Noio presentó una infección tipo 4 (uredinias grandes sin clorosis) (Figura

3D). La ausencia de familias susceptibles en este estudio indica que la composición genética de los dos progenitores comparte factores similares de resistencia; en este sentido, Singh (1991) informó que la raza RTR es avirulenta para *Sr9e*, y lo más probable es que tanto DAS15 como Cirno C2008 puedan llevar *Sr9e*. Por otro lado, se sabe que, por ejemplo, Langdon porta *Sr9e* (Luig, 1983), pero también podría portar *Sr13* de uno de sus padres, Khapli (Langdon = Ld 194/Khapli//Ld 308/3/Stewart). La línea derivada de DAS15 utilizada en el estudio tiene como pedigrí: LDN5D(5B)/PI369590//LDN/3/LDN5D(5B)/4/3\*47-1/5/CSph1b/2\*LDN//2\*47- 6/1/47-1. La línea de trigo duro 47-1 es altamente susceptible a la mayoría de las razas de roya del tallo. Langdon (LDN) y LDN 5D (5B) es una translocación monosómica de Langdon y Langdon del cromosoma 5B en el tetraploide para un 5D proveniente del fondo hexaploide. La presencia de *Sr9e* o *Sr13* en ambos padres ayudará a explicar la falta de segregación o la ausencia de familias susceptibles en el retrocruzamiento. La presencia de *Sr13* en las líneas derivadas de DAS15 RWG35, RWG36 y RWG37 (Klindworth *et al.*, 2017) no se descartó por completo, ya que sólo en la cruce Joppa × 3/RWG36 los autores pudieron identificar una familia susceptible, pero ésta era heterocigótica para ambos genes de resistencia (*Sr47sr47* y *Sr13sr13*) basado en los marcadores moleculares. Las cruces Joppa × 3/RWG35 y Joppa × 3/RWG37 no segregaron familias susceptibles (Klindworth *et al.*, 2017). Joppa es positivo para el gen de resistencia *Sr13* (Klindworth *et al.*, 2017) y el marcador molecular asociado con *Sr13* (Klindworth *et al.*, 2012; Simons *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017).

Para los genes que confieren un alto nivel de resistencia



**Figura 3. Signos de infección y reacción a la raza RTR de *P. graminis* f. sp. *tritici* en familias BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> inoculadas. Las plantas resistentes mostraron tipos de infección (IT): 0 (A), Fleck (B) y 1 (C). Noio mostró la infección susceptible tipo 4 (D).**

como *Sr26*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr39* y *Sr47* (Jin *et al.*, 2007), la selección se puede realizar basándose únicamente en el fenotipo si no hay múltiples genes *Sr* segregando en la población. Para cruces en las que los genes únicos confieren resistencia parcial o de planta adulta, como *Sr2*, *Sr55*, *Sr56*, *Sr57* y *Sr58* (Bansal *et al.*, 2014; Herrera-Foessel *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2012; 2013; Spielmeyer *et al.*, 2003) o *Sr47*, como en el presente estudio, es difícil hacer selecciones sin asistencia de marcadores moleculares y cuando ambos progenitores son resistentes a las razas de la roya del tallo utilizadas, independientemente del número de factores de resistencia. La selección sin marcadores también es difícil si múltiples genes se están segregando en la población. Por lo tanto, el desarrollo de marcadores de diagnóstico o estrechamente vinculados con los genes *Sr* efectivos a Ug99, RTR y la raza identificada en Sicilia (TTTFT) es esencial para desarrollar cultivares de trigo con

resistencia a la roya del tallo utilizando una estrategia de piramidación de genes en los programas de mejoramiento; en otras palabras, todas las progenies resultantes del cruce parental derivado de DAS15 con Cirno C2008 fueron resistentes a la raza RTR y las que portaban el gen *Sr47* no pudieron identificarse sin los marcadores moleculares; sin embargo, en las pruebas realizadas en el sur de España con la raza TTTFT, Cirno C2008 fue susceptible y los portadores Cirno C2008+*Sr47*, así como las líneas RWG35, RWG36 y RWG37, utilizadas como controles, fueron resistentes (Solís; Com. Pers.)<sup>1</sup>.

Existe la posibilidad de que *Sr13* no esté presente en algunas de las líneas derivadas de *Sr47*, pero no se llevó a cabo una prueba molecular para identificar estas líneas.

<sup>1</sup>Solís Martel, Ignacio. Director en Agrovegetal S. A. Universidad Politécnica de Madrid. Sevilla, Andalucía, España.

El gen *Sr47*, ahora presente en Cirno C2008+*Sr47*, debe combinarse con otros genes efectivos de resistencia a la roya del tallo que tengan marcadores moleculares disponibles para asegurar una resistencia duradera a la roya del tallo en el trigo cristalino.

### CONCLUSIONES

Las 141 familias derivadas de la cruce DAS15/2 × Cirno C2008 fueron resistentes a la raza RTR en México. Con el análisis de las 141 familias BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub>, basado en los marcadores *Xwms501*, *Xgwm47*, *Xrwgs38* y *Xgpw4165*, se identificó la inserción del gen *Sr47* en 63 familias en estado heterocigótico y una familia homocigótica de la cruce DAS15/2 × Cirno C2008. El gen *Sr47* confiere un alto nivel y amplio espectro de resistencia a la roya del tallo y Cirno C2008 un alto potencial de rendimiento. La inclusión de Cirno+*Sr47*, sería de gran utilidad en los esfuerzos para el control de la roya del tallo en México, así como de otras razas de roya del tallo, nuevas y reemergentes a nivel mundial.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero que hizo posible la realización de los estudios de doctorado al primer autor y al CIMMYT e INIFAP (Recurso Fiscal) por financiar parcialmente esta investigación.

### BIBLIOGRAFÍA

- Aoun M., J. A. Kolmer, M. N. Rouse, E. M. Elias, M. Breiland, W. D. Bulbula, ... and M. Acevedo (2019) Mapping of novel leaf rust and stem rust resistance genes in the Portuguese durum wheat landrace PI 192051. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 9:2535-2547, <https://doi.org/10.1534/g3.119.400292>
- Bansal U., H. Bariana, D. Wong, M. Randhawa, T. Wicker, M. Hayden and B. Keller (2014) Molecular mapping of an adult plant stem rust resistance gene *Sr56* in winter wheat cultivar Arina. *Theoretical and Applied Genetics* 127:1441-1448, <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2311-1>
- Bhattacharya S. (2017) Deadly new wheat disease threatens Europe's crops. *Nature* 542:145-146, <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21424>
- Faris J. D., S. S. Xu, X. Cai, T. L. Friesen and Y. Jin (2008) Molecular and cytogenetic characterization of a durum wheat-*Aegilops speltoides* chromosome translocation conferring resistance to stem rust. *Chromosome Research* 16:1097-1105, <https://doi.org/10.1007/s10577-008-1261-3>
- Herrera-Foessel S. A., R. P. Singh, M. Lillemo, J. Huerta-Espino, S. Bhavani, S. Singh, ... 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, <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2256-9>
- Institut for Agroøkologi (2017) CAUTION: Risk of wheat stem rust in Mediterranean Basin in the forthcoming 2017 crop season following outbreaks on Sicily in 2016. Institut for Agroøkologi, Universitas Arhusiensis. Århus, Denmark. [https://agro.au.dk/fileadmin/Sicily\\_CAUTION\\_2\\_February.pdf](https://agro.au.dk/fileadmin/Sicily_CAUTION_2_February.pdf) (November 2023).
- Jin Y., R. P. Singh, R. W. Ward, R. Wanyera, M. Kinyua, P. Njau, ... and A. Yahyaoui (2007) Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease* 91:1096-1099, <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1096>
- Klindworth D. L., Z. Niu, S. Chao, T. L. Friesen, Y. Jin, J. D. Faris, ... and S. S. Xu (2012) Introgression and characterization of a Goat grass gene for a high level of resistance to Ug99 stem rust in tetraploid wheat. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 2:665-673, <https://doi.org/10.1534/g3.112.002386>
- Klindworth D. L., J. Saini, J. Long, M. N. Rouse, J. D. Faris, Y. Jin, and S. S. Shu (2017) Physical mapping of DNA markers linked to stem rust resistance gene *Sr47* in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 130:1135-1154, <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2875-7>
- Lewis C. M., A. Persoons, D. P. Bebber, R. N. Kigathi, J. Maintz, K. Findlay, ... and D. G. O. Saunderson (2018) Potential for re-emergence of wheat stem rust in the United Kingdom. *Communications Biology* 1:13, <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0013-y>
- Luig N. H. (1983) A survey of Virulence Genes in Wheat Stem Rust, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Advances in Plant Breeding. Verlag Paul Parey. Berlin, Germany. 198 p.
- McIntosh R. A., R. C. Wellings and F. R. Park (1995) Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. Plant Breeding Institute. CSIRO, The University of Sydney. Canberra, Australia. 200 p.
- Mondal S., J. E. Rutkoski, G. Velu, P. K. Singh, L. A. Crespo-Herrera, C. Guzmán, ... and R. P. Singh (2016) Harnessing diversity in wheat to enhance grain yield, climate resilience, disease and insect pest resistance and nutrition through conventional and modern breeding approaches. *Frontiers in Plant Science* 7:991, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00991>
- Muñoz C. A. (2014) El fenómeno de la variedad de trigo Cirno C-2008 en el sur de Sonora. *Enlace, Revista de la Agricultura de Conservación* 18:26-30.
- Pardey G. P., J. M. Beddow, D. J. Kriticos, T. M. Hurley, R. F. Park, E. Duveiller, ... and D. Hodson (2016) Right-sizing stem-rust research. *Science* 340:147-148, <https://doi.org/10.1126/science.122970>
- Pretorius Z. A., R. P. Singh, W. W. Wagoire and T. S. Payne (2000) Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Disease* 84:203, <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.203B>
- Saghai-Marouf M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:8014-8018, <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>
- Saunders D. G. O., Z. A. Pretorius and M. S. Hovmøller (2019) Tackling the re-emergence of wheat stem rust in Western Europe. *Communications Biology* 2:51, <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0294-9>
- Simons K., Z. Abate, S. Chao, W. Zhang, M. Rouse, Y. Jin, ... and J. Dubcovsky (2011) Genetic mapping of stem rust resistance gene *Sr13* in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 122:649-658, <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1444-0>
- Singh R. P. (1991) Pathogenicity variations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* and *P. graminis* f. sp. *tritici* in wheat-growing areas of Mexico during 1988 and 1989. *Plant Disease* 75:790-794, <https://doi.org/10.1094/PD-75-790>
- Singh R. P., D. P. Hodson, Y. Jin, J. Huerta-Espino, M. G. Kinyua, R. Wanyera, ... 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* 54:1-13, <https://doi.org/10.1079/pavsnnr.20061054>
- Singh R. P., S. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, H. Bariana, U. Bansal, B. Mccallum, ... and E. Lagudah (2012) *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Bdv1/Ltn1* confers slow rusting, adult plant resistance to *Puccinia graminis tritici*. In: Proceedings of the 13th International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference. 28 Aug.-1 Sept. 2012. W. Q. Chen (ed.). China Agricultural Science and Technology Press. Beijing, China. p. 173.
- Singh R. P., S. A. Herrera-Foessel, J. Huerta-Espino, C. Lan, B. R. Basnet, S. Bhavani, ... and E. S. Lagudah (2013) Pleiotropic gene *Lr46/Yr29/Pm39/Ltn2* confers slow rusting, adult plant resistance to

- wheat stem rust fungus. In: Proceedings Borlaug Global Rust Initiative Technical Workshop. Borlaug Global Rust Initiative. New Delhi, India. p. 17.1.
- Singh R. P., D. P. Hodson, Y. Jin, E. S. Lagudah, M. A. Ayliffe, S. Bhavani, ... and M. S. Hovmøller (2015) Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology* 105:872-884, <https://doi.org/10.1094/PHTO-01-15-0030-FI>
- Singh R. P., P. K. Singh, J. Rutkoski, D. P. Hodson, X. Lee, L. N. Jørgensen, ... and J. Huerta-Espino (2016) Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control. *Annual Review of Phytopathology* 54:303-322, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095835>
- Spielmeier W., P. J. Sharp and E. S. Lagudah (2003) Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Crop Science* 43:333-336, <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.3330>
- Stakman E. C., D. M. Stewart and W. Q. Loegering (1962) Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. E617 Bulletin. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. Washington, D. C., USA. 53 p.
- Tapia-Tussell R., P. Lappe, M. Ulloa, A. Quijano-Ramayo, M. Cáceres-Farfán, A. Larqué-Saavedra and D. Pérez-Brito (2006) A rapid simple method for DNA extraction from yeast and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology* 33:67-70, <https://doi.org/10.1385/MB:33:1:67>
- Valadez M. E. y G. Kahl (2005) Huellas del ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa. México, D. F. 147 p.
- Wanyera R., M. G. Kinyua, P. N. Njao, Y. Jin and R. P. Singh (2006) The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on *Sr31* in wheat in Eastern Africa. *Plant Disease* 90:113, <https://doi:10.1094/PD-90-0113A>
- Yu G. T., D. L. Klindworth, T. L. Friesen, J. D. Faris, S. Zhong, J. B. Rasmussen and S. S. Xu (2015) Development of a diagnostic co-dominant marker for stem rust resistance gene *Sr47* introgressed from *Aegilops speltoides* into durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 128:2367-2374, <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2590-1>
- Zhang W., S. Chen, Z. Abate, J. Nirmala, M. N. Rouse and J. Dubcovsky (2017) Identification and characterization of *Sr13*, a tetraploid wheat gene that confers resistance to the Ug99 stem rust race group. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114:E9483-E9492, <https://doi.org/10.1073/pnas.1706277114>