

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación

**Identificación de la presencia del gen *Bru1* en variedades de caña de
azúcar (*Saccharum officinarum* L.)**

Estudiante

Santos Joel Cruz Muñoz

Asesores

Carolina Avellaneda, Ph.D.

Raphael W Colbert, Ph.D.

Honduras, agosto 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	4
Índice de Figuras	5
Índice de Anexos.....	6
Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Materiales y Métodos.....	12
Ubicación del Estudio.....	12
Toma de Muestras	13
Extracción del ADN.....	15
Evaluación de la Calidad del ADN	15
Evaluación de la Concentración del ADN.....	16
Diluciones del ADN.....	16
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	17
Resultados y Discusión.....	19
Extracción de ADN	19
Cuantificación del ADN	20
Conclusiones	26
Recomendaciones.....	27
Referencias.....	28
Anexos.....	32

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Listados y origen de la nomenclatura de los cultivares evaluados	13
Cuadro 2 Secuencia de los iniciadores R12H16 y tamaño de fragmento a amplificar	17
Cuadro 3 Reactivos utilizados para la PCR en volúmenes de microlitros (μ L), para amplificar el gen Bru1 dentro del ADN de la caña de azúcar	18
Cuadro 4 Relación entre la identificación del gen Bru1 y el comportamiento de los distintos cultivares de caña de azúcar frente a <i>Puccinia melanocephala</i> evaluada en campo	23
Cuadro 5 Progenitores de los cultivares de caña de azúcar sin evaluación previa.....	25

Índice de Figuras

Figura 1 Distribución de las variedades en las parcelas Azacualpa 2 y los Micos lote 7 en la aldea el Porvenir, Francisco Morazán, Honduras.....	12
Figura 2 Proceso de extracción de ADN de caña de azúcar	15
Figura 3 Evaluación de la calidad del ADN de las muestras extraídas de caña de azúcar sobre gel de agarosa al 1%	19
Figura 4 Imágenes de gel representativas que muestran la presencia del gen Bru1 dentro del ADN de la caña de azúcar, mediante los fragmentos de diagnóstico para el marcador R12H16 en gel de agarosa al 1%.....	22

Índice de Anexos

Anexo A Protocolo de extracción de ADN.....	32
Anexo B Concentración y dilución del ADN	33

Resumen

El uso de biotecnología en la agricultura es fundamental para mejorar la productividad y eficiencia en los sistemas productivos de los países en vía de desarrollo como Honduras. La utilización de técnicas moleculares para la detección de enfermedades o para la identificación de genes asociados a la resistencia en cultivos como la caña de azúcar representa un gran avance en nuestros países. Es por ello, que el objetivo principal de esta investigación fue determinar la presencia del gen *Bru1* en 65 variedades de caña de azúcar, mediante análisis moleculares. El gen *Bru1* cual concede resistencia a *P. melanocephala* causante de la roya café. Se tomaron muestras de las variedades en campo y se hizo la extracción de ADN para aplicar pruebas PCR. Se compararon los clones que cuentan con la presencia del alelo frente a evaluaciones en campo obtenidas de investigaciones previas en los centros de desarrollo. Se analizaron cultivares que no contaban con evaluaciones previas para el gen de resistencia y se investigaron los parentales que dieron origen a estos clones. Con las pruebas PCR se encontró un 27.69% del gen *Bru1* en el total de los materiales evaluados. Del mismo modo, al comparar los clones se conoció que es posible que existan otros genes asociados a la resistencia de la enfermedad. Finalmente, se pudo asociar la presencia del gen *Bru1* a características poligénicas heredables de los parentales.

Palabras clave: *Bru1*, caña de azúcar, *Puccinia melanocephala*, PCR, roya café.

Abstract

The use of biotechnology in agriculture is essential to improve productivity and efficiency of production systems in developing countries such as Honduras. The use of molecular techniques for the detection of diseases or for the identification of genes associated with resistance in crops such as sugarcane represents a great advance in our countries. Therefore, the main objective of this research was to determine the presence of the *Bru1* gene in 65 varieties of sugarcane. that have the presence of the *Bru1* gene, which provides resistance to *P. melanocephala*, the cause of coffee rust in sugarcane, by means of molecular analysis. Samples of the varieties were taken in the field and DNA was extracted to perform PCR tests. Clones with the presence of the allele were compared with previous field evaluations obtained from research centers. Cultivars without previous evaluations of the resistance gene were analyzed and their parents were investigated. PCR tests found 27.69% of the *Bru1* gene in the total materials evaluated. In addition, when comparing the clones, it was found that there may be other genes associated with disease resistance. Finally, it was possible to associate the presence of the *Bru1* gene to polygenic characteristics inherited from the parents.

Keywords: Brown rust, *Bru1*, PCR, *Puccinia melanocephala* sugar cane.

Introducción

Se conoce como caña de azúcar a una planta gramínea monocotiledónea que es originaria de Nueva Guinea, es plantada desde hace aproximadamente 3000 años antes de cristo y tiene una alta capacidad de adaptación (Rodríguez 2020). Su tallo tiene la capacidad de acumular una alta cantidad de sacarosa en relación con su peso fresco, aproximadamente un 50% del mismo (Dillon et al. 2007). Es cultivada en regiones tropicales y subtropicales, presenta tallos macizos y robustos los cuales puede alcanzar una altura de hasta 5 metros. Es una planta C4 esto le permite ser muy eficiente en el uso del carbono durante el proceso de la síntesis de glucosa en la fotosíntesis (OGTR 2011) y le otorga la capacidad de producir gran cantidad de biomasa en toneladas métricas por hectárea, a la vez que una excelente acumulación de azúcar.

La caña de azúcar pertenece al género *Saccharum*, de la familia *Poaceae* y de la tribu Andropogoneae la que incluye diversas gramíneas tropicales como los del género *Sorghum* y *Zea* (CINCAE 2004). Esto le hace muy compleja taxonómicamente ya que forman un grupo de entrecruzamiento denominado “complejo *Saccharum*”, este está conformado por *Saccharum*, *Erianthus*, *Ripidium*, *Miscanthus*, *Narenga* y *Sclerostachya*. Estos géneros presenta una alta poliploidía y números cromosómicos desbalanceado lo que se denomina aneuploidía (OGTR 2011). La caña de azúcar es un híbrido complejo que presenta cromosomas de tamaños pequeños entre 1 – 3 μm (Rodríguez y Portiele 2003), esto dificulta grandemente su identificación y caracterización.

La caña de azúcar es compleja genómicamente con un número de cromosomas que varía de 100 a 130 (Zhang J et al. 2018). Se asume que las variedades comerciales le deben su genoma entre un 85-90% a *Saccharum officinarum* L y del 10-20% a *Saccharum spontaneum* (D'Hont et al. 1996).

A lo largo de los años se han venido perfeccionando y mejorando los sistemas productivos que permitan incrementar los rendimientos y el aumento del porcentaje de grados brix (Vásquez Condado y Rodríguez Utrera 2019). También ha sido de mucha relevancia la creación de nuevos cultivares que mediante el mejoramiento genéticos permita la resistencia a ciertos patógenos causantes de

enfermedades de gran importancia económica (López Mora y García Gómez 2019), como lo es el caso de la roya café en la caña de azúcar.

La Roya café es causada por el hongo fitopatógeno (*Puccinia melanocephala* Sydow and P. Sydow). que es responsable del 10% al 40% de la disminución en el rendimiento de la caña de azúcar en variedades susceptibles (Santacruz Delgado 2018).

Su ciclo de vida es de los más complejos dentro el reino al que pertenece, ya que produce cinco tipos de estadios con diferentes esporas entre cada uno, (0) espermacio, (I) aeciosporas, (II) uredosporas, (III) teliosporas y (IV) basidiosporas y sus respectivas estructuras que las originan espermogonios, aecidios, uredinios, telios y basidios, esto hace que sea muy difícil su control (Rodríguez y Portiele 2003). Las urediniosporas de *Puccinia melanocephala* son muy pequeñas, con un tamaño que oscila entre 28 x 17 μm y 33 x 26 μm . Las urediniosporas en la roya en la caña de azúcar es el componente infeccioso de este patógeno que afecta principalmente a las hojas. Después de la germinación sobre la hoja infectada empieza la producción de nuevas urediniosporas, esto ocurre en un rango de tiempo estimado de 8 a 18 días y va a depender de las condiciones ambientales, así como de la susceptibilidad del cultivar al patógeno (Glynn et al. 2013).

El hongo *P. melanocephala* es considerado un fitopatógeno biótrofo obligado, esto quiere decir que necesita un tejido vivo para sobrevivir, por esto no se puede hacer crecer en medios de cultivos en laboratorio lo que dificulta su estudio e identificación.

P. melanocephala es un fitopatógeno que se encuentra ampliamente distribuido a través de los países del Caribe. La roya ataca el área foliar y se puede observar con mayor intensidad en plantas entre seis semanas a seis meses de edad. Al inicio se puede observar el desarrollo de pequeñas manchas cloróticas y alargadas de color amarillento, visibles en ambos lados de la hoja. Las manchas, al aumentar de tamaño, toman un color herrumbroso y se rodean de un halo amarillo pálido, estas se puede diseminar fácilmente por el viento a grandes distancias (Osorio Cadavid 2018).

La resistencia a la roya café es poligénica, esto se refiere que su resistencia está determinada por varios genes, se cree que esta se debe a un gen con efecto dominante llamado *Bru1* (Raboin et al.

2006). *Bru1* fue la primera secuencia génica de interés agronómico encontrado en caña de azúcar, los estudios fueron realizados en la variedad R570, que es la más utilizada en la mayoría de los programas de fitomejoramiento del mundo, según la investigación de Asinari (2019), se encontró que la resistencia a *P. melanocephala* se mantenía incluso usando diferentes patógenos recolectados en distintas partes del mundo.

En el 2016 se realizó un estudio para determinar la respuesta de diferentes genes de caña de azúcar en relación con la inoculación y afección de *P. melanocephala*, en variedades resistentes y susceptibles. Ya que la interacción entre un patógeno y la planta hospedera da como resultado la activación de genes relacionados a la defensa (Malo et al. 2015). 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 expuestos a la infección en las variedades resistentes y susceptibles, pero la alta exposición por un mayor periodo de tiempo se encontró que contribuía a la resistencia contra la roya café (Avellaneda 2016).

En esta investigación se buscó determinar y conocer las variedades que cuentan con la presencia del gen *Bru1* el cual concede resistencia a *P. melanocephala* causante de la roya café en 65 variedades de caña de azúcar mediante análisis moleculares. Determinar la relación de la presencia del alelo identificado con la resistencia y susceptibilidad que presentan los cultivares en campo mediante publicaciones de estos monitoreos. Relacionar la presencia del gen *Bru1* en los cultivares que no han sido estudiados anteriormente, observando las características de resistencia al patógeno de sus progenitores y observar si el alelo presentó heredabilidad y posibilidad de la resistencia del cultivar para estudios futuros.

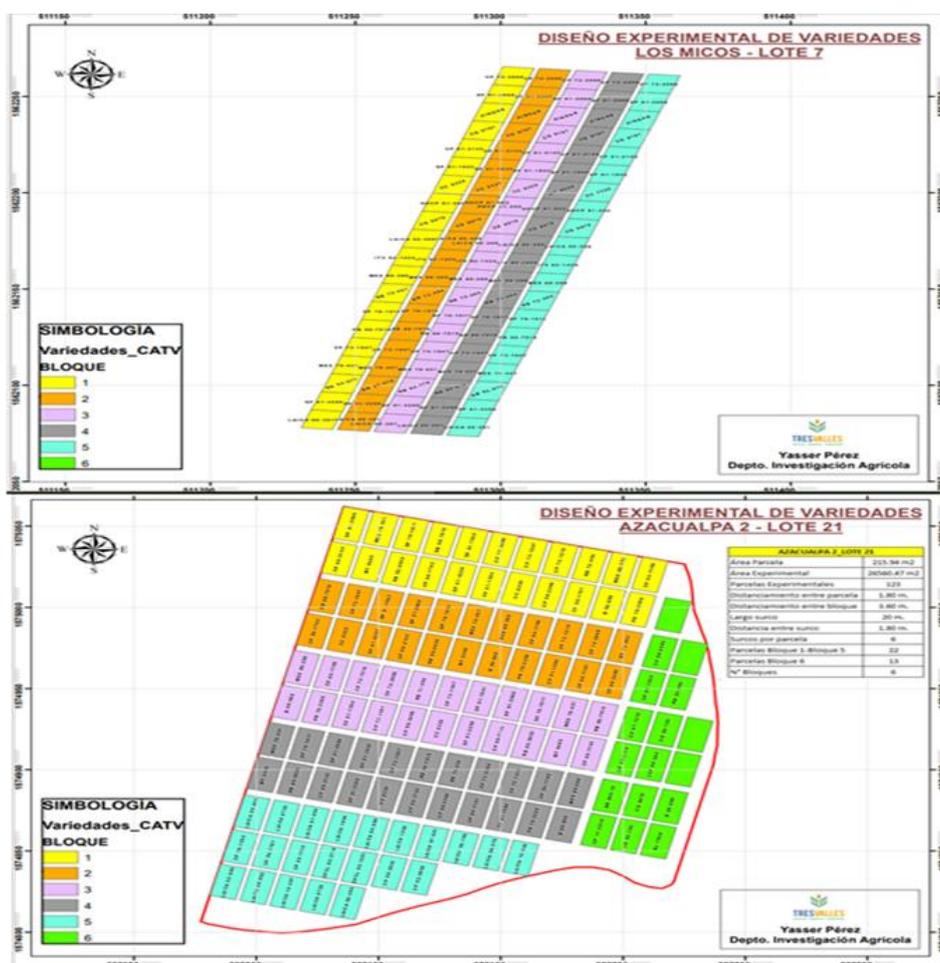
Materiales y Métodos

Ubicación del Estudio

En este estudio fue realizado en la Aldea El Porvenir, del Municipio de San Juan de Flores en el Departamento de Francisco Morazán, Honduras, a una elevación de 600 msnm. Se utilizaron un total de 65 cultivares de caña de azúcar que fueron suministrado del banco de germoplasma con el que cuenta la Compañía que está dividido en 2 fincas, Azacualpa 2, lote 21 y los Micos lote 7, en la (Figura 1) se observa la distribución de las parcelas.

Figura 1

Distribución de las variedades en las parcelas Azacualpa 2 y los Micos lote 7 en la aldea el Porvenir, Francisco Morazán, Honduras



Nota. Tomado de Pérez (2021).

Toma de Muestras

La toma de muestra fue realizada en el mes de marzo a los tres meses de edad de cultivo, tomando una muestra representativa al azar de cada lote, se muestreó cada planta seleccionada y se cortó un segmento de la TVD (Top Visible Dewlap), que es la primera hoja con primera lígula visible, esto siguiendo el protocolo establecido por Cenicaña (2020). Se tomaron entre 5 y 8 hojas, dependiendo del tamaño de la planta muestreada, estas se utilizaron para realizar la extracción de DNA genómico con el cual se determinó la presencia de la secuencia génica de interés.

Las muestras recolectadas fueron depositadas en bolsas plásticas previamente rotuladas según el número de variedad (Cuadro 1) y ubicación del lote muestreado, posteriormente se colocaron en una nevera portátil con hielo para evitar el deterioro en las muestras foliares a la vez que las conserva en buen estado. Una vez recolectadas el totalidad de muestras se llevaron al laboratorio de fitopatología de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano y se procedió a almacenar en una nevera con temperatura entre 2 y 8°C, es importante no congelar la muestra ya que causa daños en el tejido foliar (Cenicaña 2020).

Cuadro 1

Listados y origen de la nomenclatura de los cultivares evaluados

No. Variedad*	Origen
B 80-689	Barbados
B 69-566	Barbados
BJ 7938	Barbados
BR 000-10	
CC 8325	Cenicaña (Colombia)
CG 00-102	Cengicaña (Guatemala)
CG 02-163	Cengicaña (Guatemala)
CG 9878	Cengicaña (Guatemala)
CG9797	Cengicaña (Guatemala)
CP 00-1101	Canal Point (EUA)
CP 02-0926	Canal Point (EUA)
CP 02-2113	Canal Point (EUA)
CP 05-1791	Canal Point (EUA)
CP 07-1210	Canal Point (EUA)
CP 08-1110	Canal Point (EUA)
CP 08-2042	Canal Point (EUA)
CP 09-1823	Canal Point (EUA)
CP 09-2364	Canal Point (EUA)
CP 09-2498	Canal Point (EUA)

No. Variedad*	Origen
CP 11-2216	Canal Point (EUA)
CP 72-1210	Canal Point (EUA)
CP 72-2086	Canal Point (EUA)
CP 73-1547	Canal Point (EUA)
CP80-1743	Canal Point (EUA)
CP81-1384	Canal Point (EUA)
CP 81-2143	Canal Point (EUA)
CP 84-1198	Canal Point (EUA)
CP89-2143	Canal Point (EUA)
CP 96-1252	Canal Point (EUA)
CPCL 05-1201	Canal Point-Clewiston (EUA)
CPCL 92-2730	Canal Point-Clewiston (EUA)
HOCP 91552	Houma-Canal Point
LAICA 05-109	Costa Rica
ITV 92-1424	
LAICA 00-301	Costa Rica
LAICA 00-309	Costa Rica
LAICA 01-604	Costa Rica
LAICA 03-805	Costa Rica
LAICA 04-809	Costa Rica
LAICA 05-802	Costa Rica
LAICA 05-805	Costa Rica
LAICA 0720	Costa Rica
LAICA 0726	Costa Rica
LAICA 07-801	Costa Rica
LAICA 08-390	Costa Rica
LAICA 09-370	Costa Rica
LAICA 10-207	Costa Rica
LAICA 12-340	Costa Rica
LAICA 1259	Costa Rica
LAICA 1649	Costa Rica
LCP 85-384	Luisiana
MEX 69-290	México
MEX 79-431	México
MY5465	
PINDAR	
PR 76-3358	Puerto Rico
RB 72-454	República de Brasil
RB 83-594	República de Brasil
RB85-5035	República de Brasil
RB 86-7515	República de Brasil
RB 92-579	República de Brasil
SP 79-1011	Sao Paulo (Brasil)
SP 81-1842	Sao Paulo (Brasil)
SP81-2068	Sao Paulo (Brasil)
SP81-3250	Sao Paulo (Brasil)

Nota. De manera general, las variedades de caña de azúcar se nombran con las iniciales de su origen geográfico, seguido por dos números separados por un guion, el primero de ellos indica el año en que esa variedad fue seleccionada por primera vez y el segundo representa el número correlativo de selección.

Extracción del ADN

Previo a la extracción de ADN se trituró cada una de muestras recolectadas en campo, esto se realizó de la siguiente manera, se separó la lámina foliar de la nervadura principal de cada hoja recolectada, haciendo uso de un mortero y un pistilo se maceró la muestra utilizando nitrógeno líquido para evitar su deshidratación, oxidación y degradación, una vez obtenido el tamaño de partícula deseada se almacenó en tubos Falcon previamente rotulados para cada muestras, el almacenamiento se realizó a -20°C para poder conservar en buen estados las muestras.

La extracción de ADN se realizó según el protocolo establecido por Cenicaña (2014) con algunas modificaciones menores (Figura 2) (Anexo A).

Figura 2

Proceso de extracción de ADN de caña de azúcar



Evaluación de la Calidad del ADN

Posteriormente se evaluó la calidad del ADN mediante electroforesis, esta se hizo en gel de agarosa, para su preparación se utilizó una dilución de 0.2% de buffer para electroforesis en 1000 mL de H_2O destilada de la cual se tomó 150 ml para la preparación del gel añadiéndole el 1% de agarosa, posteriormente se calentó en microonda durante 3 minutos para llegar a una temperatura

aproximada de 66°C y así conseguir una dilución total, luego se añadieron 7.5 µL de bromuro de etidio a la solución y a esto se vertió en la caja de la cámara de electroforesis. Una vez solidificado el gel de agarosa se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó los 850 mL de la solución del buffer restante y se retiraron los peines, a continuación, se mezcló 4 µL de ADN y 1.5 µL de Buffer de carga los cuales fueron colocados en los pozos del gel de agarosa, una vez colocadas todas las muestras se corrió la electroforesis durante 30 minutos a 80 amperios pasado el tiempo se observó el resultado en una cámara de luz ultravioleta.

Evaluación de la Concentración del ADN

La concentración del ADN fue evaluada mediante el uso de un NanoDrop NP1000 espectrofotómetro, donde se agregaron 2 µL de cada muestra para obtener las mediciones de concentración en nanogramos por microlitro ng/ µL (Anexo B).

Diluciones del ADN

Para poder realizar las PCR o reacción en cadena de la polimerasa fue necesario realizar diluciones de todas las muestras para llevarlas a una concentración de 50 ng/µL y a 100 ng/µL, se realizaron dos diluciones diferentes para poder evaluar la que se obtenían mejores resultados y usarla para correr la totalidad de las muestras, esto realizó haciendo uso de agua para PCR, esto para evitar contaminar las muestras. Las diluciones se realizaron usando la fórmula 1:

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2 \quad [1]$$

$$V1 = \frac{V2 \cdot C2}{C1}$$

El resultado obtenido es la cantidad en µL de solución madre que utilizaremos y luego vamos a aforar a 50 µL haciendo uso de dH₂O.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La detección de la presencia del gen *Bru1* se realizó mediante una prueba de PCR convencional, que consiste en la amplificación de un fragmento del gen de interés haciendo uso del par de cebadores R12H16 (Molina 2016). La secuencia de estos iniciadores para la amplificación del gen de interés es la detallada en el Cuadro 2.

Cuadro 2

Secuencia de los iniciadores R12H16 y tamaño de fragmento a amplificar

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Tamaño de fragmento
R12H16	Fwd 5' CTACGATGAACTACACCCTTCTC 3' Rev—5' CTTCTGTAAGCGTGACCTATGGTC 3'	570 bp

Se realizaron reacciones de PCR utilizando 150 ng de ADN en un volumen total de 20 μ L, se siguió el protocolo descrito por Parco et al. (2014) con algunas pequeñas modificaciones en las concentraciones (Cuadro 3).

Previamente a la realización de la mezcla de todos los componentes se realizó una dilución de los cebadores y dNTP's para obtener una menor concentración según Parco et al. (2017). Para la dilución de los cebadores se usó la fórmula descrita en el anexo B para obtener una concentración de 10 μ M/ μ L de solución; en la dilución de los dNTP's se realizó el procedimiento anteriormente descrito para llevarlo a una concentración de 2 μ M/ μ L de solución.

Para cada reacción de PCR se obtuvieron las siguientes condiciones de temperaturas: Una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, la temperatura de anillamiento fue de 55°C durante 45 segundos, elongación a 72°C durante 72 segundos. Transcurridos los 35 ciclos hubo una elongación final a 72°C durante 8 minutos, terminando a una temperatura de mantenimiento de 8°C.

Cuadro 3

Reactivos utilizados para la PCR en volúmenes de microlitros (μL), para amplificar el gen Bru1 dentro del ADN de la caña de azúcar

Reactivo	1x
Buffer 10x	2
MgCl ₂	1
dNTP's	2
Primer F	1
Primer R	1
Taq polimerasa	0.3
DNA	3
dH ₂ O	9.7
Volumen total	20

Para la visualización del ADN se prepara un gel de agarosa al 1% una vez solidificada el gel se colocó en la cámara de electroforesis y se retiraron los peines, en cada pozo se colocó una mezcla de 6 mL del producto de la PCR y 2 μL buffer de carga. Posteriormente se corrió en electroforesis a 80V durante 1 hora 10 minutos, los resultados de la PCR se visualizaron en un transiluminador.

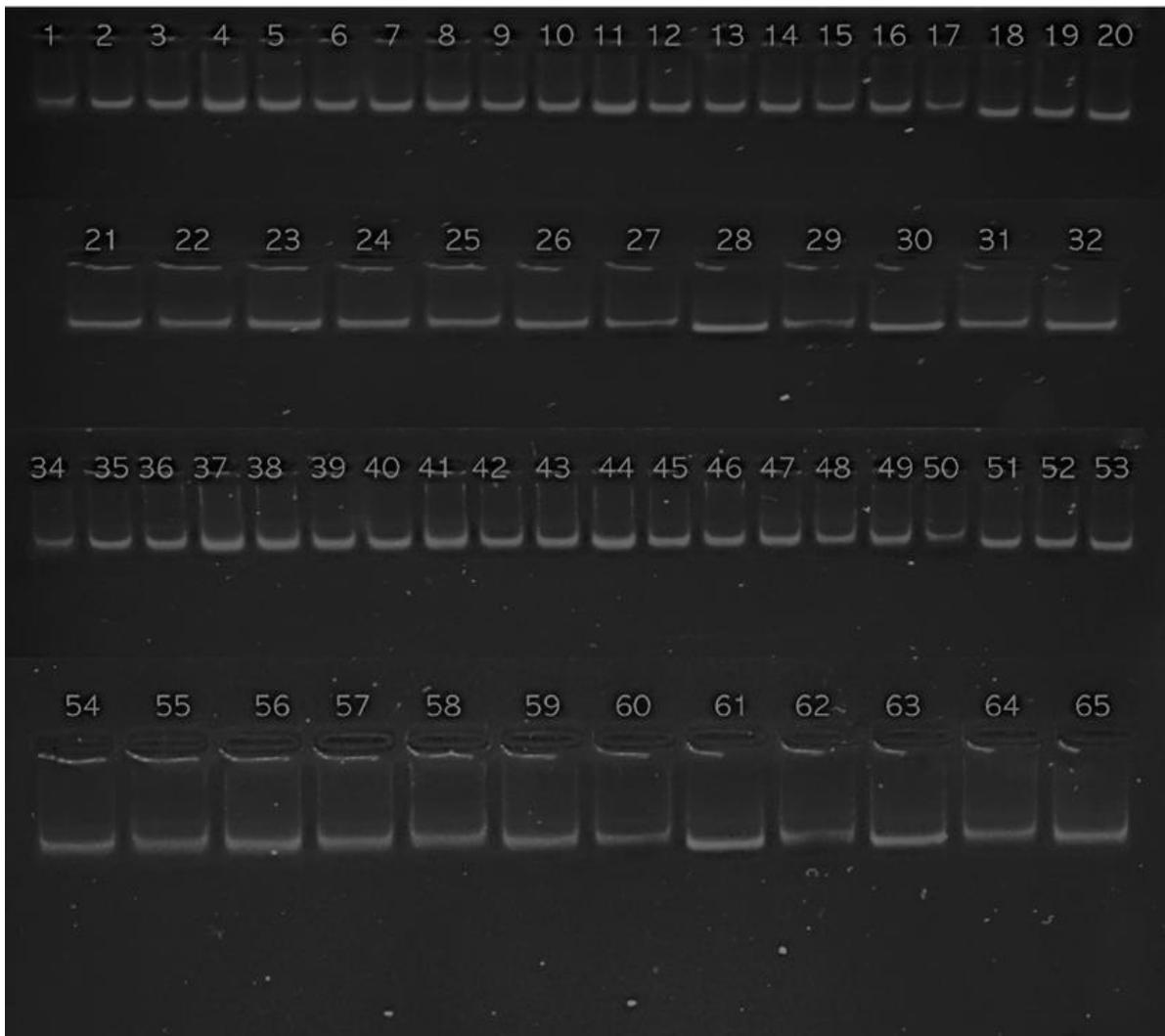
Resultados y Discusión

Extracción de ADN

Para realizar la identificación de la presencia del gen *Bru1* en los cultivares analizados fue necesario hacer una extracción del ADN de cada uno de los materiales recolectados, una vez terminada la extracción se analizó la calidad del ADN mediante electroforesis utilizando gel de agarosa al 1 % (Figura 3).

Figura 3

Evaluación de la calidad del ADN de las muestras extraídas de caña de azúcar sobre gel de agarosa al 1%



Los resultados de la evaluación de calidad se observaron mediante el uso de un transiluminador y se obtuvieron bandas bien definidas y con buena intensidad lo que indica una excelente calidad de ADN. Según Cenicaña (2014) en la evaluación de calidad del ADN mediante electroforesis se deben obtener bandas sin barrido ya que este puede deberse a una degradación del ADN.

Cuantificación del ADN

Posteriormente se realizó la cuantificación del ADN donde se obtuvo una alta concentración en ng/ μ l de muestra; se obtuvieron 43% de las muestras superiores a 1000ng/ μ L y un 56.9% inferiores a esta cantidad, es indispensable resaltar que la menor concentración obtenida fue de 179.03 ng/ μ L, esto resulta importante ya que la concentración de ADN utilizado para montar las PCR fue de 150 ng/ μ L (Anexo 2).

Presencia del gen *Bru1* Asociado a Resistencia contra *Puccinia melanocephala*

La presencia de genes de resistencia en los distintos materiales comerciales es una característica deseable, ya que la incidencia de enfermedades puede causar grandes pérdidas a los productores.

Los cultivares evaluados en este estudio empleando el par de iniciadores R12H16 mostraron una positividad ante la presencia del gen *Bru1* del 27.69% de la totalidad de materiales analizados figura 5, este resultado está dentro del rango obtenido por Molina (2016), el cual evaluó un total de 303 cultivares de caña de azúcar, de estos concordaron con 3 muestras de este estudio en los cuales el cultivar CP80-1743 no coincide con los resultados que se han obtenido ya que en la investigación realizada por Molina (2016) fue negativo y en nuestra evaluación dio positivo para la presencia del gen *Bru1*.

También en este mismo estudio se evaluó la incidencia de los síntomas del patógeno en campo donde presenta que el 68% de las totalidad de cultivares que no amplificaron para este gen no presentaron síntomas visibles de afección del patógeno, esto lo realizaron mediante evaluaciones

visuales haciendo uso de la escala de severidad para la roya café propuesta por Purdy y Dean (1979), (Ángel S et al. 2010).

Dentro de este porcentaje se encuentra la variedad CP80-1743 la cual si amplificó para el alelo en nuestra investigación lo que concuerda a lo encontrado por Avellaneda (2016) que determinó la presencia del alelo *Bru1* en esta variedad, datos que coinciden con lo obtenido por Parco et al. (2014) el cual analizó la presencia del gen *Bru1* en múltiples cultivares entre ellos la mencionada anteriormente dando positivo para el alelo evaluado.

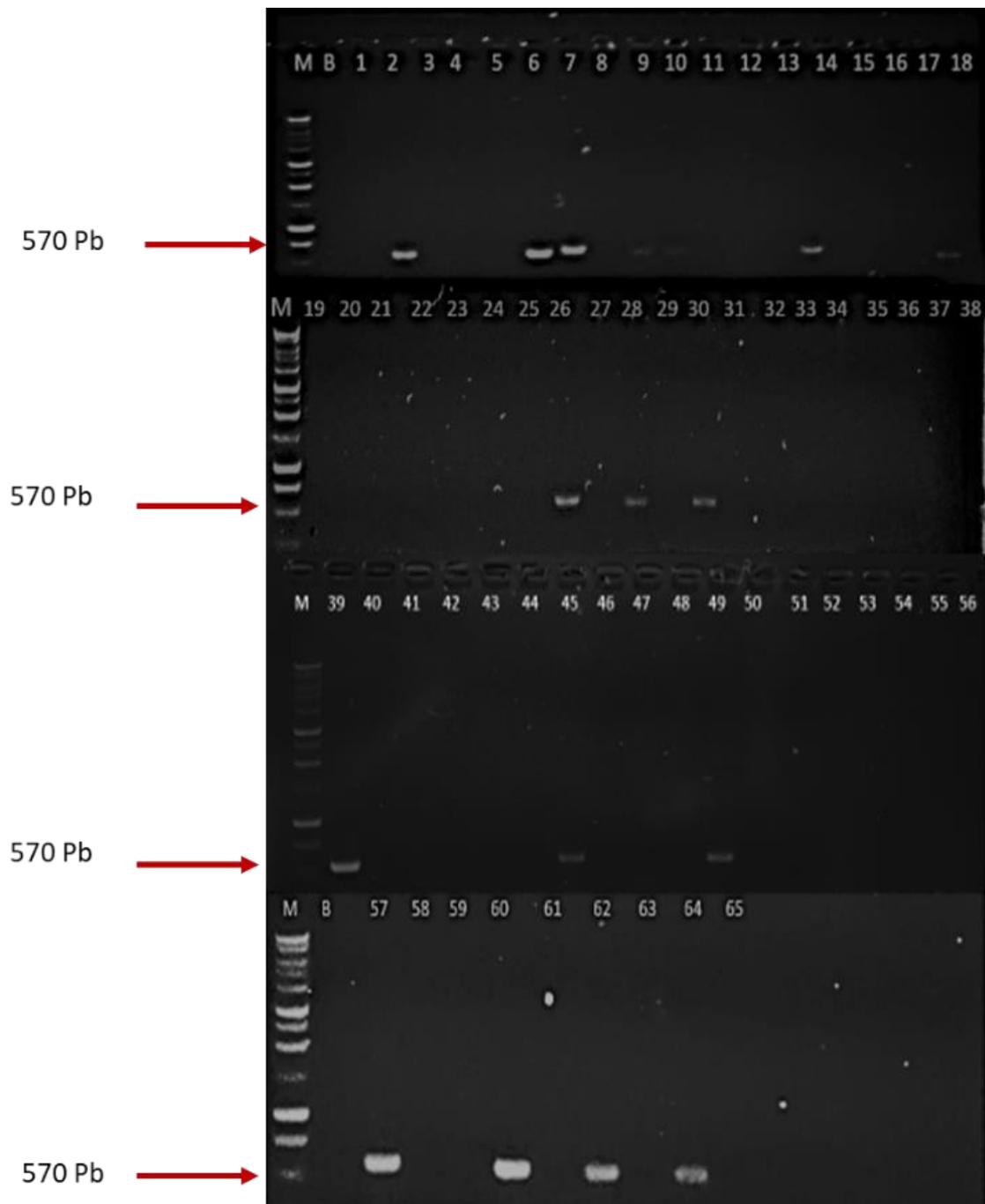
De igual forma se realizaron varias evaluaciones en PCR de esta misma muestra para descartar algún error en su realización y en cada evaluación dio positivo para el gen, en la Figura 8 se observa una de las muestras PCR realizadas con este fin.

Debido a lo anterior detallado podemos afirmar que el cultivar CP80-1743 presenta el gen de resistencia para el patógeno *Puccinia melanocephala* causante de la roya café en la caña de azúcar.

En un estudio realizado por Zhang R-Y et al. (2021) se analizaron mediante marcadores moleculares para la presencia del gen *Bru1* un total de 94 variedades de caña de azúcar de las cuales un 57.45% de estos cultivares dieron positivo para el alelo de interés, también se realizaron evaluaciones en campo para identificar la incidencia y severidad del patógeno en las plantaciones y se encontró un total de 90.21% de las variedades eran altamente resistentes al patógeno mientras que un total de 29.79% mostraba alta susceptibilidad a esta enfermedad datos similares a los obtenidos en este estudio (figura 4).

Figura 4

Imágenes de gel representativas que muestran la presencia del gen Bru1 dentro del ADN de la caña de azúcar, mediante los fragmentos de diagnóstico para el marcador R12H16 en gel de agarosa al 1%



Nota. Cultivares positivos para el alelo: SP 81-3250; MEX 79-431; RB 86-7515; MEX 69-290; CP 84-1198; RB 83-594; CPCL 92-2730; CP 08-2042; LAICA 03-805; LAICA 05-802; LAICA 05-805; LAICA 04-809; LAICA 12-59; LAICA 95-109; CP 91-2143; ITV 92-1424; CP 89-2143.

En el Cuadro 4 se puede observar la relación que existe entre la presencia del gen *Bru1* frente a la resistencia ante el patógeno *Puccinia melanocephala* en evaluaciones en campo, se puede apreciar que el 20% de los cultivares evaluados presentan susceptibilidad frente a la enfermedad pero sin embargo tan solo el 15.4% de estas variedades presenta la ausencia al gen *Bru1* por lo tanto el 4.6% si cuenta con su presencia, esto puede deberse a que el patógeno pudo haber adquirido resistencia; En el año 2007 fueron reportadas en el condado de Palm Beach, Florida U.S.A la presencia de *Puccinia melanocephala* en los cultivares CP89-2143 y CP80-1743 los cuales cuentan con la presencia del alelo *Bru1* y eran considerados resistentes (Maldonado Almanza y Gillen Vazquez 2010).

Cuadro 4

Relación entre la identificación del gen Bru1 y el comportamiento de los distintos cultivares de caña de azúcar frente a Puccinia melanocephala evaluada en campo.

Evaluación del patógeno en plantas	Variedades %	Presencia de <i>Bru1</i>	Número de variedades	Variedades en %	Variedades en % total
Sin determinar	32.3%	+	4	19%	6.1%
		-	17	80.9%	26.1%
Resistente/Tolerante	47.7%	+	11	35.5%	16.9%
		-	20	64.5%	30.8%
Susceptible	20%	+	3	23.1%	4.6%
		-	10	76.9%	15.4%
Total	100%		65	100%	100%

Nota. La resistencia, tolerancia y susceptibilidad de los cultivares frente al patógeno fue obtenida mediante diversas literaturas donde estos materiales fueron evaluados en campo. Fueron tomada de: (Sopena y Rago 2009); (Rago 2015); (Durán A 2020); (Souza Barbosa et al. 2020); (Vignola et al. 2018); (Qemé et al. 2015); (Sandhu y Davidson 2018); (Durán Alfaro et al. 2018); (Chaves Solera 2018).

En los cultivares que presentaron resistencia y tolerancia a la afectación del patógeno el cual fue un 47.7% de la totalidad, en donde de igual manera se pudo apreciar un 16.9% la presencia del alelo de interés y un 30.8% de estos cultivares no presentaron el gen.

La resistencia a la roya café es de tipo poligénica (Ramos Leal 2011), esto quiere decir que hay múltiples genes asociados a esta, los cuales se pueden comportar como un todo. La resistencia al patógeno es directamente proporcional a la cantidad de genes que tenga cada clon, esto quiere decir que entre más genes de resistencias tenga un cultivar en específico mayor probabilidad de resistencia

puede tener. Esto se puede explicar ya que si un cultivar presenta un solo gen de resistencia y el patógeno se vuelve tolerante o resistente a este gen podrá causar daños considerables a la plantación, mientras que si el cultivar presenta más de un gen asociado; y al patógeno volverse resistente a uno de los genes este cultivar sigue teniendo resistencia o tolerancia ya que existen otros alelos que codifican para esta resistencia (Molina et al. 2013).

De la totalidad de variedades evaluadas en un 90.7% de estas, no se encontró una evaluación previa para la presencia del alelo de interés de las cuales entre estos la totalidad de los que fueron en su origen denominados LAICA desarrollados en Costa Rica, el 40% fue positivo para la presencia del alelo de interés de un total de 15 cultivares.

En el cuadro 5 se observan ciertas variedades evaluadas en el presente estudio, algunas positivas y otras negativas para la presencia del gen de interés, estas variedades fueron evaluadas para resistencia a *Puccinia melanocephala* en el centro de investigación LAICA en Costa Rica, se realizaron evaluaciones visuales en distintas condiciones ambientales en las áreas productivas de caña de azúcar en el país, se observó que las variedades eran resistentes al patógeno y no presentaban síntomas visibles, mientras que los cultivares CP 72-2086 y CC 83-25 se observó la presencia de sintomatología de la enfermedad pero fueron síntomas leves por lo que se consideró tolerantes y no se observaron pérdidas en productividad y rendimientos en el cultivo (Durán Alfaro y Oviedo Alfaro 2012), en estos clones no se encontraron investigaciones previas para la detección de la presencia del gen *Bru1* el cual es asociado a la resistencia de *Puccinia melanocephala*. Se investigaron los distintos progenitores que dieron origen a estos clones se observó que en los entrecruzamientos que originaron a cada cultivar se encontraba por lo menos una variedad resistente o tolerante al patógeno causante de la roya café.

Cuadro 5*Progenitores de los cultivares de caña de azúcar sin evaluación previa*

Cultivar	Clones		Madre	Progenitores		
	<i>Bru1</i>	R/T*		R/T	Padre	R/T
LAICA 03-805	+	R	Q 96	T	SP 70-1143	R
LAICA 04-809	+	R	RD 75-11	R	B 60-267	S
RB 86-7515	+	R	RB 72-454	R	?	
CP 72-1210	-	R	CP 65-357	S	CP 56-63	R
CP 72-2086	-	R, T	CP 62-374	R	CP 63-588	T
CC 83-25	-	R, T	POJ 2878	R	CP 63-588	R
SP 81-3250	-	R	CP 70-1547	R	SP 71-1279	S

Nota. Los progenitores, cultivares y nivel de resistencias de estos fueron tomados de (Lizano Sáenz 1991); (Insuasty Burbano 2007); (Durán Alfaro y Oviedo Alfaro 2012); (Cuenya et al. 2012); (Chaves Solera 2015); (Chaves Solera 2020); (Chaves Solera 2018b).

Nota. *R: resistente; T: Tolerante; S: Susceptible.

Conclusiones

El empleo de técnicas moleculares para la identificación de regiones específicas para selección de variedades como lo es la PCR resultó ser de gran ayuda para la identificación de características deseables, ya que se logró identificar la presencia del gen *Bru1* dentro de la colección de variedades analizadas. Se observó que ciertos cultivares con la presencia del gen de interés presentaban susceptibilidad al patógeno mientras que otros que no presentaban el alelo fueron resistentes a la enfermedad, esto lo pudimos asociar ya que se conoció que la resistencia a *Puccinia melanocephala* es de tipo poligénica. Se conoció que la presencia del gen *Bru1* es una característica heredable, ya que en los cultivares evaluados para el alelo se pudo apreciar que uno los dos progenitores presentan resistencia a *Puccinia melanocephala*.

Recomendaciones

Se recomienda continuar con las investigaciones para la resistencia a *Puccinia melanocephala* ya que se pudo observar ya que hay ciertos cultivares que cuentan con el gen, pero son susceptibles mientras que hay otras que no presentan el gen, pero son resistente, es por ello por lo que recomendamos:

Realizar otras pruebas de diagnóstico molecular para la presencia del gen *Bru1* haciendo uso del par de cebadores 9020F4 digeridos con la enzima de restricción *Rsa1*, para determinar una secuencia más específica del gen.

También recomendamos realizar muestreos visuales en campo haciendo uso de la escala de severidad para la roya café de Dean y Purdy (1979), para determinar las variedades resistentes y susceptibles bajo las Seleccionar los cultivares que presenten resistencia a la enfermedad y a la vez cuenten con características agronómicas deseables para la productividad en la región.

Referencias

- Ángel S JC, Cadavid O. M, Victoria K. JI. 2010. Presencia de la roya naranja (*Puccinia kuehnii*) en el valle del río Cauca, Colombia. Cenicaña; [consultado el 17 de oct. de 2021]. (3-4):24–29. https://www.cenicana.org/pdf_privado/carta_trimestral/ct2010/ct3y4_10/ct3y4_10_p24-29.pdf.
- [APAH] Asociación de Productores de Azúcar de Honduras. 2020. Impacto económico de la agroindustria azucarera | APAH. Honduras: [sin editorial]; [consultado el 13 de oct. de 2021]. <http://azucar.hn/impacto-economico/>.
- Arévalo R, Bertoncini E, Guirado N, Chaila S, (Sin especificar). 2006. Los términos cultivar o variedad de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). Revista Chapingo serie Horticultura; [consultado el 5 de may. de 2022]. 12(1):5–9. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912102>.
- Asinari F. 2019. Enfermedad del amarillamiento en cañaverales del noroeste argentino: distribución, efecto en el rendimiento y genotipos virales de sugarcane yellow leaf virus [Tesis]. Río Cuarto: Universidad Nacional De Río Cuarto. 110 p; [consultado el 8 de nov. de 2021]. <https://cutt.ly/mTQDgDZ>.
- Avellaneda MC. 2016. Identification of genes associated with resistance to brown rust in sugarcane and prevalence of one major gene [Tesis]. Louisiana, Estados Unidos: Louisiana State University; [consultado el 12 de oct. de 2021]. https://www.researchgate.net/publication/303248070_Identification_of_genes_associated_with_resistance_to_brown_rust_in_sugarcane_and_prevalence_of_one_major_gene.
- Cenicaña. 2020. Servicio de diagnóstico de enfermedades. Colombia: Cenicaña. <https://www.cenicana.org/servicio-de-diagnostico-de-enfermedades-2/>.
- [cenicaña] Centro de investigación de la caña de azúcar de Colombia. 2014. Extracción de ADN. [sin lugar]: [sin editorial]. 5 de sep. de 2014; [actualizado el 5 de sep. de 2014].
- Chaves Solera M. 2015. Principales variedades de caña cultivadas comercialmente en algunos países de tradición azucarera del Continente Americano. San José, Costa Rica: LAICA; [actualizado Marzo 2015; consultado el 29 de may. de 2022]. 26 p. <http://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/hTWHpegbaVFEGwDKQcjzZbbCFxpLksqw>.
- Chaves Solera MA. 2018a. Carga química activa por uso de agroquímicos en la caña de azúcar. Entre Cañeros; [consultado el 8 de jul. de 2022]. (11). <https://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/kxuFXypqGsqPIIIESrprVQqPhgtWGaCe>.
- Chaves Solera MA. 2018b. Genética aplicada a la mejora de las plantaciones comerciales de caña de azúcar. Costa Rica: LAICA; [actualizado 2018; consultado el 5 de may. de 2022]. <https://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/ugjhOOEYjZaGQJqjDGmdpGDGnGsWVdZs>.
- Chaves Solera MA. 2020. Progenitores de caña de azúcar de las principales variedades sembradas comercialmente en Costa Rica: Revisión histórica periodo 1530-2020. Entre Cañeros; [consultado el 5 de jul. de 2022]. (18). <https://laica.cr/wp-content/uploads/2021/01/revista-entre-caneros-n-18-diciembre-2020.pdf>.
- [CINCAE] Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador. 2004. Fisiología, floración y mejoramiento genético de la caña de azúcar en Ecuador. Centro de investigación de la caña de azúcar del Ecuador; [consultado el 29 de may. de 2022]. 3. <https://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/FISOLOGIA-Y-MEJORAMTO.pdf>.

- Comstock JC, Glynn NC, Davidson W. 2010. Sugarcane rusts in Florida. *proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.* 37.
- Cuenya M, Chavanne ER, Ahmed MA, Díaz Romero C, García MB, Espinosa MA, Ostengo S, Costilla D. 2012. Variedades para el área cañera de Tucumán. [sin lugar]: [sin editorial]. 10 p. Manual de cañeros. <https://www.eeaoc.gob.ar/wp-content/uploads/2018/11/mdc3.pdf>.
- D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N, Glaszmann JC. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet.* 250(4):405–413. eng. doi:10.1007/BF02174028.
- Dillon SL, Shapter FM, Henry RJ, Cordeiro G, Izquierdo L, Lee LS. 2007. Domestication to crop improvement: genetic resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). *Ann Bot.* 100(5):975–989. eng. doi:10.1093/aob/mcm192.
- Durán A JR. 2020. Generalidades del programa de variedades. Costa Rica: La Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar. 83 p.
- Durán Alfaro JR, Oviedo Alfaro M. 2012. Catalogo de variedades de caña de azúcar cultivadas en algunas regiones cañeras de Costa Rica. Grecia, Costa Rica: DIECA. 48 p; [consultado el 6 de jul. de 2022]. <https://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/article/9607>.
- Durán Alfaro JR, Oviedo Alfaro M, Carvajal Quesada P, Araya Vindas A, Vargas Miranda JE, Quesada Brenes C, Fonseca R. 2018. Desarrollo de nuevas variedades de caña de azúcar en la región norte. [sin lugar]: La Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar. 23 p; [consultado el 9 de jul. de 2022]. <https://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/RIPkvwRjMLZefRqdxTsSvUyZinTTdqB>.
- [FAO] Organizaciones de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. 2020. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2020-2029. París: OECD. ISBN: 9789264418950; [consultado el 2 de nov. de 2021].
- Glynn NC, Laborde C, Davidson RW, Irey MS, Glaz B, D'Hont A, Comstock JC. 2013. Utilization of a major brown rust resistance gene in sugarcane breeding. *Mol Breeding.* 31(2):323–331. doi:10.1007/s11032-012-9792-x.
- Insuasty Burbano O. 2007. Módulo 4: Variedades de Caña de Azúcar para la producción de Panela. Colombia: Corporación Colombiana de investigación agropecuaria; [consultado el 7 de jul. de 2022]. https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home_4/mod_virtuales/modulo4/tema_8.html.
- Lizano Sáenz JR. 1991. Informe anual de labores. San José, Costa Rica: Ministerio de Agricultura y Ganadería. 94 p; [consultado el 4 de jun. de 2022]. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/Memoria-1991.pdf>.
- López Mora R, García Gómez L. 2019. El desarrollo de nuevas variedades de caña de azúcar en el área de influencia del ingenio Central Progreso, S.A. de C.V. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado 2019; consultado el 29 de may. de 2022]. 9 p. <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/2.-VARIEDADES-1.pdf>.
- Maldonado Almanza JJ, Gillen Vazquez A. 2010. Variedades prometedoras en el 2010 en los ingenios Aaron Saenz Garza y El Mante. México: Grupo Saenz. 24 p; [consultado el 10 de jul. de 2022]. <https://www.atamexico.com.mx/wp-content/uploads/2017/11/1.-VARIEDADES-Y-ENTOMOLOG%C3%8DA.pdf>.

- Malo I, Bernacchia G, Arevalo P. 2015. Activación de genes de defensa en plantas de tomate de mesa *Lycopersicon esculentum* L., a través de la aplicación de sustancias químicas y naturales. Igr. 21(1). doi:10.17163/lgr.n21.2015.05.
- Molina L, Queme JL, Longo F. 2013. Comparative analysis between phenotype and Bru1 Marker for incidence to Brown Rust in Sugarcane. [sin lugar]. en.
- Molina LG. 2016. Desarrollo y aplicación de técnicas biotecnológicas para la caracterización, selección y mejoramiento genético de la caña de azúcar en Guatemala. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia. 164 p; [consultado el 29 de may. de 2022]. <https://acortar.link/hBzkqw>.
- [OGTR] Office of the Gene Technology Regulator. 2011. The Biology of the *Saccharum* spp. [sin lugar]: Australian Government; [actualizado Mayo 2011; consultado el 19 de may. de 2011]. 67 p. https://www.ogtr.gov.au/sites/default/files/files/2021-07/the_biology_of_the_sugarcane.pdf.
- Osorio Cadavid G. [sin fecha]. Buenas prácticas Agrícolas (BPA) y buenas prácticas de manufactura (BPM) En la producción de caña y panela. [sin lugar]. 202 p; [consultado el 24 de oct. de 2021]. <https://www.fao.org/3/a1525s/a1525s.pdf>.
- Parco AS, Avellaneda MC, Hale AH, Hoy JW, Kimbeng CA, Pontif MJ, Gravois KA, Baisakh N. 2014. Frequency and distribution of the brown rust resistance gene Bru 1 and implications for the Louisiana sugarcane breeding programme. *Plant Breed*; [consultado el 12 de oct. de 2021]. 133(5):6. doi:10.1111/pbr.12186.
- Parco AS, Hale AL, Avellaneda MC, Hoy JW, Kimbeng CA, Pontif MJ, McCord PH, Ayala-Silva T, Todd JR, Baisakh N. 2017. Distribution and frequency of Bru 1, a major brown rust resistance gene, in the sugarcane world collection. *Plant Breed*; [consultado el 12 de oct. de 2021]. 136(5):637–651. doi:10.1111/pbr.12508.
- Pérez Y, cartógrafo. 2021. Diseño experimental de variedades en los lotes Azacualpa2 Lote21 y Los Micos lote7. [sin lugar]: Azucarera tres Valles. 1 p; [consultado el 28 de nov. de 2021].
- Qemé JL, Orozco H, Salazar A. 2015. Estrategia de cruzamientos en el programa de variedades de Cengicaña. Guatemala: CENGICAÑA. 79 p; [consultado el 1 de jul. de 2022]. <https://cengicana.org/files/20150902101615782.pdf>.
- Raboin L-M, Oliveira KM, Lecunff 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. *Theor Appl Genet*; [consultado el 12 de oct. de 2021]. 112(7):1382–1391. eng. doi:10.1007/s00122-006-0240-3.
- Rago AM. 2015. Ciencia y tecnología de los cultivos industriales, Caña de azúcar. Argentina: [sin editorial]. 117 p. 5 vol. (vol. 7).
- Ramos Leal M. 2011. Evaluación de la resistencia a la roya parda (*Puccinia melanocephala* SYD.) de somaclones de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) obtenidos en el Ecuador. *Fitosanidad*; [consultado el 27 de jun. de 2022]. 15(4):245–250. https://www.researchgate.net/publication/237029657_EVALUACION_DE_LA_RESISTENCIA_A_LA_ROYA_PARDA_PUCCINIA_MELANOCEPHALA_SYD_DE_SOMACLONES_DE_CANA_DE_AZUCAR_SACCHARUM_SPP_HIBRIDO_OBTENIDOS_EN_EL_ECUADOR.
- Rodríguez I. 2020. Caña de Azúcar. Colombia: Agrotendencia; [actualizado 2019; consultado el 13 de oct. de 2021]. <https://acortar.link/ARhO8>.

- Rodríguez R, Portieles R. 2003. Establecimiento de la técnica de Bando - C en clones silvestres del complejo *Saccharum*. CENIC. 34(3):137–140. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226142005>.
- Ruiz García MA. 2020. Importancia del gen Bru1 en el control de la roya café (*Puccinia melanocephala*) de la caña de azúcar: Revisión de Literatura [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. 27 p; [consultado el 6 de nov. de 2021]. <https://acortar.link/QfvkLV>.
- Sandhu H, Davidson W. 2018. Sugarcane Cultivar Descriptive Fact Sheet: CPCL 02-6848 and CPCL 05-1201. EDIS; [consultado el 1 de jul. de 2022]. 2018(2). doi:10.32473/edis-sc104-2018.
- Santacruz Delgado CX. 2018. Identificación de razas patogénicas de *Puccinia melanocephala* Syd. & P. Syd. y establecimiento de una metodología de evaluación de roya café en caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Palmira, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 31 p; [consultado el 24 de oct. de 2021]. https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76302/2025-Claudia_X_%20Santacruz.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Sopena RA, Rago AM. 2009. Variedad LCP 85-334. [sin lugar]: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; [consultado el 9 de jun. de 2022]. <https://inta.gob.ar/variedades/lcp-85-384>.
- Souza Barbosa GV, Menezes Cruz M, Araújo Viveiros AJ, Rosário Sousa AJ, Cardoso Rocha AM, Guedes Ribeiro CA, Sampaio Filho F, Santos JM, Cavalcante Ferreira JL, da Silva PP, et al. 2020. Catálogo nacional de variedades "RB" de cana-de-acúcar. Curitiba: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. 136 p.
- Statista. 2016. Azúcar: producción mundial, consumo y existencias 2015 | Statista. [sin lugar]: [sin editorial]; [consultado el 13 de oct. de 2021]. <https://es.statista.com/estadisticas/600736/produccion-consumo-y-existencias-de-azucar-a-nivel-mundial-2009/>.
- Vásquez Condado JJ, Rodríguez Utrera DN. 2019. Comportamiento agroindustrial de las variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp) y estrategias de cosecha en Central Progreso. [sin lugar]: [sin editorial]; [consultado el 29 de may. de 2022]. 11 p. <https://acortar.link/RtghCE>.
- Vignola R, Poveda Coto K, Watler W, Vargas Céspedes A, Berrocal Solís Á. 2018. Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos: Cultivo de la caña de azúcar en Costa Rica. [sin lugar]: Solutions for environment and development. 129 p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-8327.pdf>.
- Zhang J, Zhang X, Tang H, Zhang Q, Hua X, Ma X, Zhu F, Jones T, Zhu X, Bowers J, et al. 2018. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. *Nat Genet*; [consultado el 11 de oct. de 2021]. 50(11):1565–1573. eng. doi:10.1038/s41588-018-0237-2.
- Zhang R-Y, Shan H-L, Yang K, Wang X-Y, Cang X-Y, Wang C-M, Luo Z-M, Li W-F, Huang Y-K. 2021. Identification of brown rust resistance in the field and detection of the Bru1 gene in sugarcane varieties. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 21(2). doi:10.1590/1984-70332021v21n2a30.

Anexos

Anexo A

Protocolo de extracción de ADN

Se mezcló la totalidad del buffer de extracción con el β -Mercaptoetanol y con SDS al 20%, esto se preparó a partir del número de muestras de cada extracción. Por cada muestra se añadió 800 μ l de buffer de extracción, 2.5 μ l de β -Mercaptoetanol y 50 μ l de SDS al 20%. En un tubo Eppendorf™ para centrifuga de 1.5 ml se agregó 300 gramos de muestra macerada, a esta se le añadió los 852.5 μ l de la solución realizada, se agitó durante 20 segundo en el vórtex y se incubó en baño maría a 65°C durante 30 minutos mezclando cada 10 minutos. Posteriormente se añadieron 250 μ l de acetato de potasio 5M y se volvió a agitar en el vórtex por 20 segundos; luego se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm a una temperatura de 4°C.

Se transfirió un total de 700 μ l del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf™ de 1.5ml. se realizó una limpieza añadiendo 700 μ l de Cloroformo: Alcohol:Isoamyl (24:1) y se mezcló en el vórtex por 10 segundos y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 12000 rpm a 4°C. Se tomó un volumen de 600 μ l del sobrenadante y se volvió a colocar en un nuevo tubo Eppendorf™ de 1.5ml. A los 600 μ l de sobrenadante extraído se le adicionan un volumen de 600 μ l de isopropanol frío, se mezcló con la mano suavemente y se almaceno a -20°C durante 2 horas; una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C; luego se eliminó el sobrenadante. Se limpió el pellet con 500 μ l de etanol frío al 70%, se agitó en el vórtex para soltar el pellet de las paredes del tubo, centrifugar durante 5 minutos a 7000 rpm y 4°C, descartar el sobrenadante y realizar una centrifuga spin a 12000 rpm durante 1 minuto a 4°C. El tubo se deja invertido durante 30 minutos para eliminar el exceso de etanol y se procede a resuspender con 100 μ l de agua libre de RNasa.

Anexo B

Concentración y absorbancia del ADN

Muestra	ng/ul	260/280
CP89-2143	1392.71	1.77
MY 5465	1088.01	1.86
RB 85-5035	992.5	1.96
CP80-1743	1425.2	1.83
SP81-3250	475.63	1.87
CP81-1384	1028.31	1.79
CC 8325	452.63	1.86
CP 09-2498	505.26	1.66
CP 00-1101	879.41	1.75
B 80-689	542.22	1.79
PR 76-3358	473.73	1.71
SP81-2068	499.39	1.9
MEX 79-431	818.21	1.98
SP 79-1011	428.44	1.86
RB 86-7515	935.49	1.88
SP 81-1842	1451.72	1.72
CP 72-2086	479.53	1.59
CP 73-1547	1217.47	1.7
CP 72-1210	368.42	1.71
RB 72-454	1970.22	1.59
MEX 69-290	1344.7	1.62
CP 84-1198	745.82	1.7
CP 11-2216	1230.39	1.73
CG 02-163	399.23	1.9
BJ 7938	432.18	1.8
BR 000-10	999.92	1.82
B 69-566	418.36	1.81
CP 02-2113	489.82	1.79
LCP 85-384	471.66	1.78
CP 07-1210	354.15	1.8
CG 00-102	179.03	2.54
CP 09-1823	1057.2	1.78
RB 83-594	523.8	1.81
CP 09-2364	1022.7	1.86
CP 96-1252	1074.55	1.95
CP 05-1791	1118.26	1.68
CP 08-1110	1230.57	1.68
CPCL 92-2730	1335.73	1.88
CPCL 05-1201	2307.78	1.61
CP 08-2042	529.26	1.74
CP 02-0926	963.99	1.85
LAICA 03-805	482.06	1.87

LAICA 05-802	448.23	1.77
LAICA 0726	1045.66	1.95
LAICA 08-390	1676	1.73
LAICA 05-805	1022.12	1.93
LAICA 0720	462.49	1.7
LAICA 01-604	1452.25	1.7
LAICA 1649	976.83	1.88
LAICA 04-809	1806.38	1.69
LAICA 1259	470.71	1.96
LAICA 07-801	500.21	1.23
LAICA 05-109	1390.78	1.9
LAICA 09-370	408.01	1.81
LAICA 12-340	1421.91	1.85
PINDAR	511.35	1.8
CG9797	1187.44	1.81
CP 81-2143	1312.82	1.94
HOCP 91-552	362.32	1.8
CG 9878	1055.4	1.91
LAICA 00-309	1076.44	1.77
ITV 92-1424	1723.2	1.79
RB 92-579	1109.03	1.99
LAICA 00-301	866.04	1.93
