



Revista Industrial  
y Agrícola de  
Tucumán

ISSN 0370-5404

En línea  
1851-3018

Tomo 102 (2):  
51-55; 2025



ESTACION EXPERIMENTAL  
AGROINDUSTRIAL  
OBISPO COLOMBRES  
Tucumán | Argentina

Av. William Cross 3150  
T4101XAC - Las Talitas.  
Tucumán, Argentina.

**Trabajo**  
presentado en  
el XXXII ISSCT  
Centennial  
Congress, 24 al 28  
de agosto de 2025,  
Cali, Colombia,  
traducido al  
castellano.

Fecha de  
recepción:  
18/09/2025

Fecha de  
aceptación:  
19/09/2025

# Mapeo asociativo y localización de marcadores moleculares ligados a la resistencia a roya marrón de caña de azúcar

Andrea N. Peña Malavera\*, Diego Costilla\*, Aldo S. Noguera\*, Atilio P. Castagnaro\*, Santiago Ostengo\* y Josefina Racedo\*

\* Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (ITANOA), Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CCT NOA Sur. Av. William Cross 3150. Las Talitas, Tucumán, R. Argentina, T4101XAC. Email: andreapema@eeaac.org.ar

## RESUMEN

La roya marrón de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala*) es una enfermedad de gran importancia en muchas regiones productoras de azúcar del mundo, que causa importantes pérdidas de rendimiento, con repercusiones económicas. El método más eficaz para controlar esta enfermedad es el uso de variedades comerciales resistentes. La disponibilidad de marcadores de diagnóstico para detectar la presencia del gen mayor *Bru1* ha permitido estudiar su eficacia y frecuencia en el germoplasma de la caña de azúcar, revelando que en algunos casos la resistencia a la roya marrón en las variedades modernas recae esencialmente en el gen *Bru1*. Para identificar fuentes genéticas alternativas de resistencia, se realizó previamente un estudio de genotipado selectivo en una población biparental, identificando SNPs asociados nuevas fuentes. El presente estudio tuvo como objetivo realizar un mapeo de asociación en una población compuesta por 305 accesiones del banco de germoplasma de la EEAOC, genotipadas con 9K SNPs derivados de DArT seq y fenotipadas para roya marrón en el campo bajo alta presión de inóculo natural. Se encontró que un total de 10 SNPs estaban asociados con la resistencia. La localización de estos marcadores en el mapa genético de la caña de azúcar permitirá identificar las regiones que controlan este rasgo de interés, poniéndolas a disposición de la comunidad científica y de los mejoradores.

**Palabras clave:** marcadores DArT-seq, genotipos, fenotipos, estructura poblacional, parentesco.

## ABSTRACT

**Association mapping and localization of molecular markers linked to sugarcane brown rust resistance**

Sugarcane brown rust (*Puccinia melanocephala*) is a disease of major importance in many sugar producing regions of the world, causing significant yield losses and economic impacts. The most effective method for controlling this disease is the use of resistant commercial varieties. The availability of diagnostic markers to detect the presence of the major gene *Bru1* has allowed the study of its efficacy and frequency in sugarcane germplasm, revealing that in some cases resistance to brown rust in modern varieties is essentially due to the *Bru1* gene. To identify alternative genetic sources of resistance, a selective genotyping study was previously conducted in a biparental population, identifying SNPs associated with brown rust resistance. The present study aimed to perform association mapping in a population composed of 305 accessions from the EEAOC germplasm bank, genotyped with 9K SNPs derived from DArT seq and phenotyped for brown rust in the field under high natural inoculum pressure. A total of 10 SNPs were found to be associated with resistance. The localization of these markers on the sugarcane genetic map will allow for the identification of the regions that control this trait of interest, making them available to the scientific community and breeders.

**Key words:** DArT-seq markers, genotypes, phenotypes, population structure, kinship.

## INTRODUCCIÓN

El hongo *Puccinia melanocephala* H. & P. Sydow es el agente causal de la roya marrón de la caña de azúcar, una enfermedad foliar presente en muchas regiones productoras de este cultivo a nivel mundial. La presencia de un gen mayor de resistencia a roya marrón (*Bru1*) ha sido identificada en el cultivar R570 (Daugrois *et al.*, 1996) y los marcadores diagnósticos han permitido determinar que la resistencia, en la mayoría de las variedades comerciales a nivel global, está asociada con este gen. Esta amplia prevalencia amenaza la durabilidad de la resistencia conferida por *Bru1*, al incrementar el riesgo de brotes de la enfermedad (Racedo *et al.*, 2013). Como resultado, varios cultivares comerciales altamente productivos que se volvieron susceptibles a la roya marrón han sido discontinuados (Comstock *et al.*, 1992; Barreira *et al.*, 2013). Es importante asegurar una diversidad genética suficiente de resistencia entre las variedades comerciales cultivadas para prolongar la vida útil de los genes de resistencia.

Hasta la fecha, se han identificado otras fuentes de resistencia a la roya marrón. *Bru2* (Daugrois *et al.*, 1996; Raboin *et al.*, 2006) ofrece una fuente alternativa de resistencia y muestra potencial para diversificar las estrategias de resistencia; sin embargo, aún no se han reportado marcadores diagnóstico para su implementación efectiva. En un estudio previo (Chaves *et al.*, 2022), se localizaron fuentes alternativas de resistencia a *Bru1* y se identificaron SNPs asociados.

El presente estudio tiene como objetivo desarrollar una estrategia de GWAS (Genome-Wide Association Study, estudio de asociación de genoma completo) utilizando un panel de caña de azúcar compuesto por los genotipos más frecuentemente empleados en el programa de mejoramiento local. Mediante el análisis de datos de infecciones naturales y de marcadores moleculares obtenidos mediante GBS (Genotyping by Sequencing, genotipificación por secuenciación), la meta es identificar regiones asociadas con la resistencia a la roya marrón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

La población estuvo compuesta por 305 genotipos de caña de azúcar de los 789 que constituyen la colección de germoplasma del programa de mejoramiento de la EEAOC (Ostengo *et al.*, 2021). Mientras que la mayoría de ellos se utilizan con mayor frecuencia como progenitores para cruzamientos, otros se incluyeron con el fin de capturar diversidad alélica.

### Extracción de ADN

El ADN se extrajo a partir de tejido foliar congelado siguiendo el protocolo de Diversity Arrays Technology (DArT) Pty Ltd ([www.diversityarrays.com/orderinstructions/plant-dna-extraction-protocol-for-dart/](http://www.diversityarrays.com/orderinstructions/plant-dna-extraction-protocol-for-dart/)). La calidad y cantidad del ADN se evaluaron mediante geles de agarosa al 0,8% teñidos con GelRed, de acuerdo con los procedimientos recomendados por el proveedor de genotipificación por secuenciación (GBS).

### Genotipado

La población de caña de azúcar fue genotipada utilizando la plataforma DArT-seq (Yarralumla, Australia), una tecnología de alto rendimiento basada en un método de reducción de complejidad del genoma, mediante una selección inteligente de fracciones genómicas que corresponden predominantemente a genes activos. Estas fracciones genómicas se secuencian posteriormente utilizando plataformas de NGS (*Next-Generation Sequencing*, secuenciación de nueva generación). Las secuencias generadas se procesaron mediante las canalizaciones analíticas propietarias de DArT-seq.

En resumen, para la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), todas las etiquetas de todas las bibliotecas incluidas en el análisis con DArTsoft14 se agrupan mediante el algoritmo en C++ de DArT PL, seguido del análisis de los grupos para obtener loci SNP separados utilizando una serie de parámetros técnicos. Los datos se codificaron de la siguiente manera: 0 para el homocigoto de referencia, 1 para el homocigoto del SNP, 2 para el heterocigoto y “-” para el alelo nulo. Los SNPs obtenidos fueron filtrados para loci monomórficos y se aplicó un umbral de frecuencia mínima de alelo (MAF, *Minor Allele Frequency*) del 20%.

### Fenotipado

La población de caña de azúcar fue evaluada mediante infecciones naturales de roya marrón en un diseño sin replicaciones en el campo experimental de la EEAOC (Las Talitas, departamento Tafí Viejo, provincia de Tucumán, Argentina). Cada genotipo estuvo representado por una fila de cuatro metros y se evaluó el desarrollo de la roya marrón bajo alta presión de inóculo durante el período más favorable para el desarrollo de la enfermedad. La variedad LCP 85-384 (altamente susceptible) se plantó en los bordes que rodeaban el ensayo para favorecer la infección natural.

Las reacciones a la roya marrón se puntuaron en cada parcela utilizando una escala de 1 (sin enfermedad) a 9 (más del 50% del tejido de la lámina foliar dañado), según lo descrito por Amorin *et al.* (1987), por dos observadores independientes. Los análisis de datos se realizaron con Navure 2.7.3 (Navure, 2023).

### Ánalisis de mapeo asociativo

Se aplicó un modelo lineal mixto que incorpora una matriz de parentesco (K) para tener en cuenta la relación entre los genotipos. Los datos procesados se utilizaron para generar una matriz de relaciones genéticas K mediante la función A.mat de la librería rrBLUP, la cual calcula coeficientes de parentesco basados en la similitud aditiva de los genotipos.

El análisis de asociación genómica se realizó utilizando el modelo K, que incorpora la matriz de parentesco K como estructura de covarianza en el modelo (Peña Malavera *et al.*, 2018). Se utilizó el siguiente modelo lineal generalizado para evaluar la asociación entre cada SNP y el rasgo fenotípico:

$$y = \mu + x\beta + Zg + \epsilon$$

donde  $y$  es el fenotipo,  $\mu$  es la media general,  $x\beta$  representa el efecto del marcador (SNP),  $Zg$  es el efecto genético aleatorio modelado mediante la matriz de parentesco  $K$ , y  $\epsilon$  es el error residual. Los valores de  $p$  para cada SNP se calcularon utilizando una estadística  $t$ . El umbral de significancia estadística se definió como  $5 \times 10^{-6}$ , lo cual corresponde a  $-\log_{10}(5 \times 10^{-6}) \geq 5,30103$  (Chen *et al.*, 2021). Los SNPs con valores de  $p$  ajustados que cumplieran este criterio se consideraron significativos.

#### ■ Análisis de las secuencias de SNP asociadas con la resistencia a la roya marrón en el genoma de caña de azúcar

Se analizaron las secuencias de los marcadores DArT-seq de caña de azúcar significativamente asociados con la resistencia a la roya marrón para estudiar su similitud y posición en el genoma de caña de azúcar. Este análisis se realizó utilizando las bases de datos del cultivar híbrido de *Saccharum* R570, mediante la herramienta BLAST y el Gene Browser en el Sugarcane Genome Hub (<https://sugarcane-genome.cirad.fr/>) (Gruber *et al.*, 2017).

#### ■ RESULTADOS

En el mapeo asociativo, es importante conocer la estructura poblacional y el rasgo de interés. La Figura 1 ilustra la distribución de frecuencias de la severidad a roya marrón en la población bajo estudio. Los puntajes representan una medida de la severidad de la roya marrón o de la resistencia. El puntaje más frecuente es 1, con aproximadamente 180 observaciones, lo que indica que la mayoría de los individuos son resistentes. Los puntajes 2 y 3 tienen un número moderado de observaciones, alrededor de 50 cada uno. Los puntajes del 4 al 8 muestran un fuerte descenso en la frecuencia, con mínima representación en el conjunto de datos, lo que sugiere que los puntajes ele-

vados de roya (mayor severidad) son raros. En general, la distribución está sesgada hacia los puntajes bajos, destacando que la mayoría de las observaciones se encuentran en las categorías de menor severidad o alta resistencia.

Después de filtrar los marcadores monomórficos y aquellos con frecuencia de alelo menor (MAF) inferior al 20%, se utilizaron un total de 9251 SNPs para el análisis de asociación. Las correlaciones de los 9251 SNPs pueden observarse en el mapa de calor. No existen regiones en el mapa de calor donde la mayoría de los SNPs estén fuertemente correlacionados; esto podría indicar que no hay bloques genéticos (Figura 2).

El mapeo asociativo reveló 10 SNPs significativamente ligados a la resistencia a la roya marrón, superando el umbral de significancia de  $-\log_{10}(5 \times 10^{-6}) \geq 5,30103$  (Figura 3). Cuando estas secuencias de SNP se analizaron en el genoma de caña de azúcar, solo 6 SNPs se alinearon con regiones genómicas depositadas en la base de datos (Tabla 1).

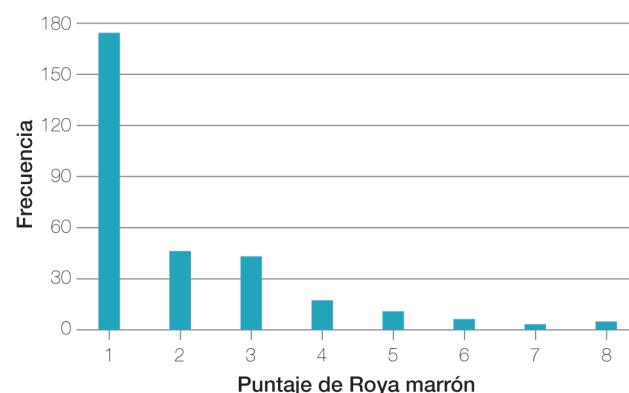


Figura 1. Distribución de frecuencias de la severidad a roya marrón, que varía de 1 a 9 en los 305 genotipos de caña de azúcar.

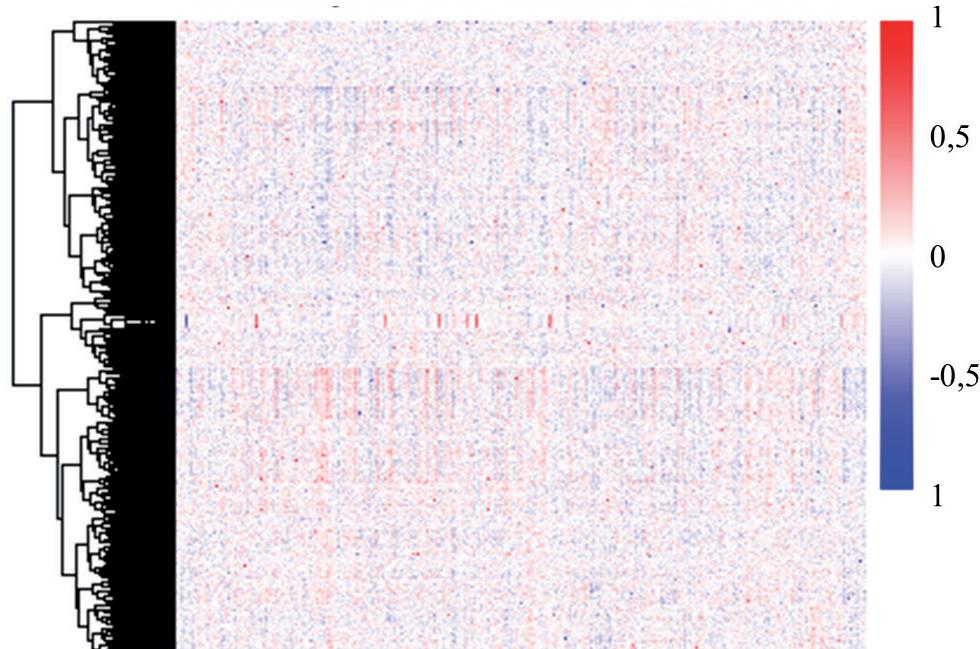
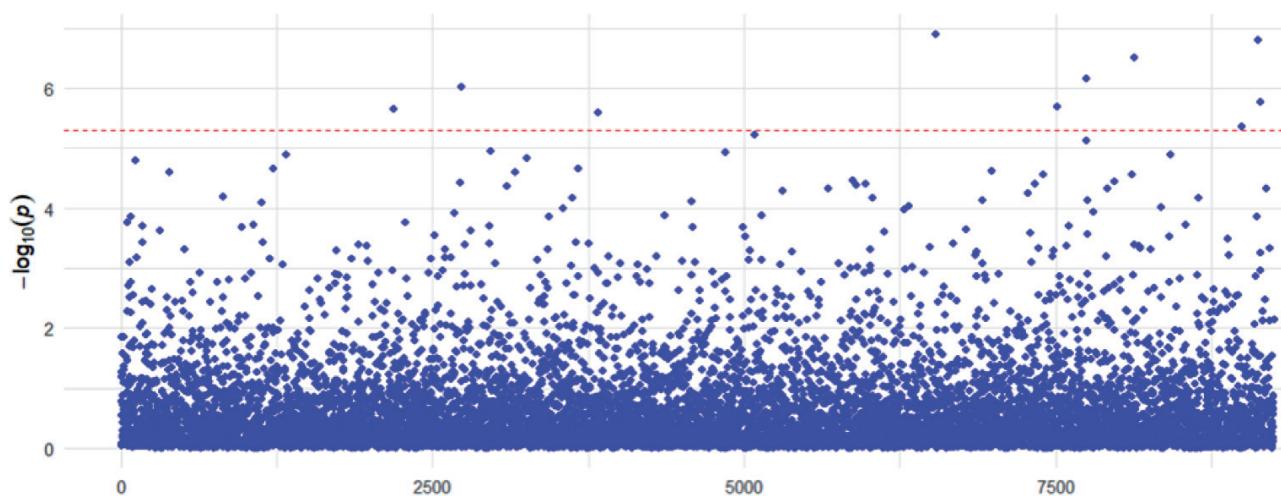


Figura 2. Mapa de calor de 9.251 SNP utilizados para el mapeo asociativo.



**Figura 3.** Gráfico Manhattan del modelo K de GWAS que muestra la significancia de cada SNP (escala logarítmica) en la resistencia a la roya marrón de caña de azúcar. La línea roja indica el umbral a nivel de todo el genoma de  $-\log_{10}(5 \times 10^{-6}) \geq 5,30103$ . El puntaje se presenta en el eje Y como  $-\log_{10}(p)$ .

**Tabla 1.** Resultados obtenidos del alineamiento de las secuencias de los 6 SNPs de caña de azúcar, ligados a la resistencia a la roya marrón, con el genoma del cultivar híbrido de *Saccharum* R570.

SNP	Posición en el genoma	Bases alineadas	% Identidad	Nombre del gen	InterPro
SNP1-BR	Chr5_9A:72600379..72600447	68	98,55	NC	
	Chr5C:26937867..26937935	68	98,55	NC	
	Chr3C:6497759..6497827	68	98,55	SoffixsponR570.03Cg021800.1	
	Chr3B:5801183..5801251	68	98,55	SoffixsponR570.03Bg021900.1	Nucleotidyltransferase superfamily (IPR043519),PAP/25A-associated
	Chr3D:5725121..5725189	68	98,55	SoffixsponR570.03Dg021900.1	
	Chr3A:4096960..4097028	68	98,55	SoffixsponR570.03Ag020900.1	(IPR002058),TUTase nucleotidyltransferase
	Chr3E:3692772..3692840	68	98,55	SoffixsponR570.03Eg022700.1	domain (IPR045100)
SNP2-BR	Chr3F:3748381..3748448	67	97,10	SoffixsponR570.03Fg021600.1	
	Chr10F:33773798..33773866	68	98,55	NC	
	Chr10A:67237884..67237952	68	98,55	NC	
	Chr8_10A:25105163..25105231	68	98,55	NC	
	Chr10D:55218936..55219004	68	98,55	NC	
	Chr10B:62674606..62674674	68	98,55	NC	
	Chr5F:3195122..3195190	68	98,55	NC	
SNP4-BR	Chr5E:2947663..2947731	68	98,55	NC	
	Chr5A:3276992..3277060	68	98,55	NC	
	Chr5B:4481665..4481733	68	98,55	NC	
	Chr5B:4571316..4571384	68	98,55	NC	
	Chr5C:2952672..2952740	68	98,55	NC	
	scaffold_118:104762..104830	68	98,55	SoffixsponR570.1Z130300.1	
	scaffold_88:9435975..9436043	68	98,55	SoffixsponR570.6us88g040600.2	Zinc finger C2H2 superfamily (IPR036236),Zinc finger C2H2-type
SNP5-BR	Chr6_9A:28883801..28883869	68	98,55	SoffixsponR570.6_9Ag116600.2	
	Chr6A:4485207..4485275	68	98,55	SoffixsponR570.06Ag020600.1	(IPR013087)
	Chr6E:6785048..6785116	68	98,55	SoffixsponR570.06Eg028600.1	

NC: región no codificante.

## CONCLUSIÓN

Los marcadores SNP permiten la identificación de posibles QTLs para la resistencia a la roya marrón y pueden servir como valiosas herramientas moleculares para la selección de genotipos resistentes en el programa de mejoramiento. Actualmente, se está evaluando la contribución individual de cada SNP a la variación fenotípica observada.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Amorim, L.; A. Bergamin Filho; A. Sanguino; C. Cardoso; V. A. Moraes e C. R. Fernandes.** 1987. Metodología de avaliação da ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). Boletim Técnico Copersucar 39: 13-16.
- Barrera, W.; J. Hoy and B. Li.** 2013. Effects of temperature and moisture variables on brown rust epidemics in sugarcane. *Journal of Phytopathology* 161: 98-106.
- Comstock, J. C.; J. M. Shine and R. N. Raid.** 1992. Effect of sugarcane rust on growth and biomass. *Plant Disease* 76: 175-177.
- Chaves, S.; S. Ostengo; R. P. Bertani; A. N. Peña Malavera; M. I. Cuenya; M. P. Filippone; A. P. Castagnaro; M. G. Balzarini and J. Racedo.** 2022. Novel alleles linked to brown rust resistance in sugarcane; Wiley Blackwell Publishing, Inc; *Plant Pathology*; 71; 8; 6-2022; 1688-1699.
- Chen, Z.; M. Boehnke; X. Wen and B. Mukherjee.** 2021. Revisiting the genome-wide significance threshold for common variant GWAS, *G3 Genes|Genomes|Genetics*, Volume 11, Issue 2, February 2021, jkaa056, <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaa056>
- Daugrois, J. H.; L. Grivet; D. Roques; J. Y. Hoarau; H. Lombard; J. C. Glaszmann and A. D'Hont.** 1996. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 1059-1064.
- Gruber, B.; A. Georges; O. Berry and P. Unmack.** 2017. dartR: Importing and analyzing SNP and silicodart data generated by genome-wide restriction fragment analysis. R package version 0.93 <https://CRAN.R-project.org/package=dartR>
- Navure Team.** 2023. Navure (2.7.3): A data-science-statistic oriented application for making evidence-based decisions. URL <http://www.navure.com>.
- Ostengo, S.; G. Serino; M. F. Perera; J. Racedo; S. Y. Mamaní González; F. Yáñez Cornejo and M. I. Cuenya** 2021. Sugarcane breeding, germplasm development and supporting genetic research in Argentina. *Sugar Tech* 24:166-180.
- Peña Malavera, A. N.; C. I. Bruno y M. G. Balzarini.** 2018. Control de falsos descubrimientos en mapeo asociativo con poblaciones estructuradas; Sociedad Argentina de Genética; *Journal of Basic and Applied Genetics* XXIX: 37-49
- R Core Team.** 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raboin, L.; K. Oliveira; L. Le Cunff; H. Telismart; D. Roques; M. Butterfield; J-Y. Hoarau; and A. D'Hont.** 2006. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploidy, using bi-parental progeny: Identification of a gene controlling stalk colour and a new rust resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1382- 1391.
- Racedo, J.; M. F. Perera; R. Bertani; C. Funes; V. González; M. I. Cuenya; A. D'Hont; B. Welin and A. P. Castagnaro.** 2013. *Bru1* gene and potential alternative sources of resistance to sugarcane brown rust disease. *Euphytica* 191: 429-436.