

## ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD DE CLONES DE CAÑA DE AZÚCAR A *Xanthomonas albilineans* MEDIANTE EL USO DE MARCADORES DArTseq

### SUSCEPTIBILITY ANALYSIS OF SUGARCANE CLONES TO *Xanthomonas albilineans* BY DArTseq MARKERS

Benjamín Cervantes-Romero<sup>1</sup>, Paulino Pérez-Rodríguez<sup>1</sup>, Carlos Flores-Revilla<sup>2</sup>, Carlos Aarón Rangel-Ortega<sup>2</sup>, Gustavo Alonso Pinto-Hernández<sup>2</sup>, Martha Hernández-Rodríguez<sup>1</sup>, Agustín Toledo-Gadea<sup>2</sup> e Hilda Victoria Silva-Rojas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México CP 56230 México

<sup>2</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar A.C., Ciudad de México CP 06500 México

#### Resumen

La caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbridos) es la gramínea poliploide más importante para la producción de azúcar a nivel mundial. En la actualidad, los marcadores Diversity Array Technology (DArTseq) permiten explorar el genoma de caña de azúcar con diferentes aplicaciones entre ellas determinar las distancias genéticas entre los clones. Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto fue genotipificar 1200 clones de caña de azúcar procedentes de la Estación de Hibridación del Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar A.C. (CIDCA), para generar información básica para el programa de mejoramiento genético, predicción de resistencia a enfermedades y estudios de asociación (GWAS). La extracción del DNA se realizó a partir de hojas jóvenes de cada clon, los que se enviaron a la compañía DArTseq en Australia para el análisis del genoma con alta densidad. Se obtuvieron 55,487 marcadores de tipo “presencia” (1) y “ausencia” (0) de un fragmento de restricción que contiene el marcador de interés. Se eliminaron marcadores de baja calidad, obteniéndose 42,338 marcadores. Se realizó un experimento para establecer la patogenicidad de 12 aislamientos de *Xanthomonas albilineans* representativos de las siete regiones cañeras del país, así como la selección del aislamiento más patogénico, los que se inocularon en clones de caña de azúcar, obtenidas de cultivo *in vitro* de la variedad susceptible MEX 69-290, de seis meses de edad. Se inocularon 12 plantas por aislamiento de *X. albilineans* y 3 plantas con agua destilada estéril como control negativo por tratamiento. Una vez que aparecieron los síntomas, se registró el número de líneas cloróticas en las hojas. Para medir la severidad del daño en función del número de líneas cloróticas de lápiz por planta, se usó una escala ordinal *ad hoc* con 4 valores: 0, 1, 2 y 3, donde 0 = Sin presencia de finas líneas de lápiz en la hoja, 1 = 1-5 líneas de lápiz por hoja, 2 = 6-10 líneas de lápiz por hoja y 3 = + 10 líneas de lápiz por hoja. Los datos resultantes se analizaron mediante el modelo de umbrales dado la naturaleza ordinal de la variable respuesta, lo cual permitió hacer comparaciones de patogenicidad entre las cepas. Considerando que se cuenta con información de los clones genotipificados utilizando la distancia de Rogers, fue posible identificar clones con perfiles genéticos similares, lo que potencialmente proporciona una lista de materiales que con probabilidad alta podrían ser susceptibles a la enfermedad de la escaldadura de la hoja de la caña de azúcar.

**Palabras clave:** modelo umbrales, patogenicidad, perfiles genéticos.

### Abstract

Sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) is the most important polyploid gramineous for sugar production worldwide. Currently, the Diversity Array Technology (DARtseq) markers allow exploring the sugarcane genome with different applications including determining the genetic distances between the clones. Therefore, the objective of the present project was to genotype 1200 clones of sugarcane from the Hybridization Station of the Sugarcane Research and Development Center A.C. (CIDCA), to generate basic information for the genetic improvement program, prediction of disease resistance and association studies (GWAS). DNA extraction was performed from young leaves of each clone, which were sent to the DARtseq Company in Australia for genome analysis with high density. The 55,487 markers of type "presence" (1) and "absence" (0) of a restriction fragment containing the marker of interest were obtained. Poor quality markers were removed, obtaining 42,338 markers. An experiment was carried out to establish the pathogenicity of 12 isolates of *X. albilineans* representative of the seven sugar cane regions of the country, as well as the most pathogenic isolation, which were inoculated in sugarcane plants, obtained from in vitro cultivation of the variety susceptible MEX 69-290, six months old. Twelve plants were inoculated by isolation of *X. albilineans* and 3 plants with sterile distilled water as a negative control by treatment. Once symptoms appeared, the number of chlorotic lines were recorded. To measure the severity of the damage based on the number of pencil chlorotic lines per plant, an ad hoc ordinal scale was used with 4 values: 0, 1, 2 and 3, where 0 = Without the presence of fine pencil lines on the leaf, 1 = 1-5 pencil lines per leaf, 2 = 6-10 pencil lines per leaf and 3 = + 10 pencil lines per leaf. The resulting data were analyzed using the threshold model given the ordinal nature of the response variable, which allowed comparisons of pathogenicity between the strains. Considering that there is information on genotyped clones using Rogers distance, it was possible to identify clones with similar genetic profiles, potentially providing a list of materials that with high probability could be susceptible to sugarcane leaf scald disease.

**Keywords:** Threshold model, pathogenicity, genetic profiles.

### Introducción

La caña de azúcar es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia Poaceae, y es la materia prima para la producción del 80% del azúcar que se produce a nivel mundial, además se ha convertido en un cultivo primario para la producción de biocombustibles (AGRI, 2017).

La constitución genética de la caña de azúcar es una de las más complejas que existen en el reino vegetal; de hecho, anteriormente su genoma se consideraba un desafío para el análisis y la secuenciación (Thirugnanasambandam et al., 2018). La caña de azúcar es un alloploiploide, cuyo genoma contiene información genética de *Saccharum officinarum* y *S. spontaneum* con un número variable de cromosomas  $2n = 100$  a  $130$  (Grivet y Arruda, 2002). En el complejo '*Saccharum*' se encuentran especies con diferentes niveles de ploidia y con un número variable de cromosomas entre  $2n = 20$  a  $\sim 200$ . La alta poliploidia y heterocigocidad debido a la hibridación, ha restringido el uso de estudios genéticos clásicos en este cultivo (Premachandran et al., 2011). Sin embargo, esta condición de poliploide le permite tener un gran rango de adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales en regiones tropicales y subtropicales de mundo, sembrándose en más de 103 países en los cinco continentes (Mendes de Paula et al., 2014).

En México, el mejoramiento genético en caña de azúcar se ha realizado mediante hibridación, esta técnica ha constituido la base para la obtención de nuevas variedades; sin embargo, los cruzamientos se han realizado sin el conocimiento de las distancias genéticas entre genotipos. Esto puede conllevar a que la combinación de genotipos susceptibles, presenten también susceptibilidad a enfermedades

que limiten su producción, como la enfermedad de la escaldadura de la hoja, cuyo agente causal es la bacteria *Xanthomonas albilineans*. Esta bacteria es considerada como una de las más importantes, ya que afecta la producción tanto en tonelaje (Rott y Davis, 2000), como en la calidad de los jugos (Ricaud and Ryan, 1989). Por tal motivo esta bacteria se encuentra cuarentenada por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-FITO-1995 y es utilizada en las evaluaciones de los programas de selección de variedades.

Con los avances en las herramientas genómicas y los métodos de secuenciación de nueva generación, se están iniciando estudios que permiten conocer la naturaleza de la complejidad del genoma de la caña de azúcar, la cual podría convertirse pronto en un modelo para estudiar otros genomas poliploides complejos (Thirugnanasambandam et al., 2018).

En la última década, el uso de la tecnología Diversity Array Technology ha sido consolidada como una herramienta de alta eficiencia para el genotipado de organismos genéticamente complejos (Edwards et al., 2017); esto representa una ventaja sobre otros marcadores moleculares tales como los microsatélites (SSR) o los Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs), que se basan en la PCR y cuyo uso está limitado a únicamente a especies de las que se tiene conocimiento previo de la secuencia de interés, afectando especialmente a las especies poliploides como la caña de azúcar (Wittenberg, 2007). Estos avances genómicos ayudan a los mejoradores a incorporar la diversidad de alelos en los programas de mejoramiento mediante hibridación, para la transferencia de genes de parientes silvestres, de tal manera que se pueda determinar las distancias genéticas de los nuevos genotipos y de los genotipos que le dieron origen (Cruz et al., 2013; Abberton et al., 2016).

La técnica de DArTseq permite realizar planteamientos innovadores en los sistemas de mejoramiento genético para caña en México, al realizar de manera dirigida las hibridaciones que se consideren pertinentes para lograr una mejor variabilidad con las accesiones disponibles, así como hacer predicciones estadísticas que permitan determinar la heredabilidad de caracteres cuantitativos y cualitativos que convengan.

Además, a partir de la genotipificación, se abre la posibilidad de la identificación de regiones del genoma que representen genes de resistencia a la enfermedad de la escaldadura de la hoja, además de permitir estudios posteriores sobre selección genómica y predicción de la herencia de variables de interés agronómico, como altura de planta, número de tallos y grados brix entre otros caracteres.

Por tanto, en la presente investigación, se analiza la respuesta de 45 clones de caña de azúcar procedente de cultivo de tejidos a la bacteria *X. albilineans*, así como determinar dentro de los clones genotipificados con la técnica de DArTseq si existen clones resistentes y susceptibles para determinar posteriormente el número de marcadores asociados a estas respuestas.

## **Materiales y Métodos**

### **Colecta del material vegetativo**

Se colectaron hojas de 45 clones de caña de azúcar establecidos en el Banco de Germoplasma de la Estación de Hibridación del CIDCA, ubicado en Tuxtla Chico, Chiapas (Figura 1).



**Figura 1.** Ubicación de la Estación de Hibridación del Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (CIDCA) A.C. en Tuxtla Chico, Chiapas.

### **Extracción de DNA**

La extracción de DNA se realizó con el método de Bromuro de Cetil trimetil amonio (CTAB)/cloroformo/alcohol isoamílico (Doyle y Doyle, 1990) con ligeras modificaciones. La concentración de DNA de cada una de las muestras se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA). Se consideró que el DNA es de buena calidad cuando las lecturas en ambas absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ , estuvieron en un rango entre 1.8 y 2.2.

### **Preparación de las matrices DArTseq**

El DNA se envió a la compañía Diversity Array Technology (DArTseq) ubicada en la Universidad de Canberra en Australia, quienes desarrollaron esta metodología para la genotipificación de poliploides. En el caso de caña de azúcar cuentan con una biblioteca de DNA compuesta con la información de más de 4608 clones.

### **Genotipificación**

Se implementó el método de genotipado de alto rendimiento que utiliza la tecnología DArTseq en Diversity Arrays Technology Pty Ltd (Canberra, Australia) que se basa en la reducción de la complejidad para enriquecer las representaciones genómicas con secuencias de copia única para su análisis en el equipo de nueva generación HiSeq2500 (Illumina, USA). DArTseq detecta tanto SNP como variantes de secuencia de presencia-ausencia, denominadas con el nombre de marcadores DArTseq (Raman et al., 2014). Esta metodología se adecuó para caña de azúcar seleccionando el

método de reducción de la complejidad más apropiado (enzimas de restricción *PstI-MseI*). Las muestras de DNA se procesaron en reacciones de digestión/ligación como lo describe Kilian et al. (2012), pero reemplazando un único adaptador compatible con *PstI* con dos adaptadores diferentes que corresponden a dos enzimas de restricción (RE) diferentes. El adaptador compatible con *PstI* fue diseñado para incluir la secuencia de unión de la celda de flujo (flow cell), la iniciación de secuencia y la región del código de barras de longitud variable y escalonada.

El adaptador inverso contenía la región de unión de la celda de flujo y la secuencia sobresaliente compatible con *MseI*. Solo los fragmentos mixtos (*PstI-MseI*) se amplificaron eficazmente con 30 ciclos de PCR usando las siguientes condiciones de reacción: 1 min a 94 °C para la desnaturalización inicial; 30 ciclos cada uno consistió en 20 s a 94 °C para la desnaturalización, 30 s a 58 °C para el alineamiento y 45 s a 72 °C para la extensión; y finalmente un paso de extensión final de 7 min a 72 °C. Después de la PCR, se agruparon cantidades equimolares de productos de amplificación de cada muestra de la placa de microtitulación de 96 pozos y la PCR de puente con el c-Bot (Illumina) seguida de secuenciación en el Illumina HiSeq2500. La secuencia (lectura única) se ejecutó durante 77 ciclos. Las secuencias generadas de cada carril se procesaron utilizando los marcadores patentados para DArTseq.

Los archivos de salida FASTq se procesaron para filtrar secuencias de baja calidad, aplicando criterios de selección más estrictos a la región del código de barras en comparación con el resto de la secuencia. Por lo tanto, las asignaciones de las secuencias a muestras específicas realizadas en el paso "división de código de barras" fueron más consistentes. Aproximadamente 52, 828 secuencias por código de barras/muestra se usaron como marcadores. Finalmente, las secuencias idénticas se colocaron en archivos 'fastqcall'. Estos archivos se usaron para DArT P/L's propiamente SNP y SilicoDArT (Presencia/ausencia de marcadores en representaciones genómicas) (presencia = 1 vs ausencia = 0) llamando algoritmos (DArTsoft14). La línea analítica procesó los datos de las secuencias (Barilli et al., 2018).

### **Análisis de los marcadores DArTseq**

La preparación de las representaciones genómicas individuales de los genotipos de caña de azúcar "Targets" (=objetivos) para la hibridación con las matrices DArTseq, se realizó con el análisis de los metadatos y polimorfismos SNP. Tanto el análisis de la imagen, la identificación del polimorfismo y el registro de datos, se realizaron con el programa DArTSoft desarrollado para este propósito por Diversity Arrays Technology Pty. Ltd. ([www.DiversityArrays.com/software.html](http://www.DiversityArrays.com/software.html)) como lo mencionó Wenzl et al. (2004) y Akbari et al. (2006).

### **Respuesta de 45 clones a la inoculación con *X. albilineans* cepa CPO-120**

Las inoculaciones se realizaron mediante inyección en la base del tallo con 0.5 mL de suspensión bacteriana con una concentración de  $10^7$  UFC por mililitro, determinada por densidad óptica de 600 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20 (Arthur H. Thomas Co., Filadelfia, PA, USA). Se inocularon 3 plantas por clon de caña de azúcar, y 2 plantas con agua destilada estéril como control negativo por tratamiento. Las plantas se mantuvieron en una cámara húmeda durante 7 días, y luego se colocaron en un invernadero con una temperatura promedio de 30 °C y humedad relativa del 75%, durante 50 días después de la inoculación (ddi). Este experimento se repitió dos veces.

**Cuadro 1.** Relación de clones provenientes de cultivo de tejidos inoculados con *Xanthomonas albilineans*.

Número	Nombre	Número	Nombre
0	CP 72-2086	23	EMex 03-165
1	CB 36-14	24	EMex 00-82
2	Co 467	25	CP 90-1371
3	ColMex 02-225	26	CP 09-2371
4	CP 75-1632	27	CP 86-1664
5	CYZ 82-154	28	CP 81-1425
6	EMex 01-323	29	CP 62-370
7	EMex 02-05	30	CP 82-1758
8	EMex 05-222	31	CPCL 02-6862
9	HOCP 93-746	32	C 88-380
10	ICA 76-7	33	CP 72-1312
11	ITV 94-1424	34	CP 09-1985
12	LTMex 93-354	35	CP 88-1179
13	Mex 57-473	36	CP 09- 1064
14	Mex 58-418	37	CP 09-1858
15	Mex 60-1459	38	CP 50-28
16	Mex 69-290	39	CP 09-2503
17	Mex 73-1278	40	HO 95-988
18	Mex 97-20	41	CP 09-2499
19	Mex SFC 95-46	42	CP 09-2405
20	MPR 338	43	CP 09-2365
21	PR 67-1070	44	B 7306
22	Q 135	45	CP 09-1291

## Resultados

### Extracción de DNA

Se obtuvo DNA de buena calidad acorde a los estándares de la empresa Diversity Arrays Technology (DArT) Pty. Ltd. en Australia.

### Caracterización genética

Se obtuvo información genética de la base de datos del CIDCA A.C. de caña de azúcar genotipificados por DArT, los marcadores generados son de tipo “presencia” (1) y “ausencia” (0) de un fragmento de restricción que contiene el marcador de interés. El número total de marcadores analizados fue de 52, 828 para cada variedad con un porcentaje bajo de marcadores que tuvieron valores faltantes por celda. Debido a que no se puede trabajar con las tasas de valores faltantes por marcador que son bastante bajas, se realizó una imputación basada en las frecuencias de los marcadores observados. Los marcadores con frecuencia del alelo menor inferiores a 0.05 se eliminaron.

Los genotipos faltantes se imputaron generando muestras aleatorias de la distribución marginal de los genotipos observados, es decir  $x_{ij} \sim \text{Bernoulli}(p^*_j)$ , donde  $p^*_j$  representa la frecuencia alélica calculada usando los genotipos no faltantes (Crossa-Iriarte et al., 2010).

Después de imputar y eliminar marcadores en base a MAF se obtuvo la matriz de relaciones genómicas  $G$ , que es la base para los estudios de las relaciones entre un individuo con los 93 clones, misma que puede ser utilizada para estudios de la diversidad de la población de interés o en predicción genómica a partir de los progenitores. La matriz puede calcularse fácilmente usando la expresión siguiente:

$$G = ZZ^T/p, \dots(1)$$

donde  $Z$  es la matriz de marcadores de dimensiones que se obtiene al centrar y estandarizar las columnas de la matriz de marcadores con 0's y 1's (López-Cruz et al., 2015).

### Respuesta de 45 clones a la inoculación de la cepa CPO-120 de *X. albilineans*

Se observaron y contabilizaron las finas líneas cloróticas o pencil lines por planta, se determinó la respuesta resistente o susceptible a la enfermedad de la escaldadura de la hoja. Los síntomas fueron reproducidos en 41 variedades, es decir, resultaron susceptibles a la enfermedad, mientras que 4 variedades no presentaron síntomas, es decir, fueron resistentes.



**Figura 2.** Respuesta de clones de caña de azúcar a la inoculación con la bacteria *Xanthomonas albilineans*, se observa la presencia de finas líneas cloróticas o ‘pencil lines’ sobre las hojas. Asimismo se muestra la escala de evaluación que va desde hoja sana, hasta 1, 2, 5 y 7 finas líneas por hoja.

**Cuadro 2.** Lista de clones de caña de azúcar inoculados con la bacteria *Xanthomonas albilineans* y su respuesta a la infección.

Número	Nombre	Respuesta	Número	Nombre	Respuesta
0	CP 72-2086	Resistente	23	EMex 03-165	Susceptible
1	CB 36-14	Susceptible	24	EMex 00-82	Susceptible
2	Co 467	Susceptible	25	CP 90-1371	Susceptible
3	ColMex 02-225	Susceptible	26	CP 09-2371	Susceptible
4	CP 75-1632	Susceptible	27	CP 86-1664	Susceptible
5	CYZ 82-154	Susceptible	28	CP 81-1425	Susceptible
6	EMex 01-323	Susceptible	29	CP 62-370	Susceptible
7	EMex 02-05	Susceptible	30	CP 82-1758	Susceptible
8	EMex 05-222	Susceptible	31	CPCL 02-6862	Susceptible
9	HOCP 93-746	Susceptible	32	C 88-380	Susceptible
10	ICA 76-7	Susceptible	33	CP 72-1312	Susceptible
11	ITV 94-1424	Susceptible	34	CP 09-1985	Susceptible
12	LTMex 93-354	Susceptible	35	CP 88-1179	Resistente
13	Mex 57-473	Susceptible	36	CP 09- 1064	Susceptible
14	Mex 58-418	Susceptible	37	CP 09-1858	Susceptible



15	Mex 60-1459	Susceptible	38	CP 50-28	Susceptible
16	Mex 69-290	Susceptible	39	CP 09-2503	Susceptible
17	Mex 73-1278	Resistente	40	HO 95-988	Susceptible
18	Mex 97-20	Resistente	41	CP 09-2499	Susceptible
19	Mex SFC 95-46	Susceptible	42	CP 09-2405	Susceptible
20	MPR 338	Susceptible	43	CP 09-2365	Susceptible
21	PR 67-1070	Susceptible	44	B 7306	Susceptible
22	Q 135	Susceptible	45	CP 09-1291	Susceptible

De las 45 variedades inoculadas con la bacteria *X. albilineans*, 4 presentaron resistencia: CP 72-2086, Mex 73-1278, Mex 97-20 y la CP 88-1179. El resto presentó síntomas de la enfermedad, confirmando su susceptibilidad. Estos resultados permitirán conocer los marcadores asociados a resistencia o susceptibilidad a la bacteria dentro de los 1,200 clones genotipificados por el CIDCA A.C. con la técnica de DArT.

**Cuadro 3.** Lista de variedades provenientes de cultivo de tejidos cuya respuesta a *Xanthomonas albilineans* fueron evaluadas y genotipificadas por DArTseq.

Número	Clones
1	CB 36-14
2	Co 467
3	ColMex 02-225
4	CP 72-2086 Resistente
5	CP 75-1632
6	CYZ 82-154
7	EMex 01-323
8	EMex 02-05
9	EMex 05-222
10	HOCP 93-746
11	ICA 76-7
12	ITV 94-1424
13	LTMex 93-354
14	Mex 57-473
15	Mex 58-418

16	Mex 60-1459
17	Mex 69-290 Susceptible

Mediante el uso de la plataforma DArTseq, ha sido posible determinar las distancias genéticas entre variedades de caña de azúcar que son utilizados como progenitores en los programas de mejoramiento genético. Esto significa que la hibridación podrá hacerse de manera dirigida y aprovechar la variabilidad genética existente entre los materiales genotipificados. La aplicación de esta tecnología representa una innovación para la obtención asertiva de genotipos con mejores características agronómicas, genéticas, sanitarias y agroindustriales que puedan ser evaluados en las diferentes regiones productoras del país.

Por otro lado, si bien el conocimiento de las distancias genéticas nos permite realizar la hibridación de una manera dirigida y específica para aprovechar la variabilidad genética existente por medio de estos marcadores, es importante mencionar que existe la herramienta de GWS (Genissel et al. 2018), la cual puede fortalecer los estudios de predicción de valores genéticos correspondiente a características de interés basándose en la información de estos marcadores de alta densidad (Meuwissen et al., 2001). La selección de líneas antes de estimar su rendimiento real en campo, mediante la eliminación de las múltiples rondas de selección fenotípica, contribuye a una mayor tasa de ganancia genética anual por unidad de tiempo y costo (Desta y Ortiz, 2014).

### Conclusión

Mediante el uso de la plataforma DArTseq para la genotipificación de los clones de caña de azúcar de la estación de Hibridación del CIDCA A.C., se determinó las distancias genéticas entre los genotipos de caña de azúcar. Estos marcadores también permiten asociar las respuestas de resistencia o susceptibilidad a la enfermedad de la escaldadura de la hoja de la caña de azúcar.

### Referencias

- Abberton, M.; Batley, J.; Bentley, A.; Bryant, J.; Cai, H.; Cockram, J.; Costa de Oliveira, A.; Cseke, L. J.; Dempewolf, H.; De Pace, C.; Edwards, D.; Gepts, P.; Greenland, A.; Hall, A. E.; Henry, R.; Hori, K.; Howe, G. T.; Hughes, S.; Humphreys, M.; Lightfoot, D.; Marshall, A.; Mayes, S.; Nguyen, H. T.; Ogonnaya, F. C.; Ortiz, R.; Paterson, A. H.; Tuberosa, R.; Valliyodan, B.; Varshney, R.; Yano, M. 2016. Global agricultural intensification during climate change: a role for genomics. *Plant Biotechnology Journal* 14:1095-1098 AGRI (European Commission of Agriculture and rural development) 2017. Sugar. [http://ec.europa.eu/agriculture/sugar/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/sugar/index_en.htm).
- Akbari, M.; Wenzl, P.; Caig, V.; Carling, J.; Xia, L.; Yang, S.; Uszynski, G.; Mohler, V.; Lehmsiek, A.; Kuchel, H.; Hayden, M.; Howes, N.; Sharp, P.; Vaughan, P.; Rathmell, B.; Huttner, E.; Kilian, A. 2006. Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput proWling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetic* 113:1409–1420.
- Barilli, E.; Cobos, M. J.; Carrillo, E.; Kilian, A.; Carling, J.; Rubiales; D. 2018. A high-density integrated DArTseq SNP-Based genetic map of *Pisum fulvum* and identification of QTLs controlling rust resistance. *Frontiers in Plant Science* 9:167.

- Crossa, J.; de los Campos, G.; Pérez-Rodríguez, P.; Gianola, D.; Burgueño, J.; Araus, J. L.; Makumbi, D.; Singh, R. P.; Dreisigacker, S.; Yan, J.; Arief, V.; Banziger, M.; Braun, H.-J. 2010. Prediction of genetic values of quantitative traits in plant breeding using pedigree and molecular markers. *Genetics* 186:713–724.
- Cruz, V. M. V.; Kilian, A.; Dierig, D. A. 2013. Development of DArT marker platforms and genetic diversity assessment of the U.S. collection of the new oilseed crop *Lesquerella* and related species. *PLoS ONE* 8(5):e64062.
- Desta, Z. A.; Ortiz, R. 2014. Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. *Trends in Plant Science* 19:592–601.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13–15.
- Edwards, D.; Batley, J.; Snowdon, R. J. 2013. Accessing complex crop genomes with next-generation sequencing. *Theoretical and Applied Genetics* 126:1–11.
- Genissel, A.; Confais, J.; Lebrun, M. H.; Gout, L. 2017. Association genetics in plant pathogens: minding the gap between the natural variation and the molecular function. *Frontiers in Plant Science* 8:1301. doi: 10.3389/fpls.2017.01301
- Grivet, L.; Arruda, P. 2001. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5:122–127.
- Kilian, A.; Wenzl, P.; Huttner, E.; Carling, J.; Xia, L.; Blois, H.; Caig, V.; Heller-Uszynska, K.; Jaccoud, D.; Hopper, C.; Aschenbrenner-Kilian, M.; Evers, M.; Cayla, C.; Hok, P.; Uszynski, G. 2012. Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. *Methods in Molecular Biology* 888:67–89.
- Meuwissen, T. H.; Hayes, B. J.; Goddard, M. E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819–1829.
- Premachandran, M. N.; Prathima, P. T.; Lekshmi, M. 2011. Sugarcane and polyploidy; a review. *Journal of Sugarcane Research* 1:1-15.
- Raman, H.; Raman, R.; Kilian, A.; Detering, F.; Carling, J.; Coombes, N.; Diffey, S.; Kadkol, G.; Edwards, D.; McCully, M.; Ruperao, P.; Parkin-Isobel, A. P.; Batley, J.; Lukett, D.; Wratten, N. 2014. Genome-wide delineation of natural variation for pod shatter resistance in *Brassica napus*. *PLoS ONE* 9:e101673.
- Ricaud, C.; Ryan, C. C. 1989. Leaf scald. Pp. 39–58. In: *Diseases of Sugarcane. Major Diseases.* (Eds.). Ricaud, C.; Egan, B. T.; Gillaspie, A. G. Jr.; Hughes, C. G. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
- Rott, P.; Davis, M. J. 2000. Leaf scald. Pp. 38-44. In: *A Guide to Sugarcane Diseases.* (Eds.). Rott, P.; Bailey, R. A.; Comstock, J. C.; Croft, B. J.; Saumtally, A. S. Montpellier: CIRAD-ISSCT. France.
- SAGARPA.1996. NORMA Oficial Mexicana NOM-016-FITO-1995; Establecimiento de la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de la caña de azúcar. Diario Oficial de la Federación. Citado el 5 de agosto de 2018 de: <https://normateca.sagarpa.gob.mx/sites/default/files/normateca/Documentos/SENASICA%20NORM%2060.pdf>
- Thirugnanasambandam, P. P.; Hoang, N. V.; Henry, R. J. 2018. The challenge of analyzing the sugarcane genome. *Frontiers in Plant Science* 9:616.
- Wenzl, P.; Carling, J.; Kudrna, D.; Jaccoud, D.; Huttner, E.; Kleinhofs, A.; Kilian, A. 2004. Diversity arrays technology (DArT) for whole genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 101:9915– 9920.

Wittenberg, A. H. J. 2007. Genetic mapping using the Diversity Arrays Technology (DArT) application and validation using the whole-genome sequences of *Arabidopsis thaliana* and the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. PhD thesis. Wageningen University.