

**USO DEL MARCADOR MOLECULAR csLV34 PARA LA IDENTIFICACIÓN DE UNA ZONA LIGADA AL GEN *Lr34* DE RESISTENCIA A ROYA DE LA HOJA EN POBLACIONES SEGREGANTES DE TRIGO (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Guillermo S. GERARD<sup>1</sup> y Sergio L. LASSAGA<sup>2-3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER, Ruta Prov. N°11, Km 10,5. CP 3100, Oro Verde, Paraná, Entre Ríos. República Argentina.

<sup>2</sup>Cátedra de Genética y Mejoramiento Vegetal. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER, Ruta Prov. N°11, Km 10,5. CP 3100, Oro Verde, Paraná, Entre Ríos. República Argentina.

<sup>3</sup>INTA - Estación Experimental Agropecuaria Paraná, Ruta Prov. N° 11, CC 128, Km 12,5 CP 3100, Oro Verde, Paraná, Entre Ríos.

\*Autor para correspondencia (guillegerard@hotmail.com)

**RESUMEN**

La roya de la hoja causada por *Puccinia triticina* Eriks es una de las enfermedades fúngicas más importantes del trigo (*Triticum aestivum* L.) en todo el mundo. En Argentina es considerada la enfermedad foliar de mayor impacto sobre el rendimiento del cultivo. Dentro de las medidas de manejo de la enfermedad, la resistencia genética es considerada la más económica y ambientalmente segura para reducir pérdidas del cultivo, dado que no implica incrementos de costos de producción ni contaminación del ambiente debido al uso indiscriminado de fungicidas. Actualmente, se dispone de más de 67 genes de resistencia a roya de la hoja identificados y caracterizados en trigo y especies cercanas; la mayoría de ellos confieren resistencia específica (genes mayores) y permanecen efectivos solamente unos pocos años cuando son desplegados a gran escala. La resistencia no específica o durable por el contrario, está asociada a la presencia de genes menores con efecto aditivo, los que se expresan mayormente en estado de planta adulta. Materiales con esta característica han demostrado resistencia efectiva y estable por varios años. El gen *Lr34* constituye uno de los genes más importantes de resistencia no específica o duradera; su forma de acción lenta y parcial ha permanecido efectiva durante varias décadas y el germoplasma que lo contiene ha sido utilizado desde la primera parte del siglo XX. En la práctica este tipo de genes presentan la dificultad de ser enmascarados por genes mayores y su expresión es condicionada por el ambiente. Esto dificulta su utilización en programas de mejoramiento tradicional. Actualmente la selección asistida por marcadores (MAS), es la vía más económica y efectiva cuando se requiere la incorporación de genes menores de resistencia a enfermedades, los que no pueden ser visualizados fácilmente o donde el efecto ambiental es importante. Los objetivos de este trabajo fueron, a) utilizar la MAS para la identificación de genotipos portadores de una zona ligada al gen *Lr34* en una progenie segregante, b) identificar el marcador molecular csLV34 ligado a la

\*Original recibido (10/03/15)

Original aceptado (11/12/15)

resistencia en la población segregante y c) analizar el tipo de segregación presentada por el marcador. Se estudiaron 728 genotipos resultantes del cruzamiento entre 3 líneas caracterizadas por la presencia del *Lr34* y 19 cultivares comerciales sin caracterización. Se realizó un análisis genotípico utilizándose el marcador csLV34, el que amplifica una zona ligada al gen de resistencia sobre el cromosoma 7D. Se identificó en la progenie segregante los genotipos portadores del alelo asociado a la resistencia; obteniéndose como resultado que el 31 % de ellos presentó el marcador asociado al *Lr34*. Existieron diferencias en la segregación de las progenies provenientes de las tres líneas con caracterización previa, siendo la proveniente de Klein Tauro la que presentó una mayor proporción de individuos con el alelo asociado a la resistencia (52 %). Esto permitió concluir que el gen *Lr34* ligado al marcador csLV34 se transmite de una generación a la siguiente como un carácter mendeliano simple y que la selección asistida por marcadores moleculares resulta una herramienta de gran utilidad en la identificación de este tipo de genes de difícil determinación por métodos tradicionales.

**Palabras clave:** *Triticum aestivum* - *Puccinia triticina* – Gen *Lr34* – resistencia no específica o durable

#### SUMMARY

**Use of the molecular marker csLV34 for identifying a linked region to *Lr34* resistance gene to leaf rust in segregating populations of wheat (*Triticum aestivum* L.)**

The leaf rust caused by *Puccinia triticina* Eriks is one of the most important fungal diseases of wheat (*Triticum aestivum* L.) worldwide. In Argentina it is considered the foliar disease of greater impact on crop yield. Among the measures of disease management, genetic resistance is the most economical and environmentally safe way to reduce their losses, since it does not increase production costs or environmental pollution due to indiscriminate fungicide use. Currently, there are more than 67 resistance genes for leaf rust identified and characterized in wheat and related species, most of them confer specific resistance (major genes) and remain effective only a few years when deployed on a large scale. Durable resistance, on the contrary, is associated with the presence of minor genes with additive effect that are expressed primarily in adult plant stage, existing various materials with this feature that have proven effective and stable resistance for several years. The *Lr34* gene is one of the most important and lasting non-specific resistance gene, its slow and partial mode of action has remained effective for decades and the germplasm containing this gene has been in use since the early part of the twentieth century. In practice, this type of genes has the difficulty of being masked by major genes, being its expression further conditioned by the environment. This hinders their use in traditional breeding programs, currently being marker-assisted selection (MAS) the most economical and effective way when incorporation of minor genes for resistance to diseases is required, which may not be easily visualized or where the environmental effect is important. The objectives of this work were a) to use MAS to identify genotypes carrying the *Lr34* gene linked-region in segregating progeny, b) to identify the

molecular marker csLV34 linked to resistance and c) to analyze the type of segregation presented by the marker. A total of 728 genotypes resulting from crosses among three lines previously characterized by the *Lr34* presence and nineteen cultivars without characterization were studied. Genotypic analysis was performed using csLV34 marker, which amplifies a region linked to the resistance gene on chromosome 7D. Genotypes carrying the allele associated with resistance were identified in the segregating progeny, resulting that 31 % of them carried the marker associated with *Lr34*. There were differences in the segregation progeny from the three lines with previous characterization, being the ones from Klein Tauro which had the highest proportion of individuals with the allele associated with resistance (52 %). It was concluded that the *Lr34* gene linked to csLV34 marker is passed from one generation to the next as a simple Mendelian character and that molecular marker-assisted selection is a useful tool in the identification of such genes difficult to determine by traditional methods.

**Key words:** *Triticum aestivum* – *Puccinia triticina* – Gene *Lr34* – Durable resistance

### Introducción

El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es una de las fuentes más importantes de granos alimenticios y alimentación animal en el mundo. Es el cereal que más se utiliza en la alimentación humana, proporcionado alrededor del 55 % de los hidratos de carbono y el 20 % de las calorías de los alimentos que se consumen a nivel mundial (Joshi *et al.*, 2011). Su rendimiento es influenciado anualmente por diferentes factores limitantes abióticos y bióticos, siendo dentro de estos últimos las enfermedades de origen fúngico las que sobresalen por su incidencia. En Argentina, la roya de la hoja (*Puccinia triticina* Eriks) es considerada la enfermedad foliar más importante del cultivo por su frecuencia, nivel epidémico y la escasez de combinaciones genéticas efectivas en cultivares comerciales (Formento, 2006). Adicionalmente, los cambios en la prácticas culturales de las últimas décadas, como el aumento de la superficie bajo siembra directa acompañado por el monocultivo y el uso reiterado de una misma variedad, han incrementado el efecto del patógeno sobre el cultivo, generando pérdidas que pueden ser cercanas o superiores al 50 % (Annone,

2006). Como consecuencia, está muy difundido el uso de fungicidas, estimándose en América del Sur, un costo anual por superior a los 45 millones de dólares (PROCISUR, 2003). Además, en zonas de alto potencial productivo de nuestro país, las aplicaciones se realizan sistemáticamente sin monitoreo previo, provocando un grave daño ambiental.

En este contexto la resistencia genética es la medida de manejo más económica y ambientalmente segura para reducir las pérdidas, dado que no implica incrementos de costos de producción ni contaminación debido al uso indiscriminado de fungicidas (Singh *et al.*, 1995).

En la actualidad se han identificado más de 67 genes de resistencia a la roya de la hoja en trigo pan, trigo duro y especies diploides emparentadas, encontrándose ampliamente distribuidos en todo el genoma (Huerta-Espino *et al.*, 2011). La mayoría de ellos condicionan resistencia a razas específicas de *P. triticina*. (genes mayores), permaneciendo efectivos solamente unos pocos años debido a la rápida adaptación del patógeno. Como consecuencia, se necesitan continuamente nuevas variedades con diferentes genes de resistencia para

reemplazar a las variedades que se han transformado en susceptibles (Lagudah *et al.*, 2009). Por el contrario, cultivares con genes de resistencia no específica tienen un promedio de vida más largo y constituyen una buena alternativa para el manejo de la enfermedad no solo por el control eficiente, sino también por ser ambientalmente seguro y ecológicamente sano (Huerta Espino *et al.*, 2002). El gen *Lr34* otorga resistencia a roya de la hoja y no presenta especificidad de raza, su respuesta no implica hipersensibilidad sino que se caracteriza por generar menos uredinias y de menor tamaño (Spielmeyer *et al.*, 2005). El mismo, fue primeramente descrito por Dyck *et al.* (1966) pero el germoplasma que lo contiene ha sido utilizado desde la primera parte del siglo XX. Adicionalmente, se ha identificado en numerosas líneas de trigo de todo el mundo (Dyck y Samborski, 1982) y a través de estudios genéticos localizado en el brazo corto del cromosoma 7D, siendo su secuencia recientemente aislada (Krattinger *et al.*, 2009). El gen *Lr34* es globalmente usado como componente de resistencia durable a roya y combinado con los efectos aditivos de 3 o 4 genes de “slow rusting” resulta en altos niveles de resistencia comparables con inmunidad. Por otro lado, se expresa predominantemente en estado de planta adulta y su efecto es frecuentemente enmascarado por genes mayores (Lagudah *et al.*, 2009). Esto genera dificultades en su determinación a través de métodos tradicionales de mejora. Por ello, la selección asistida por marcadores (MAS) resulta un método más efectivo y conveniente para su detección. La MAS es actualmente la vía más económica y efectiva para capitalizar el creciente caudal de información genómica-molecular del trigo, resultando un recurso altamente valioso cuando se requiere la incorporación de genes menores de resistencia a enfermedades, los que no pueden ser visualizados fácilmente o

donde el efecto ambiental es importante (Nisi *et al.*, 2004).

Se han realizado numerosos esfuerzos en el desarrollo de marcadores moleculares útiles en la identificación del *Lr34*. En primer instancia, dos marcadores estrechamente ligados al locus de interés, SWM10 (Bossolini *et al.* 2006) y csLV34 (Lagudah *et al.* 2006), han demostrado ser herramientas de diagnóstico específico para este rasgo de resistencia multipatógena. El csLV34 se ha derivado de un marcador RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción), a partir del cual se desarrolló el correspondiente sitio de secuencia identificada (acrónimo del inglés expressed sequence tag or STS). Adicionalmente, se han desarrollado marcadores directamente sobre la secuencia polimórfica del *Lr34* (cssfr1-cssfr5), o sobre un nucleótido polimórfico simple (cssfr6) (Lagudah *et al.*, 2009). Se hipotetiza que el material utilizado en este trabajo presenta variabilidad respecto al factor de resistencia bajo estudio y que el mismo segrega de forma mendeliana a través de las generaciones. Así, cabe esperar que, la MAS resulte una metodología adecuada para el estudio y discriminación de genotipos con presencia/ausencia de la zona ligada al *Lr34*. A partir de lo mencionado, los objetivos planteados fueron: a) Utilizar la MAS para la identificación de genotipos portadores de la zona ligada al gen *Lr34* en una progenie segregante b) identificar el marcador molecular csLV34 ligado a la resistencia en la población segregante y c) Analizar el tipo de segregación presentada por el marcador.

## Materiales y métodos

### *Material experimental*

Como material experimental se utilizaron 728 genotipos originados a partir de cruzamientos entre 3 cultivares caracterizados por la presencia del *Lr34*: BioINTA 3000, ACA 9001 y Klein Tauro y un conjunto de 19 cultivares comerciales

que carecen de tal caracterización: Califa Sur, Altigo, Andino, Baguette 11, Galera, Odiel, Atrevido, Gazul, Lubrican, Osado, Sarina, Botticeli, Autan, Craklin, Arlequin, Alixan, Berdum, Andelos, Arthur Nick. Para la obtención de los mismos, los cultivares BioINTA 3000, ACA 9001 y Klein Tauro fueron cruzados con cada uno de los 19 cultivares sin caracterización. Posteriormente, las F1 generadas se cruzaron nuevamente con los cultivares Altigo, Andino y Baguette 11. De cada cruzamiento se utilizaron 10 semillas, las que fueron consideradas como genotipos diferentes. Debido a que no todas lograron germinar y/o establecerse como plantas se obtuvieron finalmente 728 genotipos. Además, se usaron los cultivares Klein Tauro y Cronox como testigo positivo y negativo, respectivamente.

#### Análisis genotípico

Para el análisis genotípico cada material se sembró en macetas bajo invernáculo a temperatura controlada hasta que las plantas alcanzaron el estadio de 3-4 hojas (EC 1.3), momento en el cual se realizó la extracción de ADN. Para ello se trasladaron las macetas al laboratorio, identificándose cada planta a través de una etiqueta numerada para saber a qué genotipo correspondía cada muestra, luego de lo cual se extrajo una hoja de cada planta. Al material vegetal así obtenido se le realizaron extracciones de ADN según metodología del CIMMYT para extracción de ADN (Zambrano *et al.*, 2002), al cual se le adicionó un paso extra de tratamiento con ribonucleasa (ARNasa) para eliminar el ARN presente. Se determinó cantidad y calidad del ADN obtenido a través de corridas electroforéticas en geles de agarosa al 0,8 % utilizando una cuba Wide Mini – Sub Cell GT de Bio Rad®. Posteriormente, se procedió a la amplificación de las muestras de ADN en un termociclador MJ Research, Inc. - PTC-100, utilizándose para la amplificación los cebadores específicos csLV34F

(5'GTTGGTTAAGACTGGTGATGG3') y csLV34R

(5'TGCTTGCTATTGCTGAATAGT3') del marcador molecular csLV34, el que se encuentra estrechamente ligado al *Lr34*, a una distancia de 0,31 cM. (Lagudah *et al.*, 2006). Cada reacción de amplificación consistió en un volumen final de 10µl: 5 µl de ADN, 1,7 µl de H<sub>2</sub>O, 1 µl de

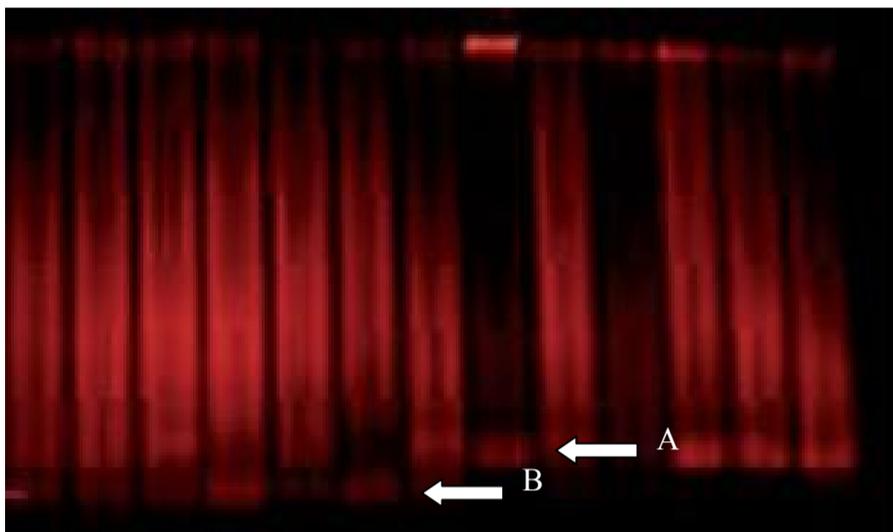
buffer (MgCl<sub>2</sub>), 0,8 µl de dNTPs, 0,6 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µl de cebador F, 0,3 µl de cebador R y 0,3 µl de Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación incluyeron un paso inicial de 3 minutos de desnaturalización a 94°C, seguido de 38 ciclos de a) desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, b) anillado del cebador a 62°C durante 40 segundos, c) extensión a 72°C durante 55 segundos y un paso final de extensión de 3 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de agarosa 1,5 %, en una cuba de electroforesis Sequi-Gene GT de Bio Rad® con las siguientes condiciones de corrida: 50V constantes, 44 mA, 2 W, con un tiempo de corrida de aproximadamente 3 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1,5 µL/100 mL de gel) y se analizaron las bandas de fluorescencia correspondientes a las moléculas de ADN a través de un transiluminador UV.

#### Resultados y discusión

El marcador csLV34 presenta dos variantes alélicas basadas en el tamaño polimórfico de sus bandas, un alelo "A" más largo que genera productos PCR de 229 pb, asociado con cultivares que no poseen la zona ligada al *Lr34*, y un alelo "B" más corto cuyos productos PCR son de 150 pb y están asociados a cultivares que presentan dicha zona. Se trata de un marcador codominante por lo que permite diferenciar genotipos homocigotas (positivos y negativos) de aquellos heterocigotas, según presenten uno de los alelos ("A" o "B") o ambos respectivamente. Este tipo de marcadores tiene la ventaja de evitar los problemas que pueden presentarse con marcadores dominantes, donde una PCR fallida puede ser interpretada como la ausencia de un alelo específico (Lagudah *et al.*, 2009). En la Figura 1 se observa uno de los geles de agarosa obtenidos, mostrando las bandas de 150 y 229 pb correspondientes a los alelos "B" y "A" del marcador csLV34, diferenciándose además los genotipos homocigotas y heterocigotas.

A partir de los productos PCR obtenidos y su resolución en geles de agarosa, los genotipos evaluados se clasificaron en 3

grupos: genotipos heterocigotas con presencia de ambos alelos csLV34a y csLV34b y por lo tanto portadores de la zona ligada al *Lr34*; genotipos homocigotas con presencia solo del alelo csLV34a indicador de la ausencia de dicha zona y genotipos donde no se logró la amplificación. Del total de 728 genotipos evaluados, 228 resultaron ser heterocigotas para el locus csLV34 ligado al L34, 443 presentaron solo el alelo csLV34a y 47 no amplificaron con el marcador utilizado.



**Figura 1.** Productos de amplificación PCR de algunos de los genotipos utilizados usando el marcador csLV34. Gel de agarosa al 2%. **PM A:** Producto de amplificación del alelo csLV34a de 229 pb, asociado con líneas que carecen del *Lr34*, **B:** Producto de amplificación del alelo csLV34b de 150 pb, asociado con líneas que presentan la zona ligada a la resistencia

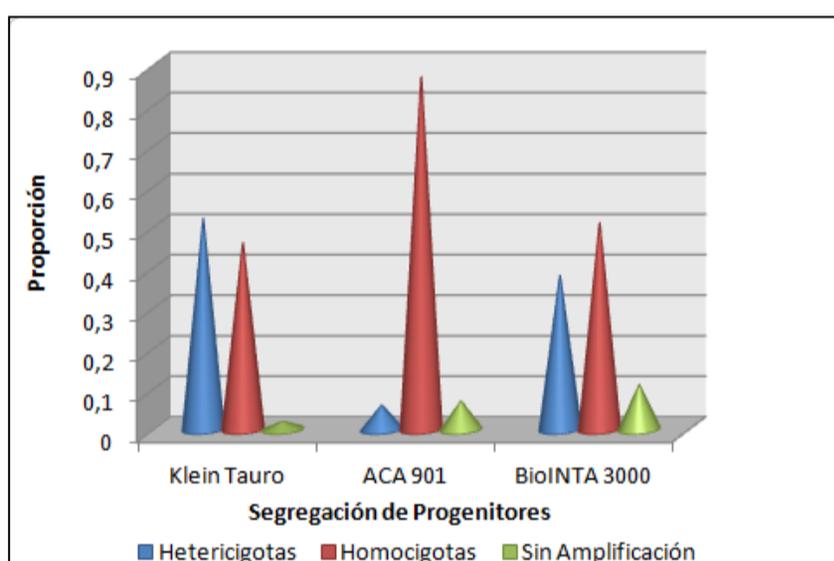
Existieron diferencias en el tipo de segregación presentada para el marcador en estudio entre los cultivares utilizados como posibles donantes del *Lr34*. La progenie generada a partir de Klein Tauro presentó mayor proporción de genotipos con el alelo csLV34b, indicador de la zona ligada a la resistencia. El 52 % de los genotipos obtenidos utilizando Klein Tauro como donante, amplificó el producto PCR de 150 pb asociado con la resistencia. Contrariamente, la progenie obtenida a partir del cultivar donante ACA 901 presentó la menor proporción de genotipos portadores del alelo csLV34b. En este caso, solo el 6,4 % amplificó el producto PCR de 150pb. Por último, en la progenie originada a partir del cultivar BioINTA 3000 se observaron valores intermedios; donde el 38 % de las mismas presentó el alelo csLV34b indicador

de la zona ligada a la resistencia. La proporción de genotipos en los que no se logra la amplificación con el marcador fue baja, siendo el cultivar BioINTA 3000 el que presentó el mayor número, el cual fue de un 11 % (Figura 2).

La gran variabilidad observada en los resultados obtenidos, según el cultivar utilizado como posible donante del *Lr34*, podría deberse por un lado a que a pesar de que los tres cultivares Klein Tauro, ACA 901 y BioINTA 3000 fueron considerados como portadores del gen *Lr 34* a partir de investigaciones previas, los genotipos particulares utilizados en la generación de la progenie analizada no han sido caracterizados molecularmente como tales en el presente trabajo. Tampoco se han caracterizado los 19 cultivares comerciales utilizados, por lo que también sería un factor

de variación adicional. Por último el número reducido de genotipos utilizados en cada cruzamiento (solo se sembraron 10 semillas, con una disminución variable en el porcentaje de germinación por causas fisiológicas o ambientales) podría llegar a ser no representativo de la totalidad de cruzamientos o combinaciones genéticas posibles y en consecuencia podría también sesgar los resultados. Considerando todos

estos factores es difícil poder determinar con certeza si el marcador presenta segregación de tipo mendeliana, sin embargo teniendo en cuenta la genealogía de los cruzamientos realizados y los resultados obtenidos con el cultivar Klein Tauro, la segregación obtenida es muy cercana a la que se esperaría si los genotipos del mismo utilizados en este estudio serían portadores del alelo de resistencia ( $\chi^2 = 0,41$ ).



**Figura 2.** Segregación del marcador csLV34 según el parental utilizado como donante. Los genotipos heterocigotas se encuentran asociados con la resistencia. La categoría sin amplificación refiere a los genotipos en los que no se observó ninguna de las dos bandas generadas por el marcador csLV34

En relación a los 47 genotipos en los que no se logró ningún producto de amplificación, una explicación razonable resulta de suponer que la calidad del ADN utilizado no fue adecuada como para permitir una correcta amplificación. Fallas en la amplificación debidas a las condiciones en las que se llevó a cabo la misma son poco probables ya que las estas resultaron adecuadas para la amplificación de las bandas en la mayoría de los genotipos evaluados.

Existió variabilidad en el conjunto de germoplasma analizado en lo que respecta a la zona ligada a la resistencia. La misma

dependió principalmente del cultivar utilizado como donante; siendo Klein Tauro considerado como la mejor fuente de resistencia a la enfermedad, ya que 52 % de su progenie presentó el alelo asociado al gen *Lr34*. La baja proporción de genotipos portadores del factor ligado a la resistencia en la progenie generada a partir de ACA 901 probablemente se explique por la ausencia del mismo en los genotipos particulares que se utilizaron en los cruzamientos. Esto dificultó el análisis de segregación del marcador, siendo posible observar solo para el cultivar Klein Tauro una segregación similar a una mendeliana.

### Conclusiones

En el conjunto de genotipos evaluados se logró identificar el marcador molecular csLV34 ligado a la resistencia. Este marcador amplificó diferencialmente según este presente o no la zona ligada a la misma como consecuencia de que se trata de un marcador codominante, es decir que permitió la identificación de ambos alelos en heterocigosis.

El csLV34 enmarcado dentro de la selección asistida por marcadores moleculares (MAS) resultó ser un marcador sencillo y de gran utilidad en la discriminación de cultivares con y sin la zona ligada al *Lr34* permitiendo analizar un gran número de genotipos en cortos periodos de tiempo, seleccionando aquellos materiales que poseen la característica de interés, y reduciendo así el número de líneas con las que se trabaja a campo. Sin embargo y más allá de la cercanía en el mapa genético del marcador csLV34 con respecto al *Lr34* (aproximadamente 0,31 cM), la posibilidad de algún caso raro de recombinación o no funcionalidad del producto de codificación hace necesario una evaluación fenotípica cuidadosa para confirmar con certeza la presencia efectiva de la resistencia.

### Agradecimientos

Al Dr. Héctor José Milisich responsable del programa de mejoramiento de trigo de la EEA Paraná del INTA, quien cedió los materiales experimentales usados en este trabajo.

### Referencias bibliográficas

- ANNONE, J. G. (2006). La roya de la hoja del trigo: Importancia económica y estrategias para reducir sus efectos sobre la producción. Trigo Actualización 2006. EEA INTA Marcos Juárez. Informe de Actualización Técnica N° 1: 26-28.
- BOSSOLINI, E.; KRATTINGER, S. G.; KELLER, B. (2006). Development of SSR markers specific for the *Lr34* resistance region of wheat using sequence information from rice and *Aegilops tauschii*. *Theor. Appl. Genet.*, 113: 1049–1062.
- DYCK, P. L.; SAMBORSKI, D. J. (1982). The inheritance of resistance to *Puccinia recondita* in a group of common wheat cultivars. *Can. J. Genet. Cytol.*, 24: 273–83.
- DYCK, P. L.; SAMBORSKI, D. J.; ANDERSON, R. G. (1966). Inheritance of adult plant leaf rust resistance derived from the common wheat varieties Exchange and Frontana. *Can. J. Genet. Cytol.*, 8: 665–671.
- FORMENTO, Á. N. (2006). Asociación entre severidad de la roya de la hoja del trigo (*Puccinia triticina*) y componentes del rendimiento. Resúmenes XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Catamarca, Argentina. pp. 320-321.
- JOSHI, A. K.; AZAB, M.; MOSAAD, M.; MOSELHY, M.; OSMANZAI, M.; GELALCHA, S.; BEDADA, G.; BHATTA, M. R.; HAKIM, A.; MALAKER, P. K.; HAQUE, M. E.; TIWARI, T. P.; MAJID, A.; JALAL-KAMALI, M. R.; BISHAW, Z.; SINGH, R. P.; PAYNE, T. S.; BRAUN, H. J. (2011). Delivering rust resistant wheat to farmers: a step towards increased food security. *Euphytica* 179 (1): 187-196.
- NISI, M.; VANZETTI, L.; BAINOTTI, C.; FORMICA, B.; NISI, J.; HELGUERA, M. (2004). Genes de calidad y resistencia a enfermedades: utilización de marcadores moleculares en el mejoramiento de trigo. *Idia XXI*: 4 (6): 34-39.
- HUERTA-ESPINO, J.; VILLASEÑOR, M.; ESPITIA, E. R.; LEYVA, S. G. M.; SINGH, R. P. (2002). Análisis de la resistencia a la roya de la hoja en trigos harineros para temporal. *Rev. Fitotec. Mex.*, 25: 161-169.
- HUERTA-ESPINO, J.; SINGH, R.; GERMÁN, S.; MCCALLUM, B., PARK, R.; CHEN, W.; BHARDWAJ, S.; GOYEAU, H. (2011). Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica*, 179(1): 143-160.
- KRATTINGER, S. G.; LAGUDAH, E. S.; SPIELMEYER, W.; SINGH, R. P.; HUERTA-ESPINO, J.; MCFADDEN, H., BOSSOLINI, E.; SELTER L. L.; KELLER, B. (2009). A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal

- pathogens in wheat. *Science*, 323: 1360–1363.
- LAGUDAH, E. S.; MCFADDEN, H.; SINGH, R. P.; HUERTA-ESPINO, J.; BARIANA, H. S.; SPIELMEYER, W. (2006). Molecular genetic characterisation of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 114: 21–30.
- LAGUDAH, E. S.; KRATTINGER, S. G.; HERRERA-FOESSEL, S.; SINGH, R. P.; HUERTA-ESPINO, J.; SPIELMEYER, W.; BROWN-GUEDIRA, G.; SELTER, L. L.; KELLER, B. (2009). Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theor Appl Genet.*, 119(5): 889–98.
- PROCISUR (Proyecto cooperativo regional en recursos genéticos de trigo en el Cono Sur). (2003). p 25. Disponible en: [http://www.procisur.org.uy/proyectos/pdfs/Proyecto\\_RegionalTrigo\\_AnexoA.pdf](http://www.procisur.org.uy/proyectos/pdfs/Proyecto_RegionalTrigo_AnexoA.pdf). [Consulta: 2 de octubre de 2013].
- SINGH, R. P.; MA, H.; RAJARAM, S. (1995). Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Frontana. *Plant Dis.*, 79: 238-240.
- SPIELMEYER, W.; MCINTOSH, R. A.; KOLMER, J.; LAGUDAH, E. S. (2005). Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 111: 731–735.
- ZAMBRANO, A. Y.; DEMEY, J. R.; MARTINEZ, G.; FUENMAYOR, F.; GUTIERREZ, Z.; SALDAÑA, G.; TORREALBA, M. (2002). Método rápido, económico y confiable de minipreparación de ADN para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. *Agronomía Tropical*, 52(2): 235-243.