

# INOCULACIÓN *IN VITRO* DE LA ROYA BLANCA (*Puccinia horiana* HENNINGS) EN CRISANTEMO (*Dendranthema grandiflora* TZVELEV)<sup>1</sup>

César Vences-Contreras<sup>2</sup>, Luis Miguel Vázquez-García<sup>2</sup>

## RESUMEN

**Inoculación *in vitro* de la roya blanca (*Puccinia horiana* Hennings) en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev).** El presente estudio tuvo como finalidad el desarrollar la técnica de inoculación *in vitro* de la roya blanca, con el objeto de ahorrar tiempo y espacio en la caracterización de los distintos cultivares de crisantemo respecto al grado de susceptibilidad o resistencia a este patógeno. En Tenancingo, Estado de México, en el periodo 2004-2005 se colectaron hojas de crisantemo que presentaban daños por la enfermedad, se desinfectaron para posteriormente inocular las pústulas sobre plantas creciendo bajo condiciones *in vitro*. El recipiente de cultivo se mantuvo a una humedad relativa alrededor del 95% y temperaturas entre los 13 y 27 °C, bajo condiciones de luz y oscuridad. Los daños por la enfermedad se manifestaron a los 20 días después de la inoculación. Los tratamientos a 17 °C y oscuridad generaron un mayor número de pústulas (18,7). El diámetro de las pústulas fluctuó entre los 0,71 mm (tratamientos con 17 °C y luz) a los 1,79 mm en los tratamientos con 19 °C y bajo oscuridad.

**Palabras clave:** *Puccinia horiana*, *Dendranthema grandiflora*, inoculación, infección, susceptibilidad a la roya blanca.

## ABSTRACT

**Inoculation *in vitro* of the white rust (*Puccinia horiana* Hennings) in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev).** Inoculation *in vitro* of the white rust was carried out to save space and time in the characterization of several chrysanthemum cultivars regarding the degree of susceptibility or resistance to this pathogen. In Tenancingo, México, in 2004-2005, leaves of chrysanthemum that presented lesions due to this disease were collected and disinfected to inoculate the pustules on plants growing *in vitro*. The cultures were maintained at about 95% relative humidity and temperatures of 13-27 °C, under light and dark conditions. Damages by the disease were observed 20 days after the inoculation. The treatments at 17°C and dark conditions produced a larger number of pustules (18.7). The diameter of pustules fluctuated between 0.71 mm in the treatments with 17 °C and light, and 1.79 mm in the treatments with 19 °C and dark conditions.

**Key words:** *Puccinia horiana*, *Dendranthema grandiflora*, inoculation, infection, white rust susceptibility.



## INTRODUCCIÓN

El interés económico que ha alcanzado la flor de corte en el mundo la ha convertido en un negocio

competitivo. México basa su potencial florícola en las ventajas climáticas y su cercanía a los Estados Unidos, segundo consumidor mundial de flor (Orozco y Mendoza 2003).

<sup>1</sup> Recibido: 13 de diciembre, 2006. Aceptado: 31 de enero, 2008. Tesis doctoral.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México, C.P. 50000. Toluca, México. Correspondencia: cvc@uaemex.mx; lmv@uaemex.mx.

El cultivo de flores en México ocupa una superficie inferior a 0,5%, sin embargo su participación en el valor agrícola nacional ha aumentado, exportando el 10% al 15% de su producción (con ventas estimadas en 40 millones de dólares anuales) y el resto destinándolo al mercado interno (INEGI 2007). El Estado de México sobresale como uno de los principales productores de flor de corte: cuenta con una superficie sembrada de 4.945 ha; la delegación regional de Coatepec Harinas, integrada por los municipios de Villa Guerrero, Tenancingo, Zumpahuacán, Malinalco e Ixtapan de la Sal, es la que concentra el 82% de la superficie total de la entidad productora de flor y ornamentales (Orozco y Mendoza 2003).

Una de las especies en la que se evidencia el creciente desarrollo del sector florícola en México en los últimos años, es el crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.), del que se han introducido un gran número de variedades con características muy diversas, tanto en calidad, tamaño, color y época de cosecha, como en el grado de susceptibilidad y resistencia a enfermedades.

Desde 1993, ha mermado la productividad en cultivos de crisantemo de la zona debido a la enfermedad denominada roya blanca, cuyo agente causal es *Puccinia horiana* Hennings, reportándose pérdidas hasta del 100% de las cosechas, la afectación de 150 hectáreas y pérdidas por 5 millones de pesos en ese año. La gravedad que ya se padecía hizo que en julio de 1993 se publicara en el Diario Oficial de la Federación un plan de prevención y/o control de esta enfermedad (Norma Oficial Mexicana NOM-EM-021-FITO-1994, 1994).

Desde la aparición de la roya blanca a nivel internacional, se han establecido medidas de protección (control legal) que impiden el comercio de material enfermo o con sospecha de estarlo, obligando a sustituir cultivos de gran valor por otros de escasa importancia, a cambiar variedades comercialmente superiores por otras inferiores, trayendo como consecuencia cuantiosas pérdidas económicas a productores y distribuidores.

Aunque De Jong y Rademaker (1986) sugirieron que la resistencia del crisantemo a esta enfermedad está generalmente controlada por un solo gen dominante, solo unos cuantos cultivares muestran resistencia

a esta enfermedad (Yamaguchi 1981). No existen muchos estudios sobre la reacción de *P. horiana* en las distintas variedades de crisantemo cultivadas en México. Puesto que la roya es un parásito obligado, las telias necesitan ser mantenidas sobre las plantas como inóculo en las pruebas de caracterización. Las pruebas de campo requieren considerable superficie de terreno y tiempo para completar las evaluaciones (Takatsu *et al.* 2000), y no se reportan procedimientos de inoculación bajo condiciones *in vitro* que permitan continuar caracterizando los materiales que se cultivan comercialmente, y de las posibles de introducirse, a fin de que se puedan seleccionar los mejores para su pronta adopción por el productor y/o como progenitores base para programas de mejoramiento genético que generen variedades resistentes a este patógeno, acordes a las condiciones de las zonas productoras.

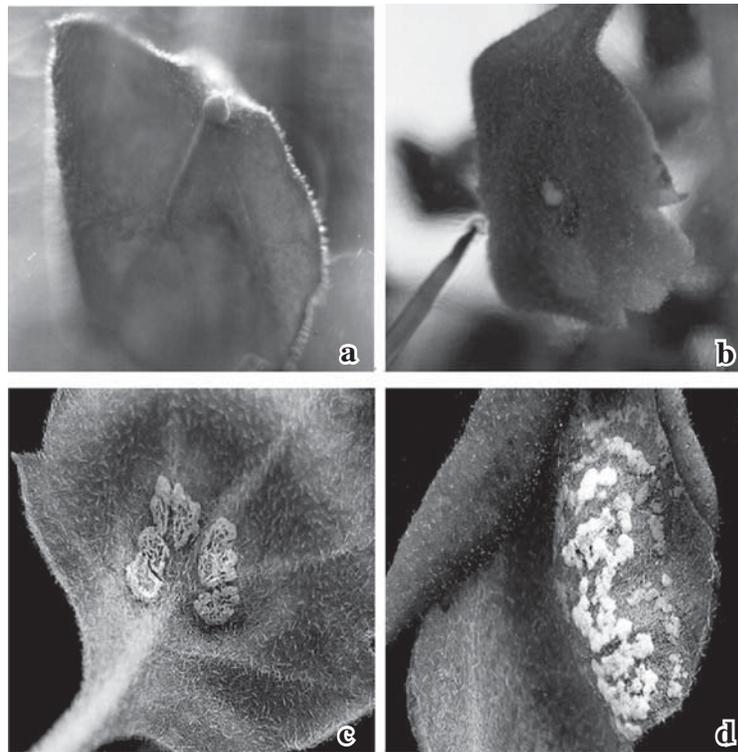
El objetivo de este trabajo fue el desarrollar la técnica de inoculación *in vitro* de la roya blanca en crisantemo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en Toluca, México en el periodo 2004-2005. Trabajos previos que comprendieron la utilización de pústulas en diferentes etapas de desarrollo como inóculo y su exposición a soluciones desinfectantes por distintos periodos de tiempo, permitieron establecer la metodología empleada en este trabajo.

Se colectaron de la zona florícola de Tenancingo, Estado de México, hojas de crisantemo variedad Polaris White, con daños por la enfermedad del 60 al 80% en el área foliar, se lavaron con una solución de detergente líquido, se sumergieron en etanol (70%) durante 30 segundos, en hipoclorito de sodio (1,5%) por cinco minutos y fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril dentro de la cámara de flujo laminar.

Con un bisturí, y bajo condiciones de asepsia dentro de una cámara de flujo laminar, se rasparon pústulas semi maduras (no eclosionadas) y se colocaron sobre la superficie foliar de las plántulas de Polaris White desarrolladas *in vitro* (Figura 1a) sobre



**Figura 1.** Inoculación y síntomas de la roya blanca (*Puccinia horiana*) en crisantemo. a) Inoculación *in vitro* de pústulas semi maduras de *Puccinia horiana*; b) manchas color verde claro a amarillento de los primeros síntomas de la roya blanca; c y d) formación de pústulas de *Puccinia horiana*. Toluca, México 2005.

medio MS (Murashige y Skoog 1962) con 1,5 mg/l de kinetina, 0,01 mg/l de ácido naftalen acético; 30 g/l de sacarosa, pH=5,6 y 6,5 g/l de agar.

Ensayos previos de inoculación mostraron que colocando los cultivos a una temperatura de 25 °C -condiciones óptimas para el desarrollo *in vitro* del crisantemo- solo inducen el desarrollo de micelio, pero no la infección por el hongo. La no existencia de reportes de desarrollo de la enfermedad bajo condiciones *in vitro*, nos llevó a considerar un amplio rango de temperaturas que cubrieran aquellas en las que se desarrolla el patógeno bajo condiciones de campo.

Se evaluaron ocho rangos de temperatura, entre los 13 y los 27° C en intervalos de 2° C (Cuadro 1). Ocho de los 16 tratamientos se colocaron bajo condiciones de oscuridad por un periodo de 24 horas después de la

inoculación para promover la esporulación e infección por basidiosporas (Leyva *et al.* 2001); los restantes con un fotoperiodo de 16 horas luz y 2 000 lux de intensidad lumínica en forma permanente. Una vez concluido el periodo de 24 horas de oscuridad a la que se sometieron los primeros ocho tratamientos, se colocaron bajo las mismas condiciones de luz que el resto. El interior del recipiente de cultivo mantuvo una humedad relativa alrededor del 95% para favorecer la germinación de teliosporas y basidiosporas (Firman y Martín 1968).

Se evaluó la presencia o no de micelio, daños por la enfermedad, número y diámetro de pústulas. Los datos se analizaron a través del análisis de varianza basado en un diseño experimental completamente al azar y se utilizó el procedimiento de Tukey para la comparación de medias de los tratamientos, empleándose un nivel de significancia  $p \leq 0,05$ .

**Cuadro 1.** Influencia de la temperatura y la luz sobre la formación de pústulas en la inoculación *in vitro* de *P. horiana*. Toluca, México 2005.

Tratamiento *	Temp. (° C)	Luz/Osc	Desarrollo micelial	Número de pústulas	Diámetro de pústulas (mm)
I	13	osc	0	0	0
II	13	luz	0	0	0
III	15	osc	0	0	0
IV	15	luz	0	0	0
V	17	osc	0	18,7	0,88
VI	17	luz	0	5,6	0,71
VII	19	osc	0	5,4	1,79
VIII	19	luz	0	10,98	1,12
IX	21	osc	1	0	0
X	21	luz	1	0	0
XI	23	osc	1	0	0
XII	23	luz	1	0	0
XIII	25	osc	1	0	0
XIV	25	luz	1	0	0
XV	27	osc	1	0	0
XVI	27	luz	1	0	0

\* 0 ausencia; 1 presencia (para la variable desarrollo micelial)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas de la roya blanca se manifestaron a los 20 días después de la inoculación. Manchas color verde claro a amarillento aparecieron en el haz de la hoja, en el envés se formaron pústulas color banco-amarillento que posteriormente se tornaron de un color rosado (Figura 1a). Bishop y Trolinger (1993), Norman *et al.* (1995), Strider (1995) reportan los mismos síntomas bajo condiciones de campo.

Los tratamientos sometidos a temperaturas de los 13°C - 15°C no manifestaron síntomas por la enfermedad (Cuadro 1), sin embargo, el borde de las hojas mostraron una ligera necrosis como daño aparente por temperatura.

Las hojas de los tratamientos a 17°C generaron 5,6 pústulas en presencia de luz y 18,7 pústulas cuando se mantuvieron en oscuridad por 24 horas después de la inoculación. Los tratamientos a 19 °C presentaron

10,98 pústulas en presencia de luz y 5,4 pústulas en oscuridad (Figura 1 c,d). El diámetro de las pústulas fluctuó entre los 0,71 mm (tratamiento con 17°C y luz) a los 1,79 mm en los tratamientos con 19°C y oscuridad (Cuadro 1), coincidiendo con Firman y Martin (1968) quienes reportan temperaturas óptimas de 17°C y la OEPP/EPPO, 2004, entre los 17 °C y 21 °C bajo condiciones de campo para la germinación de teliosporas y basidiosporas del patógeno.

Los tratamientos entre los 21 - 27°C presentaron solo desarrollo de micelio sin infección, independientemente de la presencia o no de luz (Cuadro 1). Estos datos no coinciden con los reportados por Takatsu *et al.* (2000), quien describe temperaturas de 20-25 °C como apropiadas para la germinación de teliosporas y basidiosporas del patógeno.

El efecto de la luz sobre la germinación de las teliosporas fue poco significativo, como sugieren los estudios realizados por Yamada (1956). El tiempo requerido para este proceso, fue de 20 días después de la inoculación del patógeno, en contraposición al requerido en las evaluaciones en campo como los trabajos realizados en México por Norman *et al.* (1995), Sandoval *et al.* 1997 y Vázquez *et al.* 2000, que al realizar evaluaciones comparativas de resistencia de distintas variedades de crisantemo a la roya blanca, emplearon periodos de cuatro meses. La técnica de cultivo *in vitro* permite, además de un ahorro en espacio y tiempo, el reproducir las respuestas de campo en plantas de crisantemo para evaluar su susceptibilidad a la roya blanca.

Los análisis de varianza para un diseño completamente al azar y la comparación de medias por el método de Tuckey detectaron diferencias altamente significativas y como mejor tratamiento el de 17 °C y oscuridad, para la variable número de pústulas y al de 19 °C en presencia de luz para la variable diámetro de pústulas (Cuadro 1).

Este procedimiento desarrollado en Polaris White se implementó a otras 16 variedades de crisantemo con buenos resultados, logrando de esta manera la caracterización de los mismos respecto al grado de susceptibilidad a la roya blanca.

## LITERATURA CITADA

- Bishop, AL; Trolinger, J. 1993. Chrysanthemum white rust (*Puccinia horiana*). Yoder Brothers, Inc. Ala, Fl. U.S.A. 4 p.
- Jong, J. de; Rademaker, W. 1986. The reaction of chrysanthemum cultivars to *Puccinia horiana* and the inheritance of resistance. *Euphytica* 35: 945-952.
- Firman, ID; Martin, PH. 1968. White rust of chrysanthemums. *Annals of Applied Biology*. 62: 429-442.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) 2007. Anuario Estadístico de Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2006. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Edición 2007. 637 p.
- Leyva, MSG; Lora, TI; Cárdenas, SE; Valdovinos, PG. 2001. Pathogenesis of white rust *Puccinia horiana* Henn. on a Chrysanthemum [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Hennis. Susceptible variety]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(2): 191-196.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15: 473-497.
- Norma Oficial Mexicana NOM-EM-021-FITO-1994. 1994. Por la que se establece con carácter obligatorio la campaña de prevención y acción contra la enfermedad denominada Roya Blanca del Crisantemo. 12 p.
- Norman, MT; García, FA; Sandoval, RFT; Vázquez, GLM; Aquino, MJ; Corona, RMC; Pedral, M.E. 1995. Comparative evaluation of the resistance of 18 chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Anderson) varieties to white rust (*Puccinia horiana* Henn.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 1(3): 113-18.
- OEPP/EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. *Puccinia horiana*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Bulletin* 34: 209-211.
- Orozco, HME; Mendoza, MM. 2003. Competitividad local de la agricultura ornamental en México. *Ciencia Ergo Sum*. 10(1): 29-42.
- Sandoval, RFR; Norman, MT; Corona, RMC; Aquino, MJ; Vázquez, GLM; García, FA. 1997. Determination of damage level caused by *Puccinia horiana* Henn. on 15 chrysanthemum cultivars (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) grown in México. *Fitopatología* 32(3): 160-165.
- Strider, DL. 1995. La roya blanca del crisantemo. Una revisión. *Rev. Chapingo, Serie: Horticultura* 1 (3): 109-112.
- Takatsu, Y; Ohishi, K; Tomita, Y; Hayashi, M; Nakajima, M; Akutsu, K. 2000. Use of chrysanthemum plantlets grown in vitro to test cultivar susceptibility to white rust, *Puccinia horiana* P. Hennings. *Plan Breeding*. 119: 528-530.
- Vázquez, G.L.M; Gloria E.L; Pérez M.L; 2000. Antifungal compound in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.). *Fitopatología* 35(1): 50-58.
- Yamada, S. 1956. Experiments on the epidemiology and control of chrysanthemum white rust, caused by *Puccinia horiana* P. Henn. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 20: 148-154.
- Yamaguchi, T. 1981. Chrysanthemum breeding for resistance to white rust (*Puccinia horiana*). *Japanese journal of breeding* 31(2): 121-132.