

USO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RESISTENCIA GENÉTICA A LA ROYA MARRÓN Y ROYA NARANJA EN VARIEDADES DE CAÑA DE AZÚCAR 2019-2020

Luis Molina¹, Victoriano Sut², Salomón García³

¹Biotecnólogo, ²Técnico en Biotecnología, ³Fitopatólogo, CENGICAÑA

RESUMEN

Como parte del proceso de caracterización de germoplasma, se utilizó una metodología basada en la amplificación de fragmentos de ADN por PCR, en diez variedades promisorias de caña de azúcar, con el objetivo de determinar la presencia de los alelos *Bru I*, *G1* y *M1*. Se ha comprobado que el alelo Bru1 está altamente relacionado con la resistencia a esta enfermedad, causada por el hongo *Puccinia melanocephala*. Los resultados mostraron que tres de las diez variedades evaluadas (33.33 %) son portadoras del alelo de resistencia a Roya marrón. Los alelos *G1* y *M1*, relacionados con la resistencia a Roya naranja, causada por el hongo *Puccinia kuehnii*, se identificaron en dos de las diez variedades (20 %). Ninguna de las variedades mostró resistencia a ambas royas.

USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE SEARCH FOR GENETIC RESISTANCE TO BROWN AND ORANGE RUST IN SUGAR CANE VARIETIES 2018-2019

ABSTRACT

As part of the germplasm characterization process, a methodology based on the amplification of DNA fragments by PCR was used in ten promising varieties of sugar cane, with the objective of determining the presence of the *Bru I*, *G1* and *M1* alleles. The Bru1 allele has been found to be highly related to brown rust resistance, a disease caused by the fungus *Puccinia melanocephala*. The results showed that three of the ten varieties evaluated (33.33%) are carriers of the brown rust resistance allele. The *G1* and *M1* alleles, related to resistance to orange rust, caused by the fungus *Puccinia kuehnii*, were identified in two of the ten varieties (20%). Neither variety showed resistance to both rusts.

INTRODUCCIÓN

La Roya marrón es una enfermedad causada por el hongo *Puccinia melanocephala* Syd. & P.Syd. Esta enfermedad se caracteriza por el apareamiento de lesiones alargadas y delgadas principalmente en los ápices de las hojas, dichas lesiones pueden desarrollar pústulas que al romper la epidermis liberan esporas diseminando la enfermedad (Ovalle, W. 1997). Fue reportada por primera vez en la India por Patel *et al.* (1950). Comstock (1992), reporto pérdidas en el rendimiento de la variedad susceptible B4362 de hasta un 53 por ciento y en la variedad resistente CP70-1133 de 2.3 por ciento. Existen reportes de brotes de roya marrón con importancia económica en Louisiana (Hoy 2005; Hoy y Hollier 2009) y Sudáfrica (Cadet *et al.*, 2003) en variedades que se pensaba eran resistentes. En el caso de Guatemala, la variedad CG97-97 que mostró ser resistente en los estados de evaluación I a IV, presentó infección por Roya marrón en las pruebas semicomerciales (Ovalle *et al.*, 2007). Debido a esto, los programas de mejoramiento mantienen un interés constante en obtener variedades resistentes a Roya marrón. Los marcadores moleculares son una herramienta importante en los procesos de fitomejoramiento, la selección asistida por marcadores permite determinar con exactitud la presencia de genes de interés en el proceso de selección de padres para los cruzamientos o en los procesos de selección en la progenie. La selección asistida puede presentar una serie de limitantes debido a la complejidad del genoma de la caña de azúcar por su origen interespecífico (D'Hont *et al.* 1996), sin embargo Daugrois *et al.* (1996) identificaron el gen *Bru I* que controla la esporulación de *P. melanocephala* en las hojas de la variedad R570 y desde entonces dicho gen ha sido el centro de desarrollo de un mapa genético de alta resolución y un mapa físico parcial con muchos marcadores moleculares asociados a dicho gen (Asnaghi *et al.*, 2000). En CENGICAÑA Maldonado *et al.* (2006) reportan la utilización de marcadores de tipo AFLP del mismo mapa físico parcial para detectar Roya marrón y caracterizar un grupo de 10 variedades de caña de azúcar. Posteriormente Molina, *et al.*, (2013) reportan un análisis comparativo entre una caracterización fenotípica y el marcador R12H16 para la incidencia de Roya marrón en caña de azúcar.

La Roya naranja (*Puccinia kuehnii* E.J. Butler) fue reportada en el hemisferio oriental, en las islas del Pacífico sur, Nueva Guinea, Fiji, Malasia, Australia, entre otros, a partir del año 1890; y solo hasta 2007 se registró en el continente americano en el estado de la Florida, Estados Unidos. De ahí se expandió hacia Centroamérica, pasando por países como México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Cuba, durante 2007 y 2008 (Ordóñez, Ángel y Victoria, 2010). Las pérdidas económicas ocasionadas por la Roya naranja en una sola temporada de cultivo, se han estimado en 40 millones de dólares en Florida y 117 millones en Australia (Dixon *et al.*, 2010). En Guatemala, la Roya naranja se reportó por primera vez en septiembre de 2007, en un campo comercial sembrado con la variedad CP72-2086 (Ovalle *et al.*, 2008). El plan de manejo para esa enfermedad incluye principalmente, el desarrollo de variedades resistentes y reemplazo de las variedades susceptibles. La identificación de variedades resistentes puede facilitarse mediante el uso de marcadores moleculares. En 2018, Yang *et al.* desarrollaron los marcadores moleculares *G1* y *M1* basados en PCR, los cuales mostraron asociación con la resistencia a roya naranja.

El siguiente trabajo describe el proceso de detección de los alelos *Bru I*, *G1* y *M1* en 10 variedades promisorias de caña de azúcar y cinco variedades control.

METODOLOGÍA

Las plantas de las variedades incluidas en este trabajo provinieron del ensayo de maduración natural (Cuadro 1). Cinco plantas por cada variedad, fueron obtenidas mediante la siembra de segmentos de tallo con una yema, en bandejas con sustrato peat-moss (Figura 1). Al hacer la poda de las plantas, algunos de los fragmentos de hoja cortados se utilizaron como muestra compuesta de cada variedad.

Cuadro 1. Listado de variedades evaluadas y sus progenitores.

Variedad	Progenitor femenino	Progenitor masculino
CG11-6258	Mex79-431	PR68-3120
CG12-130	CP89-2143	SP91-2074
CG12-123	CP91-1696	CP70-1133
CG11-079185	CG97-97	SP79-2233/CP72-2086/CC85-92
CG12-324003	CG96-01	B7306
CG12-108	CP81-1384	CP88-1165
CG12-116	CC85-63	CC84-75/CB38-22/B4362/Akoki
CG12-318018	CP73-1547	SP79-2233
CP08-1842		Introducida
CP08-2298		Introducida



Figura 1. Plantas de variedades promisorias sembradas en bandeja

El proceso de aislamiento de ADN se basó en el protocolo de CIMMYT (2005) para aislamiento de ADN a pequeña escala (página 9). Se tomaron 150mg de material vegetal y se maceraron con nitrógeno líquido, la lisis se llevó a cabo con un búfer CTAB (CetyltrimethylammoniumBromide) a 65°C incubado por 30 minutos, luego se realizaron dos lavados con cloroformo:isopentanol (24:1) se mezcló y se centrifugó a 13,000rpm por 10 minutos, se eliminó el ARN con ARNasa (10mg/ml) incubando las muestras a 37°C durante 30 minutos, al terminar se precipitó el ADN con isopropanol frío y acetato de amonio, el pellet se lavó con alcohol etílico al 70 por ciento y se dejó secar sobre la mesa, una vez seco se resuspendió en agua ultrapura para almacenarse a 4°C.

En la PCR, el volumen total de la reacción fue de 12 µl. Para dicha reacción se utilizaron 10 µl de Go Taq Green Master Mixmaster (Promega), 0.5 µl de cada iniciador (10 µM) y 1 µl de ADN (200 ng/µl). Las secuencias de los iniciadores se muestran en el Cuadro 2. La electroforesis de los fragmentos amplificados

se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1.5% con 0.025 % v/v de Nancy-520 (Sigma) para tinción del gel y se corrió a 90 voltios durante 45 minutos. La visualización se realizó en un transiluminador de luz UV.

Cuadro No. 2. Secuencias de los iniciadores para amplificar *BruI*, *G1* y *M1*.

Marcador	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')
BruI	CTA CGA TGA AAC TAC ACC CTT GTC	CTT ATG TTA GCG TGA CCT ATG GTC
G1	ACC ATG GAA ATC CAT ACG TC	GGC CAA CAC TTA GGC CAA TA
M1	GCG GGT TAT ACT GAG GAT CAA G	GAC GGC CTC CAA TTT CCA AC

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El marcador *BruI* se encontró en tres de diez variedades (33.33 %), siendo CG12-130, CG12-123 y CP08-1842, además de la variedad control CP72-2086 como se muestra en la Figura 2. Comparativamente, esta relación es similar a la que encontraron Molina, *et al.* (2019) en una evaluación de variedades promisorias, en la que solamente tres de nueve variedades (33 %) portaban el marcador. En colecciones de germoplasma, una relación también similar, 32 por ciento en 485 variedades evaluadas fue reportada por Glynn, *et al.* (2012), y Molina, *et al.* (2013) también reportan la presencia del marcador R12H16 en igual frecuencia (32.5% de 80 variedades evaluadas).



Figura 2. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del alelo *BruI* en las muestras 2, 3, 11 y 14.

Otros estudios reportan porcentajes aún más bajos en colecciones de variedades elite como Racedo *et al.* (2013) en Argentina, donde únicamente siete por ciento de 190 variedades evaluadas mostró la presencia del gen *Bru I* y Parco *et al.* (2014) en Louisiana en donde únicamente 4.3 por ciento de 117 variedades evaluadas dieron positivo para *Bru I*.

Como se ha establecido anteriormente, la ausencia del marcador *Bru I* no implica susceptibilidad a Roya marrón en la variedad. La resistencia a Roya marrón en una variedad carente de este marcador probablemente se deba a la acción de otros genes de resistencia, como por ejemplo el *Bru II* (Raboin *et al.*, 2006).

El marcador *G1* se identificó en cinco de las diez variedades evaluadas (50 %), siendo CG11-079185, CG12-324003, CG12-116, CG12-318018 y CP08-2298, además de la variedad control P33-11, como se muestra en la Figura 3. Resultados similares se obtuvieron el año anterior, en el cual se encontró el marcador en cinco de nueve variedades (56 %). En ese trabajo se identificó la variedad SP79-2233 como resistente de acuerdo con el marcador *G1*, cuando ha mostrado susceptibilidad en campo. Para aumentar la precisión, en

el presente estudio se incluyó el marcador M1, también ligado con la resistencia a Roya naranja y se identificó una variedad como resistente a esta enfermedad, cuando mostró la presencia de ambos marcadores.



Figura 3. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del alelo *G1*, indicando resistencia en las muestras 4, 6, 8, 12, 13 y 15.

En la Figura 4 se muestran los resultados del marcador M1, en los que se observa que cuatro de 10 variedades (40 %) presentan el marcador, siendo CG11-6258, CG12-324003, CG12-108 y CG12-318018.



Figura 4. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación del alelo *M1*, indicando resistencia en las muestras 1, 5, 6, 7, 9 y 13.

CONCLUSIONES

Mediante el uso del marcador R12H16 que muestra el alelo de resistencia a Roya marón en el gen *Bru I*, se encontró que el 33.3 por ciento (3 de 10) de las variedades analizadas en el presente trabajo, portan el alelo de resistencia. Estas variedades son: CG12-130, CG12-123 y CP08-1842.

El uso del marcador *G1* indicó resistencia a Roya naranja en el 50 por ciento de las variedades (5 de 10), siendo estas: CG11-079185, CG12-324003, CG12-116, CG12-318018 y CP08-2298.

El uso del marcador M1 indicó resistencia a Roya naranja en cuarto de diez variedades, siendo estas CG11-6258, CG12-324003, CG12-108 y CG12-318018.

Las variedades CG12-324003 y CG12-318018 se identificaron como resistentes a Roya naranja debido a que fueron positivas para los marcadores *G1* y *M1*. No se consideraron como resistentes aquellas que solo mostraron uno de los dos marcadores.

Ninguna de las variedades evaluadas mostró resistencia para ambas royas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Asnaghi, C., Paulet, F., Kaye, C., Grivet, L., Deu, M., Glaszmann, J.C., D'Hont, A. (2000). Application of synteny across Poaceae to determine the map location of a sugarcane rust resistance gene. *TheorAppl Genet* 101:962–969
2. Cadet P, McFarlane S. A., Meyer J. H. (2003). Association between nutrients and rust in sugarcane in Kwazulu-Natal. *Proc South AfrSug* 77:223–229
3. CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT
4. Comstock JC (1992) Effect of rust on sugarcane growth and biomass. *Plant Dis* 76:175–177
5. Daugrois J. H., Grivet L., Roques D., Hoarau J.Y., Lombard H., Glaszmann J. C., D'Hont A. (1996). A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. *TheorAppl Genet* 92:1059–1064
6. D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Glaszmann J, Rao S, Berding N. (1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet* 250:405–413
7. Dixon, L., Castlebury, L., Aime, M., Glynn, N., Comstock, J. (2010). Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycol Progress* 9:459-468.
8. Glynn, N.C., Laborde, C., Davidson, R., Irej, M., Glaz, B.S., Comstock, J.C., D'Hont, A. (2012). Major Brown Rust Resistance Gene (*Bru1*) Utilization in Sugarcane Breeding and Disease Management. *Molecular Breeding*. 30:3. DOI: 10.1007/s11032-012-9792-x
9. Hoy J.W., Hollier C.A. (2009) Effect of brown rust on yield of sugarcane in Louisiana. *PlantDis* 93:1171–1174
10. Maldonado, A, Quemé, J. L., Ovalle, W. (2006) Desarrollo de marcadores tipo AFLP para determinar resistencia genética a *Puccinia melanocephala* H. Syd. & P. Syd. (Roya marrón de la caña) en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp).
11. Molina, L., Sut, V., Ovalle, W. (2019). Uso de marcadores moleculares en la búsqueda de resistencia genética a roya marrón y roya naranja en variedades de caña de azúcar 2018-2019. Memoria Presentación de resultados de investigación zafra 2018-2019. CENGICAÑA.
12. Molina, L., Quemé, J.L., Rosales, F. (2013). Comparative analysis between phenotype and *Bru1* marker for incidence to brown rust in sugarcane. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* (28):1-6.

13. Ordóñez, M., Ángel, J., Correa, J. (2010). Métodos de diferenciación en campo y laboratorio de los agentes causales de la roya café (*Puccinia melanocephala*) y roya naranja (*Puccinia kuehnii*) en caña de azúcar. Carta trimestral 3 y 4. Cengicaña, Colombia.
14. Ovalle, W., Orozco, H., Quemé, J., Melgar, M., García, S. (2008). La roya naranja en Guatemala y estrategias para su manejo. Memoria presentación de resultados de investigación zafra 2007-2008. Cengicaña, Guatemala.
15. Ovalle, W., García, S. (2007) Efecto de la Roya marrón de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala*) en la producción de semilleros de la variedad CG97-97, en épocas de siembra-corte. Memoria presentación de resultados de investigación zafra 2006-2007. Cengicaña, Guatemala.
16. Ovalle, W. 1997. Manual para identificación de enfermedades de la caña de azúcar, Centro de investigación y capacitación de la caña de azúcar.
17. Patel M., Kamat M., Padhye, Y. (1950) A new record of *Puccinia* on sugarcane in Bombay. Current Sci India 19:121–122
18. Raboin L., Oliveira K., Le Cunff L., Telismart H., Roques D., Butterfield M., Hoarau J.Y., D’Hont A. (2006) Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. TheorAppl Genet 112:1382–1391
19. Racedo, J., Perera, M. F., Bertani, R., Funes, C., Gonzalez, V., Cuenya, M. I., D’Hont, A., Welin, B., Castagnaro, A. P. (2013). Bru1 gene and potential alternative sources of resistance to sugarcane brown rust disease. Euphytica 191, 429—436.
20. Yang, X., Islam, Md., Sood, S., Maya, S., Hanson, E., Comstock, J., Wang, J. (2018). Identifying Quantitative Trait Loci (QTLs) and Developing Diagnostic Markers Linked to Orange Rust Resistance in Sugarcane (*Saccharum* spp.). Frontiers in Plant Science 9:1-10.