

## VARIACIÓN PATOGENICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Puccinia horiana* Henn.

### PATHOGENIC AND MOLECULAR VARIABILITY OF *Puccinia horiana* Henn. ISOLATES

Rómulo García Velasco<sup>5</sup>, Emma Zavaleta- Mejía<sup>1\*</sup>, Reyna Isabel Rojas Martínez<sup>1</sup>,  
Santos Gerardo Leyva Mir<sup>2</sup>, Guillermo Fuentes Dávila<sup>3</sup> y June Simpson<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carr. México- Texcoco 56230, Montecillo, Edo de México.

<sup>2</sup>Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carr. México- Texcoco. 56230, Chapingo, Edo. de México <sup>3</sup>Campo Experimental Valle del Yaqui, CIRNO, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Norman E. Borlaug, Apdo. Postal 515. Km 12 entre 800 y 900, Valle del Yaqui. 85000, Cd. Obregón, Sonora <sup>4</sup>Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional-Unidad Irapuato. Apdo. Postal 629. Km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León. 36500, Irapuato, Guanajuato, México.

<sup>5</sup>Dirección actual: Centro Universitario Tenancingo, Universidad Autónoma del Estado de México. Km. 1.5 Carr. Tenancingo-Villaguerrero, Ex-Hacienda de Santa Ana Tenancingo, 52400.

\* Autor para correspondencia (zavaleta@colpos.mx)

#### RESUMEN

Se estudió la variación patogénica y molecular de 16 aislamientos de *Puccinia horiana* colectados en los Estados de México, Morelos y Puebla. Con los aislamientos se inocularon cinco variedades de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzveler.) ('Indianápolis', 'Harman', 'Eleonora', 'Vikyngo' y 'Marble'). Los aislamientos del Estado de México fueron más virulentos que los de Morelos y Puebla, cuyo periodo de incubación en 'Indianápolis' fue de 15 d en promedio, mientras que los aislamientos de Morelos y Puebla requirieron 3 y 4 d más. Para los aislamientos del Edo. de México la máxima incidencia en 'Indianápolis' se registró 4 d después de aparecer los primeros síntomas, mientras que los provenientes de Morelos y Puebla requirieron 5 y 6 d más. Del grupo del Edo. de México se capturaron 539 a 977 basidiosporas en 0.25 cm<sup>2</sup>, mientras que del grupo de Morelos y Puebla se atraparon 76 y 42 basidiosporas. En los aislamientos del Edo. de México la severidad varió de 23 a 36 %, mientras que en los provenientes de Morelos y Puebla fue de 5.7 a 8.5 % y de 4.2 a 7.3 %. Con los análisis de polimorfismo del ADN mediante RAPD, MP-PCR y RAMP, se identificaron tres grandes grupos (*a*, *b* y *c*) que correspondieron exactamente con el origen geográfico de los aislamientos.

**Palabras clave:** *Dendranthema grandiflora*, virulencia, polimorfismo.

#### SUMMARY

The pathogenic and molecular variability of 16 isolates of *Puccinia horiana* collected from the States of México, Morelos and Puebla were studied. Five chrysanthemum *Dendranthema grandiflora* Tzveler cultivars ('Indianápolis', 'Harman', 'Eleonora', 'Vikyngo' y 'Marble') were inoculated with the isolates. The isolates from the State of México were the most virulent as compared to those collected from Morelos and Puebla, since the incubation period in 'Indianápolis' took around 15 d whereas the isolates from Morelos and Puebla required 3 and 4 more d. For the isolates from the State of México the maximum incidence in 'Indianápolis' was reached only 4 d after the first symptoms appeared, whereas those from Morelos and Puebla needed 5 and 6 more d. Of the isolates coming from the State of México, 539 to 977

basidiospores were trapped in 0.25 cm<sup>2</sup>; in contrast, for those from Morelos and Puebla only 76 and 42 basidiospores were trapped. In the isolates from the State of México the severity fluctuated from 23 to 36 %, whereas in those coming from Morelos and Puebla varied from 5.7 to 8.5 % and from 4.2 to 7.3 %. Through the DNA polymorphism analyses with RAPD, MP-PCR and RAMP, three groups were identified (*a*, *b* y *c*) which corresponded exactly to the geographical origin of the isolates.

**Index words:** *Dendranthema grandiflora*, virulence, polymorphism.

#### INTRODUCCIÓN

La roya blanca causada por *Puccinia horiana* Henn. afecta de manera importante la producción del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzveler.), tanto para maceta como para flor de corte, debido a que en México no se cuenta con suficientes variedades resistentes a esta enfermedad. El establecimiento y desarrollo del patógeno es favorecido por temperaturas entre 17 y 24 °C y humedad relativa superior a 96 %; en estas condiciones la germinación de esporas y penetración en los tejidos del hospedante ocurre en 4 ó 5 h, y la manifestación de los primeros síntomas se puede observar a los 7 d en cultivares susceptibles (Firman y Martin, 1968).

Sin embargo, la temperatura para la germinación de las teliosporas y basidiosporas de *P. horiana* varía entre poblaciones; por ejemplo, en el Reino Unido ocurre entre 4 y 23 °C, mientras que en Japón el rango es de 6 a 36 °C. Aún así, no está bien definido si tales diferencias pueden estar relacionadas con propiedades particulares de diferentes razas (Whipps, 1993). En Alemania, Krebs (1985) reportó la

presencia de las razas 83 y 84 de *P. horiana* que difieren en su capacidad de infectar a un cultivar específico o a grupos de cultivares.

En cuanto al ciclo biológico del hongo, *P. horiana* difiere del resto de royas en que es microcíclica autoica; durante su reproducción sexual no lleva a cabo la plasmogamia (unión entre micelio + y -) y sólo ocurre cariogamia (fusión nuclear) en las teliosporas, seguida inmediatamente por la meiosis que da origen a cuatro núcleos haploides que se distribuyen en dos basidiosporas; por tanto, cada basidiospora tiene dos núcleos y al germinar origina un micelio dicariótico que contiene dos núcleos hermanos (Hirasuka y Sato 1982; Alexopoulos y Mims, 1985). Dado que *P. horiana* es una roya que se autofertiliza todas sus basidiosporas son genéticamente uniformes, a menos que ocurra una mutación o que haya un intercambio de núcleos de micelios genéticamente diferentes, mediante la anastomosis (fusión de hifas) (Anikster y Wahl, 1979; Redemaker y de Jong, 1987); a través de estos mecanismos se pueden generar nuevas razas en este tipo de royas (Anikster y Wahl, 1979).

En general, la tasa de mutación en poblaciones naturales de hongos es de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$ , que incluyen individuos virulentos y avirulentos (Skylakakis, 1987). La variación genética del patógeno puede reflejarse en diferencias en capacidad patogénica (Zhan *et al.*, 1998; Lannou, 2001). Es posible evidenciar tal diversidad mediante marcadores moleculares, como polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado al azar (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphisms, AFLP) y polimorfismos en secuencias repetidas con mini o microsatélites (RAMP), que detectan polimorfismo en tamaños de fragmentos a nivel de individuo o de población. La combinación de estos métodos permite obtener información más precisa de la variación genética y estructura de las poblaciones de fitopatógenos (Kolmer *et al.*, 1995).

México es un país productor de crisantemo cuyas principales zonas productoras para corte y maceta se ubican en los Estados de Morelos, Puebla y México, zonas que difieren en clima, cultivares comerciales y en manejo del cultivo, variabilidad que puede contribuir a la generación de diversidad genética del patógeno. Con base en lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la variación patogénica y molecular de 16 aislamientos de *P. horiana* procedentes de los estados mencionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta de aislamientos, incremento de inóculo y determinación de la virulencia de los aislamientos monopustulares de *P. horiana* en crisantemo var. ‘Indianápolis’.** Se colectaron 16 aislamientos de *P. horiana* de planta-

ciones comerciales y viveros de crisantemo infectadas con roya blanca en los Estados de Morelos, Puebla y México. De cada estado se seleccionaron sitios representativos; en el Estado de México se consideraron dos regiones: la Occidente (Occ), con las localidades de La Lagunilla (Lag-Occ), Zumpango (Zum-Occ) y Sta. Ana (SA-Occ) pertenecientes al municipio de Tenancingo, Sta. María Aranzazú (Ara-Occ) del municipio de Villa Guerrero, Porfirio Díaz (PD-Occ) y Coatepec Harinas (CH-Occ) del municipio de Coatepec Harinas; y la región Oriente (Ori) con San Miguel Tlaixpan (SMT-Ori), San Pablo Izayoc (SPI-Ori), Sta. María Nativitas (SMN-Ori), Tequexquinahuac (Teq-Ori), San Diego (SD-Ori) y Boyeros (Boy-Ori), todos pertenecientes al municipio de Texcoco. En el Estado de Morelos se colectó en las localidades de Tepetzingo (Tep-Mor), Temixco (Tem-Mor) y Jiutepec (Jiu-Mor) del municipio de Cuernavaca. En el Estado de Puebla se obtuvo el material del municipio de Atlixco (Atl-Pue). En el Cuadro 1 se muestran algunas características climatológicas de las localidades.

De cada localidad se tomaron pústulas de color miel a café y se colocaron individualmente en tubos tipo eppendorf etiquetados, que se mantuvieron a baja temperatura durante el transporte al laboratorio, en donde se seleccionó una pústula de cada localidad. Las teliosporas se obtuvieron mediante el raspado con un portaobjetos, luego se suspendieron en 50 mL de agua destilada estéril con una gota de Tween 20® para una mejor dispersión del inóculo. La suspensión se asperjó a punto de goteo sobre el haz y envés de las hojas en 10 plantas de crisantemo var. ‘Indianápolis’ susceptible a la roya, con el fin de incrementar el inóculo monopustular.

Las plantas inoculadas se incubaron durante 48 h en una cámara de polietileno a 100 % de humedad relativa (HR) y temperatura de 12 a 14 °C. Luego se transfirieron a un invernadero cuya temperatura varió entre 14 y 28 °C y con HR de 80 %. A los 13 d de la inoculación las plantas se sometieron nuevamente a una HR de 100 % durante 24 h (Leyva-Mir *et al.*, 2001). Cada grupo de plantas inoculadas con diferente aislamiento se mantuvo separado en compartimientos de polietileno, para evitar la mezcla de aislamientos.

En esta primera etapa se registró el inóculo inicial que se obtuvo de la pústula colectada (teliosporas mL<sup>-1</sup>), la incidencia final de plantas con pústulas, y las variables: periodo de incubación (días posteriores a la inoculación “dpi”), número de pústulas incipientes (manchas cloróticas en el envés de la hoja) al inicio de la infección y número de pústulas desarrolladas en toda la planta a los 50 d posteriores a la inoculación. Estas tres últimas variables constituyeron los criterios de comparación de virulencia entre aislamientos, donde la virulencia se consideró como una medida relativa de la patogenicidad y del grado de daño, de acuerdo con Agrios (2005) y Shaner *et al.* (1992), respectivamente.

**Cuadro 1. Ubicación geográfica, temperatura media en °C y precipitación anual en mm de los sitios de colecta de *Puccinia horiana*. Tomado de Enriqueta García (1998).**

| Región                               | Altitud (m) | Ubicación geográfica (LN y LO) | Temperatura (°C) | Precipitación (mm) |
|--------------------------------------|-------------|--------------------------------|------------------|--------------------|
| <b>Edo. de Méx. región Oriente</b>   |             |                                |                  |                    |
| Tenancingo                           | 1842        | 18° 58'<br>99° 36'             | 17.2             | 1253.9             |
| Coatepec de Harinas                  | 2240        | 18° 55'<br>99° 36'             | 16.2             | 1132.3             |
| <b>Edo. de Méx. región Occidente</b> |             |                                |                  |                    |
| Chapingo                             | 2250        | 19° 29'<br>98° 53'             | 15.2             | 636.5              |
| Texcoco                              | 2353        | 19° 31'<br>98° 53'             | 15.9             | 691.5              |
| Sn. Miguel Tlaixpan                  | 2200        | 19° 32'<br>98° 49'             | 14.7             | 621.0              |
| Sta. María Nativitas                 | 2750        | 19° 35'<br>99° 37'             | 13.5             | 997.2              |
| <b>Edo. de Morelos</b>               |             |                                |                  |                    |
| Temixco                              | 1280        | 18° 51'<br>99° 14'             | 22.9             | 910.7              |
| Cuernavaca                           | 1529        | 18° 55'<br>99° 14'             | 20.7             | 1146.6             |
| <b>Edo. de Puebla</b>                |             |                                |                  |                    |
| Atlixco (Izúcar de Matamoros)        | 1285        | 18° 36'<br>98° 27'             | 22.2             | 856.7              |

**Comparación de la virulencia de los aislamientos de *P. horiana*.** Esquejes de cinco variedades de crisantemo con diferentes grados de susceptibilidad a *P. horiana*: 'Indianápolis', 'Harman', 'Eleonora', 'Vikyngo' y 'Marble', se plantaron en vasos de unicel de 250 mL que contenían sustrato Finnpeat®, y se mantuvieron en invernadero a 17-24 °C y HR mayor a 96 % (Leyva-Mir *et al.*, 2001). Para suprimir el desarrollo de roya que podría venir como contaminante del esqueje, a los 5 d después del trasplante se hizo una aplicación de Azoxystrobin® a dosis de 0.5 g L<sup>-1</sup>, que es un fungicida sistémico con propiedades preventivas y curativas (Wojdyla, 1999). A los 25 d después de la aplicación del fungicida, las plantas se inocularon con *P. horiana*.

**Ensayo 1.** De plantas de la var. 'Indianápolis', que en la primera etapa fueron inoculadas con los aislamientos monopustulares, se obtuvieron pústulas de color miel a café y mediante raspado se desprendieron y se suspendieron en 200 mL de agua destilada estéril, se agregaron 2 gotas de Tween 20® y se licuó para dispersar las teliosporas. Se cuantificó el número de teliosporas con un hemacitómetro y se preparó una suspensión de 10<sup>6</sup> teliosporas por mL. Cada uno de los 16 aislamientos se inoculó en un grupo de 25 plantas, cinco de cada variedad, mediante asperjado de hojas por el haz y envés hasta punto de goteo. Cada grupo se mantuvo separado como se indicó anteriormente. Las condiciones de temperatura y humedad y el manejo de las plantas, fueron similares a las descritas en la primera etapa.

Se registró el número de pústulas incipientes por planta y el periodo de incubación, esto es el número de días posteriores (dpi) a la inoculación en que aparecieron los primeros

síntomas. También se estimó el número de basidiosporas liberadas por cada aislamiento a los 20, 30 y 40 dpi; para esto se colocaron a la altura de la base del tallo cinco portaobjetos cubiertos por un lado con pegamento Bio-Tac® (ECOGEN, Inc) y se expusieron por 24 h, al cabo de las cuales se contabilizó el número de basidiosporas atrapadas en tres segmentos de 0.25 cm<sup>2</sup> (dos laterales y el centro) de cada portaobjetos, y se calculó el promedio por portaobjeto. Se registró el número de plantas con síntomas (incidencia) y se evaluó el grado de daño (severidad); para esto último se tomó solamente la hoja más dañada de cada planta inoculada con cada uno de los 16 aislamientos, la cual se digitalizó y con los programas computacionales Adobe Photoshop 6.0 y UTHSCSA ImageTool (Wilcox *et al.*, 2002) se obtuvo el porcentaje de área foliar dañada por *P. horiana*.

**Ensayo 2.** Se estableció y evaluó de igual manera que el Ensayo 1, excepto que sólo se inocularon las vars. 'Vikyngo' (susceptible) y 'Marble' (resistente).

**Análisis estadístico.** Los resultados se analizaron conforme a un diseño completamente al azar. A menos que se indique de otra manera, los datos se sometieron a análisis de varianza y a comparación de tratamientos mediante la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), con el paquete estadístico SAS® (SAS Institute, 1999).

**Extracción y amplificación de ADN de los aislamientos de *P. horiana*.** Se colectaron pústulas de *P. horiana* de las plantas de la var. 'Indianápolis', la cual se utilizó para incrementar el inóculo de cada aislamiento, se eliminó la mayor cantidad posible de tejido vegetal y las pústulas se

colocaron en tubos de plástico de 1.5 mL para su liofilización. Dado que *P. horiana* es un parásito obligado que no se puede cultivar *in vitro*, se utilizó tejido foliar sano de crisantemo como referencia para discriminar entre las bandas correspondientes al hongo y las del hospedante.

La extracción del ADN de los aislamientos de *P. horiana* y de la planta de crisantemo se realizó mediante el método de CTAB 3 % descrito por Ahrens y Seemüller (1992). Se tomó 0.03 g de tejido liofilizado y se molió en morteros con nitrógeno líquido. El polvo se pasó a tubos de plástico de 1.5 mL estériles que contenían 200 µL de CTAB (Tris-HCl 100 mM pH 8.0; Na<sub>2</sub>EDTA 2H<sub>2</sub>O 20 mM; CTAB 3 %; NaCl 1.4M; β-mercaptoetanol 0.2 %) y que fueron previamente calentados a 60 °C, se agitó vigorosamente y se adicionaron y mezclaron 600 µL más, se incubó a 60 °C por 1 h con agitación ocasional. Una vez transcurrido ese tiempo, se adicionaron 600 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se mezcló. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 8 min; se tomó la fase acuosa, se colocó en tubos estériles de plástico de 1.5 mL y se adicionó 600 µL de isopropanol frío; se mezcló suavemente por inversión siete veces, y enseguida se incubó a -20 °C por 1 h para precipitar el ADN. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 14 000 rpm durante 8 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente; posteriormente se disolvió en 50 µL de agua destilada estéril.

El estado físico del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %, y se visualizó en un transiluminador marca Bio-Rad® modelo Gel-Doc 2000. El ADN obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro Perkin Elmer® modelo Lambda Bio 10 y se diluyó en agua desionizada estéril hasta obtener una concentración de 20 ng µL<sup>-1</sup>.

La reacción de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) se llevó a cabo con cuatro iniciadores decámeros de secuencias aleatorias (Operon Technologies Inc.; Alameda, CA, EE. UU.). Los iniciadores fueron: OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3'), OPA-08 (5'-GTGACGTAGG-3'), OPA-13 (5'-CAGCACCCAC-3') y OPA-19 (5'-CAAACGTCGG-3'). Para la técnica de microsatélites (MP-PCR) se utilizaron los iniciadores (GATA)<sub>4</sub> y (GACA)<sub>4</sub>, y para la técnica RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphic) se utilizaron los iniciadores decámeros más los iniciadores de los microsatélites, y quedaron las siguientes combinaciones: OPA-05 + (GATA)<sub>4</sub>, OPA-08 + (GATA)<sub>4</sub>, OPA-13 + (GATA)<sub>4</sub>, OPA-19 + (GATA)<sub>4</sub>; OPA-05 + (GACA)<sub>4</sub>, OPA-08 + (GACA)<sub>4</sub>, OPA-13 + (GACA)<sub>4</sub>, OPA-19 + (GACA)<sub>4</sub>. Las concentraciones finales y reactivos para preparar las mezclas de reacción se muestran en el Cuadro 2.

Se mezclaron todos los reactivos en el orden y concentración indicada, y al final se agregó el ADN, de manera que el volumen final de la reacción fue de 25 µL; para evitar la

evaporación a cada tubo se le adicionó 2 µL de aceite mineral estéril. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer® (CETUR, Norwalk CT, EE. UU. modelo 2400) bajo las siguientes condiciones: RAPD (A05, A08 y A19) 2 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 50 °C, 3 min a 72 °C y el último ciclo de 10 min a 72 °C seguido de 30 s a 4 °C. Microsatélites: (GATA)<sub>4</sub> 2 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s a 40 °C y 2 min a 72 °C, seguido de 10 min a 72 °C; (GACA)<sub>4</sub> 2 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s a 48 °C y 2 min a 72 °C seguido de 10 min a 72 °C. Para RAMP se utilizaron los mismos programas de los microsatélites. Los productos amplificados fueron colocados en un gel de agarosa 1.8 %, junto con un marcador de 1 kb (Invitrogen®) como referencia, y fueron separados por electroforesis durante 1 h a 85 V. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg mL<sup>-1</sup>) y se visualizó bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador Bio-Rad® modelo Gel-Doc 2000. Los resultados se documentaron a través de impresos para su análisis posterior.

**Cuadro 2. Condiciones de reacción para RAPD, Microsatélites y RAMP.**

| Compuesto                         | Concentración      |
|-----------------------------------|--------------------|
| <b>RAPD</b>                       |                    |
| Amortiguador de reacción          | 1X                 |
| MgCl <sub>2</sub>                 | 1.5 mM             |
| dNTP's                            | 200 µM             |
| Iniciador aleatorio               | 20 pmol            |
| ADN polimerasa                    | 1.5 U <sup>†</sup> |
| ADN genómico de <i>P. horiana</i> | 80 ng              |
| Agua                              | -                  |
| <b>Microsatélites</b>             |                    |
| Amortiguador de reacción          | 1X                 |
| MgCl <sub>2</sub>                 | 3 mM               |
| dNTP's                            | 200 µM             |
| Iniciador (microsatélite)         | 30 pmol            |
| ADN polimerasa                    | 1.5 U              |
| ADN genómico de <i>P. horiana</i> | 50 ng              |
| Agua                              | -                  |
| <b>RAMP</b>                       |                    |
| Amortiguador de reacción          | 1X                 |
| MgCl <sub>2</sub>                 | 3 mM               |
| dNTP's                            | 200 µM             |
| Iniciador de microsatélite        | 20 pmol            |
| Iniciador aleatorio               | 20 pmol            |
| ADN polimerasa                    | 1.5 U              |
| ADN genómico de <i>P. horiana</i> | 80 ng              |
| Agua                              | -                  |

<sup>†</sup>Unidades de actividad.

Las bandas obtenidas en cada aislamiento se enumeraron en orden descendente a partir de la de mayor peso molecular. A cada banda se le asignó un valor numérico, 1 para denotar presencia y 0 para ausencia, con lo que se generó una matriz binaria de disimilaridad genética mediante el coeficiente de apareamiento simple (SM). El dendrograma fue derivado de la matriz de disimilaridad con el programa

SAHN del sistema taxonómico numérico para computadora personal (NTSYSpc) Versión 2.10pc, por el método del promedio UPGMA (Adams *et al.*, 2000). La robustez del dendrograma, es decir la estabilidad estadística del agrupamiento de las ramas o nodos del dendrograma, se estimó por el análisis “bootstrap” con 2000 remuestreos, con el programa computacional “Winboot” (Nelson *et al.*, 1994).

## RESULTADOS

**Incremento de inóculo y patogenicidad de los aislamientos monopustulares de *P. horiana* en crisantemo var. ‘Indianápolis’.** Dado que las pústulas colectadas en cada localidad fueron de varios tamaños, la cantidad de teliosporas por mL obtenidas varió entre aislamientos. En los aislamientos de La Lagunilla, Sta. Ana y Boyeros se estimaron “cero” teliosporas ya que en el área de conteo del hemacitómetro no se observaron esporas (aunque fuera del área de conteo ocasionalmente se observaron algunas, lo que indicó que el nivel de inóculo fue extremadamente bajo, al que de manera convencional se consideró como “cero”). En contraste, en los aislamientos de Sn. Miguel Tlaixpan y Tepetzingo el nivel de inóculo fue de hasta 14 000 teliosporas por mL (Cuadro 3).

No hubo una relación directa entre el nivel de inóculo y el periodo de incubación. Así, en aislamientos con bajos ni-

veles de inóculo inicial (de 0 a 320 teliosporas por mL, como fue el caso de La Lagunilla y Porfirio Díaz) se registraron periodos de incubación relativamente cortos (19 d), mientras que en aislamientos con niveles altos de inóculo inicial (de 4000 a 8600 teliosporas por mL), los periodos de incubación fueron más largos (39 a 44 d, para Coatepec de Harinas y San Diego, por ejemplo).

Los primeros síntomas de infección (pústulas incipientes, que consistieron en una mancha circular de color blanco amarillento con una depresión o hundimiento) se manifestaron a los 14 dpi en el aislamiento Sn. Miguel Tlaixpan, cuyo inóculo inicial fue alto. Con los aislamientos Boyeros, La Lagunilla y Porfirio Díaz, los primeros síntomas aparecieron a los 19 dpi, a pesar de que el nivel de inóculo inicial fue extremadamente bajo (“cero”) en los dos primeros, y en Porfirio Díaz fue de sólo 320 teliosporas/mL, en comparación con el resto de aislamientos del Estado de México. El máximo contraste se observó entre aislamientos en los que la manifestación de síntomas ocurrió entre los 39 y 49 dpi, aún cuando el nivel de inóculo inicial fue muy superior, en comparación con aquéllos en los que el estimado inicialmente fue de “cero” teliosporas (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Comportamiento patogénico de 16 aislamientos monopustulares de *Puccinia horiana* en plantas de crisantemo var. ‘Indianápolis’ crecida en condiciones de invernadero.**

| Localidad y Aislamiento             | Inóculo inicial (teliosporas/mL) <sup>e</sup> | Periodo de incubación (días) <sup>g</sup> | Pústulas incipientes <sup>h</sup> | Promedio de pústulas/planta <sup>i</sup> | Incidencia final (%) <sup>j</sup> |
|-------------------------------------|---|---|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| <b>Región Occidente<sup>†</sup></b> |   |   |                                   |  |                                   |
| La Lagunilla                        | 0 <sup>u</sup>                                | 19  | 1                                 | 5.2 dce                                  | 100                               |
| Porfirio Díaz                       | 320   | 19  | 1                                 | 3.7 dfe                                  | 90.9                              |
| Zumpango                            | 660   | 44  | 1                                 | 1.6 gf                                   | 90.9                              |
| Sta. Ana                            | 0   | 49  | 4                                 | 2.8 gfe                                  | 81.8                              |
| Coatepec Harinas                    | 4000  | 39  | 2                                 | 19.9 a                                   | 100                               |
| Sta. Ma. Aranzazú                   | 660   | 44  | 16                                | 2.9 dgfe                                 | 90.9                              |
| <b>Región Oriente<sup>†</sup></b>   |   |   |                                   |  |                                   |
| Nativitas                           | 6600  | 44  | 13                                | 3.6 dfe                                  | 90.9                              |
| Sn. Diego                           | 8600  | 44  | 15                                | 8.2 c                                    | 100                               |
| SP. Isayo                           | 6000  | 44  | 9                                 | 5.6 dc                                   | 100                               |
| Tequexquihua                        | 1320  | 39  | 5                                 | 7.9 c                                    | 100                               |
| Sn. M. Tlaixpan                     | 14000   | 14  | 1                                 | 13.4 b                                   | 100                               |
| Boyeros                             | 0   | 19  | 1                                 | 19.4 a                                   | 100                               |
| <b>Morelos</b>                      |   |   |                                   |  |                                   |
| Tepetzingo                          | 14000   | 39  | 2                                 | 2.3 gf                                   | 90.9                              |
| Jiutepec                            | 7320  | 44  | 2                                 | 1.1 g                                    | 81.8                              |
| Temixco                             | 7200  | 39  | 1                                 | 3.1 dgfe                                 | 90.9                              |
| <b>Puebla</b>                       |   |   |                                   |  |                                   |
| Atlixco                             | 1320  | 49  | 4                                 | 2.6 dgfe                                 | 100                               |

<sup>†</sup>Regiones pertenecientes al Edo. de México. <sup>u</sup>No se registraron teliosporas en el área de conteo del hemacitómetro, aunque estuvieron presentes en la suspensión en muy baja densidad. <sup>e</sup>Teliosporas por mL obtenidas a partir de una pústula. <sup>g</sup>Número de días posteriores a la inoculación en que aparecieron las primeras pústulas incipientes. <sup>h</sup>Número de pústulas incipientes (manchas cloróticas) como primer síntoma de infección. <sup>i</sup>Promedio de pústulas desarrolladas a los 49 d posteriores a la inoculación (dpi). <sup>j</sup>Incidencia máxima alcanzada a los 49 dpi. Valores con la misma letra en cada columna no difieren significativamente (Tukey, 0.05).

Tampoco se observó una relación directa entre inóculo inicial y número de pústulas desarrolladas por planta a los 49 dpi. Por ejemplo, el aislamiento Tepetzingo de Morelos cuyo inóculo inicial fue tan alto como el de Sn. M. Tlaixpan de Texcoco (14 000 teliosporas/mL), sólo presentó 2.3 pústulas por planta, mientras que en las inoculadas con el aislamiento de Sn. Miguel Tlaixpan en promedio se desarrollaron 13.4 pústulas por planta (Cuadro 3). El máximo contraste se observó con el aislamiento Boyeros de Texcoco, el cual con un nivel de inóculo inicial de “cero” indujo el desarrollo de 19.4 pústulas/planta.

La incidencia final de plantas enfermas inducida por los diferentes aislamientos de *P. horiana*, tampoco estuvo directamente relacionada con el nivel de inóculo inicial. Los tres aislamientos (Boyeros, La Lagunilla y Sta. Ana) en los que se estimó un nivel de inóculo inicial de “cero” teliosporas/mL, presentaron 100, 100 y 81.8 % de incidencia. En contraste, el aislamiento Jiutepec con un nivel alto de inóculo inicial (7320 teliosporas/mL) indujo una incidencia similar a la de Sta. Ana (Cuadro 3).

**Ensayo 1.** Al comparar la virulencia de los aislamientos por regiones y estados, se detectó que los provenientes del Occidente y del Oriente del Estado de México fueron mucho más virulentos que los colectados en los Estados de Morelos y Puebla. El periodo de incubación promedio de los dos primeros grupos de aislamientos en plantas de la var. ‘Indianápolis’ fue de 15 d, mientras que Morelos y Puebla requirieron de 3 y 4 días más para que indujeran las pústulas incipientes. La tendencia en los tres cultivares restantes fue similar; los dos primeros grupos de aislamientos se comportaron como los más virulentos (Cuadro 4). El tiempo requerido para alcanzar la máxima incidencia (100 % de plantas enfermas) en la var. ‘Indianápolis’ fue de sólo 4 d después de aparecer los primeros síntomas, para los aislamientos de las regiones Occidente y Oriente del Estado de México. En cambio, para los aislamientos de los Estados de Morelos y Puebla se requirieron 5 y 6 d más (Cuadro 4). Los cuatro grupos de aislamientos alcanzaron 100 % de incidencia en las vars. ‘Indianápolis’ y ‘Harman’, mientras que en la var. ‘Vikyngo’ sólo el grupo de la región Occidente alcanzó 100 % de incidencia; en la var. ‘Eleonora’ el grupo de aislamientos con el mayor grado de incidencia fue el de la región Oriente, con 93.3 % (Cuadro 4). Las plantas de la var. ‘Marble’ no presentaron síntomas con ninguno de los cuatro grupos de aislamientos.

Se detectaron diferencias significativas en la producción de basidiosporas entre los grupos de aislamientos provenientes de las distintas regiones; la mayor liberación se registró a los 40 dpi (Cuadro 5). Los grupos del Occidente y Oriente del Edo. de México se comportaron de manera similar y fueron los que más basidiosporas liberaron (539 y 977 basidiosporas/0.25 cm<sup>2</sup>, respectivamente), en comparación con los grupos de Morelos y de Puebla; entre los primeros,

solamente a los 20 dpi hubo diferencia en el conteo realizado. En contraste, los aislamientos de Morelos y de Puebla liberaron un número significativamente bajo de basidiosporas (76 y 47 basidiosporas/0.25 cm<sup>2</sup>, respectivamente), sin diferencia entre ellos.

En general, se observó que el grupo de aislamientos de Occidente y de Oriente fueron los que indujeron la mayor severidad en las cuatro variedades que presentaron daño (‘Indianápolis’, ‘Harman’, ‘Vikyngo’ y ‘Eleonora’), con un rango de severidad que varió de 22.8 a 37.1 %, y entre ellos no hubo diferencias (Cuadro 5). En cambio, el grupo de aislamientos provenientes de los Estados de Morelos y Puebla, causaron un daño significativamente menor en dichas variedades (5.7 a 8.5 % y 4.2 a 7.3 %) y fueron similares entre ellos. En las condiciones en las que se hizo el ensayo, la var. ‘Marble’ no mostró síntomas de infección ni de colonización con ninguno de los aislamientos de *P. horiana* (Cuadro 5).

En las vars. ‘Indianápolis’ y ‘Vikyngo’ el periodo promedio de incubación fue 16 d para los diferentes aislamientos de *P. horiana*, mientras que en ‘Eleonora’ requirió 3 d más (19.4 d). En la var. ‘Harman’ fue de hasta 21.2 d, y la var. ‘Marble’ no mostró síntomas de la enfermedad durante la evaluación (Cuadro 6). Aunque en el número de pústulas incipientes no hubo diferencia estadística entre cultivares, ‘Indianápolis’ tuvo menor número (cinco) que ‘Harman’ (seis). ‘Indianápolis’ y ‘Harman’ alcanzaron 100 % de incidencia a los 4.4 y 7.6 d, respectivamente, después de aparecer los primeros síntomas, mientras que en ‘Vikyngo’ y ‘Eleonora’ la incidencia máxima fue del 96 y 81 % a los 8.6 y 8.7 d, respectivamente. La severidad mostrada por ‘Indianápolis’, ‘Vikyngo’, ‘Harman’ y ‘Eleonora’ fue estadísticamente similar, aunque ‘Indianápolis’ presentó mayor daño (29 %) que ‘Eleonora’ (18.9 %).

**Ensayo 2.** En ‘Vikyngo’ los aislamientos de las regiones Occidente y Oriente tuvieron el menor tiempo de incubación, con una diferencia de 2.5 d entre ellos, y tuvieron el mayor número de pústulas incipientes. El grupo del Occidente fue el que a los 26 dpi indujo 100 % de incidencia, seguido del grupo de la región oriente (Cuadro 7). Los grupos del Estado de Morelos y de Puebla tuvieron un comportamiento similar en periodo de incubación y número de pústulas incipientes, pero el de Morelos alcanzó más rápidamente (38 d) la máxima incidencia (86.6 %) que el de Puebla (40 d y 60 %). El desarrollo de la enfermedad en ‘Marble’ fue más lento; a todos los aislamientos les llevó mayor tiempo inducir la expresión de síntomas (de 29 a 31 d); el número de pústulas incipientes varió de 3 a 7 y la máxima incidencia (60 a 70 %) se alcanzó a los 40 dpi en todos los casos. Con la excepción del grupo de Puebla que no causó infección en ‘Marble’, los tres grupos restantes tuvieron un comportamiento similar.

**Basidiosporas capturadas y severidad.** Al igual que en el Ensayo 1, la producción de basidiosporas varió significativamente entre los grupos de aislamientos provenientes de las distintas regiones. La mayor liberación se registró a los 40 dpi (Cuadro 8). Los grupos de Oriente y Occidente fueron los que más basidiosporas liberaron (54.4 y 40.6 basidiosporas/0.25 cm<sup>2</sup>, respectivamente), en comparación con los grupos de Morelos y Puebla. Los aislamientos de Occidente y Oriente del Estado de México también fueron los más virulentos en las vars. ‘Vikyngo’ y ‘Marble’, con un rango de severidad que varió de 0.2 a 19 %, pero sin diferencias entre ellos. En contraste, los aislamientos provenientes de Morelos y Puebla causaron menor daño en ‘Vikyngo’ y el aislamiento de Puebla fue incapaz de infectar a ‘Marble’. La var. ‘Vikyngo’ mostró mayor severidad e incidencia final de la enfermedad que ‘Marble’ (Cuadro 9), lo que confirma su alta susceptibilidad a la roya blanca.

**Polimorfismo del ADN.** Mediante el análisis de RAPD con los iniciadores aleatorios OPA-05, OPA-08, OPA-13 y OPA-19, y el análisis con MP-PCR con los iniciadores (GATA)<sub>4</sub> y (GACA), se obtuvieron polimorfismos. Al com-

binar estas dos técnicas (RAMP) se obtuvo un mayor número de polimorfismos que con cada técnica por separado. El tamaño de los productos amplificados en general fue menor a 1000 pb. El dendrograma generado por el coeficiente SM y el método UPGMA basado en 76 bandas obtenidas de los 16 aislamientos (Figura 1) identificó tres grupos (**a**, **b** y **c**) a una distancia génica entre 0.7 y 0.8. Tales grupos correspondieron exactamente al origen de los aislamientos; así el grupo **a** correspondiente al Estado de Puebla se separó completamente del resto de aislamientos con una robustez de 100 %. El grupo **b** se conformó con los aislamientos provenientes de Morelos (Tep-Mor, Tem-Mor y Jiu-Mor) con una robustez de 48 %, donde los dos primeros mostraron mayor cercanía. En el grupo **c** quedaron incluidos los aislamientos del Estado de México de la región Occidente (CH, Ara, SA, PD, Zum y Lag) y de la Oriente (Boy, Nat, SMT, SD, Teq y SPI). El rango de temperatura media que prevalece en las localidades del Edo. de México es más bajo (13.5 a 17.2 °C), que en Morelos (20.7 y 22.9 °C) y Puebla (22.2 °C), como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 4. Comportamiento patogénico de *Puccinia horiana* en plantas de cinco variedades de crisantemo crecidas en condiciones de invernadero.**

| Cultivar              | Origen de los aislamientos por región y estado | Periodo de incubación (días) <sup>£</sup> | Número de pústulas incipientes <sup>§</sup> | Días a la máxima incidencia <sup>¶</sup> | Incidencia final (%) <sup>‡</sup> |
|-----------------------|--|---|---|--|-----------------------------------|
| <b>‘Indianápolis’</b> | Región Occidente                               | 15  | 4.8   | 19                                       | 100                               |
|                       | Región Oriente <sup>v</sup>                    | 15.5                                      | 7.1   | 19.5                                     | 100                               |
|                       | Morelos  | 18  | 3.6   | 23                                       | 100                               |
|                       | Puebla   | 19  | 3   | 25                                       | 100                               |
| <b>‘Harman’</b>       | Región Occidente                               | 22  | 6   | 32.3                                     | 100                               |
|                       | Región Oriente                                 | 19  | 3.5   | 28.2                                     | 100                               |
|                       | Morelos  | 23  | 2   | 32                                       | 100                               |
|                       | Puebla   | 25  | 2   | 37                                       | 100                               |
| <b>‘Vikyngo’</b>      | Región Occidente                               | 15  | 7.1   | 22.5                                     | 100                               |
|                       | Región Oriente                                 | 15.5                                      | 4.5   | 23.5                                     | 96.6                              |
|                       | Morelos  | 19  | 2.6   | 29                                       | 93.3                              |
|                       | Puebla   | 19  | 3   | 34                                       | 80                                |
| <b>‘Eleonora’</b>     | Región Occidente                               | 19.6                                      | 5.2   | 30                                       | 73.3                              |
|                       | Región Oriente                                 | 17.5                                      | 7.2   | 23                                       | 93.3                              |
|                       | Morelos  | 21  | 3   | 31                                       | 73.3                              |
|                       | Puebla   | 25  | 3   | 40                                       | 80                                |
| <b>‘Marble’</b>       | Región Occidente                               | 0   | 0   | 0  | 0                                 |
|                       | Región Oriente                                 | 0   | 0   | 0  | 0                                 |
|                       | Morelos  | 0   | 0   | 0  | 0                                 |
|                       | Puebla   | 0   | 0   | 0  | 0                                 |

<sup>¶</sup>Regiones pertenecientes al Estado de México. <sup>£</sup>Tiempo promedio en días posteriores a la inoculación (dpi) en los que aparecieron las pústulas incipientes.

<sup>§</sup>Número de pústulas incipientes promedio por planta en cada grupo de aislamientos. <sup>¶</sup>Número de dpi en alcanzar la máxima incidencia por origen de aislamientos. <sup>‡</sup>Incidencia final alcanzada por grupo.

**Cuadro 5. Severidad y basidiosporas liberadas en plantas de cinco variedades de crisantemo, por 16 aislamientos de *Puccinia horiana* provenientes de los Estados de México, Morelos y Puebla.**

| Contrastes por grupos <sup>ψ</sup> de acuerdo a su origen | Basidiosporas capturadas <sup>ε</sup> en 0.25 cm <sup>2</sup> |               |                 | Severidad (%)  |               |               |               |          |
|---|---|---------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------|
|   | 20  | 30            | 40              | 'Indianápolis' | 'Harman'      | 'Vikyngo'     | 'Eleonora'    | 'Marble' |
| 1) Reg. Occ. <sup>ε</sup> vs. Reg. Ori. <sup>ε</sup>      | 3.2 vs 2.6 <sup>†*</sup>                                      | 64.2 vs 73.4  | 539.5 vs 977.4  | 35.7 vs 37.1   | 28.9 vs 30.4  | 35.5 vs 34.1  | 22.9 vs 24.2  | 0 vs 0   |
| 2) Reg. Occ. vs. Morelos                                  | 3.2 vs 2.0*   | 64.2 vs 5.3** | 539.5 vs 76.5** | 35.7 vs 7.7**  | 28.9 vs 7.0** | 35.5 vs 8.5** | 22.9 vs 5.7** | 0 vs 0   |
| 3) Reg. Occ. vs. Puebla                                   | 3.2 vs 1.2*   | 64.2 vs 1.6** | 539.5 vs 47.2** | 35.7 vs 5.7**  | 28.9 vs 6.7*  | 35.5 vs 7.3*  | 22.9 vs 4.2** | 0 vs 0   |
| 4) Reg. Ori. vs. Morelos                                  | 2.6 vs 2.0  | 73.4 vs 5.3** | 977.4 vs 76.5** | 37.1 vs 7.7**  | 30.4 vs 7.0** | 34.1 vs 8.5** | 24.2 vs 5.7** | 0 vs 0   |
| 5) Reg. Ori. vs. Puebla                                   | 2.6 vs 1.2  | 73.4 vs 1.6** | 977.4 vs 47.2** | 37.1 vs 5.7**  | 30.4 vs 6.7*  | 34.1 vs 7.3*  | 24.2 vs 4.2** | 0 vs 0   |
| 6) Puebla vs. Morelos                                     | 1.2 vs 2.0  | 1.6 vs 5.3    | 47.2 vs 76.5    | 5.7 vs 7.7     | 6.7 vs 7.0    | 7.3 vs 8.5    | 4.2 vs 5.7    | 0 vs 0   |

<sup>ψ</sup>Aislamientos agrupados por región y Estado para contrastes. <sup>ε</sup>Región Occidente y Oriente pertenecientes al Estado de México.

<sup>ε</sup>Basidiosporas capturadas a los 20, 30 y 40 d posteriores a la inoculación. <sup>†</sup>Diferencia significativa (\*); diferencia altamente significativa (\*\*) entre las medias del contraste (P ≤ 0.05).

**Cuadro 6. Respuesta de plantas de cinco variedades de crisantemo a 16 aislamientos de *Puccinia horiana* en condiciones de invernadero.**

| Variedad       | Periodo de incubación (días) <sup>ε</sup> | Número de pústulas incipientes <sup>ε</sup> | Días a máxima incidencia <sup>ψ</sup> | Incidenca final (%) <sup>ψ</sup> | Severidad (%) |
|----------------|---|---|---------------------------------------|----------------------------------|---------------|
| 'Harman'       | 21.2 a                                    | 6.2 a                                       | 28.8 a                                | 100 a                            | 23.9 a        |
| 'Eleonora'     | 19.4 a                                    | 5.4 a                                       | 28.2 a                                | 81.2 b                           | 18.9 a        |
| 'Vikyngo'      | 16.2 b                                    | 5.4 a                                       | 24.8 ab                               | 96.2 a                           | 28.1 a        |
| 'Indianápolis' | 16.0 b                                    | 5.1 a                                       | 20.4 b                                | 100 a                            | 29.1 a        |
| 'Marble'       | 0 c                                       | 0 b   | 0 c                                   | 0 c                              | 0 b           |

<sup>ε</sup>Número de días posteriores a la inoculación (dpi) en que se manifestaron las primeras pústulas incipientes. <sup>ψ</sup>Pústulas incipientes al primer registro de evaluación. <sup>ψ</sup>Número de dpi en alcanzar la máxima incidencia. <sup>ψ</sup>Incidenca alcanzada 40 dpi. Valores con la misma letra en cada columna no difieren significativamente (Tukey, 0.05).

**Cuadro 7. Comportamiento patológico de los grupos de aislamientos de *Puccinia horiana* en cada variedad de crisantemo con plantas crecidas en condiciones de invernadero.**

| Variedad  | Origen de los aislamientos por región y estado | Periodo de incubación (días) <sup>ε</sup> | Número de pústulas incipientes <sup>ψ</sup> | Días a máxima incidencia <sup>ψ</sup> | Incidenca final (%) <sup>§</sup> |
|-----------|--|---|---|---------------------------------------|----------------------------------|
| 'Vikyngo' | Región Occidente <sup>ε</sup>                  | 17  | 10.2  | 26                                    | 100                              |
|           | Región Oriente                                 | 19.5                                      | 8.3   | 28.5                                  | 100                              |
|           | Morelos  | 25  | 2.3   | 38                                    | 86.6                             |
|           | Puebla   | 25  | 2   | 40                                    | 60                               |
| 'Marble'  | Región Occidente                               | 30.4                                      | 7.4   | 40                                    | 60                               |
|           | Región Oriente                                 | 29.5                                      | 5   | 40                                    | 70                               |
|           | Morelos  | 31.2                                      | 3   | 40                                    | 60                               |
|           | Puebla   | 0   | 0   | 0                                     | 0                                |

<sup>ε</sup>Regiones pertenecientes al Estado de México. <sup>ε</sup>Número de días posteriores a la inoculación (dpi) en los que se manifestaron las primeras pústulas incipientes.

<sup>ψ</sup>Número de pústulas incipientes promedio por planta. <sup>ψ</sup>Número promedio de dpi en alcanzar la máxima incidencia. <sup>§</sup>Incidenca final alcanzada.

**Cuadro 8. Producción de inóculo y severidad inducida por 16 aislamientos de *Puccinia horiana* (agrupados por estado y región) en dos variedades de crisantemo crecidas en condiciones de invernadero.**

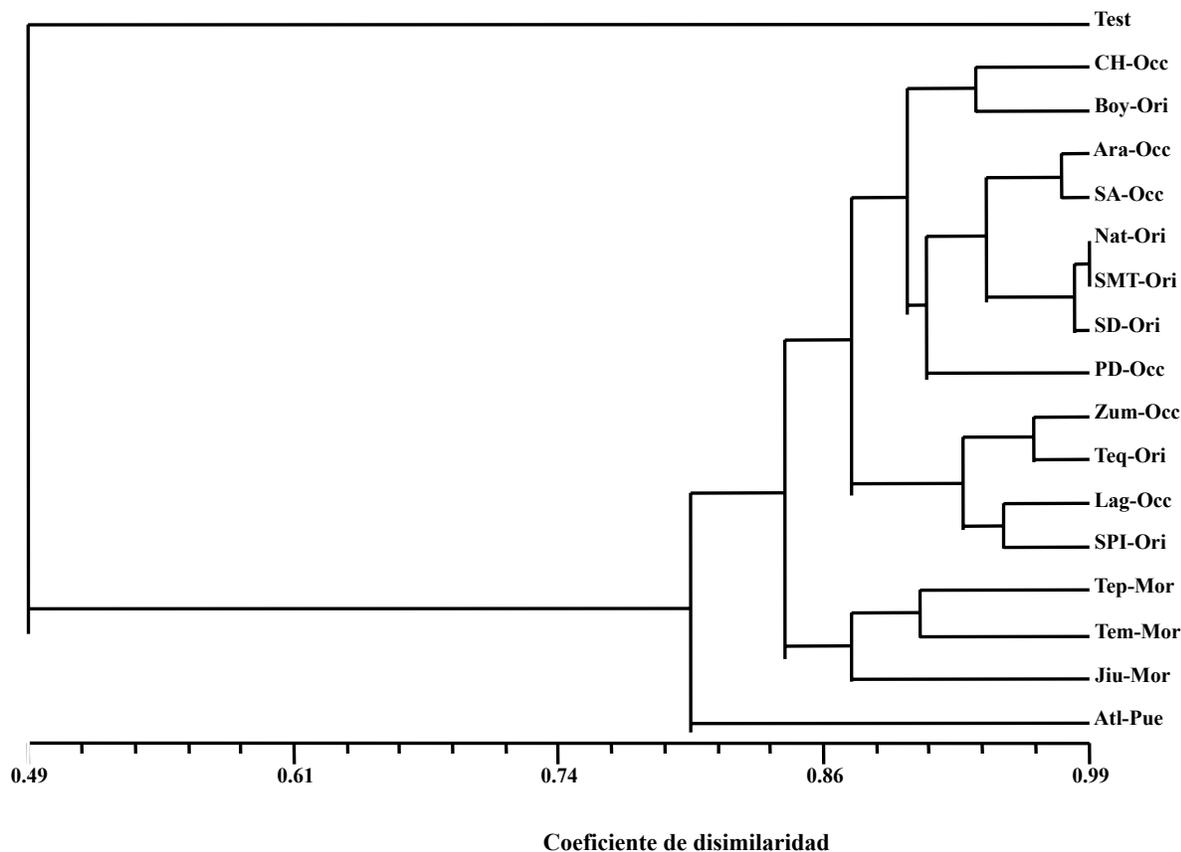
| Contrastes por grupos <sup>‡</sup> de acuerdo a su origen | Basidiosporas capturadas <sup>ψ</sup> en 0.25 cm <sup>2</sup> |                             |                 | Severidad (%) |             |
|---|---|-----------------------------|-----------------|---------------|-------------|
|   | 20  | 30                          | 40              | 'Vikyngo'     | 'Marble'    |
| 1) Reg. Occ. <sup>‡</sup> vs. Reg. Ori. <sup>‡</sup>      | 0 vs. 3.2* <sup>‡</sup>                                       | 20 vs. 27.4                 | 40.6 vs. 54.4*  | 19 vs. 15.9   | 0.2 vs. 0.2 |
| 2) Reg. Occ. vs. Morelos                                  | 0 vs. 0.3   | 20 vs. 1.5*                 | 40.6 vs. 10.5*  | 19 vs. 6*     | 0.2 vs. 0.1 |
| 3) Reg. Occ. vs. Puebla                                   | 0 vs. 1   | 20 vs. 0.8*                 | 40.6 vs. 13.4*  | 19 vs. 0.82*  | 0.2 vs. 0   |
| 4) Reg. Ori. vs. Morelos                                  | 3.2 vs. 0.3*  | 27.4 vs. 1.5** <sup>‡</sup> | 54.4 vs. 10.5** | 15.9 vs. 6*   | 0.2 vs. 0.1 |
| 5) Reg. Ori. vs. Puebla                                   | 3.2 vs. 1.0   | 27.4 vs. 0.8*               | 54.4 vs. 13.4*  | 15.9 vs. 0.8* | 0.2 vs. 0   |
| 6) Puebla vs. Morelos                                     | 1 vs. 0.3   | 1.5 vs. 0.8                 | 10.5 vs. 13.4   | 6 vs. 0.8     | 0 vs. 0.1   |

<sup>‡</sup>Aislamientos agrupados por región y estado para contrastes. <sup>‡</sup>Región Occidente y Oriente pertenecientes al Estado de México. <sup>ψ</sup>Basidiosporas capturadas a los 20, 30 y 40 d posteriores a la inoculación. <sup>‡</sup>Diferencia significativa (\* P ≤ 0.05) y altamente significativa (\*\*P ≤ 0.01) entre las medias del contraste.

**Cuadro 9. Respuesta de dos variedades de crisantemo a 16 aislamientos de *Puccinia horiana* en condiciones de invernadero.**

| Variedad  | Periodo de incubación (días) <sup>‡</sup> | Número de pústulas incipientes <sup>‡</sup> | Días a máxima incidencia <sup>ψ</sup> | Incidencia final <sup>ψ</sup> (%) | Severidad (%) |
|-----------|---|---|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| 'Vikyngo' | 19.9 b <sup>‡</sup>                       | 13.2 a                                      | 29.0 b                                | 95.0 a                            | 14.7 a        |
| 'Marble'  | 30.2 a                                    | 5.8 b                                       | 40.0 a                                | 62.5 b                            | 0.5 b         |

<sup>‡</sup>Número de días posteriores a la inoculación (dpi) en los que se manifestaron las primeras pústulas incipientes. <sup>‡</sup>Pústulas incipientes al primer registro de evaluación. <sup>ψ</sup>Número de dpi en alcanzar la máxima incidencia. <sup>ψ</sup>Incidencia alcanzada a 40 dpi. <sup>‡</sup>Valores con la misma letra en cada columna no difieren significativamente (Tukey, 0.05).



**Figura 1. Dendrograma que muestra la disimilaridad de 16 aislamientos de *Puccinia horiana* colectados en el Estado de México región Occidente: La Lagunilla (Lag-Occ), Porfirio Díaz (PD-Occ), Coatepec Harinas (CH-Occ), Zumpango (Zum-Occ), Sta. Ma. Aranzazú (Ara-Occ), Sta. Ana (SA-Occ) y región Oriente: Nativitas (Nat-Ori), Tequexquinahua (Teq-Ori), Sn. Miguel Tlaixpan (SMT-Ori), Sn. Diego (SD-Ori), Sn. Pablo Izayo (SPI-Ori), Boyeros (Boy-Ori); Estado de Morelos: Tepetzingo (Tep-Mor), Jiutepec (Jiu-Mor) y Temixco (Tem-Mor); y el Estado de Puebla: Atlixco (Atl-Pue). Test=Planta de crisantemo sin *P. horiana***

## DISCUSIÓN

Durante de incremento de inóculo en plantas de la var. 'Indianápolis' no se detectó relación directa entre el nivel de inóculo aplicado y el desarrollo de la enfermedad inducida por cada aislamiento de *P. horiana*. Así, los aislamientos con bajos niveles de inóculo inicial (de escasa presencia de esporas, convencionalmente denominada "cero", a 320 teliosporas por mL), presentaron periodos de incubación relativamente cortos (19 d), con alto número de pústulas por planta a los 49 dpi, e incidencias finales de 82 a 100 %. Esto sugiere que las diferencias en el desarrollo de la roya blanca en plantas del crisantemo 'Indianápolis' inducido por los aislamientos, se podrían deber a diferencias en patogenicidad inherentes a cada aislamiento con base en su origen geográfico. Según Firman y Martín (1968), las diferencias en agresividad y virulencia de *P. horiana* se explican por diferencias en su origen geográfico.

Los aislamientos colectados en el Estado de México fueron los más virulentos, sobre todo los de Coatepec Harinas, Boyeros y Sn. Miguel Tlaixpan, pues requirieron periodos de incubación más cortos, indujeron mayor número de pústulas por planta (19.9, 19.4 y 13.4, respectivamente) y produjeron 100 % de incidencia (Cuadro 3). Así mismo, la mayor capacidad reproductiva, inferida por el número de basidiosporas capturadas, la presentaron los aislamientos colectados en el Estado de México. El número de basidiosporas liberadas estuvo directamente relacionado con la severidad, pues a mayor cantidad de basidiosporas capturadas fue mayor la severidad de la roya blanca en las variedades de crisantemo (Cuadros 5 y 8). Estas diferencias de potencial reproductivo entre aislamientos son otra evidencia de la variación genética entre ellos; el potencial reproductivo puede influir en la habilidad competitiva del patógeno (Martens y Dyck, 1989; Shaner *et al.*, 1992). La estrecha relación entre el nivel inóculo de *P. horiana* y la severidad, también fue reportada por Rodríguez-Navarro *et al.* (1996) en la var. 'Spider', con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.95. Estos mismos autores capturaron 63 basidiosporas en 0.25 cm<sup>2</sup> en 24 h de exposición de la trampa en campo; en cambio, García *et al.* (2005), en invernadero contabilizaron hasta 1086 basidiosporas en la misma superficie de conteo y con en el mismo tiempo de exposición. Por tanto, se infiere que el potencial reproductivo de *P. horiana* varía entre aislamientos en función de su origen, de la variedad hospedante y de las condiciones ambientales prevalecientes durante el desarrollo de la enfermedad.

También se evidenció variación en la susceptibilidad a la roya blanca entre las variedades de crisantemo. Al considerar las variables periodo de incubación, tiempo a máxima incidencia final, incidencia y severidad, se deduce que 'Indianápolis' fue la variedad más susceptible, seguida por 'Vikyngo', 'Harman' y 'Eleonora' (Cuadro 6). En 'Marble' el desarrollo de la enfermedad fue mucho más lento y la in-

cidencia final fue la más baja (Cuadro 7), además de ser la única variedad en la que el aislamiento menos virulento (Atl-Pue) no indujo síntomas visibles de infección.

El hecho de que en el primer ensayo no hubo evidencia de la infección en 'Marble' por *P. horiana* (Cuadro 4), podría deberse a las condiciones de temperatura (14-26 °C) y humedad (91.8 al 100 %) que prevalecieron durante este ensayo. En el segundo ensayo, donde 'Marble' fue afectado por la roya blanca, la temperatura varió de 19 a 28 °C y la HR fluctuó de 70 a 100 %; en estas condiciones, los aislamientos del Estado de México y de Morelos indujeron síntomas prácticamente imperceptibles en la var. 'Marble', que presentó valores de severidad de 0.25 y 0.10 respectivamente (Cuadro 8). Según Whipps (1993), las diferencias en los rangos de temperatura en los que germinan los aislamientos de *P. horiana*, podrían relacionarse con requerimientos específicos de algunas razas.

Redemaker y de Jong (1987) consideran que las variedades de crisantemo con resistencia completa no desarrollan ningún síntoma macroscópico visible, y que tal resistencia es controlada por un sólo gen dominante, por lo que existe el riesgo de rompimiento de la resistencia por nuevos genes virulentos del patógeno. Sin embargo, este tipo de resistencia se ha conservado por 12 años en Holanda. En cultivares con resistencia incompleta, el desarrollo de *P. horiana* tiene lugar sólo bajo fuerte presión de inóculo, y esta resistencia parece estar conferida por varios genes. Las vars. 'Guyana' y 'Taffeta' presentan resistencia incompleta (Firman y Martín 1968), mientras que 'Ozenda white', 'Pesaro white', 'Pidoul', 'Tasman', 'Tom Pearse' y 'Veria Dark' son consideradas inmunes (Wojdyla, 1999).

Las diferencias en tiempo de incubación de *Uromyces appendiculatus* (Pers.:Pers.) Unger en variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), se ha relacionado con la resistencia propia de cada variedad (Edington *et al.*, 1994). También Patterson *et al.* (1957) señalan que el periodo de incubación, frecuencia y tamaño de pústulas, así como el tipo de reacción a *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* es una respuesta de la resistencia inherente a la variedad de planta y no por efecto de las razas. Cuando diversas variedades son inoculadas con un mismo aislamiento, las diferencias varietales en la respuesta a la inoculación puedan atribuirse a diferencias en susceptibilidad entre ellas. Sin embargo, cuando una variedad responde de manera diferente a la inoculación con aislamientos provenientes de diferentes regiones, las diferencias en periodo de incubación y frecuencia de pústulas pueden más bien atribuirse a variaciones en patogenicidad inherentes a los aislamientos de *P. horiana*. En resumen, el desarrollo de la enfermedad estará determinado tanto por las características inherentes del patógeno y del hospedante, como por las condiciones ambientales.

En el análisis polimórfico del ADN de los aislamientos, los grupos resultantes se conformaron de acuerdo con el lugar de procedencia de los mismos. Los aislamientos del Occidente y Oriente del Estado de México formaron un solo grupo (c), que correspondió al de mayor virulencia (Cuadros 5 y 8, Figura 1). La estrecha relación entre los aislamientos de la región Oriente y Occidente podría en parte explicarse por el constante movimiento de material vegetativo de crisantemo entre ambas regiones. El grupo b se conformó por los aislamientos Tep-Mor, Tem-Mor y Jiu-Mor, originarios del Estado de Morelos; pero el de Jiu-Mor se separó de los otros dos, lo que coincide con su menor grado de virulencia, ya que tan solo presentó 1.1 pústulas en promedio y la máxima incidencia que indujo fue de 81.8 %. El grupo a lo conformó el aislamiento de Puebla (Atl-Pue), separado completamente del resto y se caracterizó por poseer una virulencia extremadamente baja.

La relación entre virulencia y similaridad genética de aislamientos se ha demostrado en múltiples trabajos, tanto de royas como de otros hongos fitopatógenos. No obstante, debe hacerse hincapié en que las variaciones detectadas en el ADN de los aislamientos, no necesariamente son las responsables de los cambios en virulencia. Por ejemplo, Chen *et al.* (1995) encontraron una relación baja entre virulencia y polimorfismo del ADN de aislamientos de *Puccinia striiformis* Westend. Burdon y Roelfs (1985) tampoco encontraron asociación entre virulencia y polimorfismo en poblaciones de reproducción sexual de *P. graminis* Pers.:Pers. *tritici* Eriks. y E. Henn. En cambio, al evaluar la severidad de la infección por *Magnaporthe grisea* (T. T. Hebert) M. E. Barr en arroz (*Oryza sativa* L.), se encontró una alta relación entre la virulencia de aislamientos y la variación a nivel de ADN (Levy *et al.*, 1993).

Los presentes resultados con *P. horiana* claramente indicaron que el agrupamiento en el dendrograma por origen geográfico (Figura 1), correspondió exactamente al agrupamiento de aislamientos con base en su virulencia (Cuadros 5 y 8). La agrupación por origen geográfico ha sido reportada por varios autores en diferentes patógenos (Tuskan *et al.*, 1990; Guthie *et al.*, 1992; González-Chavira *et al.*, 1998). Esto puede deberse a que más de un gen, posiblemente muchos, estén involucrados en las reacciones de adaptación a diversas condiciones climáticas (Miles y Lenné, 1984). En *P. horiana*, la agrupación de los aislamientos por área geográfica con base en los análisis de ADN fue evidente en este estudio, lo que sugiere que las condiciones geográficas, manejo del cultivo y variedades de crisantemo en cada región influyen en la variabilidad de *P. horiana*.

Los aislamientos del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. y Magnus) Lams.-Scrib. en frijol analizados por RAPD y AFLP también se agruparon en función de su origen geográfico (González-Chavira *et al.*, 1998). En aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz.

y Sacc. obtenidos tanto de papaya (*Carica papaya* L.) como de aguacate (*Persea americana* Mill.) y analizados por RAPD, se agruparon en primera instancia en función del área geográfica, y luego por el tipo de síntomas que producen (Casarrubias-Carrillo *et al.*, 2003).

## CONCLUSIONES

Los aislamientos de *Puccinia horiana* del Estado de México, tanto de la región Occidente como la del Oriente, fueron más virulentos que los de los Estados de Morelos y Puebla. Destacan los aislamientos de Coatepec Harinas y Boyeros de las regiones Occidente y Oriente, respectivamente, los cuales formaron un nodo separado en el dendrograma. En contraste, los aislamientos Jiutepec de Morelos y Atlixco de Puebla fueron los menos virulentos y formaron un nodo diferente en el dendrograma. Las diferencias en virulencia entre los 16 aislamientos se reflejaron en el análisis de ADN.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G N (2005) Plant Pathology. Academic Press, New York, USA. 992 p.
- Adams D, J Kim, R Jensen, M Les, E D Slice, J Walker (2000) NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.10p. Exeter Software, New York, USA. (<http://www.ExeterSoftware.com>) (Enero, 2005).
- Ahrens U, E Seemöller (1992) Detection of ADN of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- Alexopoulos C J, C W Mims (1985) Introducción a la Micología. Ed. Omega, S.A. Barcelona, España. 638 p.
- Anikster Y, I Wahl (1979) Coevolution of the rust fungi on gramineae and Liliaceae and their hosts. *Annu. Rev. Phytopathol.* 17:367-403.
- Burdon J J, A P Roelfs (1985) The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 75:1068-1073.
- Casarrubias-Carrillo U, M M González-Chavira, A Cruz-Hernández, E Cárdenas-Soriano, D Nieto-Ángel, R G Guevara-González (2003) Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. aislado de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21:338-345.
- Chen X M, R F Line, H Leung (1995) Virulence and polymorphic DNA relationships of *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* to other rusts. *Phytopathology* 85:1335-1342.
- Edington B R, P E Shanahan, F H J Rijkenberg (1994) Breeding for partial resistance in dry beans (*Phaseolus vulgaris*) to bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Ann. Appl. Biol.* 125:601-605.
- Firman I D, P H Martín (1968) White rust of chrysanthemums. *Ann. Appl. Biol.* 62:429-442.
- García V R, E Zavaleta-Mejía, R I Rojas Martínez, S G Leyva Mir, J Simpson, G Fuentes Davila (2005) Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Heen. causante de la roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.). *Rev. Mex. Fitopatol.* 23:79-86.
- González-Chavira M, R Rodríguez, M E Zavala, J L Jacobo, F Hernández, J Acosta, O Martínez, J Simpson (1998) Caracterización de mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88:292-299.
- Guthie P A I, C W Magill, R A Frederiksen, G N Odvody (1992) Random amplified polymorphic DNA markers: A system for

- identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum gramini-cola*. Phytopathology 82:832-835.
- Hiratsuka Y, S Sato (1982)** Morphology and Taxonomy of rust fungi. In: The Rust Fungi. K J Scout, A K Chakravorty (eds). Academic Press, London. pp:1-35.
- Kolmer J A, J Q Liu, M Seis (1995)** Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in Canada. Phytopathology 85:276-285.
- Krebs K E (1985)** Chrysanthemum white rust can be controlled. Gartnerbörse und Gartenwelt 3:69-73.
- Lannou C (2001)** Intrapathotype diversity for aggressiveness and pathogen evolution in cultivar mixtures. Phytopathology 91:1851-1857.
- Levy M, F J Correa-Victoria, R S Zeigler, S Xu, J E Hamer (1993)** Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. Phytopathology 83:1427-1433.
- Leyva-Mir S G, I Lora Trejo, E Cárdenas Soriano, G Valdovinos Ponce (2001)** Pathogenesis of white rust *Puccinia horiana* Henn. on a chrysanthemum [*Chrysanthemum morifolium* (Ramat.) Hemsl. susceptible variety]. Rev. Mex. Fitopatol. 29:191-196.
- Martens J W, L P Dyck (1989)** Genetics of resistance to rust in cereals from a Canadian perspective. Can. J. Plant Pathol. 11:78-85.
- Miles J W, M J Lenne (1984)** Genetic variation within a natural *Stylosanthes guinensis*, *Colletotrichum gloeosporioides* host-pathogen population. Austr. J. Agric. Res. 35:211-218.
- Nelson R J, M R Baraoidan, C M Vera Cruz, I V Yap, J E Leach, T W Mew, H Leung (1994)** Relation between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. Appl. Env. Microbiol. 60:3275-3283.
- Patterson F L, R G Shands, J G Dickson (1957)** Temperature and seasonal effects on seedling reactions of barley varieties to three races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology 47:395-402.
- Redemaker W, J de Jong (1987)** Types of resistance to *Puccinia horiana* in chrysanthemum. Acta Hort. 197:85-88.
- Rodríguez-Navarro J A, E Zavaleta-Mejía, R Alatorre-Rosas (1996)** Epidemiología y manejo de la roya blanca (*Puccinia horiana* P. Heen.) del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Fito-patología 31:122-132.
- SAS Institute (1999)** SAS user's guide, version 8. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Shaner G, E L Stromberg, G H Lacy, K R Barker, T P Pirone (1992)** Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. Annu. Rev. Phytopathol. 30:47-66.
- Skylakakis G (1987)** Changes in the composition of pathogen populations caused by resistance to fungicides. In: Populations of Plant Pathogens, Their Dynamics and Genetics. S M Wolfe, E C Caten (eds). Blackwell Scientific Publications. London, England pp: 227-237
- Tuskan G A, J A Walla, J E Lundquist (1990)** Genetic geographic variation in *Peridermium harknessii* in the north-central United States. Phytopathology 80:857-861.
- Whipps J M (1993)** A review of white rust (*Puccinia horiana* Henn.) disease on chrysanthemum and the potencial for its biological control with *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas. Ann. Appl. Biol. 122:173-187.
- Wilcox D, B Dove, D McDavid, D Greer (2002)** ImageTool for Windows version 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio. San Antonio, Texas, USA.
- Wojdyla A T (1999)** Susceptibility of chrysanthemum cultivars to *Puccinia horiana*. Folia Hort. 11:115-122.
- Zhan J, C C Mundt, B A MacDonal (1998)** Measuring immigration and sexual reproduction in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology 88:1330-1337.