

**Importancia del gen *Bru1* en el control de la roya
café (*Puccinia melanocephala*) de la caña de
azúcar: Revisión de Literatura**

Max Andrés Ruiz García

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Importancia del gen *Bru1* en el control de la roya café (*Puccinia melanocephala*) de la caña de azúcar: Revisión de Literatura

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Max Andrés Ruiz García

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2020

Importancia del gen *Bru1* en el control de la roya café (*Puccinia melanocephala*) de la caña de azúcar: Revisión de Literatura

Presentado por:

Max Andrés Ruiz García

Aprobado:



Carolina Avellaneda, Ph.D.
Asesora Principal



Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria



Raphael Colbert, Ph.D.
Asesor



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Vicepresidente y Decano Académico

Importancia del *Bru1* en el control de la roya café (*Puccinia melanocephala*) de la caña de azúcar: Revisión de Literatura

Max Andrés Ruiz García

Resumen. Mientras el consumo mundial de azúcar se ha proyectado en un aumento sostenido en los últimos años, la disponibilidad llegó a situaciones críticas. La roya café de la caña, causada por el hongo *Puccinia melanocephala* es una enfermedad que afecta el rendimiento de la caña de azúcar. Esta revisión de literatura buscó resaltar la importancia del control de *P. melanocephala*, explicar el origen del gen *Bru1* y su importancia para el futuro de este cultivo, y establecer el valor de los marcadores moleculares para el manejo de esta enfermedad. La roya ataca el sistema foliar de la planta, su mayor mecanismo de control en caña es el desarrollo de variedades resistentes. Se atribuyó la resistencia a roya a un gen encontrado a partir de la variedad R570, el gen *Bru1*. Se encontró que esta resistencia a *P. melanocephala* se mantenía usando diferentes aislados del patógeno recolectados en distintas partes del mundo y la segregación de la resistencia también se mantuvo. Los marcadores encontrados fueron R12H16 y 9020-F4-PCR-*RsaI*, están completamente ligados al gen *Bru1* y se encontró consistencia en la presencia de estos marcadores en las variedades. Otra alternativa de fitomejoramiento que podría ser usada para otorgar resistencia a *P. melanocephala* es la selección asistida por marcadores, y su principal beneficio es el ahorro de tiempo al sustituir pruebas complejas en campo. Las grandes pérdidas ocasionadas por *P. melanocephala* acompañadas de condiciones climáticas ideales y un hospedero susceptible, pueden ser evitadas usando herramienta genéticas en la selección de parentales.

Palabras clave: Marcadores PCR, resistencia, roya, susceptibilidad.

Abstract. While world sugar consumption has been projected to increase steadily in recent years; availability is reaching critical situations. Brown rust, caused by the fungus *Puccinia melanocephala*, is a disease that affects the yield of sugarcane. This review sought to highlight the importance of controlling *P. melanocephala*, explain the origin of the *Bru1* gene and its importance for the future of this crop, and establish the value of molecular markers for the management of this disease. Rust attacks the leaf system of the plant, and major control mechanism in sugarcane is the development of resistant varieties. Rust resistance was attributed to the *Bru1* gene found from variety R570. It was found that this resistance to *P. melanocephala* was maintained using different isolates of the pathogen collected in different parts of the world and the segregation of resistance was also maintained. The markers found were R12H16 and 9020-F4-PCR-*RsaI*, they are completely linked to the *Bru1* gene and consistency was found in the presence of these. Another breeding alternative that could be used to provide resistance to *P. melanocephala* is marker-assisted selection, and its main benefit is saving time by substituting complex tests in the field. The great losses caused by *P. melanocephala* accompanied by ideal climatic conditions and a susceptible host can be avoided by using the *Bru1* gene tool in the selection of parents.

Key words: PCR markers, resistance, rust, susceptibility.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Índice general	iv
Índice de Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. REVISIÓN LITERARIA	4
4. CONCLUSIONES.....	15
5. RECOMENDACIONES.....	16
6. LITERATURA CITADA	17
7. ANEXOS	21

ÍNDICE DE FIGURAS Y ANEXOS

Figuras	Página
1. Esquema genético típico de un cultivar moderno de caña de azúcar Esquema genético típico de un cultivar moderno de caña de azúcar. Cada barra representa un cromosoma, las barras blancas representan regiones originarias de <i>S. officinarum</i> y las barras grises de <i>S. spontaneum</i> . Los cromosomas alineados en la misma fila son homólogos y representan un grupo homologo, mientras los cromosomas alineados en la misma columna representan un genoma monoploide	5
2. Sintomatología de <i>Puccinia melanocephala</i>	6
3. Distribución de clones con <i>Bru1</i>	10
4. Frecuencia de distribución de los índices de <i>P. melanocephala</i> en las variedades con <i>Bru1</i> y con ausencia del mismo.	11
5. Imágenes del gen demostrando presencia de <i>Bru1</i> , mediante el diagnóstico de productos de amplificación PCR de R12H16(570 pb) y/0 9020-F4-RsaI (200 pb) en diferentes especies del género <i>saccharum</i>	12
Anexos	Página
1. Distribución y frecuencia de los distintos genotipos en la colección mundial.....	21
2. Secuencias de primers para detección <i>Bru1</i>	21

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), pertenece a la familia Poaceae; se caracteriza por ser la fuente de uno de los alimentos más consumidos en el mundo: el azúcar. La producción de caña de azúcar en Honduras tiene una gran importancia, con un área cultivada de 64.6 mil hectáreas, con un rendimiento de aproximadamente 83 ton/ha (FAOSTAT 2017). Mientras que el consumo mundial de azúcar se ha proyectado en un aumento sostenido en los últimos años, la disponibilidad se está acercando a niveles históricamente bajos, llegando a situaciones críticas. Una de las claves principales de este declive es por la incidencia de enfermedades en el cultivo de la caña. A pesar de todos los esfuerzos realizados por el hombre, las plagas (insectos, enfermedades y malezas) destruyen anualmente cerca del 35% de las cosechas, incluso postcosechas, generándose entre un 10 y un 20% de pérdidas adicionales, por lo que en total se puede producir entre 40-50% de pérdidas en la producción (Perez 2017).

La roya de la caña, causada por el hongo *Puccinia melanocephala* H. Sydow y P. Sydow, es una enfermedad que afecta el rendimiento de la caña de azúcar. La planta de caña de azúcar después de los seis meses de edad se recupera de la afección del patógeno, pero los daños provocados a la planta son irreversibles. Al ser una enfermedad de la que la planta se recupera y al no haber información precisa sobre las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad, en algunos países la consideran sin importancia (Osorio 2007). En 1980, se reportaron millones de toneladas perdidas relacionadas a esta enfermedad, debido a cultivares susceptibles a esta enfermedad (Cassalett *et al.* 1995). *P. melanocephala* pertenece al filo Basidiomycota, clase Pucciniomycetes, orden Puccinales, familia Pucciniaceae y al género *Puccinia* (Dixon *et al.* 2010). *P. melanocephala* tiene un ciclo de vida simple, siendo la uredospora el único método de infección conocido (Avellaneda 2016). *P. melanocephala* entra a la planta mediante los estomas usando el apresorio, al pasar las células largas este crece en tamaño y forma una vesícula que ocupa casi toda la cavidad subestomatal. Esta vesícula formada genera de 2 a 3 hifas infectivas, las cuales crecen en el espacio intercelular y al tener contacto con el mesófilo de la hoja, forman el haustorio principal o madre (Purdy *et al.* 1982). La germinación de uredosporas y formación de apresorio ocurre entre 5 y 30 °C. La temperatura óptima para la germinación de esporas es de 15 a 30° C, arriba de esto no hay germinación (Sotomayor *et al.* 1982).

La roya ataca el sistema foliar de la planta, y la intensidad es mayor en las plantas de seis semanas a seis meses de edad. Como sintomatología, es característico encontrar pequeñas manchas cloróticas elongadas que forman un halo amarillento-verdoso, visibles en ambos lados de la hoja. Las pústulas en el envés de la hoja es el signo característico en cualquier roya (Osorio 2007). Las pústulas tienen una longitud promedio de 2 a 20 mm por 1 a 3 mm de ancho, estas son causadas por la formación de uredosporas. En hojas con lesiones avanzadas, se forman áreas necrosadas que llegan a secar la hoja, esto causado por el colapso de las pústulas, lo cual da al campo una apariencia de quemado. Las uredosporas son fácilmente diseminadas a grandes distancias por el viento, una vez formadas las pústulas (Infante *et al.* 2009).

El mayor mecanismo de control de roya en caña se lleva a cabo gracias al desarrollo de variedades resistentes. La resistencia a roya y distintas enfermedades es imperativo en los programas de investigación de nuevas variedades, y la susceptibilidad a esta enfermedad llega a ser un factor de

descarte de variedades promisorias. En plantas superiores se encontró presencias de enzimas quitinasas, que hidrolizan la quitina de la pared celular de hongos. Se demostró la utilidad de la beta 1-3 glucanasa como potencial indicador de resistencia a *P. melanocephala* (Infante *et al.* 2009; López 2002). La durabilidad de esta resistencia no está muy clara, ya que, *P. melanocephala* tiene la habilidad de adaptarse y superar esta resistencia del hospedero con el tiempo. El uso excesivo de una sola variedad resistente es factor determinante a este cambio de resistencia a susceptibilidad (Avellaneda 2016). He ahí la importancia de generar nuevas variedades resistentes para generar una rotación de estas variedades, pero que las mismas cumplan ciertos estándares agronómicos y fenotípicos característicos de la caña comercial.

La caña de azúcar es compleja genómicamente con un número de cromosomas de 100 a 130. Se asume que las variedades comerciales le deben su genoma en un 85-90% a *Saccharum officinarum*, y se sugiere que la resistencia a esta enfermedad es poligénica, parcialmente dominante y cuenta con heredabilidad alta (Chu *et al.* 1982). Se atribuyó esta resistencia a un gen con efecto dominante llamado *Bru1*. Esto se logró estudiando la variedad R570 la cual había sido usada como progenitor de un sin número de variedades, debido a su alta resistencia a *P. melanocephala*. Al ser analizada la resistencia mediante una escala numérica, se asoció a cualidades cuantitativas, por lo que se usó la técnica de QTLs para poder determinar el loci asociado a esta resistencia (Daugrois *et al.* 1996). La variedad R570 se demostró resistente a varias cepas de *P. melanocephala* obtenidas de diversas partes del mundo, por lo cual se reconfirmó esta resistencia a factores genotípicos. Esta variedad también se mostró resistente en diferentes ambientes por lo cual se descartó el factor ambiental (Asnaghi *et al.* 2001). Los objetivos de la revisión literaria son:

- Resaltar la importancia del control de *P. melanocephala* en caña de azúcar.
- Explicar el origen del gen *Bru1* y la importancia de este proceso para el futuro de la caña de azúcar.
- Establecer el valor de los marcadores moleculares asociados a *Bru1* en el manejo de *P. melanocephala* y en el fitomejoramiento en caña.

2. METODOLOGÍA

Estrategia de búsqueda

El estudio se realizó durante los meses de junio y agosto de 2020, donde se realizó una búsqueda de literatura en las bases de datos Science Direct, APS press, Pub med, Springer Link, Scopus, Pub Med Science, Research Gate, Scielo, así como las páginas oficiales de la FAO, USDA, y CENICAÑA. La búsqueda general se realizó mediante palabras clave como roya café, resistencia, *Bru1*, caña de azúcar, diagnóstico molecular, marcadores PCR, y selección asistida por marcadores, y sus traducciones al inglés.

Criterios de inclusión y exclusión

Se incluyeron solo artículos originales reportados en la literatura científica en los últimos 30 años (1990 a 2020), exceptuando ciertos estudios previos a estos años que eran claves y debían ser incluidos debido a su relevancia al tema. Los artículos usados fueron escritos en el idioma inglés y español. Se incluyeron artículos que hablaran sobre el cultivo de caña de azúcar, la roya café, la resistencia a esta enfermedad, el gen asociado a la resistencia, y fitomejoramiento.

Este artículo es considerado un artículo de revisión descriptivo donde se realizó una búsqueda de publicaciones actuales relacionadas con *Saccharum* spp. y *P. melanocephala*, de preferencia de estudios realizados en condiciones tropicales y subtropicales. La búsqueda de publicaciones se realizó con la ayuda de la plataforma de la Biblioteca Wilson Popenoe y Google Scholar, a través de las bases de datos de revistas por suscripción y de acceso libre entre ellas Agora, Springer, Oare, Research Gate, Scielo y Teal.

Otra forma de encontrar información fue el de buscar las citas de fragmentos relevantes en otros estudios, para así ahondar en estas ideas. Todos estos documentos de interés citados se buscaron por los motores de búsqueda previamente mencionados.

3. REVISIÓN LITERARIA

Caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un cultivo altamente demandado, ya que, uno de sus derivados **el azúcar**, es utilizado como el principal endulzante de la actualidad. Pero no siempre fue así, en el siglo XVII era considerado un lujo en Europa, lo que cambió con el descubrimiento de América. Gracias a esto, el azúcar se volvió disponible para el mercado mundial en cantidad y con precios más aceptables, que permitieron que el azúcar se vuelva un producto de primera necesidad. El origen de la caña de azúcar se le atribuye a India y China, y el continuo mejoramiento del cultivo y de generación de variedades se dio desde el origen de este (James 2004). *Saccharum officinarum* es un cultivo altamente demandado en la actualidad por todos los usos que se le dan a este generoso cultivo, la producción de azúcar como uso principal, ensilaje, bioetanol, alcohol, panela, energía a partir de biomasa, melaza, cachaza y vinaza (Cassalett *et al.* 1995). Esta gran cantidad de usos que se le puede dar al cultivo, son la razón de la gran cantidad de extensiones de tierra destinados a este cultivo, con un total de 26 millones de hectáreas (FAO 2018).

El continente con mayor área destinada a este cultivo es América del Sur con 11 millones de hectáreas, seguido de Asia con 10 millones de hectáreas, esto va directamente ligado a la cantidad de toneladas producidas por cada continente. En cuanto a rendimientos de toneladas por hectárea, el continente con mayor rendimiento es América del Norte con 86 t/ha, seguido de América central con 83 t/ha. Los países con mayor área destinada al cultivo de caña de azúcar son Brasil, India y China, con 10 millones, 4.7 millones y 1.4 millones de hectáreas respectivamente. Cabe recalcar que Brasil cuenta con el 88% de toda el área producida en América del Sur. En cuanto a rendimiento, los países que mejor producen son Perú con 121.8 t/ha, seguido por Guatemala con 118.4 t/ha, y Senegal con 114.8 t/ha (FAO 2018).

La morfología y fisiología de *S. officinarum* permiten conocer los órganos de mayor importancia agroeconómica de este cultivo. Estos órganos de importancia agroeconómica son los mismos de cualquier planta: la raíz, el tallo, la hoja y la flor. El sistema radical de la caña está formado por raíces primordiales, las cuales se originan a partir de la estaca que se siembra, y por las raíces permanentes, que brotan de los anillos de crecimiento de los nuevos brotes. Las hojas se originan en los nudos y se distribuyen a lo largo del tallo a medida que crece. Es el órgano fotosintético por excelencia, por eso cuando este se ve afectado por algún patógeno o plaga, se ve directamente afectada la producción. La inflorescencia de la caña es una panícula sedosa en forma de espiga (Cassalett *et al.* 1995).

El tallo es el órgano de mayor importancia agroeconómica, ya que en él se almacenan los azúcares y es usado como semilla en las producciones comerciales por su habilidad de reproducirse vegetativamente. El número de tallos, diámetro y habito de crecimiento de este depende principalmente de las variedades. Una vez cosechados estos tallos sus raíces mueren, y al mismo tiempo, las yemas rebrotan dando origen a la soca. El número de cortes y de rendimiento de la caña en cada corte, es definido por la variedad, las prácticas y las condiciones ambientales en la cosecha. En cuanto a la siembra, al tener dominancia apical la caña induce la germinación de las yemas superiores, lo cual puede inducir a una disminución en la germinación cuando se usa tallos demasiado largos como semilla (Cassalett *et al.* 1995).

La caña de azúcar tiene un alto nivel de poliploidía (8-14x) y aneuploidía, lo que hace complicado trabajar a nivel genético con este cultivo, por lo que es considerado el modelo extremo para entender el impacto de la poliploidía en cultivos. Por lo que, el desarrollo de herramientas moleculares de selección y transferencia de genes de forma eficiente es imperativo. El cultivo ha sido mejorado genéticamente, pero este alto nivel de poliploidía ha hecho que el desarrollo de transgénicos con niveles estables de expresión sea muy complicado (Henry y Kole 2010).

El género *Saccharum* pertenece a la tribu Andropogoneae de la familia de las Poaceas, que también incluye al sorgo. Esta cercanía filogenética se encontró cuando la secuenciación de sorgo y caña de azúcar fue comparada, por lo que el genoma del sorgo se convirtió en una herramienta importante en los análisis relacionados al genoma de la caña (Henry y Kole 2010).

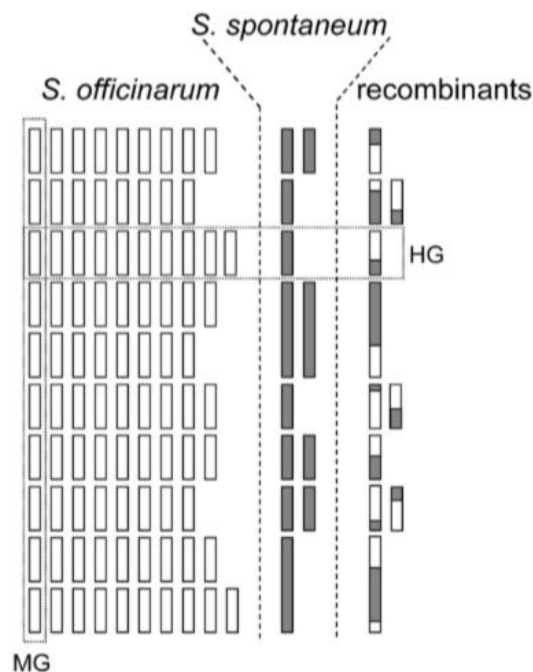


Figura 1. Esquema genético típico de un cultivar moderno de caña de azúcar. Cada barra representa un cromosoma, las barras blancas representan regiones originarias de *S. officinarum* y las barras grises de *S. spontaneum*. Los cromosomas alineados en la misma fila son homólogos y representan un grupo homólogo, mientras los cromosomas alineados en la misma columna representan un genoma monoploide.

Fuente : (Le Cunff *et al.* 2008)

Los cultivares modernos son producto de hibridaciones, entre especies domesticadas de *S. officinarum* y especies silvestres de *S. spontaneum* (Henry and Kole 2010). D'Hont *et al.* (1996) usó la técnica de hibridación in situ genómica (GISH) en el cultivar R570 y demostró que esta variedad contaba con $2n = 115$ cromosomas de los cuales el 80% venían de *S. officinarum*, 10% de

S. spontaneum y el otro 10% pertenecían a genes recombinantes entre las dos especies. Este porcentaje alto de *S. officinarum* es debido a las retro cruza hechas para recuperar las características agronómicas favorables de esta especie (Henry y Kole 2010).

Roya café (*Puccinia melanocephala*) de la caña de azúcar

La roya café es causada por el hongo *Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd. *P. melanocephala* pertenece al filo Basidiomycota, clase Pucciniomycetes, orden Pucciniales, familia Pucciniaceae y al género *Puccinia* (Dixon *et al.* 2010). *P. melanocephala* aparece por primera vez en 1978, en República Dominicana, lo cual resultó en pérdidas significativas de azúcar en América. Producciones de un cultivar susceptible específicamente B4362 en México, reportando perdidas promedio de 12.6 toneladas por hectárea. Científicos mexicanos que se perdieron el 50% de los cultivos con esta variedad debido a la roya.

La roya de la caña puede ser causado por *P. melanocephala* y *P. kuehnii*, pero las perdidas por *P. kuehnii* han sido insignificantes debido a la baja incidencia de este hongo. Mientras que *P. melanocephala* ha sido reportado en casi todas las áreas en las que se produce caña en el hemisferio occidental (Purdy *et al.* 1983). A pesar de tener el mismo hospedero, *P. melanocephala* y *P. kuehnii* no tienen cercanía filogenética entre los *Pucciniales*, más bien tienen relaciones más cercanas con otras especies de *Puccinia* que infectan hospederos distintos a *Saccharum spp.* (Dixon *et al.* 2010).

La sintomatología de *P. melanocephala* comienza con manchas cloróticas pequeñas y alargadas, lesiones elongadas color marrón en el envés de la hoja y pústulas de color marrón en severidades más altas (Figura 2). Bajo el microscopio se puede observar uredosporas pardas, con prominentes poros y espinas más pequeñas, de forma numerosa y uniformemente distribuidas (Garces n.d.). Es fácil de diferenciar con otras enfermedades fúngicas, las lesiones de la roya café y naranja se caracterizan por la presencia de pústulas que sobresalen de la lámina foliar y tienen apariencia de polvo disperso. La presencia de las pústulas nos permite diferenciar de otras enfermedades fúngicas con coloraciones oscuras y como: *Dimeriella sacchari*, *Cercospora longipes* y *Bipolaris sacchari* (Victoria *et al.* 1995).



Figura 2. Sintomatología de *Puccinia melanocephala*. a) Pústulas de roya café en el envés de la hoja. b) Manchado café característico al frotar el envés de la hoja. c) Uredosporas de *P. melanocephala*

Fuente: (CINCAE 2013)

La germinación de las uredosporas y formación de apresorio se da entre los 5 y 30 °C, pero la temperatura óptima está entre los 15 y 30 °C. Los porcentajes de germinación y de apresorio entre 5-10 °C fueron menores en comparación a los de temperaturas más altas. No hubo germinación de uredosporas a los 35 °C. El hongo es estimulado por la topografía de donde cae, esta estimulación se da por los estomas, lo que estimula formación de un apresorio, lo que conlleva a la formación de estructuras infectivas. El apresorio es fundamental en la formación de órganos infectivos, ya que, no se desarrollaron en ausencia de este. Al pasar las células guarda del estoma, el tubo germinativo forma una vesícula que ocupa toda la cavidad sub estomatal, de esta surgen de 2 a 3 hifas que colonizan la hoja y las células de esta. La formación de haustorio se da cuando la parte terminal de la hifa tiene contacto con la pared de las células del mesófilo (Sotomayor *et al.* 1982).

Las epidemias de *P. melanocephala* varían entre temporadas de siembra, esto se debe a diversos factores. Siendo la temperatura máxima diaria la variable más correlacionada al desarrollo de la epidemia. Severidades bajas se dan con la combinación de temperaturas máximas diarias y humedad en las hojas desfavorables, siendo estas mayores a 32 °C y una exposición menor a seis horas diarias de humedad en la hoja, respectivamente. Mientras las temporadas críticas se dieron al tener temperaturas máximas diarias menores y una exposición mayor a seis horas de humedad en la hoja (Barrera *et al.* 2013). Esta información nos permite identificar posibles temporadas críticas y así tomar las decisiones pertinentes basándonos en proyecciones meteorológicas.

El control de roya café se da a partir del desarrollo de variedades resistentes y el cultivo de estas. La resistencia a roya se ha vuelto un requisito en el desarrollo de nuevas variedades y es un pilar fundamental de los programas de fitomejoramiento. Este desarrollo ha permitido el control de la enfermedad y ha reducido drásticamente las pérdidas económicas ocasionadas por *P. melanocephala* (Asnaghi *et al.* 2001).

No hay certeza de la durabilidad de la resistencia, pues se han reportado varios casos de variedades que eran previamente resistentes a *P. melanocephala* y con el tiempo se reportaron como susceptibles. Esto se debe al sobre uso de una sola variedad, lo que genera una presión de selección sobre el hongo en el largo plazo y aumenta la varianza genética. Un gran ejemplo de esto la variedad LCP 85-384, la cual era usada en grandes extensiones en el estado de Louisiana, Estados Unidos, lo cual conllevó a grandes pérdidas por la reducción del rendimiento (Barrera *et al.* 2013). Esto conllevó a buscar alternativas de control con fungicidas, los cuales eran alternativas más caras, pero eran necesarias al momento debido a la gran extensión que se tenía con esa variedad. (Chaulagain *et al.* 2019), encontraron que al aplicar fluxapyroxad + pyraclostrobin durante el inicio, medio y final de la época epidemiológica la severidad disminuía en un 40-42%.

Avellaneda (2016), realizó un estudio de la respuesta de diferentes genes a la interacción de la caña de azúcar con *P. melanocephala*, en variedades resistentes y susceptibles. La resistencia de una planta a una enfermedad es el resultado de un grupo de genes involucrados en la percepción de señales y la respuesta a estas, la activación de genes relacionados a la defensa y la transcripción de estos. Los resultados demostraron que genes asociados al metabolismo primario, actividad de proteasas, enlace de proteínas con nucleótidos y respuesta a señales bióticas, fueron expresadas de manera diferente en respuesta al patógeno. Todos los genes analizados fueron expresados a la infección en las variedades resistentes y susceptibles, pero la alta expresión por un mayor periodo

de tiempo se encontró como un factor que contribuía a la resistencia a roya café. Los genes encontrados para encontrar QTLs asociados a estos, y así encontrar marcadores funcionales relacionados a estas respuestas de la planta. Estos nuevos genes pueden ser combinados con el uso del gen *Bru1* (Daugrois *et al.* 1996) en los programas de fitomejoramiento, para desarrollar cultivares con resistencias más efectivas y duraderas al patógeno (Avellaneda 2016).

Gen asociado a la resistencia de *P. melanocephala* y marcadores PCR ligados a este

Daugrois *et al.* (1996), atribuyeron la resistencia a roya a un gen encontrado a partir de la variedad R570 con un efecto de dominancia Mendeliana. Primero evaluaron la resistencia en campo de 65 clones de R570, en el que encontraron una heredabilidad de 0.94 en planta caña y 0.97 en soca. Luego, se evaluó la resistencia en condiciones controladas en las que se asperjaron las plantas con uredosporas y las mantuvieron a 100% de humedad relativa por 16 horas, para luego pasarlas a un invernadero. La susceptibilidad se midió por la media de la densidad de uredosporas germinadas en 5 cm² de cada hoja. Encontraron un ratio resistente versus susceptible muy cercano al 3:1, el cual es ratio esperado en un gen de dominancia simple. Para buscar el gen asociado a la resistencia a *P. melanocephala* usando herramientas para detectar QTLs se usaron 439 marcadores moleculares, esto gracias al mapeo genético hecho en esta variedad (Grivet *et al.* 1995), el cual había obtenido 505 marcadores, pero se descartaron todos los que tenían el 10% de información faltante (Daugrois *et al.* 1996).

La detección de QTLs es una herramienta promisoriosa para el mejoramiento de cualquier cultivo, estas consisten en identificar las variantes fenotípicas de la característica de interés y asociarlo con las variantes genotípicas. Usando marcadores moleculares y buscando los loci encargados de expresar estas características, esto por métodos estadísticos el cual agrupa por diferencia de medias por expresión fenotípica y busca el marcador molecular que cumpla con estas en su totalidad (Montoya y Romero 2016).

El gen *Bru1* fue el primer gen de interés agronómico encontrado en caña de azúcar, gracias a los estudios hechos en la variedad R570, una variedad incluida en la mayoría de los programas de fitomejoramiento en el mundo, y se encontró que esta resistencia a *P. melanocephala* se mantenía usando diferentes aislados del patógeno recolectados en distintas partes del mundo y la segregación de la resistencia también se mantuvo (Asnaghi *et al.* 2001). Además de encontrar durabilidad en esta resistencia, ya que no ha habido pérdida de esta resistencia a pesar del cultivo intensivo de la variedad R570 por más de 20 años (Le Cunff *et al.* 2008).

Daugrois *et al.* (1996) encontraron una fuerte correlación entre la resistencia a la roya y el marcador RFLP *CDSR29-H5*, el cual fue confirmado en la progenie de estos clones analizados. No se encontró ningún grupo de ligamiento a este marcador, hasta que Asnaghi *et al.* (2000) determinó la localización del gen usando la sintenia en la familia de las Poaceas. En el que se comparó los mapas genéticos de caña de azúcar, sorgo, maíz y arroz, esto gracias al grado de conservación genómica observado entre estas especies. Esto permitió usar esta información genética y recursos de mapeo de genomas bien caracterizados, como el maíz, y genomas más simples como el arroz y el sorgo, para una especie con un genoma mucho más complejo y menos estudiado como la caña de azúcar. Este estudio permitió la ubicación del gen en el grupo de ligamiento VII y la identificación de segmentos cromosómicos homólogos al gen *Bru1*, en los grupos de ligamiento D

en sorgo, grupo 2 en arroz y en maíz en el grupo 4 y en el centrómero del grupo 5. Además de encontrar que el marcador CDSR29 es el marcador de mayor cercanía al gen con 6.5 cM.

El estudio de Asnaghi *et al.* (2000) permitió encontrar el grupo de ligamiento asociado a *Bru1*, mas no encontró suficientes marcadores debido a la posición distal del gen y la baja densidad de marcadores ortólogos cercanos al gen. Posteriormente Asnaghi *et al.* (2004), identificaron 8 marcadores de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) en un intervalo de 10 cM, siendo los más cercanos dos marcadores ubicados a 1.9cM y a 2.2 cM en cada lado del gen.

Le Cunff *et al.* (2008), usó la sintenia de la caña de azúcar con el sorgo y el arroz, para hacer un mapa de alta resolución que incluía marcadores a 0.28 y 0.14 cM en ambos lados y 13 marcadores con cosegregación a *Bru1*. Además de encontrar la ubicación exacta del gen, el grupo de cosegregación VII-1, confirmando la ubicación en el grupo de ligamiento VII encontrado por Asnaghi *et al.* (2000). Este grupo de ligamiento es asociado a diversos marcadores moleculares, de los cuales se analizaron todos en un intervalo de 8.2 cM al gen *Bru1*, para analizar el patrón de desequilibrio de ligamiento, y establecer marcadores PCR. De los marcadores probados se encontraron patrones bimodales, de media (0.41-0.61) y alta frecuencia (0.74-0.97), siendo los marcadores de media frecuencia los de mayor asociación a la resistencia a roya. La mayor asociación se encontró en cuatro marcadores localizados a 0.28-0.14 cM del gen *Bru1*, siendo estos cBR37-PCR, 9O20-F4-PCR-*RsaI*, R12H16-PCR y m164H22. Los marcadores R12H16 y 9O20-F4-PCR-*RsaI*, están completamente ligados al gen *Bru1* en el mapa de R570 y se encontró consistencia en la presencia de estos marcadores en las variedades resistentes de un 86% y una total ausencia en las variedades susceptibles. Además, se encontró que la reducción de recombinación del gen *Bru1* está acompañada de un desequilibrio de ligamiento fuerte (Costet *et al.* 2012).

Análisis de distribución y comportamiento del gen en distintos bancos de germoplasma

Glynn *et al.* (2013) analizaron todas las variedades usadas en el centro de fitomejoramiento de caña en Canal Point, Florida. Esta colección de germoplasma es usada en el programa de cruzamientos de caña de azúcar y representa la base genética de los cultivares desarrollados en Florida. Estas variedades tenían diversos orígenes y fueron separadas según su origen, Canal Point, “Townsite Farm of the United States Sugar Corporation (USSC)”, Texas, Louisiana, las exóticas e históricas. Se usaron un total de 1072 genotipos para el análisis de ADN, y 1521 genotipos para el análisis en campo usando una escala de 0-4. Para la detección del gen *Bru1* se usaron los dos primers encontrados por Costet *et al.* (2012), 9O20-F4 y R12H16. De los 1072 clones, *Bru1* fue detectada en 285 clones (27%). Según su origen, las que presentaron el gen en mayor proporción fueron las de Canal Point (41%), comparadas con las exóticas y las de la USSC que tenían proporciones similares 33 y 28% respectivamente. Mientras que las variedades con menor proporción fueron las de Texas (16%), las históricas (10%) y, por último, las de Louisiana (7%) (Figura 4).

De las 1521 variedades analizadas en campo, 667 (44%) presentaron *Bru1*. De las cuales en 86 (13%) se encontraron pústulas de *P. melanocephala*, en el resto de las variedades no se encontró la presencia de estas. De las variedades que no presentaron el gen, 119 (14%) clones se comportaron resistentes a la enfermedad (Figura 5). La media del índice de presencia de roya café fue de 1.74 en variedades sin el gen con un máximo de 4 (11 clones), y de 0.18 en variedades con el gen *Bru1* con un máximo de 3 (2 clones) (Glynn *et al.* 2013).

En un estudio hecho en Guatemala, encontraron la presencia del gen *Bru1* en 26 de las 80 (32.5%) variedades analizadas y todas presentaron resistencia a *P. melanocephala*. Mientras que las 54 variedades con ausencia del gen el 91.4% también se comportó resistente al hongo. Esto puede ser atribuido a la existencia de otras fuentes de resistencia (Molina *et al.* 2013). Esto puede ser gracias a la selección hecha por los programas de fitomejoramiento, que descartan variedades agrónomicamente promisorias con alguna susceptibilidad a enfermedades. Molina también analizó seis variedades resistentes y a sus progenitores, en las que encontró que todas tenían un progenitor resistente y uno susceptible. De los tres progenitores con la presencia de *Bru1* la F1 presentó el gen en dos ocasiones.

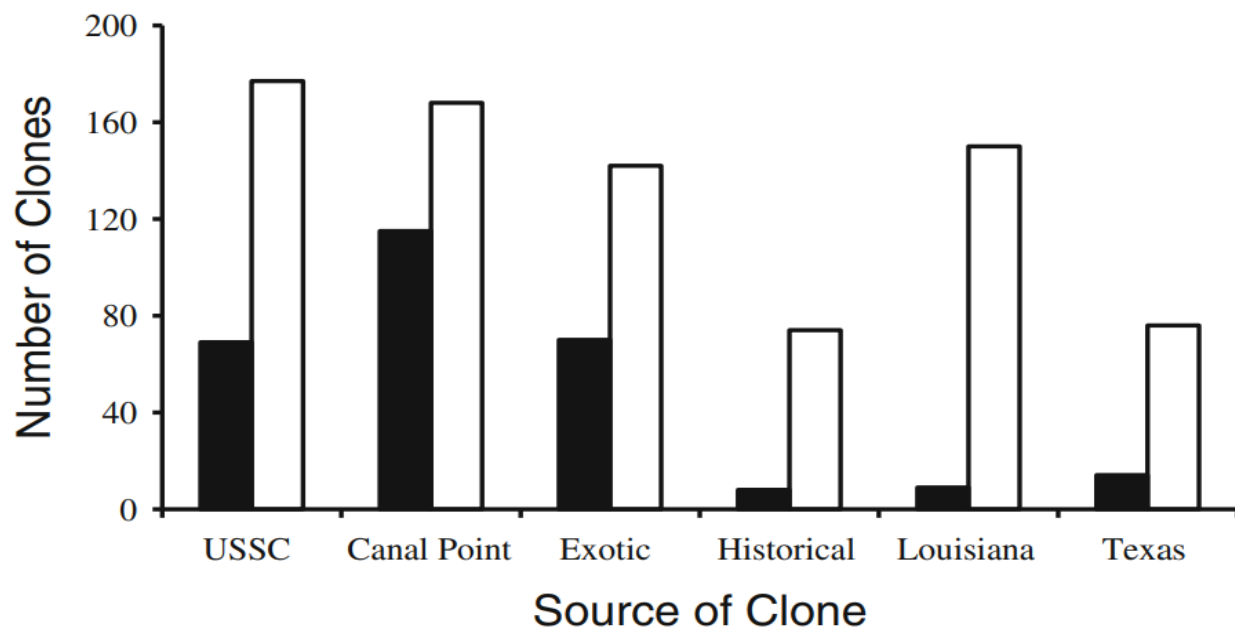


Figura 3. Distribución de clones con *Bru1*. Cantidad de clones en los cuales se detectó *Bru1* (negro) y en los que el gen estuvo ausente (blanco).
Fuente: (Glynn *et al.* 2013)

En Argentina, se analizó la presencia del gen en el banco de germoplasma en un programa de fitomejoramiento de caña de azúcar en Tucumán. En el que evaluaron 129 cultivares de caña de azúcar, usando los mismos marcadores encontrados por Costet *et al.* (2012) y lo relacionaron con su comportamiento en campo con presencia de la enfermedad. En el que 29 variedades no presentaron pústulas, de las cuales ocho (28%) dieron positivo a *Bru1*. A demás se analizó todo el banco de germoplasma del programa en el que 21 variedades (7%) de 319 dieron positivo al gen. (Racedo *et al.* 2013)

En los últimos años, China desarrolló 50 nuevas variedades consideradas elite y fueron analizadas para ver la frecuencia de *Bru1* dentro de estas y dos variedades que son ampliamente cultivadas en este país. Usando los marcadores moleculares encontrados por Costet *et al.* (2012), detectaron 32 (64%) variedades resistentes *P. melanocephala* y de estas variedades resistentes 27 (84%) dieron positivo a *Bru1*. Lo que indica que la resistencia a roya café en China se debe en su gran mayoría

a la presencia de este gen, las cinco restantes indican la presencia de otros genes que confieren esta resistencia, coincidiendo con estudios anteriores (Glynn *et al.* 2013; Molina *et al.* 2013; Racedo *et al.* 2013; Li *et al.* 2018).

En el programa de fitomejoramiento de Luisiana se evaluó la frecuencia y distribución del gen *Bru1*. En el encontraron una baja frecuencia del gen (4,3%) en cultivares de caña de azúcar y en parentales elite, esto coincidió con la baja frecuencia del gen encontrado en las variedades originarias de Luisiana por Glynn *et al.* (2013). La progenie de cruzamientos derivadas de variedades silvestres o exóticas repitieron esta frecuencia baja (6.7%), mientras que los variedades silvestres o exóticas del banco de germoplasma tuvieron una frecuencia mayor (28.7%). Lo que indica que los recursos genéticos para la introgresión del gen *Bru1* están disponibles para este programa. También encontraron variedades altamente resistentes a *P. melanocephala* con la ausencia del gen, que significan una oportunidad para identificar fuentes alternativas o complementarias al gen para generar variedades resistentes en el tiempo (Parco *et al.* 2014).

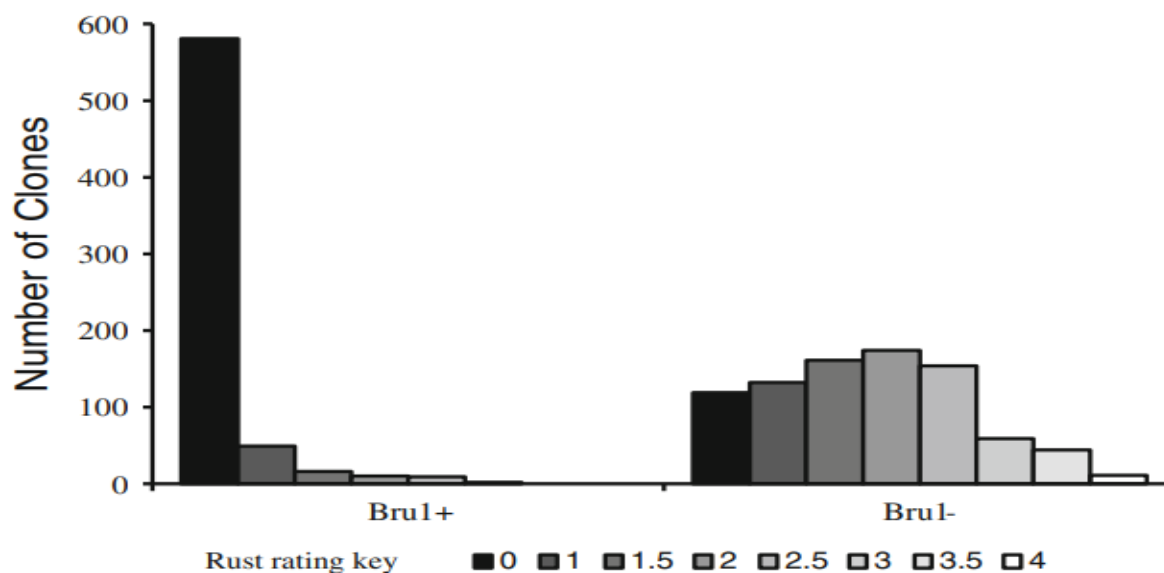


Figura 4. Frecuencia de distribución de los índices de *P. melanocephala* en las variedades con *Bru1* y con ausencia de este.

Fuente: (Glynn *et al.* 2013)

Un estudio realizado sobre la distribución y frecuencia de *Bru1* en la Colección Mundial de Caña de azúcar y Pastos relacionados (WCSR). Los genotipos analizados fueron obtenidos de 52 lugares y 46 países diferentes. Siendo India y Nueva Guinea los países que fueron la mayor fuente de genotipos. Un total de 1282 genotipos fueron analizados para la presencia de *Bru1* usando los dos marcadores encontrados por Costet *et al.* (2012). La presencia de *Bru1* fue determinada por la detección de productos de amplificación de productos de R12H16 (570 pb) y/o 9020-F4-*RsaI* (200 pb) (Figura 6; (Parco *et al.* 2017)).

El 21.6% (268 de 1241 variedades) de genotipos de *Saccharum* resultaron positivos a *Bru1*, al detectar uno o ambos marcadores. Ambos marcadores fueron encontrados en 201 (75%) de los 268

genotipos positivos, mientras que solo el marcador 9020-F4-RsaI fue detectado en 67 ocasiones (25%) en los genotipos positivos, lo que indica la existencia de variabilidad genética. Los genotipos con mayor frecuencia de *Bru1* son *S. barberi* (82.8%) y *S. sinense* (66.7%) y con una variabilidad genética baja menor al 10%. *S. officinarum* y *S. robustum* tienen frecuencias similares, con un 20.6 y 28.8 respectivamente, y son similares a los híbridos (28.7%), especies de *Saccharum* sin identificar (20.1%) y unas variedades categorizadas como desconocidas (24.3%). *S. spontaneum* (12.9%) es el genotipo con la frecuencia más baja (12.9%). La variabilidad genética de cada especie varía (Parco *et al.* 2017).

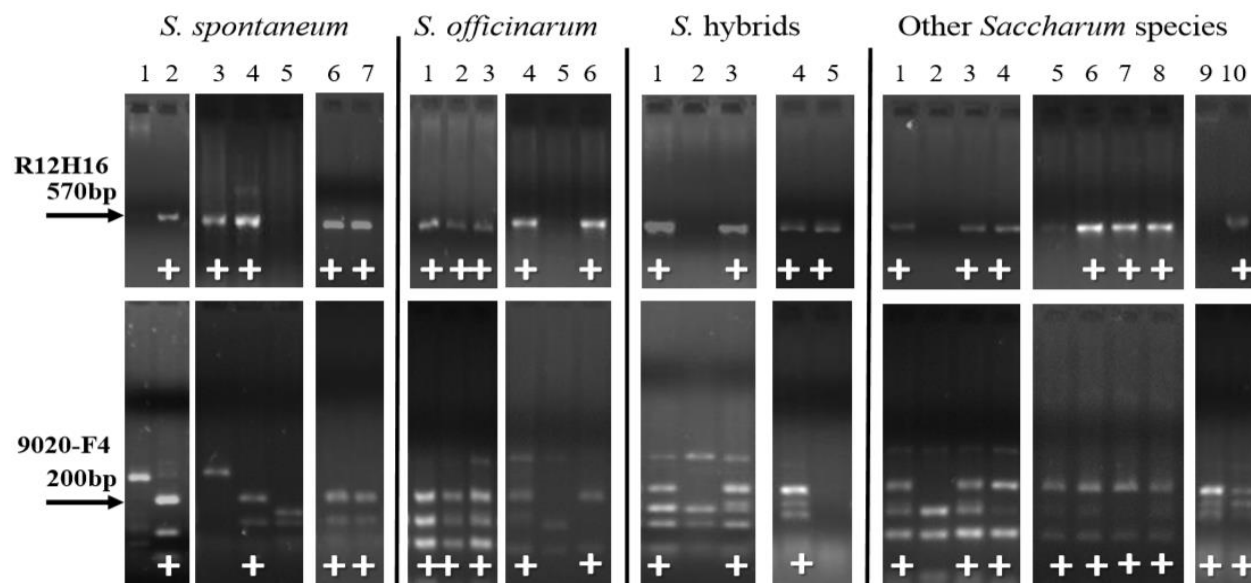


Figura 5. Imágenes del gel demostrando presencia de *Bru1*, mediante el diagnóstico de productos de amplificación PCR de R12H16 (570 pb) y/o 9020-F4-RsaI (200 pb) en diferentes especies del género *Saccharum*.

Fuente: (Avellaneda 2016).

El 21.6% (268 de 1241 variedades) de genotipos de *Saccharum* resultaron positivos a *Bru1*, al detectar uno o ambos marcadores. Ambos marcadores fueron encontrados en 201 (75%) de los 268 genotipos positivos, mientras que solo el marcador 9020-F4-RsaI fue detectado en 67 ocasiones (25%) en los genotipos positivos, lo que indica la existencia de variabilidad genética. Los genotipos con mayor frecuencia de *Bru1* son *S. barberi* (82.8%) y *S. sinense* (66.7%) y con una variabilidad genética baja menor al 10%. *S. officinarum* y *S. robustum* tienen frecuencias similares, con un 20.6 y 28.8 respectivamente, y son similares a los híbridos (28.7%), especies de *Saccharum* sin identificar (20.1%) y unas variedades categorizadas como desconocidas (24.3%). *S. spontaneum* (12.9%) es el genotipo con la frecuencia más baja (12.9%). La variabilidad genética de cada especie varía (Parco *et al.* 2017).

La frecuencia de genotipos positivos a *Bru1* varía según la ubicación geográfica y según el origen de la variedad. La frecuencia de *Bru1* en *S. officinarum* fue de 20.2% en variedades originarias de Nueva Guinea, en comparación a las originarias de Indonesia con una frecuencia de 33.3% y de

18.2% a una colección localizada en Hawái. *S. robustum* presentó el mismo patrón de frecuencia, con una mayor frecuencia en las variedades originarias de Indonesia en comparación a las de Nueva Guinea. *S. spontaneum* al ser una especie con un mayor rango geográfico tenía un diferente patrón de frecuencia de *Bru1* positivos; India (14.8%), Indonesia (11.1%), Filipinas (7.2%), Taiwán (11.4%) y Tailandia (21.04%) (Parco *et al.* 2017).

Fitomejoramiento de caña de azúcar

La variedad ideal de caña de azúcar es aquella que se comporta de la mejor manera con las condiciones ambientales a la que se somete, así como la que se adapta a las necesidades de la industria y el agricultor. El objetivo del fitomejorador es encontrar la variedad con mejor adaptación al suelo y clima de la zona en la que será cultivada. Las variedades también se van adaptando a los avances tecnológicos de la industria, adaptadas a la cosecha mecánica, de mejor calidad y rendimiento de sacarosa (Cassalett *et al.* 1995).

Los programas de fitomejoramiento han sido la razón fundamental del mejoramiento productivo de esta industria a lo largo de los años. Busca encontrar cultivares agrónomicamente eficientes, resistentes a enfermedades, plagas y factores abióticos, además de buscar reducir los costos al cultivar caña. Los programas de mejoramiento cuentan con tres componentes principales: colección y evaluación de germoplasma, cruzamiento y selección (James 2004).

Las colecciones de germoplasmas cuentan con una diversidad de cultivares, que son evaluados y categorizados según las características de mayor heredabilidad e interés agronómico, y que son expresadas en todo ambiente. El cruzamiento es el que permite la vasta diversidad genética en los cultivos, la gran mayoría de cultivares comerciales son derivados de *S. officinarum* y *S. spontaneum*, siendo menos del 20% de cromosomas derivados de este último. Esto no quita la gran importancia de ambas especies para el éxito de estas variedades, se dice que *S. officinarum* contribuye los genes en cuanto a producción de sacarosa y a *S. spontaneum* se le atribuye el vigor, resistencia a enfermedades, habilidad de rebrote y la resistencia a condiciones ambientales adversas. De estos cruzamientos se seleccionan los mejores cultivares para un posterior análisis (James 2004).

En México, el Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (CIDCA) cuenta con un proceso de selección que le permite liberar de una a diez variedades cada 15 años. Este proceso cuenta con diversas fases denominadas: Plántula, Surco, Cepa, Parcela, Multiplicación I, Prueba de adaptabilidad, Multiplicación II, Evaluación Agroindustrial, Multiplicación III, Prueba Semicomercial y Semillero (Figura 6). Efectuando una presión de selección de 20%, usando los grados Brix como indicador prioritario. Las características agroindustriales de mayor importancia son: sanidad como característica discriminatoria (evaluaciones trimestrales a enfermedades como: el virus del mosaico [ScMV], carbón [*Ustilago scitaminea*], roya café [*Puccinia melanocephala*] y roya naranja [*Puccinia kuehnii*]), grados Brix, diámetro, altura y población de tallos (Senties *et al.* 2017).

La generación de nuevas variedades es consecuencia del trabajo integrado de genetistas, fitopatólogos, entomólogos y fisiólogos, para así explotar al máximo el potencial genético del germoplasma disponible. Hay distintos tipos de variedades dentro de cada germoplasma: las de buen comportamiento agroindustrial, pero no son buenos progenitores; las que son buenos progenitores y tienen buen comportamiento en campo; y las variedades que pueden no ser buenas

comercialmente, pero son muy buenos progenitores y otorgan características de alta importancia a su progenie (Cassalett *et al.* 1995).

A pesar de la antigüedad de la industria, la diversidad genética en esta no es muy amplia, por lo que se ha observado una creciente dificultad en lograr grandes progresos de mejoramiento. Actualmente se intenta mantener e incrementar la diversidad, evitando las combinaciones de progenitores relativamente emparentados. Por lo que se han usado técnicas moleculares para determinar este parentesco, y facilitar la selección de progenitores genéticamente distantes (Collavino *et al.* 2008). Los principales objetivos de los programas de mejoramiento genético son: incrementar el tonelaje por unidad de área, mejorar la calidad industrial de los cultivares, obtener madurez y concentración de azúcar en menos tiempo, desarrollar variedades adaptadas a condiciones adversas (sequías, anegamiento, heladas, salinidad, etc.) y obtener variedades tolerantes a las principales plagas y enfermedades del cultivo (Sopena 2008).

Otra alternativa de fitomejoramiento es la selección asistida por marcadores, mas no ha sido aplicada en caña de azúcar por la ausencia de marcadores confiables. Básicamente, la selección asistida por marcadores (SAM) se enfoca en dos correlaciones: la de una característica con un QTL y la de ese QTL con un marcador molecular. La eficacia o confiabilidad de esta técnica depende de la fuerza de las correlaciones entre los tres actores, y su variabilidad en el tiempo, por lo que la confiabilidad de los marcadores encontrados es extremadamente importante. Al usar marcadores que no sean confiables en su relación con el rasgo buscado no se encontrará mejoría en la progenie, y no habrá éxito en esta selección (Platten *et. al* 2019). Estudios han demostrado la posibilidad de hacer introgresiones de dos o más QTLs simultáneamente mediante esta técnica, lo cual redujo la cantidad de genotipos usados en la selección y agilizó el proceso (Kumar *et al.* 2018).

El evaluar la presencia o ausencia de un marcador molecular ligado a un rasgo de interés se ha usado como reemplazo o asistencia a la selección fenotípica tradicional, de una manera eficiente, efectiva, confiable y rentable comparando a las estrategias de fitomejoramiento tradicional (Collard *et al.* 2005). La SAM ha sido usada eficientemente en diversos cultivos como tomate (Hanson *et al.* 2016), arroz (Kumar *et al.* 2018; Lu *et al.* 2020), trigo (Arruda *et al.* 2016) y maíz (Xu *et al.* 2009), entre otros.

Los múltiples beneficios del SAM son los que han despertado el interés de los fitomejoradores en aplicar esta técnica en cada uno de los cultivos de interés. Como el ahorro de tiempo al sustituir pruebas complejas en campo, las cuales necesitan ser hechas a ciertas épocas del año o con condiciones climatológicas específicas según el patógeno analizado o característica de interés. La eliminación del efecto ambiental en la respuesta fenotípica de cada planta, la selección a nivel de plántulas y evitar la transferencia de genes no deseados o genes que actúan negativamente sobre la característica de interés son otros beneficios que impulsan el uso de SAM (Collard *et al.* 2005). La eficiencia del mejoramiento con esta técnica aumenta sustancialmente, pero esta depende de la confiabilidad de los marcadores usados y del QTL analizado (Lande y Thompson 1990).

4. CONCLUSIONES

- Las grandes pérdidas ocasionadas por *P. melanocephala* cuando son acompañadas de las condiciones climáticas ideales y de un hospedero susceptible, demuestra la importancia del control de este patógeno enfocándonos en la interacción de estos tres protagonistas.
- El gen *Bru1* encontrado en la variedad R570 ha demostrado su validez en la determinación de resistencia a *P. melanocephala*. Además de la posibilidad de encontrar genes confiables en caña de azúcar, a pesar de la poliploidía y aneuploidía que encontramos en este cultivo.
- La fuerte correlación del gen *Bru1* y los marcadores R12H16 y 9020-F4-PCR-*RsaI*, con la resistencia a *P. melanocephala*, además de la baja recombinación y desequilibrio de ligamiento completo de los marcadores. Permite afirmar la gran herramienta que son estos dos marcadores, para la detección del gen *Bru1* en variedades de interés, además del potencial de este gen para el desarrollo de nuevas variedades y para elegir parentales de interés agronómico, omitiendo los ensayos en campo que significan un costo y requieren una gran cantidad de tiempo.

5. RECOMENDACIONES

- Analizar la presencia del gen *Bru1* en las variedades en Honduras y su comportamiento en campo dadas las condiciones climatológicas de la región.
- Crear alianzas con los departamentos de investigación de los ingenios de caña de azúcar en Honduras, para así generar variedades adaptadas a las condiciones socioeconómicas y climatológicas del país.
- Tomar como guía el proceso hecho con *P. melanocephala*, en otras enfermedades u otras características agronómicas asociadas a genes cuantitativos.
- Elaborar planes preventivos para *P. melanocephala* tomando en cuenta las proyecciones meteorológicas y así saber posibles temporadas epidemiológicas, esto acompañado del uso de variedades resistentes.

6. LITERATURA CITADA

- Arruda MP, Lipka AE, Brown PJ, Krill AM, Thurber C, Brown-Guedira G, Dong Y, Foresman BJ, Kolb FL. 2016. Comparing genomic selection and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breeding* 36:1-11. [consultado el 13 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0508-5>
- Asnaghi C, Paulet F, Kaye C, Grivet L, Deu M, Glaszmann JC, D'Hont A. 2000. Application of synteny across Poaceae to determine the map location of a sugarcane rust resistance gen. *Theor Appl Genet* 101:962-969. [consultado el 25 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1007/s001220051568>
- Asnaghi C, D'Hont A, Glaszmann JC, Rott P. 2001. Resistance of sugarcane cultivar R 570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. *PlantDisease Journal* 85:282-286 [consultado el 8 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1094/pdis.2001.85.3.282>
- Asnaghi C, Roques D, Ruffel D, Kaye C, Hoarau J, Telismart H, Girard JC. 2004. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (Bru1) using bulked segregant analysis and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108:759-764 [consultado el 25 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1487-6>
- Avellaneda MC. 2016. Identificación de genes asociados con resistencia a Brown Rust en sugarcane and prevalence of one major gene. [Tesis de doctorado] Louisiana State University. [consultado el 25 de jul de 2020] https://www.researchgate.net/publication/303248070_Identification_of_genes_associated_with_resistance_to_brown_rust_in_sugarcane_and_prevalence_of_one_major_gene
- Barrera W, Hoy J, Li B. 2013. Effects of temperature and moisture variables on Brown Rust epidemics. *Journal of Phytopathology* 161:98-106. [consultado el 8 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1111/jph.12035>
- Cassalett C, Torres J, Isaacs C. 1995. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia. CENICAÑA [consultado el 15 de jun de 2020] https://www.cenicana.org/pdf_privado/documentos_no_seriados/libro_el_cultivo_cana/libro_p3-394.pdf
- [CINCAE] Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador. 2013. *Puccinia melanocephala* H. Sydow. & P. Sydow (*Basidiomycota: Uredinales*). Ecuador. [consultado el 8 de jul de 2020] <http://cincae.org/areas-de-investigacion/manejo-de-enfermedades/roya/>
- Chaulagain B, Neil R, Rott P. 2019. Timing and frequency of fungicide applications for the management of sugarcane brown rust. *Elsevier Crop Protection* 124. [consultado el 8 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.05.020>
- Chu TL, Serapion J, Rodriguez JL. 1982. Varietal reaction and heritance trends of susceptibility of sugarcane to rust (*Puccinia melanocephala* H. & P. Syd.). *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico* 66:99-108. [consultado el 8 de jul de 2020] <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302191826>
- Collard BC, Jahufer MZ, Brouwer JB, Pang EC. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping. *Euphytica* 142:169-196. [consultado el 15 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>
- Collavino NG, Pocovi MI, Locatelli FM, Pacheco MG, Ríos RD, Mariotti JA. 2008. Aplicación de Técnicas Isoenzimáticas y Moleculares en el Programa de Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar. *idiaXXI Cultivos Industriales* 6-9. [consultado el 15 de ago de 2020] https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-idia_xxi_cult_industriales.pdf

- Costet L, Le Cunff L, Royaert S, Raboin LM, Hervouet C, Toubi L, Telismart H. 2012. Haplotype structure around Bru1 reveals a narrow genetic basis for brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. *Theor Appl Genet* 125:825-836. [consultado el 26 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1875-x>
- Daugrois JH, Grivet L, Roques D, Hoarau JY, Lombard H, Glazmann JC, D'Hont A. 1996. A putative rust resistance linked with a RFLP marker in sugar cane cultivar "R570. *Theoretical and Applied Genetics* 92:1059-1064 [consultado el 8 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1007/BF00224049>
- D'Hont A, Grivet L, Glazmann JC, Rao S, Berding N. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum spp.*) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics MGG* 250:405-413 [consultado el 15 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1007/BF02174028>
- Dixon LJ, Castlebury LA, Aime MC, Glynn NC, Comstock JC. 2010. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycological Progress* 9:459-468 [consultado el 8 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1007/s11557-009-0649-6>
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. Base de datos de producción y rendimiento de caña de azúcar en el mundo, FAOSTAT.
- Garces F. s.f. Identificación de las royas café y anaranjada en caña de azúcar. CINCAE. [consultado el 24 de jul de 2020] <https://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/TRIPTICO-Royas.pdf>
- Glynn NC, Laborde C, Davidson RW, Irey MS, Glaz B, D'Hont A, Comstock JC. 2013. Utilization of a major brown rust resistance gene. *Mol Breeding* 31:323-331. [consultado el 26 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9792-x>
- Hanson P, Lu SF, Wang JF, Chen W, Kenyon L, Tan CW, Tee KL. 2016. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 201:346-354. [consultado el 15 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.020>
- Henry RJ, Kole C. 2010. Genetics, genomics and breeding of sugarcane. CRC Press y Science Publishers. Clemson University
- Infante D, Martínez B, González E, González N. 2009. Puccinia kuehnii (krüger) butler y Puccinia melanocephala H. Sydow y P. Sydow. En el cultivo de la caña de azúcar. *Rev. Protección Veg.* v.24 n.1 La Habana. [consultado el 26 de jul de 2020] http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100003
- James G. 2004. Sugarcane. Blackwell Science. 2004. Sugarcane. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Kumar A, Sandhu N, Dixit S, Yadav S, Swarny BP, Shamsudin NA. 2018. Marker-assisted selection strategy to pyramid two or more QTLs for quantitative trait-grain yield under drought. *Rice* 11:11-35. [consultado el 15 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1186/s12284-018-0227-0>
- Lande R, Thompson R. 1990. Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of quantitative traits. *Genetics Society of America* 124:734-756. [consultado el 17 de ago de 2020] https://www.researchgate.net/publication/21186882_Efficiency_of_Marker-Assisted_Selection_in_the_Improvement_of_Quantitative_Traits
- Le Cunff L, Garsmeur O, Raboin LM, Pauquet J, Telismart H, Selvi A, Grivet L. 2008. Diploid/Polyploid Syntenic Shuttle Mapping and Haplotype-Specific Chromosome Walking Toward a Rust Resistance Gene (Bru1) in Highly Polyploid Sugarcane (2n~12x~115). *Genetics Society of America* 180:649-659. [consultado 2 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1534/genetics.108.091355>

- Li W, Shan H, Zhang R, Pu H, Wang X, Cang X, Yin J, Luo Z, Huang Y. 2018. Identification of field resistance and molecular detection of the brown rust resistance gene *Bru1* in new elite sugarcane varieties in China. *Crop Protection* 103:46-50. [consultado el 28 de jul de 2020] <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.09.007>
- Lu J, Hou J, Ouyang Y, Luo H, Zhao J, Mao C, Han M. 2020. A direct PCR-based SNP marker-assisted selection system (D-MAS) for different crops. *Mol. Breeding* 40:1-10. [consultado el 24 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1007/s11032-019-1091-3>
- Molina L, Queme JC, Rosales F. 2013. Comparative analysis between phenotype and *bru1* marker. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, Vol. 28. [consultado el 8 de ago de 2020] https://www.researchgate.net/publication/244478204_comparative_analysis_between_phenotype_and_bru1_marker_for_incidence_to_brown_rust_in_sugarcane/citations
- Montoya C, Romero H. 2016. ¿Qué se debe saber sobre los QTL (Quantitative Trait Loci) y su utilidad en el mejoramiento fenético de palma de aceite? [consultado el 26 de ago de 2020] <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/11807>
- Osorio G. 2007. Buenas prácticas agrícolas -BPA- y buenas prácticas de manufactura -BPM- en la producción de caña y panela. *FAO*. [consultado el 8 de jul de 2020]. <http://www.fao.org/3/a-a1525s.pdf>.
- Parco AS, Hale AL, Avellaneda MC, Hoy JW, Kimbeng CA, Pontif MJ, McCord PH, Ayala-Silva T, Todd TR, Baisakh N. 2017. Distribution and frequency of *Bru1*, a major brown rust resistance gene, in the sugarcane world collection. *Wiley Plant Breeding* 136:1-15. [consultado el 8 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1111/pbr.12508>
- Parco AS, Avellaneda MC, Hoy JW, Hale AH, Pontif MJ, Gravois KA, Baisakh N. 2014. Frequency and distribution of the brown rust resistance gene *Bru1* and implications for the Louisiana sugarcane breeding programme. *Plant Breeding* 133:654-659. [consultado el 8 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1111/pbr.12186>
- Perez H. 2017. Control fitosanitario en agroecosistemas de caña de azúcar. *CUMBRES* [consultado el 25 de jun de 2020] <http://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/Cumbres/article/view/163>.
- Platten JD, Cobb JN, Zantua RE. 2019. Criteria for evaluating molecular markers. *Plos One* 14:1-20. [consultado 29 jul 2020] <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210529>
- Purdy L, Liu L, Dean JL. 1983. Sugarcane rust, a newly important disease. *PlantDisease* 67:1292-1296 [consultado 10 de jun de 2020] DOI:10.1094/PD-67-1292.
- Racedo J, Perera MF, Bertani R, Funes C, González V, Cuenya MI, D'Hont A, Welin B, Castagnaro AB. 2013. *Bru1* gene and potential alternative sources of resistance to sugarcane brown rust disease. *Euphytica* 191:429-436. [consultado el 12 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0905-3>
- Sentías HE, Valdez A, Loyo R, Gómez F. 2017. Fases experimentales en el mejoramiento genético de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en México. *AgroProductividad* 10(11):93-98.[consultado el 24 de ago de 2020] <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/58>
- Sopena RA. 2008. Mejoramiento Genético de Caña de Azúcar. *idiaXXI Cultivos Industriales* 23-28.
- Sotomayor IA, Purdy LH, Trese AT. 1982. "Infection of sugarcane leaves by *Puccinia melanocephala*." [consultado el 24 de jun de 2020] https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n05_695.pdf

- Victoria J, Guzmán M, Angel J. 1995. Enfermedades en la caña de azúcar en Colombia. CENICAÑA. [consultado el 12 de jun de 2020] https://www.cenicana.org/pdf_privado/documentos_no_seriados/libro_el_cultivo_cana/libro_p265-293.pdf
- Xu Y, Skinner DJ, Wu H, Palacios-Rojas N, Araus JL, Yan J, Gao S, Warburton ML, JH Crouch. 2009. Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding. *International Journal of Plant Genomics* 2009:1-30. [consultado el 20 de ago de 2020] <https://doi.org/10.1155/2009/957602>

7. ANEXOS

Anexo 1. Distribución y frecuencia de los distintos genotipos en la colección mundial.

Fuente: Parco, et al. 2017

Taxa in collection	Number of genotypes with positive detection of <i>Bru1</i> based on the presence of single or both markers ^a			Total genotypes in the collection
	Genotypes with only 9020-F4	Genotypes with both markers	Total genotypes in the collection <i>Bru1</i> +	
<i>Saccharum officinarum</i>	4 (7.8%)	47 (92.2%)	51 (20.6%)	247
<i>Saccharum spontaneum</i>	38 (56.7%)	29 (43.3%)	67 (12.9%)	521
<i>Saccharum</i> hybrids	4 (13.8%)	25 (86.2%)	29 (28.7%)	101
<i>Saccharum robustum</i>	3 (15.8%)	16 (84.2%)	19 (28.8%)	66
<i>Saccharum barberi</i>	2 (8.3%)	22 (91.7%)	24 (82.8%)	29
<i>Saccharum sinense</i>	3 (11.5%)	23 (88.5%)	26 (66.7%)	39
<i>Saccharum arundinaceum</i>	1 (50%)	1 (50%)	2 (16.7%)	12
<i>Saccharum bengalense</i>	0	0	0	6
<i>Saccharum brevibarbe</i>	0	0	0	1
<i>Saccharum edule</i>	0	1 (100%)	1 (50%)	2
<i>Saccharum kanashiro</i>	1 (100%)	0	1 (50%)	2
<i>Saccharum procerum</i>	0	0	0	1
<i>Saccharum ravennae</i>	0	0	0	3
<i>Saccharum rufipilum</i>	0	0	0	2
Unidentified <i>Saccharum</i> spp.	2 (14.3%)	12 (85.7%)	14 (20.1%)	69
Pending (Unknown)	9 (26.5%)	25 (73.5%)	34 (24.3%)	140
Total <i>Saccharum</i> spp.	67 (25%)	201 (75%)	268 (21.6%)	1,241
<i>Coix</i>	0	0	0	1
<i>Erianthus</i>	3 (60%)	2 (40%)	5 (18.5%)	27
<i>Imperata</i>	0	0	0	1
<i>Miscanthus</i>	0	0	0	11
<i>Sorghum plumosum</i>	0	0	0	1
Total other genera	3 (60%)	2 (40%)	5 (12.5%)	41
Total in collection	70 (25.6%)	203 (74.4%)	273 (21.3%)	1,282

Anexo 2. Secuencias primers para detección de *Bru1*.

Primer	Secuencia	Tamaño de banda (pb)
R12H16 Fw	5'CTACGATGAAACTACACCCTTCTC3'	570
R12H16 Rv	5'CTTCTGTAAGCGTGACCTATGGTC3'	570
9020-F4 Fw	5'TACATAATTTTAGTGGCACTCAGC3'	200
9020-F4 Rv	5'ACCATAATTCAATTCTGCAGGTAC3'	200