

## GENÉTICA DE LA RESISTENCIA A ROYA AMARILLA EN LOS GENOTIPOS DE TRIGO HARINERO PI250413 Y C591

### GENETICS OF RESISTANCE TO YELLOW RUST IN THE BREAD WHEAT GENOTYPES PI250413 AND C591

Mariana Rodríguez-Flores<sup>1</sup>, Julio Huerta-Espino<sup>2\*</sup>, José Sergio Sandoval-Islas<sup>1</sup>, Olga Gómez-Rodríguez<sup>1</sup>, María F. Rodríguez-García<sup>2</sup> y Héctor Eduardo Villaseñor-Mir<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Postgrado en Fitosanidad, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, México.

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

#### RESUMEN

La roya amarilla del trigo, causada por *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, ha evolucionado rápidamente en los últimos años, ocasionando pérdidas económicas importantes en trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) y macarronero (*Triticum durum* D.). El manejo de *P. striiformis* se basa en la resistencia genética, que constituye el método más económico y ambientalmente seguro. El objetivo de la presente investigación fue estimar el número de genes que condicionan la resistencia a *P. striiformis* en los genotipos de trigo harinero PI250413 y C591 e identificar la presencia o ausencia de los genes *Yr46* y *Yr67*. Se generaron familias  $F_3$ ,  $F_4$  y  $F_5$  provenientes de la cruce Apav × PI250413 y la  $F_3$  de la cruce PI250413 × C591, mismas que fueron evaluadas bajo condiciones de campo e invernadero durante 2019 y 2020. Epidemias artificiales se crearon utilizando la raza MEX14.191 de *P. striiformis*. El número de genes se estimó con el uso de proporciones fenotípicas. La presencia de los genes se corroboró con marcadores moleculares SNP. El comportamiento de las familias en planta adulta y el análisis de  $X^2$  indicó la presencia de dos a tres genes. Las frecuencias de las distribuciones observadas en plántula se ajustaron a la segregación de un gen. Los resultados indicaron que PI250413 y C591 poseen resistencia de tipo cuantitativa y cualitativa. El análisis molecular confirmó la presencia de *Yr46* y *Yr67* en los progenitores PI250413 y C591. La combinación *Yr46/Yr67* es efectiva tanto en plántula como en planta adulta y disminuye considerablemente los niveles de infección a casi inmunidad, por lo menos en PI250413 y C591; dichos genotipos son adecuados para usarse como progenitores en los programas de mejoramiento para lograr una resistencia durable a roya amarilla.

**Palabras clave:** *Triticum aestivum* L., genes, marcadores moleculares, razas.

#### SUMMARY

The yellow rust of wheat, caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, has evolved rapidly in recent years, causing significant economic losses in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum durum* D.). Management of *P. striiformis* is based on genetic resistance, which is the most economical and environmentally safe method. The objective of this research was to estimate the number of genes that condition resistance to *P. striiformis* in the bread wheat genotypes PI250413 and C591 and to identify the presence or absence of genes *Yr46* and *Yr67*.  $F_3$ ,  $F_4$  and  $F_5$  families were generated from the Apav × PI250413 cross and the  $F_3$  of the PI250413 × C591 cross, which

were evaluated under field and greenhouse conditions during 2019 and 2020. Artificial epidemics were created using the MEX14.191 race of *P. striiformis*. The number of genes was estimated by using the phenotypic ratios. The presence of the genes was corroborated with SNP molecular markers. The behavior of the families in adult plant and the analysis of  $X^2$  indicated the presence of two to three genes. The frequencies of the distributions observed at seedling stage were adjusted to the segregation of one gene. Results indicated that PI250413 and C591 have quantitative and qualitative resistance. Molecular analysis confirmed the presence of *Yr46* and *Yr67* in parents PI250413 and C591. The *Yr46/Yr67* combination is effective both in seedlings and in adult plants and considerably decreases infection levels to almost immunity at least in PI250413 and C591; these genotypes are suitable for use as parents in breeding programs to achieve durable resistance to yellow rust.

**Index words:** *Triticum aestivum* L., genes, molecular markers, races.

#### INTRODUCCIÓN

El trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) es el cereal con mayor producción en el mundo (FAO, 2021). En México, durante el año 2020, *Triticum* spp. destacó como el cuarto cereal en importancia en cuanto a superficie sembrada (562,217.46 ha) (SIAP, 2021). Para capitalizar un incremento de la producción de trigo en México es importante disminuir o controlar los factores que merman el rendimiento del cultivo. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, agente causal de la enfermedad conocida como roya amarilla del trigo, es un parásito obligado que posee alta variación genética para virulencia, debido a mutaciones y recombinación genética (Singh et al., 2011). El mejoramiento genético sigue siendo la forma más eficiente y ambientalmente más segura para el control de *P. striiformis* y otras enfermedades causadas por hongos del género *Puccinia* (Huerta-Espino et al., 2020).

El conocimiento basado en las leyes genéticas de la herencia y el descubrimiento de que la resistencia a royas es un carácter de herencia simple dieron lugar a

considerables investigaciones sobre la herencia de la resistencia a roya amarilla, principalmente para identificar genes mayores (Villaseñor-Espín *et al.*, 2009). Singh *et al.* (2011) mencionaron que para alcanzar una resistencia durable a la roya es esencial conjuntar de cuatro a cinco genes de efectos menores con acción génica aditiva, con lo que se obtendría una resistencia cercana a la inmunidad. Con la infección por *P. striiformis* es necesario estar un paso adelante, puesto que la resistencia específica de las variedades que se liberan comercialmente perdura poco tiempo; al cabo de tres a cinco años éstas se vuelven susceptibles por la evolución del patógeno en nuevas formas de virulencia. La búsqueda de alternativas en el manejo e identificación de fuentes de resistencia para recombinar diferentes genes en las nuevas variedades permitirá alcanzar una resistencia más estable en los diferentes ambientes (Singh *et al.*, 2011).

Los estudios genéticos de poblaciones biparentales permiten identificar genes y el tipo de acción génica; ésto resulta en una herramienta valiosa para la toma de decisiones sobre el tipo de resistencia más conveniente a utilizar; es decir, resistencia de plántula o resistencia de planta adulta (RPA) (Huerta-Espino *et al.*, 2020); sin embargo, la combinación de ambos tipos de resistencia resulta la mejor opción en ciertos ambientes de producción.

Por lo general, la resistencia en plántula está controlada por genes de efectos mayores que confieren respuesta de hipersensibilidad causando necrosis y evitando que el patógeno se propague (Sansón y Zavaleta, 2011). La RPA ocurre en una etapa posterior al estado de plántula, confiere una respuesta no específica a las diferentes razas del patógeno y es controlada por genes de efectos menores. Se espera que la identificación de nuevas fuentes de resistencia en las variedades cultivadas y variedades antiguas de trigo contribuya a ampliar y mantener la base genética de la resistencia a royas (Huerta-Espino *et al.*, 2020).

Recientemente se ha identificado el gen de resistencia *Yr46* en la variedad canadiense RL6077 con efecto pleiotrópico a la roya de la hoja, cuyo gen de resistencia se ha designado como *Lr67* y se ha mapeado en el brazo largo del cromosoma 4D (Herrera-Foessel *et al.*, 2011; Hiebert *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha determinado que tanto *Lr67* como *Yr46* son el mismo gen (Moore *et al.*, 2015). También se ha determinado que la resistencia en RL6077 proviene de la variedad PI250413 de origen pakistaní, la cual posee el gen de resistencia *Yr46/Lr67* con efecto en planta adulta (Dyck y Samborski 1979). Además de la resistencia de planta adulta conferida por *Yr46/Lr67*, se ha observado que la variedad PI250413 es resistente en plántula contra las razas de roya amarilla que actualmente existen en

México, aunque la resistencia en plántula de la variedad PI250413 no ha sido reportada.

Dentro de la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia, también se ha determinado que la variedad de origen pakistaní C591 (CIMMYT, 1989) ha mostrado altos niveles de resistencia en plántula y planta adulta (Lan *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2009). Uno de los genes que confieren la resistencia a C591 fue inicialmente denominado *YrC591* (Li *et al.*, 2009), y posteriormente designado como *Yr67*, se trata de un gen de resistencia efectivo en todas las etapas de desarrollo de la planta, se localiza en el cromosoma 7BL y actualmente no se ha reportado en ninguna otra variedad de trigo.

Por la importancia de la roya amarilla del trigo en México y la necesidad de identificar nuevas fuentes de resistencia, el objetivo de la presente investigación fue estimar el número de genes que condicionan la resistencia a *P. striiformis* en los genotipos de trigo harinero PI250413 y C591 e identificar la presencia o ausencia de los genes *Yr46* y *Yr67*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material genético

Se utilizaron los genotipos de trigo harinero PI250413 y C591, resistentes a roya amarilla. Como progenitor susceptible se utilizó el cultivar Apav, línea proveniente de la cruce de Avocet-YrA × Pavon 76 (Herrera-Foessel *et al.*, 2012).

### Obtención de las generaciones $F_1$ , $F_2$ y familias $F_3$ , $F_4$ y $F_5$

El progenitor susceptible Apav se cruzó con el progenitor resistente PI250413 para obtener la cruce Apav × PI250413. Así también, el progenitor resistente PI250413 se cruzó con el progenitor resistente C591 para obtener la cruce PI250413/C591 que sirvió como prueba de alelismo. Estas cruces se realizaron siguiendo el método de emasculación-polinización manual simple, descrito por Mellado (2007). La cruce Apav/C591 no se realizó, pues la genética de la resistencia de esta variedad ya ha sido publicada (Li *et al.*, 2009). La  $F_2$  se sembró en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Chapingo, Texcoco, Estado de México, a 19° 53' LN y 99° 53' LO, a una altitud de 2250 msnm. La siembra se realizó en el ciclo primavera-verano del año 2018. De las poblaciones  $F_2$  se obtuvieron las familias  $F_3$ . La progenie  $F_3$  de la cruce Apav × PI250413 se sembró en CEVAMEX-INIFAP durante el ciclo primavera-verano 2019, donde se seleccionaron 166 familias y de

cada familia se seleccionó una espiga para obtener la  $F_4$ . La  $F_4$  se sembró en el Campo Experimental Bajío del INIFAP, ubicado en Celaya, Guanajuato, México a 20° 34' LN y 100° 49' LO a 1768 msnm, en parcelas de un suco de 1.0 m por espiga. La  $F_4$  se cosechó en masa y además se seleccionó una espiga por familia para obtener semilla  $F_5$ .

### Evaluación y clasificación de familias $F_3$ , $F_4$ y $F_5$ en planta adulta en campo

#### Generación $F_3$

La evaluación en campo de las familias  $F_3$  y progenitores se realizó en un ensayo no replicado en la estación experimental del CIMMYT, en Toluca, México, donde las condiciones ambientales son propicias para el desarrollo de roya amarilla. Se sembraron parcelas de 0.7 m y bordos susceptibles de las variedades Nana F2007 y Morocco. Se estableció una epidemia artificial con el fin de asegurar que la infección se estableciera a tiempo. Se utilizó la raza fisiológica de roya amarilla MEX14.191 con la fórmula de avirulencia/virulencia *Yr1*, *5a*, *5b*, *10*, *15*, *24*, *26*, *YrPoll*/*Yr2*, *3*, *6*, *7*, *8*, *9*, *17*, *27* y *31*, proporcionada por el CIMMYT. Para llevar a cabo la inoculación, las urediosporas se suspendieron en aceite mineral de bajo peso molecular (Sotrol® 170) a una concentración de 3 mg mL<sup>-1</sup> de aceite, y se asperjaron directamente en la superficie de las plantas con ayuda de atomizadores manuales.

La toma de datos se realizó dos veces; la primera cuando el progenitor susceptible alcanzó de 80 a 100 % de severidad en la hoja bandera; esta evaluación permitió identificar a las familias homocigóticas susceptibles. La segunda evaluación se realizó 10 días después de la primera, donde se corroboraron los datos y se observaron las familias homocigóticas resistentes. En las plantas de cada familia se registró el porcentaje de severidad en la hoja bandera (0 a 100 %). En las familias heterocigóticas, identificadas por su segregación, se utilizó la misma escala (Kishii *et al.*, 2019) y se registró el dato promedio de severidad. Una vez realizada la toma de datos de las familias  $F_3$  de cada cruce, las familias se clasificaron en cuatro grupos. El Grupo 1 se conformó por las familias homocigóticas con una respuesta similar a la del progenitor resistente (de 0 a 1 %); el Grupo 2 se formó por las familias homocigóticas con una respuesta similar a la del progenitor susceptible (90 a 100 %); en el Grupo 3 se incluyó a las familias heterocigóticas segregantes, hasta un porcentaje intermedio (5 a 40 %); finalmente, el Grupo 4 comprendió a las familias heterocigóticas segregantes en las que se agrupan todas las categorías de plantas, desde aquellas tan resistentes como el progenitor resistente (0 a 1 %), intermedias (5 a 40 %), hasta aquellas tan susceptibles como el progenitor susceptible (90 a 100 %) (Singh y Rajaram, 1992).

Al evaluar la  $F_3$  de la cruce PI250413/C591, tanto en plántula como en planta adulta, no se observó segregación; por lo tanto, las progenies de esta cruce ya no se avanzaron a generaciones subsecuentes ( $F_4$ ,  $F_5$ ).

#### Generaciones $F_4$ y $F_5$

Las familias  $F_4$  de la cruce Apav/ PI250413 se evaluaron bajo la incidencia natural de roya amarilla durante el ciclo primavera-verano 2020. La evaluación se realizó en Nanacamilpa, Tlaxcala, México, ubicada a 19° 28' LN y 98° 33' LO, a 2822 msnm. La  $F_5$  se evaluó durante el ciclo primavera-verano 2020 en el CEVAMEX-INIFAP, para lo cual se provocó una epidemia artificial con la raza MEX14.191. La inoculación de las plantas con urediosporas se realizó de la misma manera en que se inocularon las plantas, como se describió en párrafos anteriores. La evaluación y clasificación de las familias se realizó de la misma manera.

#### Evaluación y clasificación de familias $F_3$ y $F_4$ en plántula

La evaluación de la resistencia en plántula de las familias  $F_3$  de la cruce PI250413/C591, la  $F_4$  de la cruce Apav/ PI250413 y los progenitores Apav, PI250413 y C591 se realizó en invernadero (T máxima 21 °C, T mínima 12 °C) del Laboratorio Nacional de Royas y Otras Enfermedades de Cereales (LANAREC) del INIFAP-CEVAMEX, durante los meses mayo-julio de 2020. Las familias de cada cruce y los progenitores se sembraron en charolas de plástico de 20 × 30 × 6 cm que contenían una mezcla de tierra estéril y peat moss en una proporción 60:40. En las charolas se realizaron pequeños orificios y se colocaron de ocho a nueve semillas por familia; adicionalmente, se sembraron las líneas diferenciales de roya amarilla con el fin de determinar la pureza de la raza usada en el estudio. Se fertilizó a los 5 d después de la emergencia, usando una fórmula soluble de triple 20 (20-20-20), nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente.

Plántulas de 14 d de edad se inocularon con una suspensión de urediosporas de la raza de roya amarilla MEX14.191. Para rehabilitar las urediosporas se aplicó un tratamiento de rehidratación por 4 h en una cámara húmeda; posteriormente, éstas se suspendieron en aceite mineral Sotrol® 170 a una concentración de 1 × 10<sup>6</sup> urediosporas mL<sup>-1</sup>. Una vez que se inocularon las plántulas, éstas se colocaron en una cámara bioclimática con temperaturas de 4 °C por 24 h y rocío al 100 %; posteriormente, se trasladaron al invernadero y después de 13 d de inoculación se registró la reacción a roya de las 166 familias procedentes de la cruce Apav × PI250413, y de las 134 familias  $F_3$  de la cruce PI250413 × C591, además de los progenitores, usando la escala propuesta por Roelfs *et al.* (1992). Las familias clasificaron en tres grupos de acuerdo

con la reacción de infección en: 1) familias resistentes como el progenitor resistente (PI250413 o C591), 2) familias segregantes que contenían plantas resistentes y susceptibles y 3) familias susceptibles similares al progenitor susceptible Apav (Singh y Rajaram, 1992).

### Análisis de datos

Las familias resistentes segregantes y susceptibles observadas se contrastaron con las familias respectivas esperadas y se realizó una prueba de chi-cuadrada ( $X^2$ ). El valor de tablas y la significancia fue determinada de acuerdo con la  $X^2$  que se obtuvieron de las proporciones de las familias observadas y esperadas. Para el valor de tablas se usaron  $n-1$  grados de libertad, siendo  $n$  el número de grupos de clasificación de familias (Infante y Zárate, 1998).

Cuando las proporciones de familias resistentes:segregantes:susceptibles fue clara, se usaron las familias similares a los progenitores para determinar el número de genes y el tipo de acción génica, como fue en el caso de la  $F_3$  y  $F_5$  con datos de las familias en planta adulta y  $F_4$  en plántula. Por otro lado, cuando no se pudieron separar claramente las proporciones de familias resistentes sólo se obtuvieron dos categorías: las susceptibles y otras que agrupan a las familias segregantes y resistentes (Rosewarne *et al.*, 2012), como fue el caso de la  $F_4$  en planta adulta. En este caso, la frecuencia de familias susceptibles similares al progenitor susceptible se usó como base para determinar el número de genes, de acuerdo con las proporciones observadas y esperadas (Huerta *et al.*, 2012; Mariscal-Amaro *et al.*, 2009; Villaseñor-Espín *et al.*, 2009).

### Análisis molecular de los progenitores

El análisis molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del CIMMYT. Los progenitores PI250413, C591 y Apav, y los testigos RL6077 y Sujata se sembraron en charolas de plástico que contenían suelo estéril. A los 15 d después de la siembra se colectaron hojas de las plántulas, se cortó el tejido y se hizo la extracción de ADN mediante la técnica CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), siguiendo los protocolos de Dreisigacker *et al.* (2016). La cuantificación y valoración de la calidad del ADN se realizó de acuerdo con los protocolos de laboratorio para trigo descritos por Dreisigacker *et al.* (2016).

La caracterización genética se realizó con los marcadores moleculares SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Kukr1\_c18011\_732/IWB41869 y Tdurum\_contig28598\_245/IWB69562 para detectar la presencia del gen *Yr67*. Para la detección del gen *Yr46* se utilizó el marcador TM4. Se incluyeron además muestras control con los fluoróforos VIC y FAM correspondientes a los alelos positivos y negativos.

El programa para la técnica de PCR utilizada (Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system- KASPar) se ejecutó con la temperatura de amplificación más favorable de acuerdo con los protocolos del CIMMYT (Dreisigacker *et al.*, 2016). La lectura de las placas del producto de PCR se realizó en un lector de placas fluorescentes BMG Pherastar Plus (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania); para la visualización gráfica de datos genotípicos se utilizó el Software KlusterCallerTM.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estimación del número de genes en planta adulta

El número de genes en las poblaciones se estimó mediante un análisis de segregación mendeliana (Singh y Rajaram, 1992). Las frecuencias observadas para cada categoría se contrastaron con las frecuencias esperadas para diferentes números de genes mediante análisis de chi-cuadrada ( $X^2$ ). Los datos de las respuestas a la infección por *P. striiformis* W. en las familias  $F_3$  de cruce del progenitor resistente PI250413 por el susceptible Apav señalaron que las distribuciones observadas se ajustan a la segregación de tres genes (Cuadro 1). La frecuencia de familias  $F_3$  homocigotas similares al progenitor resistente o susceptible fue muy baja, lo que indica que la resistencia es compleja, condicionada por más de un gen. En la  $F_3$  de la cruce PI250413  $\times$  C591 no se observó segregación y todas las familias fueron tan resistentes como ambos progenitores (0 % de infección), lo que indica que PI250413 y C591 tienen por lo menos un gen de resistencia en común.

Las generaciones  $F_4$ ,  $F_5$  y sus progenitores, evaluadas sobre la respuesta a la infección, se clasificaron en tres categorías fenotípicas. de acuerdo con Singh y Rajaram (1992): resistente (R), susceptible (S) y segregante (Seg). En la generación  $F_4$  se observó una proporción 27:115:23, resistentes, segregantes y susceptibles, respectivamente; mientras que en la  $F_5$  las proporciones resultaron en 39:101:25. Para realizar el análisis de la  $F_4$  (Cuadro 2) las familias resistentes y segregantes se agruparon en una sola clase, de la misma forma que lo reportado por Rosewarne *et al.* (2012) debido a que en campo no fue clara la diferenciación de familias segregantes de las familias con un porcentaje de infección intermedia. Las distribuciones observadas y comparadas con las esperadas en la  $F_4$  se ajustaron a la segregación de dos genes.

Por otro lado, el análisis de la  $F_5$  (Cuadro 3) implicó agrupar los grupos segregantes 3 y 4. Las distribuciones observadas y esperadas de la  $F_5$  también se ajustaron a la segregación de dos genes, como en el caso de la  $F_4$ ; difiriendo un poco de los resultados obtenidos cuando se evaluó la  $F_3$ . Esta es la razón por la cual se avanzó

la población hasta F<sub>5</sub> donde existe un nivel mayor de homocigosis, lo que permite diferenciar más fácilmente las líneas homocigotas. Resultados similares han sido reportados por otros investigadores en estudios de resistencia a roya amarilla y de la hoja (Huerta-Espino *et al.*, 2012; Lan *et al.*, 2014; Rodríguez-García *et al.*, 2019a; 2019b).

**Estimación del número de genes en plántula**

Existen genes que confieren resistencia expresada desde el estado de plántula y durante las siguientes etapas de desarrollo; se trata de un tipo de resistencia que puede ser heredada como un carácter cualitativo. En el Cuadro 4 se muestran las frecuencias de las familias F<sub>4</sub> en estado de plántula evaluadas en contra de la raza MEX14.191 bajo condiciones controladas. Las familias se clasificaron en resistentes, segregantes y susceptibles. Las frecuencias observadas en plántulas de familias F<sub>4</sub> fueron 67:50:49, resistentes, segregantes y susceptibles, respectivamente.

Las frecuencias esperadas para un gen en la generación F<sub>4</sub> son de 0.375:0.25:0.375, que equivalen a la proporción 0.25:0.50:0.25; y el número de familias se obtiene por la multiplicación del número de familias usadas en el estudio, en este caso 166 × 0.375 = 62.25 (Cuadro 4.). Resultados similares han sido reportados por Mariscal *et al.* (2007) y Mariscal-Amaro *et al.* (2009).

Li *et al.* (2009) indicaron que el gen presente en C591 es efectivo contra diversas razas de *P. striiformis* en China. Estos mismos autores corroboraron que en la cruce C591 × Taichung 29 las progenies en la F<sub>3</sub> segregaron en proporciones 1:2:1 (Xu *et al.*, 2014). Estos resultados y la ausencia de segregación en la F<sub>3</sub> de la cruce PI250413 × C591 indicarían que PI250413 y C591 comparten el mismo gen de resistencia en plántula; lo cual podría deberse al origen pakistaní de ambos genotipos (Dyck y Samborski, 1979; CIMMYT, 1989).

El análisis de la F<sub>4</sub> en estado plántula indicó que no hubo

**Cuadro 1. Frecuencias observadas y esperadas de las familias F<sub>3</sub> de la cruce Apav × PI250413 evaluadas en Toluca, México, ciclo primavera-verano 2019.**

Cruza	Grupos de familias						No. de genes	X <sup>2</sup>
	Observadas			Esperadas				
	1	3+4	2	1	3+4	2		
Apav × PI250413	1.7	97.2	1.1	6.3	87.5	6.3	2	8.7261
				1.6	96.9	1.6	3	0.1634

X<sup>2</sup>t = 5.9915, gl = 2, α = 0.05

**Cuadro 2. Distribución y frecuencias observadas y esperadas en familias F<sub>4</sub> en planta adulta de la cruce Apav × PI250413 evaluadas en Nanacamilpa, Tlaxcala, ciclo primavera-verano 2020.**

Cruza	Total de familias	Grupos de familias				No. de genes	X <sup>2</sup>
		Observadas		Esperadas			
		1+3+4	2	1+3+4	2		
Apav × PI250413	165	142	23	141.8	23.2	2	0.00203516

X<sup>2</sup>t = 3.8415, gl = 1, α = 0.05.

**Cuadro 3. Distribución y frecuencias observadas y esperadas en familias F<sub>5</sub> en planta adulta de la cruce Apav × PI250413 evaluadas en CEVAMEX-INIFAP, ciclo primavera-verano 2020.**

Cruza F <sub>5</sub>	Total de familias	Grupos de familias						No. de genes	X <sup>2</sup>
		Observadas			Esperadas				
		1	3+4	2	1	3+4	2		
Apav × PI250413	165	39	101	25	31.5	101.8	31.5	2	3.1207

X<sup>2</sup>t = 5.9915, gl = 2, α = 0.05



una segregación normal (1R:2SEG:1S) al observarse un mayor número de familias resistentes en comparación con las familias resistentes esperadas. Lo anterior podría indicar que los genes de planta adulta tienen cierta influencia en el comportamiento de las familias en estado de plántula; aun así, las distribuciones y frecuencias se ajustan a la segregación de un gen.

La combinación de genes efectivos en plántula y la expresión de la resistencia de otros genes en planta adulta, ayudará a tener una mayor protección de las variedades contra la roya amarilla; ésto se aplicaría de forma particular en aquellas regiones donde las condiciones para el desarrollo de la enfermedad son propicias desde las primeras etapas de crecimiento del trigo.

#### Análisis molecular de los progenitores

El análisis molecular de los progenitores utilizados en el estudio indicó una asociación positiva de los marcadores en los progenitores PI250413 y C591, con los marcadores asociados a los genes *Yr46* y *Yr67*, lo que confirma la presencia de los genes *Yr46* y *Yr67* en PI250413 y C591 (Cuadro 5). La presencia de los genes *Yr46* y *Yr67* en

ambos progenitores explica la ausencia de segregación en la progenie de la  $F_3$  de la cruce PI250413 × C591, tanto en planta adulta como en plántula.

#### Control FAM para CIMwMAS0651 y CIMwMAS0652: Avocet, Control VIC: Sujata

Existen variedades que pueden presentar genes de resistencia similares, por lo que es necesario determinar esta posible similitud a través de una prueba de segregación. En el presente estudio se realizó la cruce resistente × resistente. Mariscal *et al.* (2010) mencionaron que la similitud de genes de resistencia se puede observar al evaluar cruces entre progenitores resistentes.

Los resultados del presente estudio indican que la combinación *Yr46/Yr67* es efectiva tanto en plántula como en planta adulta y disminuye considerablemente los niveles de infección a casi inmunidad en PI250413 y C591. Esto también ocurre en otras variedades con la misma combinación, como en el caso de Sujata (Lan *et al.*, 2015). Hasta antes de este estudio no se había determinado la presencia de la combinación *Lr67/Yr46* en C591. Otra variedad que también posee *Lr67* es New Pusa

**Cuadro 4. Distribución y frecuencias observadas y esperadas de familias  $F_4$  en plántula de la cruce Apav x PI250413, evaluada con la raza MEX14.191.**

Cruza	Total de familias	Grupos de familias						No. de genes	$\chi^2$
		Observadas			Esperadas				
		1	3	2	1	3	2		
Apav × PI250413	166	67	50	49	62.5	41.5	62.5	1	4.9237

$\chi^2 t = 5.9915$ , gl = 2,  $\alpha = 0.05$ .

**Cuadro 5. Resultados de los marcadores en los progenitores PI250413, C591 y Apav, y los testigos Sujata y RL6077.**

CIMMYT ID	CIMwMAS0071	CIMwMAS0651	CIMwMAS0652
Gen	<i>Lr67</i>	<i>YrV2_Yr67_YrC591</i>	<i>YrV2_Yr67_YrC591</i>
Marcador	<i>Lr67_TM4</i>	Kukri_c18011_732/IWB41869	Tdurum_contig28598_245/IWB69562
Herencia	Co-dominante	Co-dominante	Co-dominante
Call 1 (FAM)	C:C - <i>Lr67+</i>	A:A - <i>Yr67-</i>	A:A - <i>Yr67-</i>
Call 2 (VIC)	G:G - <i>Lr67-</i>	G:G - <i>Yr67+</i>	C:C - <i>Yr67+</i>
PI250413	<i>Lr67/Yr46+</i>	<i>Yr67+</i>	<i>Yr67+</i>
C591	<i>Lr67/Yr46+</i>	<i>Yr67+</i>	<i>Yr67+</i>
Sujata	<i>Lr67/Yr46+</i>	<i>Yr67+</i>	<i>Yr67+</i>
RL6077	<i>Lr67/Yr46+</i>	<i>Yr67-</i>	<i>Yr67-</i>
Apav	<i>Lr67/Yr46-</i>	<i>Yr67-</i>	<i>Yr67-</i>

Control FAM para CIMwMAS0071: RL6077 y Sujata, Control VIC: Avocet y Chinese Spring.

876, pero no se tienen evidencias de que posea *Yr67*, o no se ha reportado a la fecha. En este caso, podría ser que resultó algo similar a lo ocurrido en la cruce Thatcher\*6/PI250413 en la que se mantuvo *Yr46* pero se perdió *Yr67* en el proceso de obtención de RL6077 (Ponce-Molina *et al.*, 2018). New Pusa 876 en su pedigrí también comparte C591 como progenitor (Zeven y Zeven-Hissink, 1976; Ponce-Molina *et al.*, 2018).

Las pérdidas en rendimiento provocadas por la roya amarilla y su constante evolución que le permite romper la resistencia sugieren la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia tanto en parientes silvestres como en variedades ancestrales. Contar con un alto grado de diversidad genética en genotipos resistentes en los campos de los agricultores permite disminuir la probabilidad de aparición imprevista de nuevas razas fisiológicas, con la capacidad de vencer la resistencia de las variedades comerciales sembradas y causar pérdidas económicas a los productores.

### CONCLUSIONES

En generaciones filiales  $F_4$  y  $F_5$  de Apav  $\times$  PI250413 se determinó la segregación de dos genes que confieren resistencia a roya amarilla, causada por *P. striiformis*, en PI250413. El gen que se expresa en estado de plántula corresponde a *Yr67*, mientras que en planta adulta los dos genes identificados en las progenies  $F_4$  y  $F_5$  fueron *Yr46* y *Yr67*. De acuerdo con los marcadores moleculares, los progenitores PI250413 y C591 fueron positivos para los marcadores asociados con los genes *Yr46* y *Yr67* que confieren resistencia a roya amarilla. La resistencia identificada en PI250413 y C591 puede ser útil en el desarrollo de variedades con resistencia a la roya amarilla.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al primer autor y al proyecto "Evaluación de ensayos nacionales para la liberación de nuevas variedades de trigo para siembras en México" INIFAP, No. SIGI: 11471535275.

### BIBLIOGRAFÍA

- CIMMYT, International Maize and Wheat Improvement Center (1989) Wheat Research and Development in Pakistan. CIMMYT. México, D. F. 129 p.
- Dreisigacker S., D. Sehgal, A. E. Reyes J., B. Luna G., S. Muñoz Z., C. Núñez R. and S. Mall (2016) CIMMYT Wheat Molecular Genetics: Laboratory Protocols and Applications to Wheat Breeding. CIMMYT. Mexico, D. F. 142 p.
- Dyck P. L. and D. J. Samborski (1979) Adult-plant leaf rust resistance in PI250413, an introduction of common wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 59:329-332, <https://doi.org/10.4141/cjps79-053>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2021) Crops and livestock products. FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Octubre 2021).
- Herrera-Foessel S. A., E. S. Lagudah, J. Huerta-Espino, M. J. Hayden, H. S. Bariana, D. Singh and R. P. Singh (2011) New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked. *Theoretical and Applied Genetics* 122:239-249, <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1439-x>
- Herrera-Foessel S. A., R. P. Singh, J. Huerta-Espino, G. M. Rosewarne, S. K. Periyannan, L. Viccars, ... and E. S. Lagudah (2012) *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 124:8:1475-86, <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1802-1>
- Hiebert C. W., J. B. Thomas, B. D. McCallum, D. G. Humphreys, R. M. DePauw, M. J. Hayden, ... and W. Spielmeier (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, <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1373-y>
- Huerta E. J., R. Torres G., M. F. Rodríguez G., H. E. Villaseñor M., S. G. Leyva M. y E. Solís M. (2012) Resistencia a roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) en variedades de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:879-891, <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i5.1381>
- Huerta-Espino J., R. Singh, L. A. Crespo-Herrera, H. E. Villaseñor-Mir, M. F. Rodríguez-García, S. Dreisigacker, ... and E. Lagudah (2020) Adult plant slow rusting genes confer high levels of resistance to rusts in bread wheat cultivars from Mexico. *Frontiers in Plant Science* 11:824, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00824>
- Infante G. S. y G. P. Zárate de Lara (1998) Métodos Estadísticos: Un Enfoque Interdisciplinario. Segunda edición. Editorial Trillas. México, D. F. 643 p.
- Kishii M., J. Huerta, H. Tsujimoto and Y. Matsuoka (2019) Stripe rust resistance in wild wheat *Aegilops tauschii* Coss.: genetic structure and inheritance in synthetic allohexaploid *Triticum* wheat lines. *Genetic resources and Crop Evolution* 66:909-920, <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00758-w>
- Lan C. X., R. P. Singh, J. Huerta-Espino, V. Calvo-Salazar and S. A. Herrera-Foessel (2014) Genetic analysis of resistance to leaf rust and stripe rust in wheat cultivar Francolin#1. *Plant Disease* 98:1227-1234, <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0707-RE>
- 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, <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2454-8>
- Li Y., Y. C. Niu and X. M. Chen (2009) Mapping a stripe rust resistance gene *YrC591* in wheat variety C591 with SSR and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 118:339, <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0903-3>
- Mariscal A. L. A., S. G. Leyva M., J. Huerta E. and E. Villaseñor M. (2007) Genetics of leaf rust resistance (*Puccinia triticina* E.) in elite durum wheat lines. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30:33-38.
- Mariscal A. L. A., J. Huerta E., H. E. Villaseñor M., S. G. Leyva M., S. Sandoval I. e I. Benítez R. (2010) Prueba de similitud de genes con resistencia a roya del tallo en genotipos de avena. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1:541-554.
- Mariscal-Amaro L. A., J. Huerta-Espino, H. E. Villaseñor-Mir, S. J. Leyva-Mir, J. S. Sandoval-Islas e I. Benítez-Riquelme (2009) Genética de la resistencia a roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae* Erikss. & Henning) en tres genotipos de avena (*Avena sativa* L.). *Agrociencia* 43: 869-879.
- Mellado Z. M. (2007) El Trigo en Chile: Cultura, Ciencia y Tecnología. Centro Regional de Investigación Quilmapu, Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chillán, Chile. 684 p.
- Moore J. W., S.A. Herrera-Foessel, C. Lan, W. Schnippenkoetter, M. Ayliffe, J. Huerta-Espino, ... and E. Lagudah (2015) A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* 47:1494-1498, <https://doi.org/10.1038/ng.3439>

- Ponce-Molina L. J., J. Huerta-Espino, R. P. Singh, B. R. Basnet, E. Lagudah, V. H. Aguilar-Rincón, ... and C. Lan (2018) Characterization of adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in Indian wheat cultivar 'New Pusa 876'. *Crop Science* 58:630-638, <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0396>
- Rodríguez-García M. F., R. I. Rojas-Martínez, J. Huerta-Espino, H. E. Villaseñor-Mir, E. Zavaleta-Mejía, J. S. Sandoval-Islas y J. F. Crossa-Hiriart (2019a) Genética de la resistencia a roya amarilla causada por *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* W. en tres genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana* 42:31-38, <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.1.31>
- Rodríguez-García M. F., J. Huerta-Espino, R. I. Rojas-Martínez, R. Prakash-Singh, H. E. Villaseñor-Mir, E. Zavaleta-Mejía, ... y C. Lan. (2019b) Herencia de la resistencia del trigo (*Triticum aestivum* L.) Huites F95 a roya amarilla causada por *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* W. *Agrociencia* 53:765-780.
- 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.
- Rosewarne G. M., R. P. Singh, J. Huerta-Espino, S. A. Herrera-Foessel, K. L. Forrest, M. J. Hayden and G. J. Rebetzke (2012) Analysis of leaf and stripe rust severities reveals pathotype changes and multiple minor QTLs associated with resistance in an Avocet × Pastor wheat population. *Theoretical and Applied Genetics* 124:1283-1294, <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1786-x>
- Sansón G. D. y E. Zavaleta M. (2011) Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:154-164.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2021) Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreaagricola/> (Octubre 2021).
- Singh R. P. and S. Rajaram (1992) Genetics of adult-plant resistance of leaf rust in 'Frontana' and three CIMMYT wheats. *Genome* 35:24-31, <https://doi.org/10.1139/g92-004>
- Singh R. P., J. Huerta-Espino, S. Bhavani, S. A. Herrera-Foessel, D. Singh, P. K. Singh, ... and J. Crossa (2011) Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats. *Euphytica* 179:175-186, <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0322-9>
- Villaseñor-Espín O. M., J. Huerta-Espino, S. G. Leyva M., H. E. Villaseñor-Mir, R. P. Singh, J. S. Sandoval-Islas y E. Espitia-Rangel (2009) Genética de la resistencia a roya amarilla en plantas adultas de trigo harinero. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:217-233, <https://doi.org/10.35196/rfm.2009.3.217-223>
- Xu H. X., J. Zhang, P. Zhang, Y. Qie, Y. Niu, H. Li, ... and D. An (2014) Development and validation of molecular markers closely linked to the wheat stripe rust resistance gene *YrC591* for marker-assisted selection. *Euphytica* 198:317-323, <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1108-2>
- Zeven A. C. and N. C. Zeven-Hissink (1976) Genealogies of 14,000 Wheat Varieties. The Netherlands Cereals Centre (NGC), Wageningen, The Netherlands, and International Maize and Wheat Improvement Center. Mexico D. F. 119 p.