



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA

GENÉTICA DE LA RESISTENCIA DE TRIGOS CRISTALINOS DE  
HÁBITO INVERNAL A *Puccinia triticina* Eriks Y SU RESPUESTA  
*in vitro*

LAURA MARISA DELGADO SÁNCHEZ

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis, titulada “**Genética de la resistencia de trigos cristalinos de hábito invernal a *Puccinia triticina* Eriks y su respuesta *in vitro***”, realizada por la alumna: **Laura Marisa Delgado Sánchez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado:

**MAESTRA EN CIENCIAS**  
**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**  
**GENÉTICA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERA**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA**

**DIRECTOR DE TESIS**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JULIO HUERTA ESPINO**

**ASESOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. IGNACIO BENITEZ RIQUELME**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio 2015.

## RESUMEN

### GENÉTICA DE LA RESISTENCIA DE TRIGOS CRISTALINOS DE HÁBITO INVERNAL A *Puccinia triticina* Eriks Y SU RESPUESTA *in vitro*

Laura Marisa Delgado Sánchez, M.C.

Colegio de Postgraduados

El trigo (*Triticum turgidum* ssp. *Durum*) es un cereal de la familia de las gramíneas. Durante 2002-2012 tuvo una producción en México de 22 millones de hectáreas. Uno de los problemas importantes que ha enfrentado el trigo es la roya de la hoja causada por *Puccinia triticina* E., enfermedad ampliamente distribuida y devastadora. Los objetivos de esta investigación fueron: 1) Determinar la presencia de un gen resistente a la roya de la hoja en estado de plántula dentro de un grupo selecto de 51 genotipos de trigos duros en invernadero; 2) Evaluar dos genotipos de trigo tolerantes y uno susceptible a la resistencia de roya de la hoja bajo condiciones *in vitro*. Se detectaron a los genotipos “Mirlo 26” y “Elinia 48” como resistentes a la raza de roya BBG/BPC en la progenie de la cruce con el genotipo susceptible “Atred”. En “Elinia 48” la resistencia que estuvo asociada con un gen dominante y otro recesivo y para “Mirlo 26” por un recesivo. La germinación *in vitro* de semillas de los tres genotipos se logró en medio de Murashige y Skoog (1962, MS) adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>); 2,4-D (20.3 µM) y Kin (5.8 µM). Además, de obtenerse plántulas, las semillas también formaron callos. La inducción de organogénesis directa fue a partir de explantes de secciones transversales basales del tallo disecadas de las plántulas; las cuales se sembraron, en medio MS adicionado con BA (11.1 µM) y AIA (1.0 µM). La regeneración de plántulas vía organogénesis indirecta se logró a partir de callos con las concentraciones hormonales antes señaladas. En ambas rutas morfogénicas las plántulas formaron raíces en el mismo medio de cultivo y concentraciones hormonales. La aclimatación de plantas fue del 90% en sustrato de agrolita y peat-moss (proporción 1:1). La evaluación *in vitro* de los genotipos susceptibles y resistentes a la roya de la hoja, fue detectada en plántulas crecidas en medio de cultivo basal MS (1962) suplementado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>) inoculando las plántulas con *Puccinia triticina* E., (0.3 g L<sup>-1</sup>). Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son una herramienta para el mejoramiento genético convencional para distinguir genotipos seleccionados en campo de materiales susceptibles o resistentes a enfermedades. Esta es la primera investigación en que se aplica.

Palabras clave: roya, selección, *in vitro* e *in vivo*, susceptibilidad, variación somaclonal.

## ABSTRACT

### **GENETICS OF DURUM WINTER WHEAT RESISTANCE TO *Puccinia triticina* Eriks AND ITS RESPONSE *in vitro*.**

**Laura Marisa Delgado Sánchez, M.C.  
Colegio de Postgraduados**

Wheat (*Triticum turgidum* ssp. *Durum*) is a cereal grass family. During 2002-2012 it was a production in Mexico of 22 million hectares. One of the major problems faced wheat is the leaf rust caused by *Puccinia triticina* E., widely devastating disease. The objectives of this research were: 1) To determine the presence of a resistant to leaf rust in seedling stage among a select group of 51 genotypes of durum wheat in greenhouse; 2) Evaluate two tolerant wheat genotypes susceptible and resistance of leaf rust under *in vitro* conditions. Genotypes "Mirlo 26" and "Elinia 48" as resistant to rust race BBG/BPC in the progeny of crosses with the susceptible genotype "Atred" were detected. In "Elinia 48" the resistance was associated with a dominant and one recessive gene for "Mirlo 26". The *in vitro* seed germination of the three genotypes was obtained on Murashige and Skoog medium (1962, MS) supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>); 2,4-D (20.3 µM) and Kin (5.8 µM). Direct induction of organogenesis was from explants basal stem cross sections dissected from seedling. They were planted on MS medium supplemented with BA (11.1 µM) and AIA (1.0 µM). Seedling regeneration was achieved through indirect organogenesis from callus with the hormone level concentrations before mentioned. Both way morphogenic seedling roots formed in the same culture medium and hormone levels. Plant acclimatization was 90% on substrate perlite and peat-moss (1:1). *In vitro* evaluation of susceptible and resistance to leaf rust genotypes was detected in seedlings grown on MS basal medium supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>) by inoculating with *Puccinia triticina* E (0.3 g L<sup>-1</sup>). Plant Tissue Culture Techniques *in vitro* are a tool for conventional breeding to distinguish selected genotypes in the field susceptible or resistant to diseases materials. This is the first investigation in which es applied.

**Key words:** rust, selection, *in vitro* e *in vivo*, susceptibility, somaclonal variation.

## DEDICATORIA

### ***A mis padres Leonila Sánchez Morales y Román Delgado Fonseca:***

Porque nunca me dejan vencer, ya que con su inmenso amor y comprensión me brindan la fortaleza que necesito en la vida, son ejemplo de esfuerzo y dedicación cada día, símbolo de fé, confianza pero sobre todo amor. Las personas más importantes que Dios envió a mí vida y que a través de ustedes y con su inmenso apoyo todo se vuelve más fácil. Me han enseñado muchas cosas pero sobre todo el amor, la dedicación y la honestidad en todo que realizo. Los amo mucho papás.

### ***A mí hermano y mi cuñada Iván Delgado Sánchez y Alma Lilia Benítez Cerón:***

Mis grandes confidentes mis entrañables amigos, las personas que jamás se rinden aunque el cansancio los haya vencido nunca claudican, mí ejemplo de trabajo y valentía y sobre todo de amor, porque cada instante han estado conmigo no importando lo que pase, ejemplo para mí vida puesto que no importa que tan difícil sea el camino nunca se dejan vencer. Los quiero mucho.

### ***A mí amiga Natalia Ayala Hernandez:***

La persona que ha estado conmigo en cada instante por que estuviste a mí lado en momentos muy difíciles, por ser quien me daba una palabra de aliento. Una mujer admirable y sincera que siempre me escucha y me aconseja, por acompañarme, animarme. Gracias amiga te quiero mucho.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por brindarme el apoyo económico para poder realizar mis estudios en el Colegio de Postgraduados.

Al **INIFAP** campo experimental CEVAMEX por las instalaciones prestadas para la realización del proyecto.

**Dra. María Cristina Guadalupe López Peralta.** Gracias por ser una mujer admirable, la persona que confío en mí, que me brindo sus incomparables consejos, por ser mi guía en mi estancia. Gracia por darme una oportunidad y por apoyarme tanto.

**Dr. Julio Huerta Espino.** Agradezco la dirección en el trabajo, por todo el conocimiento compartido, gracias por su comprensión. Por escucharme y por el apoyo en cada momento. Un ejemplo en mi vida.

**Dr. Ignacio Benítez Riquelme** por su conducción en esta investigación

**Dr. Eleodoro Hernandez Meneses** por su gran labor y dirección en la realización de la tesis, y por su enorme paciencia.

**Dr. Marc Ellis Harvey** gracias por las grandes oportunidades brindadas, por la inmensa confianza y por ser el precursor de mis estudios de maestría.

**Natalia Ayala Hernandez** mi compañera de laboratorio y apreciable amiga quien se convirtió en mi mejor amiga y mi consejera, por su inmenso apoyo dentro y fuera del colegio de postgraduados.

**Lic. Lucía Gutiérrez Peralta** por ser mi guía, dirección, fortaleza, gracias por darle luz a mi camino y por ser la persona que Dios envió para que cambiará mi vida.

Leonila Sánchez Morales por ser mi fortaleza, por enseñarme que la vida aunque parezca difícil siempre tiene una razón de ser, por ser la persona que siempre me

apoya en cada instante de mí vida, y que siempre me alienta a ser mejor cada día, gracias por todo tú inmenso amor. Eres la mujer que más admiro ejemplo de valentía.

**Román Delgado Fonseca** por ser el mejorador triguero y el padre que más admiro, gracias por que me enseñas que la vida siempre nos regala algo maravilloso solo es cuestión de paciencia por el gran apoyo que me brindas a cada momento y tu gran comprensión. Te quiero mucho.

**Alma Lilia Benitez Cerón** por ser más que mí cuñada mí amiga, mí consejera, compañera, por el gran apoyo cada instante de mí vida. Gracias por ayudarme siempre, te quiero mucho.

**Iván Delgado Sánchez** gracias hermano por nunca dejarme sóla, te admiro muchísimo por ser una persona llena de logros, por ser una persona muy valiente y noble ante la vida. Que no se deja vencer aunque el cansancio se muy grande.

**Majatma Neftali Pardo López** por nunca dejarme claudicar, por enseñarme el significado de la fé y de la amistad, porque siempre has estado conmigo sin importar cualquier circunstancia.

**Ariadna Escalona Rodríguez** por siempre escucharme, acompañarme en cualquier momento gracias porque siempre tienes una palabra de aliento. .

**Gabriela Mendoza Mendoza** gracias confiar en mí por no dejarme caer, por escucharme apoyarme y darme tú inmenso cariño.

**Alejandro Cortez y Victor Rosas** quienes siempre han sido mis grandes amigos y un apoyo incondicional, por sus sabios consejos y la gran confianza.

***Dios gracias por darme esta gran oportunidad, por darme vida, paz, amor. Te amo Dios.***

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ÍNDICE DE APÉNDICE</b> .....	<b>xviii</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>20</b>
1. Planteamiento del problema .....	20
2. Objetivos.....	22
2.1 Generales.....	22
2.2 Específicos.....	22
3. Hipótesis .....	23
4. Revisión de Literatura .....	24
4.1 Descripción botánica del trigo .....	24
4.1.2 Origen y distribución del trigo .....	26
4.1.3 Producción de trigo.....	27
4.2 Las royas.....	27
4.2.1 Roya de la hoja.....	28
4.2.2 Epidemiología .....	29
4.2.3 Hospedante .....	30
4.2.4 Sintomatología de <i>P. triticina</i> E.....	31
4.2.6 Virulencia.....	33
4.3 Razas fisiológicas .....	34
4.3.1 Agresividad.....	35
4.4 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	35
4.4.1 Explante.....	35
4.5 Morfogénesis <i>in vitro</i> .....	36
4. 5.1 Embriogénesis somática <i>in vitro</i> .....	37



4.5.2 Factores que afectan los procesos morfogénicos.....	38
4.6 Medio de cultivo .....	39
4.6.1 Componentes inorgánicos del medio de cultivo.....	39
4.6.2 Fitohormonas.....	40
4.6.2.1 Auxinas .....	40
4.6.2.2. Citocininas.....	41
4.6.2.3 Etileno .....	42
4.6.2.4 Giberelinas .....	42
4.6.2.5 Ácido abscísico .....	43
4.7 Asepsia .....	43
4.9 Variación somaclonal .....	46
4.9.1 Selección <i>in vitro</i> .....	46
5. Literatura citada.....	48
<b>CAPÍTULO I. GENÉTICA DE LA RESISTENCIA DE TRIGOS CRISTALINOS DE HÁBITO INVERNAL A <i>Puccinia triticina</i> Eriks .....</b>	<b>53</b>
1.1 Introducción.....	53
1.2 Materiales y métodos .....	55
1.2.1 Material genético de trigo cristalino .....	55
1.2.2 Razas del patógeno .....	55
1.2.3 Genética de la resistencia .....	56
1.2.4 Obtención de F1, F2 y familias F3 .....	58
1.2.5 Evaluación de genotipos, líneas F2 y familias F3 .....	58
1.2.6 Inoculación de plantas F2 y Familias F3 .....	60
1.2.7 Variables medidas.....	61
1.2.8 Obtención de líneas resistentes con hábito de primavera.....	62
1.2.9 Análisis estadístico.....	62
1.3 Resultados y discusión.....	64
1.3 Conclusiones.....	71
1.4 Recomendaciones.....	71
1.6 Literatura citada.....	73
<b>CAPITULO II. RESISTENCIA <i>in vitro</i> EN TRIGOS CRISTALINOS DE HÁBITO INVERNAL A <i>Puccinia triticina</i> Eriks .....</b>	<b>76</b>

2.1	Introducción.....	76
2.2	Materiales y métodos .....	79
2.2.1	Material vegetal.....	79
2.2.2	Medio de cultivo y condiciones de incubación.....	79
2.2.3	Germinación <i>in vitro</i> .....	80
2.2.3.1	Establecimiento del cultivo aséptico .....	80
2.2.3.2	Inducción de la germinación .....	80
2.2.3.3	Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	81
2.2.4	Inducción de callos.....	81
2.2.5	Regeneración de plantas vía organogénesis directa e indirecta .....	82
2.2.5.1	Organogénesis directa.....	82
2.2.5.2	Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	83
2.2.5.3	Organogénesis indirecta .....	83
2.2.6	Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	83
2.2.7	Aclimatación de plántulas.....	84
2.2.8	Inoculación de <i>Puccinia triticina</i> E.....	84
2.2.8.1	Raza del patógeno.....	84
2.2.8.2	Inoculación en las plantas .....	84
2.2.8.3	Variables cuantificadas y análisis estadístico .....	85
2.2.9	Inoculación de roya <i>in vitro</i> .....	85
2.2.9.1	Inoculación de roya de la hoja con rocío .....	85
2.2.9.2	Inoculación de roya de la hoja sin exposición a rocío.....	86
2.3.	Resultados y discusión.....	88
2.3.1	Establecimiento del cultivo aséptico.....	88
2.3.2	Inducción de la germinación.....	90
2.3.3	Inducción de callos.....	91
2.3.4	Regeneración de plantas vía organogénesis directa e indirecta .....	94
2.3.4.1	Organogénesis directa.....	94
2.3.4.2	Obtención de brotes a partir Organogénesis indirecta.....	96
2.3.5	Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	97
2.3.6	Aclimatación de plántulas.....	98
2.3.7	Inoculación de <i>Puccinia triticina</i> E., en plantas aclimatadas de trigo .....	100

2.3.8 Inoculación de roya de la hoja con rocío .....	106
2.3.9 Inoculación de roya de la hoja sin exposición a rocío .....	108
2.4 Conclusiones.....	116
2.5 Recomendaciones.....	117
2.6 Literatura citada.....	118
CONCLUSIONES GENERALES.....	122
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>124</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Genotipos de trigos cristalinos de hábitos invernales evaluados en plántula por su resistencia a la roya de la hoja.....	56
Cuadro 2. Respuesta del hospedante y reacciones producidas por la infección de la roya de la hoja <i>Puccinia triticina</i> E. (Roelfs <i>et al.</i> , 1992). .....	59
Cuadro 3. Respuesta de los 51 genotipos de trigos duros en estado de plántula a las razas de roya de la hoja BBB/BNJ y BBG/BPC.....	65
Cuadro 4. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en plantas F2 de la cruce entre las variedades Atred y Mirlo 26 en respuesta a la raza BBG/BPC de roya de la hoja. ....	67
Cuadro 5. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en plantas F2 de la cruce entre las variedades Atred y Elinia 48 en respuesta a la raza BBG/BPC de roya de la hoja .....	67
Cuadro 6. Comportamiento de la resistencia a roya de la hoja en plantas F1 con las cruces con Elinia 48/Mirlo 26 y la raza BBG/BPC .....	68
Cuadro 7. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en plantas F2 de la cruce entre “Atred” y “Mirlo 26” y “Atred” y “Elinia 48” en respuesta a la raza BBB/BNJ.....	68
Cuadro 8. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en plantas F2 de la cruce entre “Mirlo 26” y “Elinia 48” en respuesta a la raza BBB/BNJ.....	68
Cuadro 9. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en familias F3 de la cruce Mirlo 26/Elinia 48 en respuesta a la raza BBB/BNJ.....	69
Cuadro 10. Tratamientos probados para la desinfección de semillas de los genotipos de trigo “Atred”(S), “Elinia 48” (R) y “Mirlo 26” (R).....	80

Cuadro 11. Dosis de 2, 4-D y cinetina adicionadas al medio de cultivo MS (1962) en la germinación de los genotipos de trigo “Atred” (S), “Elinia 48” (R) y “Mirlo 26”(R). .... 81

Cuadro 12. Concentraciones de 2,4-D y cinetina evaluadas en la inducción de callos de de los genotipos de trigo “Atred” (S), “Elinia 48”(R) y “Mirlo 26” (R)..... 82

Cuadro 13. Dosis de BA y AIA evaluadas en la inducción de brotes en la organogénesis directa e indirecta de los genotipos de trigo “Atred”(S), “Elinia 48”(R) y “Mirlo 26”(R)82

Cuadro 14. Germinación *in vitro* de semillas de tres genotipos de trigo, tres semanas después de la siembra en medio de cultivo MS (1962) y diferentes dosis de 2,4-D y Kin. .... 90

Cuadro 15. Contaminación *in vitro* de tres genotipos “Atred” (S). “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) de trigo a los cinco días después de la inoculación del patógeno *Puccinia triticina* E..... 110

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del trigo <i>Triticum aestivum</i> (Reynolds <i>et al.</i> , 2014).....	25
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Puccinia graminis</i> f.sp. <i>tritici</i> y ciclo de enfermedad de la roya de la hoja del trigo (Singh <i>et al.</i> , 2001).....	34
Figura 3. Escalas para evaluar el tipo de infección de la roya de la hoja <i>Puccinia triticina</i> E. (Roelfs <i>et al.</i> , 1992).....	59
Figura 4. Proceso de inoculación de la roya <i>Puccinia triticina</i> E: (a) Inoculación de la roya en charolas con 48 orificios (b) Cámara de humidificación. (c) Inicio de rocío. (d) Humificador (Hydrofogger). (e) Plantas después de 16 h de rocío posterior a la aplicación de rocío. (f) Aparición de signos de la roya de la hoja.....	61
Figura 5. Protocolo para la evaluación y obtención de la resistencia de trigos cristalinos de hábito invernal a <i>Puccinia triticina</i> Eriks. ....	63
Figura 6. Clasificación de los genotipos para la raza BBB/BNJ de <i>Puccinia triticina</i> E., “Atred” (a) Primera hoja. (b) Segunda hoja. “Elinia 48” (c) Primera hoja. (d) segunda hoja. “Mirlo 26” (e) Primera hoja. (f) Segunda hoja. Para la raza BBG/BP: “Atred” (g) Primera hoja. (h) Segunda hoja. “Elinia 48” (i) Primera hoja. (j) Segunda hoja. “Mirlo 26” (k) Primera hoja. (l) Segunda hoja. ....	64
Figura 7. Protocolo empleado para la regeneración de plantas de trigo <i>Triticum Durum</i> y la inoculación de roya de la hoja. ....	87
Figura 8. Supervivencia de semilla de tres variedades de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a los 15 días después de siembra. (T1) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2% v/v) 21 min, Plata coloidal (10% v/v)+Tween <sup>®</sup> 20 (4% v/v)+NaClO (50% v/v) 30 min, Benlate <sup>®</sup> (8g L <sup>-1</sup> ) +Captán <sup>®</sup> (8g L <sup>-1</sup> ) 30 min. (T2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2% v/v) 21 min, Plata coloidal (10% v/v)+Tween <sup>®</sup> 20 (4% v/v)+NaClO (50% v/v) 30 min, Benlate <sup>®</sup> (8g L <sup>-1</sup> ) +Captán <sup>®</sup> (8g L <sup>-1</sup> )	

30 min., Vitavax® 300, 20 min. (T3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2% v/v) 22.5, Plata coloidal (10%v/v)+Tween®20 (4%v/v)+NaClO (50% v/v) 40 min, Benlate® (8g L<sup>-1</sup>) +Captán® (8g L<sup>-1</sup>) 50 min..... 89

Figura 9. Inducción de callos en el genotipo “Atred” (S) con 2,4-D (11.3 µM) y Kin (5.8 µM). (a) Callos de trigo a los 60 días de su siembra. (b) Callos con diferenciación de brotes. .... 91

Figura 10. Producción de callos *in vitro* en semillas de genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a los 30 d después de la siembra en medio de cultivo MS (1962) y diferentes concentraciones de 2,4-D y cinetina. .... 92

Figura 11. Peso final de callos de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R), “Elinia 48” (R) en la inducción de callos a los 30 días después de ser cultivados *in vitro*. n = 20. .... 93

Figura 12. Obtención de plántulas vía organogénesis directa para el genotipo “Atred” (S). (a) Sección transversal basal de tallo. (b) Planta de trigo con un aproximado de 12 hojas. (c) Plantas de trigo con una altura máxima 4 cm. .... 94

Figura 13. Respuesta de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R), “Elinia 48” (R) en organogénesis directa a partir de explantes de secciones transversales basales de tallo. n = 20..... 95

Figura 14. Respuesta *in vitro* de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) en la organogénesis indirecta. n = 20..... 97

Figura 15 . Respuesta de tres genotipos de trigo “Atred (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) en el enraizamiento *in vitro*. n = 20..... 98

Figura 16. Aclimatación de plantas de los genotipos de trigo “Atred” (S), “Elinia 48” (R) y “Mirlo 26” (R). (a) Plantas del genotipo “Atred” (S) a los 10 días después de su

aclimatación. (b) Plantas del genotipo “Elinia 48” (R) a los 30 días después de su aclimatación. (c) Plantas en fase de espigamiento a los 40 días después de su aclimatación. (d,e) Plantas de “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) con 90% de espigamiento a los 50 días después de su aclimatación. (f) Plantas de “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) próximas a la cosecha a los 90 días después de su aclimatación. .... 100

Figura 17. Plantas aclimatadas del genotipo “Atred” (S) inoculadas con roya de la hoja. (a) Inoculación de *Puccinia triticina* E. (b) Plantas con rocío (c,d) Planta con signos de roya. .... 101

Figura 18. Respuestas de dos genotipos de trigo a la inoculación con *Puccinia triticina* E. (a) “Atred” (S) genotipo con características de resistencia, plántula con 5 cm de altura. (b) “Elinia 48” (R) genotipo con características de susceptibilidad plántula con 10 cm de altura. (c) Plántulas del genotipo susceptible “Atred” sin síntomas de susceptibilidad cambios en su respuesta, plántulas con 15 cm de altura. .... 102

Figura 19. Respuesta de roya de la hoja en plántulas de trigo aclimatadas bajo condiciones de invernadero. (a) Reacción de sensibilidad en “Elinia 48” (R). (b) Reacción de susceptibilidad para “Elinia 48” (R) (c) Reacción de resistencia para “Atred” (S) a los 12 días después de la inoculación. .... 103

Figura 20. Proceso de inoculación de la roya *Puccinia triticina* E. *in vitro* en los genotipos de trigo “Atred” (S) “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R). (a) Frascos en invernadero a temperatura de  $26.0 \pm 2$  °C. (b) Esporas suspendidas con aceite mineral. (c) Inoculación de las esporas. (d) Frascos colocadas en cámara de humedad. (e) Plantas después de 3 h de rocío. (f) Frascos cerrados con rocío. .... 107

Figura 21. Resultados de la inoculación de roya de la hoja con rocío *in vitro*. (a) Material susceptible “Atred” con pústula de *Puccinia triticina* E. (b) Material resistente “Elinia 48”. (c) Material resistente “Mirlo 26” con pústulas de roya de la hoja. (d) “Atred” (S) con pústulas en la parte superior de la hoja. pr: pústula de roya. .... 108



Figura 22. Respuesta de plántulas de tres genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) de trigo a la roya de la hoja *Puccinia triticina* E., a los 20 días después de su inoculación. .... 109

Figura 23. Respuesta de plántulas de tres genotipos de trigo “Atred” (S) “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a la roya de la hoja *Puccinia triticina* a las cuatro semanas de inoculación. .... 111

Figura 24. Respuesta de sensibilidad en el genotipo “Atred” (S). (a) Plántula con humedad presente en el frasco. (b y c) Aparición de pecas de color blanco en las hojas. .... 112

Figura 25. Roya de la hoja *in vitro* sin rocío a los 20 días después de la inoculación de *Puccinia triticina* E. (a) Aparición de pústulas del patógeno en el genotipo “Atred” (S). (b) Pústula del patógeno en la base de la planta del genotipo “Mirlo 26” (R). (c) Pústula a los 25 días después de su inoculación con muerte de hoja en el genotipo “Atred” (S). (d) Pústula en la parte inferior de la planta del genotipo “Elinia 48” (R). pr pústula de roya. .... 113

Figura 26. Plántulas *in vitro* sensibles a roya de la hoja. (a) Genotipo “Atred” (S) con pústulas de roya a los 20 días después de su inoculación. (b) Muerte del genotipo “Atred” (S) después de la aparición de roya de la hoja *in vitro*. .... 114

Figura 27. Comportamiento de la aparición de pústulas en plántulas de trigo *in vitro*. (a, b y c) Genotipo “Atred” (S) a las cuatro semanas después de su inoculación. (d) Genotipo “Mirlo 26” (R). (e) Genotipo “Atred” (S) a las cinco semanas de su inoculación. (f) Genotipo “Elinia 48” (R) a las cuatro semanas después de su inoculación ..... 115

## ÍNDICE DE APÉNDICE

1. Respuesta de genotipos en estado de plántula con la raza BBB/BNJ y BBG/BPC .....	124
2. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de contaminación y supervivencia <i>in vitro</i> de los genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R). .....	127
3. Respuesta de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a la inducción de callos embriogénicos cultivados <i>in vitro</i> . Promedio de 20 repeticiones, con una semilla cada unidad experimental. Porcentaje de callos (PC), Peso de callos (PDC). .....	127
4. Respuesta organogénica de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) sometidos a diferentes concentraciones de Benciladenina (BA) medida en número de brotes por explante (BE) , Logitud de brotes (LB), Número de hojas por explante (NH) de los genotipos mediante la evaluación en organogénesis directa. 127	
5. Respuesta organogénica de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (resisntete) y “Elinia 48” (R) sometidos a diferentes concentraciones de Benciladenina (BA) medida en número de brotes por explante (BE), Longitud de brotes (LB), Número de hojas por explante (NH) de los genotipos mediante la evaluación en organogénesis indirecta. ....	128
6. Enraizamiento de tres genotipos de trigo genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) sometidos a diferentes concentraciones de Benciladenina (BA) medida en número de raíces (NR) , Logitud de raíces (LR). .....	128
7. Respuesta de las 48 líneas en estado de plántula con la raza BBB/BNJ.....	129
8. Respuesta de las 48 líneas en estado de plántula con la raza BBB/BNJ.....	130

9. Respuesta de las 48 líneas en estado de plántula con la raza BBB/BNJ..... 131

10. Respuesta de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a la inoculación de roya de la hoja *Puccinia triticina* E., con rocío metodología *in vitro*.  
..... 132

11. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de contaminación y supervivencia *in vitro* de los genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R). ..... 132

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. Planteamiento del problema

En México la producción de trigo (*Triticum ssp.* L.) fue de 37 millones de toneladas en el periodo 2002-2012; es uno de los cereales más cultivados a nivel mundial con 240 millones de hectáreas. El 37% de la población utiliza al trigo como su principal alimento; aporta alrededor de 20% de calorías consumidas diariamente por el hombre. El trigo se cultiva en varios estados del país y se adapta a suelos pobres y ricos en nutrientes, en zonas húmedas, semiáridas y áridas. Las zonas trigueras más importantes en México son Sonora, Sinaloa Baja California, Guanajuato, Morelos, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla (SIAP, 2015).

A nivel mundial, la producción de trigo duro (*T. turgidum* var. *Durum*) se lleva a cabo en el Medio Oriente y África del Norte, Estados Unidos, Canadá, Asia y Europa. Ocupa casi 22 millones de hectáreas a nivel mundial y representa 10% del área total sembrada con trigo (Annone, 2006).

En México la roya de la hoja (*Puccinia triticina* E.) es una de las principales enfermedades diseminada en las regiones productoras de trigo de temporal, con excepción de las zonas secas. Si se siembra una variedad susceptible, lo más probable es que la roya de la hoja se presente, llegando a alcanzar niveles de infección severos, dependiendo de las condiciones climáticas. Por más de 20 años el trigo fue cultivado en pequeña escala en el Noroeste donde las variedades mostraron inmunidad a la roya de la hoja; sin embargo, cuando la producción incrementó se generaron condiciones propicias para que se presentara una nueva raza del patógeno denominada BBG/BN. En el trigo de temporal se han identificado alrededor de 50 razas fisiológicas del hongo causante de la roya de la hoja del trigo mediante un conjunto de líneas diferenciales que sólo poseen un gen de resistencia específico. Los muestreos hechos sobre las razas para vigilar las modificaciones de la virulencia en la población patógena se hacen con el fin de contribuir al desarrollo de variedades de trigo resistentes a las royas de los cereales, lo que explica el porqué de una variedad

susceptible en una región y resistente en otra, o porqué una variedad siendo resistente, se torna susceptible dependiendo de la raza localizada en diferentes altitudes o zonas climáticas (Rodríguez *et al.*, 2009).

La interacción entre hospedante (trigo) y patógeno (*Puccinia*) sigue un patrón de comportamiento que se ajusta a la teoría de gen a gen, que indica que por cada gen de resistencia en la planta existe un gen correspondiente de avirulencia en el patógeno (Flor, 1971). En roya de la hoja, existe una diferencia de avirulencia y desarrollo de la enfermedad marcada entre las poblaciones del patógeno que afectan a trigos harineros (Singh, 1991; Ali *et al.*, 1994; Singh y Dubin, 1997), trigos duros (Huerta y Roelfs, 1989; Ali *et al.*, 1994) y triticale (Singh, 1991). La roya de la hoja puede causar pérdidas hasta del 100% del rendimiento; provoca una disminución significativa del número de granos por espiga, el peso hectolitro y la calidad del grano. Por tal motivo, es importante enfocar el mejoramiento genético de trigo para desarrollar opciones de control o la generación de líneas resistentes a esta enfermedad (Quintero, 1995).

Las pruebas en campo requieren considerable superficie de terreno y tiempo para completar las evaluaciones. Una opción viable es la micropropagación que permite la obtención de gran cantidad de plantas libres de enfermedades y genéticamente estables e idénticas a la planta madre. Las plantas aclimatadas y en cultivo *in vitro* pueden usarse para evaluaciones de resistencia y susceptibilidad de algún patógeno y con la roya de la hoja (Domínguez *et al.*, 2008).

En algunas gramíneas como cebada, trigo y arroz se aplican las Técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* para obtener líneas puras y generar nuevas variedades. En trigo harinero las técnicas *in vitro* contribuyeron a obtener la variedad Mackellar con resistencia viral y que se cultiva en Australia desde el año 2003. En apio y tomate se han obtenido variedades resistentes a hongos. Uno de los métodos especializados en el mejoramiento genético es el cultivo de embriones (Larkin, 2004).

La inoculación de roya de la hoja *in vitro* es una opción para la evaluación del patógeno en trigo puesto que representa ventajas importantes para el mejoramiento genético a nivel de producción, disminución de costos y tiempo en la aparición de la enfermedad.

## 2. Objetivos

### 2.1 Generales

- Efectuar cruzamientos entre variedades susceptibles y resistentes a la roya *Puccinia triticina* E.
- Seleccionar genotipos de trigo resistentes a roya de la hoja a través del cruzamiento con el progenitor susceptible “Atred” y su progenie.
- Determinar la presencia de un gen resistente a la roya de la hoja en estado de plántula dentro de un grupo selecto de 51 genotipos de trigos duros en invernadero.
- Evaluar dos genotipos tolerantes y uno susceptible a la roya de la hoja bajo condiciones *in vitro*.

### 2.2 Específicos

- Identificar nuevas fuentes de resistencia a la roya en 51 genotipos de trigos cristalinos de hábito invernal con diferente grado de susceptibilidad y resistencia a la raza BBG/BPC.
- Obtener genotipos con características de resistencia a roya de la hoja.
- Desarrollar un protocolo de regeneración *in vitro* de tres genotipos de trigo vía organogénesis, así como su aclimatación a condiciones de invernadero.
- Identificar bajo condiciones *in vitro* la respuesta de algunas variedades de trigo tolerantes y susceptibles a la roya de la hoja.
- Evaluar la respuesta de plantas de trigo inoculadas con *Puccinia triticina* E. bajo condiciones *in vitro*.

### 3. Hipótesis

- Dentro de los 51 genotipos de trigo cristalino de hábito invernal existen algunos resistentes a la raza BBG/BPC de roya de la hoja en estado de plántula obtenidos mediante el cruzamiento con un genotipo susceptible (“Atred”).
- La obtención de plantas *in vitro* vía organogénesis es una nueva opción para el análisis de la roya de la hoja en trigo.
- Las plantas de trigo se aclimatan satisfactoriamente en condiciones de invernadero.
- La evaluación de roya de la hoja *in vitro* es un procedimiento novedoso que permite comprobar genotipos de trigo susceptibles y resistentes.

## 4. Revisión de Literatura

### 4.1 Descripción botánica del trigo

El trigo (*Triticum sativum* Lam. = *Triticum aestivum* L.) es un cereal de la familia de las gramíneas, a la que pertenecen también otros cereales como el arroz, maíz, avena y sorgo. Es una planta anual herbácea de hasta 1.2 m de altura. Los tallos son erectos y presentan estructura de caña, es decir, son huecos en su interior excepto en los nudos. El crecimiento de los tallos no es apical sino que se produce por el estiramiento de los meristemas situados por encima de los nudos. Las hojas se forman en los nudos; al igual que el resto de las gramíneas; presentan dos partes: la vaina que rodea al peciolo y protege el meristemo y el limbo que tiene forma alargada y presenta nervios paralelos. Las flores se reúnen en espigas, cada espiga consta de un eje principal o raquis sobre el que se distribuyen lateralmente las espiguillas. Éstas constan de un eje principal del que emergen las flores (Reynolds *et al.*, 2014).

#### 4.1.1 Estructura del trigo

1. Altura planta que varía entre los 30 y 180 cm.
2. El tallo es recto, cilíndrico y con nudos.
3. El nudo es sólido; la mayoría de los trigos tienen seis nudos aproximadamente.
4. La hoja es lanceolada, con un ancho de 0.5 a 1.0 cm y una longitud de 15.0 a 25.0 cm; cada planta tiene de cuatro a seis hojas.
5. La lígula es de longitud media.
6. La aurícula es despuntada y tiene pelos: la lígula y la aurícula sirven en la identificación de las plántulas
7. Plántula: las hojas se despliegan al emerger, giran en el sentido de las manecillas del reloj; es también una característica para la identificación taxonómica.
8. Amacollamiento; las plantas producen macollos de número variable, generalmente de dos a siete.



9. Las raíces son semejantes a las de la cebada y avena.
10. Las raíces permanentes o secundarias emergen del primer nudo.
11. Raíces que nacen a partir de la semilla. Normalmente existen cinco raíces seminales, una radical o primaria y cuatro laterales, que funcionan durante la vida de la planta (Figura 1).

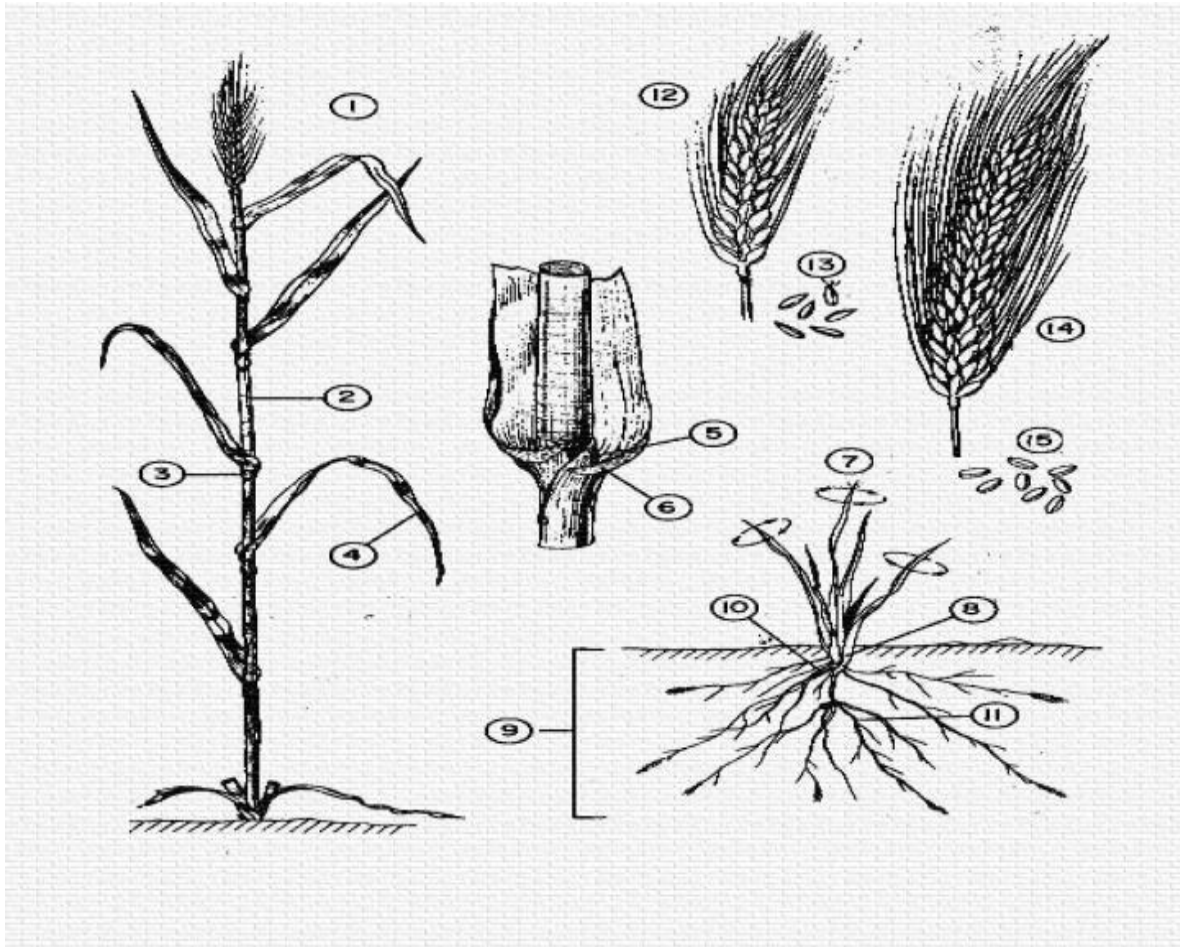


Figura 1. Morfología del trigo *Triticum aestivum* (Reynolds *et al.*, 2014).

12. La espiga del trigo macarrón es densa y corta; consiste en una infinidad de espiguillas que terminan en una arista o barba.

13. Los granos del trigo macarrón son generalmente alargados, puntiagudos, durísimos y de color ámbar rojizo.
14. Espiga del trigo común.
15. Los granos del trigo común pueden ser blandos o duros.

#### 4.1.2 Origen y distribución del trigo

Al género *Triticum* pertenecen las plantas cultivadas y silvestres que se pueden clasificar dentro del grupo de los trigos; los cuales están constituidos por especies diploides, tetraploides y hexaploides, en función del número de genomas que constituyen su número básico duplicado de siete cromosomas. Las especies silvestres de trigo *T. boeoticum* que poseen el genoma AA (especies diploides) se desarrollaron al suroeste de Asia, antes del inicio de la agricultura y fue domesticado en esta región junto con *T. dicoccoides*. Las especies silvestres de *T. monococcum* están ampliamente distribuidas desde los Balcanes hasta Irán, en hábitat naturales de malezas, a las orillas de carreteras y caminos (Solís, 2000).

Con respecto a las especies tetraploides, *T. dicoccoides* probablemente estuvo en el campo mucho antes que el principio de la agricultura y su origen estuvo generado mediante la cruce de *T. boeoticum* (genoma AA) y otra especie diploide muy semejante a *Aegilops*, seguido de un doblamiento en el número cromosómico en híbrido para dar origen a la combinación AABB. *T. Durum* (trigo macarronero o duro) se originó en el mediterráneo mediante la mutación en *T. dicoccum*, principalmente para genes QQ que promueven y determinan la dureza del grano, glumas compactas y raquis quebradizo al gene alternativo qq que determina suavidad del grano, glumas con mayor o menor soltura y raquis fuerte. Las principales variedades modernas de trigos tetraploides, duros o macarroneros son cultivados en áreas semiáridas del mundo. En la India, la cuenca del mediterráneo, la ex Unión Soviética y las áreas de temporal de las grandes planicies de Norte América (Huerta y Skovmand, 2000).

### 4.1.3 Producción de trigo

Según las proyecciones, la producción mundial de trigo aumenta 1.3% al año. Esto representa un incremento de aproximadamente 12 millones de toneladas anuales. Se prevé que la producción de trigo aumentará a un ritmo más rápido durante el período 2012-2015 que en los años 1990, sostenido por un decidido impulso registrado en los países en transición y por un crecimiento más rápido en los principales países productores de trigo de América Latina y el Caribe.

En México, el trigo duro es una de las especie más cultivadas, ya que tiene mejores rendimientos y es más resistente a las enfermedades, por lo tanto existe un aumento de la superficie sembrada, unido a un cierto incremento de los rendimientos. Por lo que se refiere a los países en desarrollo, se prevé un aumento de la producción de trigo de 1.2% anual. Entre los factores principales que contribuyen a esta desaceleración es el lento crecimiento de la mejora de los rendimientos, debido principalmente a los problemas de escasez de agua unidos a las posibilidades más limitadas de lograr nuevas tierras productivas (FAO, 2015).

### 4.2 Las royas

La producción de trigo se ve afectada por la presencia de enfermedades, entre las más comunes, son las causadas por hongos, donde las royas son las de mayor distribución e importancia.

Se conocen tres tipos de royas: a) La roya del tallo (*Puccinia graminis* Pers. F. sp. *Tritici*) también llamada roya negra, b) La roya lineal o amarilla (*Puccinia triiformis* West. F.sp. *Tritici*) y c) La roya de la hoja (*Puccinia triticina* Eriks) conocida también como roya café. Esta última es considerada la más común ya que se encuentra en todos los lugares donde se siembra trigo (Huerta y Singh, 2000).

Las pérdidas ocasionadas por las royas pueden ser del 100% del rendimiento causando graves epidemias por lo que las investigaciones sobre este patógeno se han

intensificado para controlar mediante el mejoramiento genético la enfermedad y para estudiar sus razas fisiológicas. El hospedante primario de la roya de la hoja del trigo es *Triticum aestivum* L.; sin embargo, *Triticum turgidum* var. *Durum* L., no queda exento de ser afectado por este patógeno. Huerta-Espino y Roelfs (1989) indican que en Europa, Asia, África y América del Norte y del Sur existen poblaciones de roya de la hoja que son patógenos de trigo duro, diferentes de las poblaciones que afectan al trigo harinero.

El daño fisiológico que provoca la roya de la hoja en la planta es sobre el desarrollo, llegando a ocasionar su muerte, ya que reduce el área fotosintética y causa pérdidas de agua y nutrientes; por lo tanto al reducir la fotosíntesis se debilita el sistema radical, los granos se arrugan, la formación de florecillas disminuye y todo se refleja en la baja en el rendimiento de grano (Roelfs, 1978).

#### 4.2.1 Roya de la hoja

La roya de la hoja o café se presenta en las láminas de las hojas, pero las vainas también pueden ser infectadas cuando se combinan las condiciones ambientales, elevadas las densidades del inóculo y la susceptibilidad de las variedades. Con frecuencia la enfermedad no muestra la producción abundante de teliosporas que presenta la roya del tallo al final de la temporada, y causa una lesión foliar de color café en lugar de las lesiones negras provocadas por la roya del tallo. Cuando la roya de la hoja produce teliosporas, generalmente se originan en las telias de la superficie de las hojas inferiores, que permanecen cubiertas por las células epidérmicas. Las pérdidas del rendimiento de granos son básicamente atribuibles a la menor formación de florecillas. Las epifitias graves cuando hay sequía provocan el arrugamiento de los granos. En unos pocos genotipos, las epifitias tempranas (antes del espigamiento) pueden matar las florecillas, los macollos y toda la planta (Singh, 1991).

#### 4.2.2 Epidemiología

*Puccinia recóndita* puede sobrevivir en las mismas condiciones ambientales que la roya de la hoja del trigo, siempre que se haya producido infección pero no esporulación. El hongo requiere períodos de rocío de tres horas o menos a temperaturas de alrededor de 20 °C para causar infección, provoca mayor número de infecciones cuando el período de rocío es más prolongado. Con temperaturas más bajas, ese período debe ser aún más extenso, por ejemplo a 10 °C se necesitan 12 horas de rocío. Ninguna o muy pocas infecciones se producen cuando las temperaturas durante el período de rocío son superiores a los 32 °C o inferiores a los 2 °C. La mayoría de las epifitias graves se presentan cuando los uredinios y/o las infecciones latentes sobreviven al invierno en cierto nivel de umbral en el trigo, o cuando en el trigo sembrado en primavera recibe tempranamente inóculo exógeno, por lo general antes del espigamiento (Annone, 2006).

Se suelen producir epifitias y pérdidas graves cuando la hoja bandera se infecta previo a la antesis. En ocasiones el trigo sembrado en otoño puede ser intensamente infectado con lo cual se reduce el desarrollo de las raíces, el macollamiento, la supervivencia al invierno e incluso se produce la muerte de las plantas antes de la antesis. A veces la enfermedad que se desarrolla a fines del otoño y el inicio del invierno termina cuando las hojas más viejas infectadas mueren y una combinación de humedad y temperaturas desfavorables limitan su propagación a las hojas más nuevas. En primavera, se produce un fenómeno similar, cuando las temperaturas diurnas son suficientemente altas (un promedio de 10 °C) para que la planta crezca, no llueve y las condiciones durante la noche no son propicias para la formación de rocío o las bajas temperaturas causan heladas. Cuando llueve durante el día se producen algunas infecciones, pero con frecuencia las temperaturas nocturnas limitan el número de infecciones. El sistema de pronóstico de la roya de la hoja según los meses críticos se basa en la determinación de la gravedad al final de un período de rocío y temperaturas desfavorables, después de esa época la enfermedad progresa a un ritmo uniforme (Chen, 2013).

Los uredinios de la roya de la hoja que se desarrollan en la primavera a partir de infecciones producidas en el otoño o el invierno (inóculo endógeno), suelen encontrarse en la parte baja del follaje con las infecciones más antiguas en las hojas más bajas.

La roya de la hoja que se desarrolla a partir del inóculo transportado por el aire (exógeno) comúnmente se presenta en la parte alta del follaje y las hojas de más arriba son las infectadas. Sobre esta base, generalmente se puede distinguir si el inóculo es local o si ha sido transportado desde grandes distancias. Las proporciones a partir de un solo uredinio situado en la parte baja del follaje con frecuencia dan como resultado un foco de tejido muy infectado con un radio igual a la altura hasta la cual se ha difundido la infección. Esos focos generalmente tienen un metro de diámetro cuando la enfermedad llega a la hoja bandera. Las infecciones en la parte alta del follaje comúnmente provocan una rápida propagación horizontal. Cuando existe difusión horizontal del inóculo, las hojas banderas se ven muy afectadas pero hay muy poca o ninguna roya en las hojas inferiores de las plantas (Singh *et al.*, 2001).

#### 4.2.3 Hospedante

*Puccinia recondita* ataca a muchas gramíneas pero parece existir una especialización estricta en cuanto a la gama de hospedantes de las diversas formas especiales del hongo. *Puccinia recondita* sp. *tritici* es fundamentalmente un patógeno que afecta al trigo, sus antepasados inmediatos y al *triticale*. Actualmente existen evidencias suficientes para designar a *Puccinia triticina* E., como el agente causal de la roya de la hoja del trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) y dos subgrupos del trigo duro (*T. turgidum* sp. *durum* y sp. *dicoccoides*) (Hernández y Alvarado, 2011).

El hongo también produce sus gametos sexuales (pignidiosporas e hifas receptoras) en el hospedante alternativo. Los hospedantes alternos de *P. recondita* pertenecen a las familias Ranunculaceae y Boraginaceae. Varias especies de *Thalictrum*, *Anchusa* y *Clematis* e *Isopyrum fumaroides* también pueden ser hospedantes alternos (Singh *et al.*, 1993). La roya de la hoja que afecta al centeno (*Puccinia recondita* f. sp. *recondita*

o *P. recóndita* Rob. Ex. Desm) tiene como hospedante alternativo a *Lycopsis arvensis* y *Anchusa undulata* dentro de la familia Boraginaceae. Por lo tanto, existen dos organismos completamente diferentes a nivel de especie. La roya de la hoja del centeno no afecta a ningún miembro que tiene a *Thalictrum* como hospedante alternativo y a especies del género *Triticum*. La mayoría de los investigadores consideran que *Thalictrum speciosissimum* es el hospedante alternativo primario de *P. recóndita* f. sp. *Tritici* en Europa (Mazzilli *et al.*, 2007).

#### 4.2.4 Sintomatología de *P. triticina* E.

La infección de la roya de hoja, desarrollada por *P. triticina* E., se basa en la formación de pequeñas pústulas de color marrón, en las hojas con una distribución de dispersión aleatoria. Pueden agruparse en parches en los casos graves (Chen, 2013). Las esporas infecciosas se transmiten a través del suelo. El inicio de la enfermedad es lento, pero se acelera con temperaturas superiores a 15 °C, por lo que es una enfermedad presente generalmente en cereales maduros en verano (Duff *et al.*, 2006).

En una planta de trigo infectada, los síntomas pueden presentarse en cualquier momento después del establecimiento del cultivo. En general, todas las partes aéreas son susceptibles. Al iniciar se presentan manchas cloróticas de forma redonda u ovalada, después se desarrollan los uredinios o pústulas de color café rojizo-naranja, los cuales contienen masas de urediniosporas que se observan como un polvillo de color rojo-naranja sobre las láminas de las hojas como si estuvieran oxidadas o enmohecidas. Las pústulas o lesiones se distribuyen en el haz de las láminas de las hojas, pero en variedades susceptibles se les puede encontrar en vainas pedúnculos, glumas y aristas. Se ha observado que cuando una raza ataca a trigos duros, un alto porcentaje de pústulas también se pueden encontrar en el envés de la lámina (Singh *et al.*, 2002).

#### 4.2.5 Ciclo biológico

El hospedante alterno normalmente proporciona muy poco inóculo directo al trigo pero puede ser un mecanismo para los intercambios genéticos entre las razas y las poblaciones. En muchas zonas el patógeno sobrevive al período entre los silos de cultivo del trigo en un “puente verde” de trigo voluntario (cimarrón). El inóculo en forma de urediniosporas puede ser arrastrado por los vientos de una región a otra (Singh *et al.*, 2005).

Las urediniosporas inician la germinación dentro de los 30 minutos posteriores al contacto con el agua libre con temperaturas de 15 – 25 °C. El tubo germinal se desarrolla a lo largo de la superficie foliar hasta que llega al estoma, se forma entonces un apresorio, seguido inmediatamente por el desarrollo de un gancho de penetración y de una vesícula subestomática a partir de la cual crecen las hifas primarias. Aparece una célula madre del haustorio contra las células del mesofilo y se produce la penetración directa. Cuando hay una interacción de compatibilidad entre el hospedante y el parásito, el haustorio se forma dentro de una célula hospedante viva. Se generan hifas secundarias que dan como resultado otras células madres y haustorio. Cuando existe una respuesta de incompatibilidad entre el hospedante y el patógeno no se desarrollan los haustorios ya que lo hacen a un ritmo más lento. Cuando muere la célula hospedante, también muere el haustorio del hongo. Según el momento y la cantidad de células involucradas, la interacción entre el hospedante y el patógeno dará como resultado una respuesta evidente de la resistencia (Rodríguez *et al.*, 2014).

El período entre la germinación de las esporas y la esporulación puede abarcar de 7 a 10 días cuando las temperaturas son óptimas y constantes, pero con temperaturas bajas (10 – 15 °C) o fluctuaciones diurnas, se requieren períodos más prolongados. El hongo puede sobrevivir como micelios incipientes por un mes o más cuando las temperaturas se acercan o son inferiores al punto de congelación. Se alcanza la esporulación máxima unos cuatro días después de la esporulación inicial (aproximadamente a 20 °C). La cantidad puede variar mucho, se producen unas 3000



esporas por uredinio al día. Esta intensidad de la producción puede continuar durante tres semanas o más si la hoja de trigo sigue viva durante ese tiempo. Las teliosporas se forman bajo la epidermis cuando las condiciones se vuelven desfavorables o se produce la senescencia y permanecen en las hojas. Los tejidos foliares pueden ser dispersados o trasladados a distancias considerables por el viento, los animales o el hombre (Rodríguez *et al.*, 2008)

Se forman también basidiosporas que son liberadas cuando hay humedad, lo cual limita su propagación. Las basidiosporas son hialinas y susceptibles a la luz, esto probablemente limita su traslado a unas decenas de metros. Las aeciosporas se asemejan más a las uredinioporas en cuanto a su capacidad de ser transportadas por el viento, pero por alguna razón, no se ha observado su traslado a grandes distancias. (Villareal *et al.*, 1992).

#### 4.2.6 Virulencia

La virulencia es la capacidad de un patógeno para superar la resistencia determinada por un gen específico. A nivel mundial probablemente exista virulencia para todos los genes *Lr* numerados, excepto *Lr19*. Se ha observado virulencia para *LR19* pero no se le ha confirmado y no se dispone de aislamientos. No hay virulencia para *Lr9* y *Lr24* en muchas partes del mundo y no se ha señalado que un aislamiento sea virulento cuando están combinados ambos genes. Como existe virulencia para la mayoría de los genes de la resistencia por separado y en diversas combinaciones de dos o más genes, es fundamental conocer cuál combinación de la virulencia existe en la población patógena antes de dedicar tiempo a combinar resistencias en variedades del hospedante. Para esto se requiere efectuar un muestreo sistemático del patógeno en el cual se obtengan muestras provenientes de distintas variedades y diferentes zonas ecológicas y geográficas a lo largo de la temporada (Figura 2). En la mayoría de las zonas, la roya (y por lo tanto su virulencia) puede sobrevivir todo el año en el ciclo asexual (Singh *et al.*, 2001).

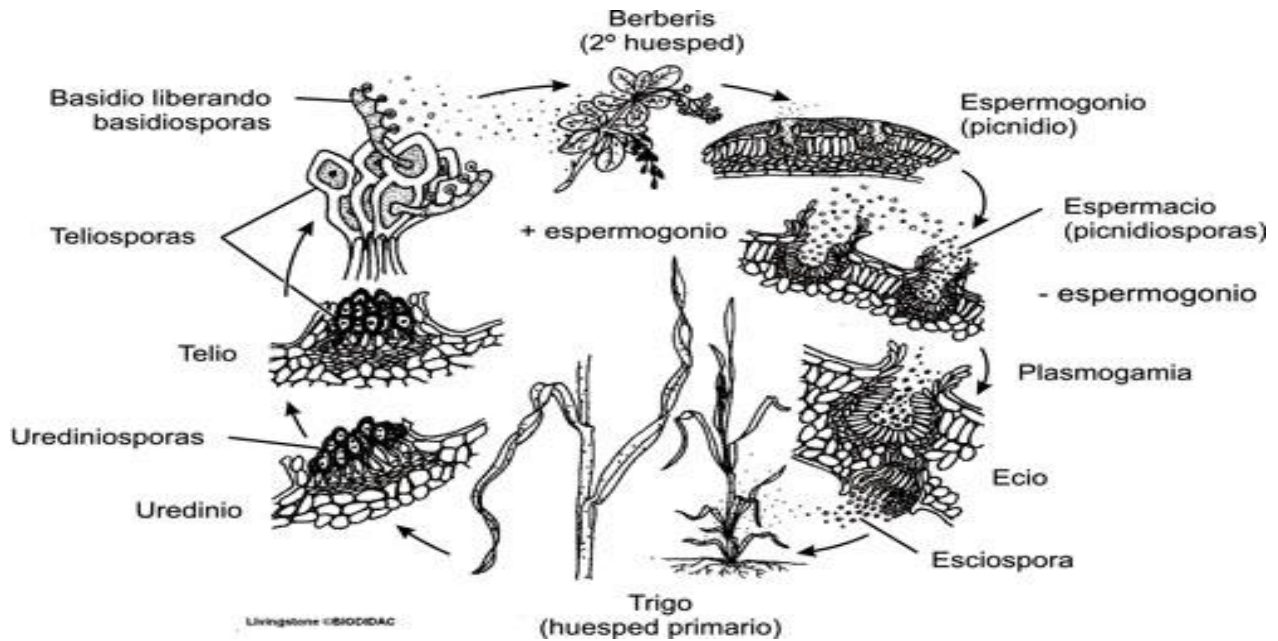


Figura 2. Ciclo biológico de *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* y ciclo de enfermedad de la roya de la hoja del trigo (Singh *et al.*, 2001).

#### 4.3 Razas fisiológicas

Se han desarrollado muestreos sobre las razas para observar las modificaciones de la virulencia en la población patógena con el fin de contribuir al desarrollo de variedades de trigo resistentes a las royas de los cereales (Singh *et al.*, 2005).

Los hospedantes diferenciales originales para la roya de la hoja tenían un solo gen de resistencia eficaz, en contraste con los hospedantes diferenciales de las otras dos royas, que tenían una combinación de genes de resistencia. La introducción de los genes de resistencia *Lr* en un fondo genético uniforme mejoró la homogeneidad de la evaluación. La mayoría de los genes de resistencia importantes del hospedante actualmente usados no estaban incluidos en el conjunto diferencial original. En 1989, los investigadores de la roya de la hoja de América del Norte seleccionaron un conjunto de 12 diferenciales; *Lr1*, *2a*, *2c*, *3*, *9*, *16*, *24*, *26*, *3 ka*, *11*, *17* y *30*. A causa de la gran cantidad de resistencia de plántula adulta usadas en las variedades comerciales, cualquier sistema para evaluar la virulencia sólo en la etapa de plántula dará un

panorama incompleto de la virulencia presente en la población patógena (William *et al.*, 2003).

#### 4.3.1 Agresividad

No todos los aislamientos tienen la misma capacidad de provocar epifitias, aun cuando poseen los genes necesarios para la virulencia. Esta diferencia en la agresividad puede relacionarse con diferencias no estimadas en la producción de esporas, la idoneidad del medio ambiente, la capacidad de las esporas para sobrevivir o infectar la duración de los períodos de latencia y de esporulación. En el caso de las royas de los cereales, es difícil determinar hasta qué punto las diferencias en el período de latencia obedecen a la agresividad del patógeno, las condiciones ambientales y sus interacciones, y en qué medida son resultado de la resistencia no específica (Singh y Dubin, 1997).

#### 4.4 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* pueden ser definidas como un conjunto heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (cualquier parte de la planta) pueda ser regenerado asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se (desarrolla) incuba en condiciones ambientales controladas y específicas. Para el establecimiento del cultivo, utilizando cualquier sistema, es necesario considerar aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación (Ewind *et al.*, 2008).

##### 4.4.1 Explante

Los explantes son de diversa naturaleza, pueden ser porciones de tejido, células sueltas, protoplastos, esporas, granos de polen o semillas. El tipo de explante a usarse puede generar la inducción de la morfogénesis *in vitro* en donde es de gran importancia

la edad del explante, puesto que cuanto más joven, mejor será su respuesta *in vitro* (Albornoz *et al.*, 1999).

Los explantes como los meristemas apicales y las yemas axilares son genéticamente estables, este tipo sirve para reproducir múltiples clones de una forma o variedad con características especiales que se desea mantener en el cultivo. Otros explantes, como las yemas adventicias pueden ser genéticamente inestables y producen un alto grado de variabilidad en los clones, este procedimiento no es útil para la producción de plántulas con una determinada característica de cultivo, pero si lo es para el fitomejoramiento, ya que mediante esta variación seminatural, es posible obtener nuevas líneas de cultivo (Wang *et al.*, 2004).

En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados (Shaom *et al.*, 2008).

#### 4.5 Morfogénesis *in vitro*

La morfogénesis es la formación de órganos y comprende el desarrollo (crecimiento y diferenciación celular). En células o tejidos cultivados *in vitro* el proceso morfogénico puede inducirse ya que, las células vegetales son capaces bajo determinados estímulos de desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo. Esta plasticidad celular se conoce como totipotencia celular que es el potencial o la capacidad que presenta una célula somática para desarrollarse en una planta completa si se estimula adecuadamente, implica que toda la información necesaria para el desarrollo está contenida en una célula. Aunque todas las células son totipotentes, las células

meristemáticas son las más capaces para expresarla y obtener plántulas idénticas a la planta madre (Krikorian y Simola, 1999; Razdan, 2003).

La respuesta morfogénica puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas; la organogénesis y la embriogénesis somática. En la organogénesis se produce la formación de tallo, raíces u otras estructuras y en la embriogénesis somática se forman embriones que al germinar dan lugar a una planta. En ambos casos, se generan a partir de células somáticas. Si la respuesta primaria al estímulo morfogénico es la formación de callo antes de diferenciarse en meristemas o embriones se habla de organogénesis o embriogénesis indirecta (Bao *et al.*, 2015).

#### 4. 5.1 Embriogénesis somática *in vitro*

Es una técnica biotecnológica de propagación de plantas que permite obtener embriones a partir de células somáticas (no sexuales) desde cualquier tipo de tejido, haciendo más eficiente la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión y sus altos coeficientes de multiplicación en períodos de tiempos cortos. La embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas como la capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente (como semilla sexual) con una aplicación en propagación y mejora de plantas, en saneamiento de enfermedades e intercambio y/o conservación de germoplasma y en ingeniería genética y selección de especímenes transformados (Te-chato y Hilao, 2007).

La embriogénesis somática incluye diferentes fases; inducción, proliferación, maduración de los embriones somáticos, germinación y conversión en plántulas; cada una depende del genotipo de la planta progenitora, del tipo y del estado fisiológico del explante, de las fitohormonas adicionadas y de las condiciones del cultivo. Existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*: directa e indirecta. La vía directa, involucra la formación de embriones somáticos en un segmento del explante a partir de células embriogénicas predeterminadas sin la formación previa de callos; puesto que las

células dentro de un embrión cigótico son de por sí embriogénicas, es posible inducir las y posteriormente promover su división para formar embriones somáticos (Zimmerman, 1993).

La forma indirecta implica una fase intermedia de callo en la que las células cambian su competencia genética a la expresión embriogénica induciendo la formación de pro-embryones al utilizar altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo, los cuales, posteriormente evolucionan a embriones somáticos al ser transferidos a un medio de cultivo con menores concentraciones de fitohormonas (Bao *et al.*, 2015).

#### 4.5.2 Factores que afectan los procesos morfogénicos

Los tres factores principales que condicionan la obtención y el desarrollo (crecimiento y diferenciación) de nuevos órganos en condiciones *in vitro* son: el genotipo, las condiciones químicas seleccionadas para realizar el cultivo y el explante.

El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* así como también para la proliferación de callo, o la diferenciación y crecimiento de nuevos órganos. Por esta causa, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo seleccionados, deben ser específicos para cada situación en particular. La composición del medio de cultivo. La composición salina más empleada para inducir la formación de callo, la organogénesis directa o indirecta en la mayoría de las especies vegetales, es la de Murashige y Skoog (MS, 1962). Sin embargo, existen otras formulaciones diseñadas para inducir determinados patrones morfogénicos. Existe además una estrecha relación entre la composición hormonal del explante y la concentración de fitohormonas agregada al medio de cultivo (Von, 2008).

## 4.6 Medio de cultivo

El crecimiento de los cultivos *in vitro* se lleva a cabo en medios de cultivo específicos. En general, estos medios deben tener una composición que proporcione los nutrientes necesarios y los factores de crecimiento en la proporción adecuada. Los medios de cultivo se componen de nutrientes principalmente inorgánicos tales como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. Los oligoelementos tales como el boro, el cobre, el manganeso, el yodo, el cobalto y el sodio son necesarios para apoyar un crecimiento saludable y sano. Los cultivos de tejidos son a menudo heterótrofos y por lo tanto, requieren de una fuente de carbono. También necesitan hierro para la síntesis de la clorofila y para las diversas reacciones de reducción de oxidación dentro del cultivo en desarrollo. Las fitohormonas, tales como las auxinas y las citocininas, deben estar presentes en la proporción correcta para formación de la raíz y de los brotes (Litz y Jarret, 1991; Vargas *et al.*, 2006).

### 4.6.1 Componentes inorgánicos del medio de cultivo

Los medios de cultivo están constituidos por componentes inorgánicos, los cuales son suministrados en cantidades relativamente grandes (macronutrientes) y otros añadidos en menor cantidad (micronutrientes). Dentro de los macronutrientes, se encuentran iones de nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S).

Los micronutrientes, que son añadidos a los medios de cultivo son hierro (Fe), cloro (Cl), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), y molibdeno (Mo). Estos elementos junto con el carbono (C), oxígeno (O) e hidrógeno (H) constituyen los elementos esenciales. Estos micronutrientes aunque son requeridos en menor cantidad son necesarios para una adecuada actividad metabólica de las células vegetales. El Fe y el Mn son esenciales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos. El Fe es requerido para la formación de precursores de la clorofila y es un componente de los citocromos, ferredoxina y legohemoglobina, esta última es

esencial en la fijación de nitrógeno por las plantas leguminosas. El Mn es necesario para el mantenimiento de la ultra estructura y el proceso fotosintético. Los elementos Cu y Zn son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos. El Zn está relacionado con la síntesis de triptófano, precursor del ácido indolacético (AIA) y ejerce control sobre las ribonucleasas lo que permite mantener la síntesis proteica en caso de estrés ambiental (medio de cultivo). El Cu, es un componente de la Plastocianina que es esencial en el funcionamiento del transporte electrónico de la fotosíntesis y es activador de otras enzimas como la oxidasa del ácido ascórbico (Vitamina C), tirosinasa, lacasa, fenolasa y citocromoxidasa, esta última forma parte de la cadena de transporte electrónico del proceso respiratorio (Giri *et al.*, 1993).

#### 4.6.2 Fitohormonas

Se entiende por hormonas vegetales aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el desarrollo (crecimiento y diferenciación) o metabolismo del vegetal (Krikorian, 1991).

##### 4.6.2.1 Auxinas

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas identificadas y es precisamente el ácido indol acético (AIA), la principal auxina endógena en la mayoría de las plantas (Thorpe *et al.*, 2008). La mayoría de las moléculas que integran este grupo son derivados indólicos, aunque también se encuentran algunos compuestos fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos con actividad auxínica. Las auxinas se encuentran en la planta en mayores cantidades en las partes donde se presentan procesos activos de división celular, lo cual se relaciona con sus funciones fisiológicas asociadas con la elongación de tallos y coleoptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical (Krikorian, 1991).



En cuanto a los mecanismos de transporte, se conoce un mecanismo polar (más lento) en tallos y raíces, exclusivo de auxinas, que depende de proteínas transportadoras específicas para esta hormona y no polar en el floema (más rápido) donde se encontraría asociado con procesos de división del cambium y ramificación de las raíces. Las auxinas generalmente son transportadas en el sentido del eje longitudinal de la planta, alejándose del punto apical hacia la base en el tallo y en sentido contrario de la raíz (Giri *et al.*, 1993). Las principales auxinas sintéticas utilizadas son: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), Ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico (Dicamba), Ácido indol-3-acético (AIA) Ácido indol-3 butírico (IBA), Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA), Ácido 1-naftalenacético (ANA), Ácido 4-amino-2,5,6-tricloropicolínico (Picloram) (Hernández, 2008).

#### 4.6.2.2. Citocininas

Las citocininas influyen en el crecimiento vegetal de varias maneras, incluidos el control de la división y diferenciación celular, contrarrestando la dominancia apical, y retrasando el envejecimiento de las hojas. Las citocininas se sintetizan en la raíz y se transportan a través del xilema a otros órganos de la planta, donde fomentan de manera general un estado más juvenil de desarrollo. Por ejemplo, en el tallo, promueven el crecimiento de las yemas axilares. La aplicación directa de las citocininas puede también impulsar el crecimiento de las yemas incluso si el meristemo apical está intacto. Las citocininas retrasan el envejecimiento de las hojas y aumentan su longevidad de diversas maneras, entre ellas la atracción de aminoácidos desde otras partes de la planta.

Cuando se emplean en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* las citocininas están asociadas tanto con la división celular como con la diferenciación que conduce a la producción de yemas del vástago. Las citocininas por sí mismas presentan efectos en las células de cultivo principalmente en la división celular, pero cuando se aplican junto con la auxina, las células cultivadas comienzan a dividirse y diferenciarse más rápidamente (González y Martin, 2011).

#### 4.6.2.3 Etileno

El etileno ha sido implicado en la maduración, abscisión, senescencia, dormancia y floración entre, otras respuestas. El etileno es producido esencialmente por todas las partes vivas de las plantas superiores, y la tasa varía con el órgano y tejidos específicos y su estado de crecimiento. Se ha encontrado que las alteraciones en la tasa sintética de etileno están asociadas cercanamente al desarrollo de ciertas respuestas fisiológicas en plantas y sus secciones, por ejemplo, la maduración de frutas climatéricas y la senectud de flores. A diferencia de otras hormonas, el etileno es gaseoso, se difunde fácilmente fuera de la planta. Esta emanación pasiva del etileno fuera de la planta parece ser la principal forma de eliminar la hormona (Azcon-Brito y Talon, 2000).

#### 4.6.2.4 Giberelinas

Las giberelinas provocan la división celular al acortar la interfase del ciclo celular e inducir las células en fase G1 a sintetizar ADN. También promueven la elongación celular al incrementar la plasticidad de la pared y aumentar el contenido de glucosa y fructosa, provocando la disminución del potencial agua, lo que lleva al ingreso de agua en la célula y produce su expansión, inducen la deposición transversal de microtúbulos y participan en el transporte de calcio. También pueden actuar a nivel génico para provocar algunos de sus efectos fisiológicos, su traslado se lleva a cabo a través de floema y xilema, no es polar como en el caso de las auxinas (Litz, 1991).

Las auxinas controlan el crecimiento y elongación de los tallos, Inducción de floración en plantas de día largo cultivadas en época no apropiada, crecimiento y desarrollo de frutos, estimulan la germinación de numerosas especies, y en cereales movilizan reservas para crecimiento inicial de la plántula e inducen la formación de flores masculinas en plantas de especies diclinas como maíz, sauce, palmera y datilera (Domínguez-Rosales *et al.*, 2008).

#### 4.6.2.5 Ácido abscísico

El ácido abscísico ABA es un sesquiterpenoide particularmente importante en la respuesta a estrés y desempeña un papel importante en procesos fisiológicos, cuyos efectos varían dependiendo del tejido y estado de desarrollo de la planta. Entre sus múltiples funciones, se incluye la inducción de síntesis de proteínas, con lo cual promueve la tolerancia del embrión a la deshidratación y acumulación de proteínas de almacenamiento. Además se le atribuye el mantenimiento de la dormancia de semillas: en hipocótilos, epicótilos y coleótilos inhibe el crecimiento y elongación; y en hojas promueve su senescencia (Giri *et al.*, 1993). Se ha reconocido su antagonismo a diversos efectos de las giberelinas, incluyendo la promoción del crecimiento en plántulas y la síntesis de  $\alpha$  amilasa, cumple un papel importante en la regulación de las relaciones hídricas, por su relación determinante en la respuesta de las células guarda estomáticas y en el mantenimiento del crecimiento radical durante el déficit hídrico (Thorpe *et al.*, 2008).

Es una hormona ubicua en plantas vasculares, cuyo movimiento lento y no polar ocurre en condiciones normales por los haces vasculares y en todas las direcciones. En condiciones de estrés hídrico el ABA aumenta su transporte desde la raíz a las hojas, donde con el cambio de pH se re direcciona principalmente hacia las células oclusivas de los estomas para facilitar el cierre de estas estructuras y evitar mayor transpiración y pérdida de agua. El ABA afecta las respuestas vegetales frente a patógenos, mediante la promoción de resistencias que van desde impedir la entrada al patógeno por vía estomática, hasta incrementar la susceptibilidad interfiriendo con las respuestas de defensa del sistema inmune vegetal en el que pueden interrelacionarse otras hormonas (Jiménez, 2005).

#### 4.7 Asepsia

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer cultivos *in vitro* es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de

microorganismos (hongos, levaduras, bacterias virus). El ambiente generado por explante, medio de cultivo y condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se ha estimado que es alrededor del 10%. En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias.

Dos son las fuentes de contaminaciones: a) microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes y b) fallas en el manejo de los diferentes procedimientos que se siguen para establecer el cultivo aséptico en el laboratorio. La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos importantes para el éxito de los cultivos, pues por un lado ayuda a determinar la fuente de contaminación y por otro lado, ayuda a la planificación de los procedimientos para controlarlos (Rout y Senaparti, 2008).

Varios géneros de bacterias (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*) y de hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Neurospora*) están frecuentemente en los cultivos *in vitro*. Es conveniente inspeccionar con la ayuda de un microscopio estereoscópico los cultivos en forma periódica (Leifert *et al.*, 1994).

#### 4.8 Aclimatación de plantas

La aclimatación es un proceso de gran importancia, ya que el uso exitoso del método de micropagación de especies vegetales depende, de una adecuada aclimatación.

Pospisilova *et al.* (1999) conceptualizó la aclimatación como la adaptación de una planta a un área o zona climática de la cual no es nativa, o a un microclima distinto al que ha tenido lugar en una fase previa al cultivo por ejemplo, la aclimatación de las plantas *in vitro* a condiciones de invernadero.

La aclimatación de las plantas cultivadas *in vitro* es un proceso crítico, ya que las plantas pasan de un ambiente de baja transpiración a otro que exige una mayor demanda hídrica, que eventualmente puede ocasionar estrés hídrico. Igualmente, pasan de un estado heterótrofo a un estado autótrofo con diferentes niveles de nutrientes y finalmente, de un ambiente aséptico a uno donde pueden estar expuestas al ataque de microorganismos saprofitos y/o fitopatógenos (Litz y Jarret, 1991).

En el proceso normal de micropropagación los brotes y plantas son cultivados en medios de cultivos con azúcares vitaminas y otras sustancias orgánicas, lo que determinan el desarrollo heterótrofo o mixótrofo de los mismos (nula o baja capacidad fotosintética). Sin embargo, durante la fase de adaptación estas plantas están forzadas a ser completamente autótrofos y sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir de minerales agua, CO<sub>2</sub> y luz. Este cambio en las plantas así como la morfología de las mismas, determina la susceptibilidad durante las etapas iniciales del proceso de aclimatación (Riquelme *et al.*, 1991).

Las condiciones *in vitro*, como la alta humedad, baja intensidad luminosa, temperatura constante y bajo o nulo intercambio gaseoso en el frasco, favorecen los cambios en la morfología de las plantas y que a su vez influyen en la capacidad de supervivencia y crecimiento de las plantas. Estos cambios son:

- Hojas con estomas que no cierran normalmente y desarrollo deficiente de la cutícula. Esto hace que las plantas sean más susceptibles al estrés por pérdida de agua y por lo tanto pueden desarrollar nuevas hojas adaptadas a las nuevas condiciones. El mantener una alta humedad en los primeros días del trasplante a condición *ex vitro*, es un factor crítico para la supervivencia de las plantas *in vitro*, ya que por sus condiciones fisiológicas y anatómicas, son altamente

sensibles a presentar desequilibrio en el mecanismo estomático y en consecuencia, las células de las regiones más tiernas manifiestan estrés hídrico (Preece y Sutter, 1991)

- Tallo con escaso tejido de soporte (colénquima y esclerénquima).
- Raíces poco funcionales. En ocasiones existe una conexión vascular incompleta entre tallo y raíces que impide el transporte eficiente de agua y nutrientes. Como resultado de esto, prácticamente las plantas deben desarrollar todo el sistema radical nuevo durante la etapa de aclimatación (Litz *et al.*, 1991).

#### 4.9 Variación somaclonal

La variación somaclonal se refiere a la variación que ocurre *in vitro* en cultivos celulares, de tejidos y órganos, así como en plantas regeneradas de los mismos. La variación somaclonal generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no (Brar y Jain 1998; Kathiravan *et al.*, 2006).

##### 4.9.1 Selección *in vitro*

El cultivo de células, tejidos y órganos vegetales *in vitro* está generalmente asociado a varios problemas de calidad fisiológica, epigenética y genética. Cuando se requiere mantener la identidad clonal del material propagado, también existen implicaciones importantes para los programas y estrategias de fitomejoramiento. Existen varios factores que inciden en la obtención de variación somaclonal (Karp, 1995). Entre mayor sea el nivel de desorganización del tejido del explante y mayor el tiempo que este pasa en la fase de cultivo *in vitro*, mayores serán las probabilidades de generar variación somaclonal. Esta variación se ve influenciada por la constitución genotípica y los niveles de ploidia del explante, por lo que si se considera un mismo grado de ploidia, algunos genomas pueden ser más estables que otros. El tipo y la concentración de las fitohormonas en el medio de cultivo influyen también en la generación de variación somática ya que estos pueden actuar como mutágenos (especialmente los sintéticos), o influir sobre la división celular, el grado de crecimiento

desorganizado y la proliferación selectiva de tipos celulares específicos. Por último, generalmente se observa, entre más viejo y más especializado es el explante, mayor es la posibilidad de recuperar variación en las plantas regeneradas. Jelenic *et al.* (2001) plantearon la importancia de las condiciones ambientales durante el cultivo y la presencia o ausencia de agentes selectivos *in vitro*, como generadores de variación.

## 5. Literatura citada

- Albornoz, L., Fernández, L., León, S., y Castro, C. 1999. Efecto del tratamiento de plantas donantes y del número de explantes a utilizar para el control de la contaminación y ennegrecimiento en el cultivo *in vitro* de *Annona muricata* L. Memorias VI Jornadas Científicas Técnicas de la Facultad de Agronomía. Maracaibo, Venezuela. 23 p.
- Ali, I., P, Roelfs., and J, Huerta Espino. 1994. Inheritance of Leaf Rust Resitence in Wheat Cultivars Morocco and Little club. *Plant Disease*. 78: 383-384.
- Annone, J. 2006. Roya de la hoja en trigo. Importancia económica y estrategias para reducir los efectos sobre la producción. Trigo Informe de Actualización Técnica N° 1. EEA INTA Ms Juárez. pp 30.
- Azcon-Bieto.J and Talón, M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid.40 p.
- Bao, Y., Liu. B., Wang, T., Cai, Y., Liang. B., Wang, J. 2015. *In vitro* activities of combinations of fifampin with other antimicrobials agains multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 59: 1466-1471.
- Brar, D.S., Jain, M. 1998. Somaclonal variation: mechanism and application in crop improvement. *In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (eds.) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Great Britain. Pp. 15-37.*
- Chen, X. M. 2013. High-temperature adult-plant resistance, key for sustainable control of stripe rust. *American Journal of Plant Science*. 4: 608-627.
- Domínguez-Rosales M S, A G Alpuche-Solís, N L Vasco-Méndez, E Pérez-Molphe-Balch .2008. Efecto de las citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Rev. Fitotec. Mex*. 31: 317-322.
- Duff, C., Hamnblin, P., y Poole, N. 2006. Stripe rust management in wheat. Grains Research & Development Corporation (GRDC). Australia. 92 p.
- Ewind, G., Hall, M., and Klerk, D. 2008. Plant Propagation by tissue culture Volume 1. Ed. Klerk. 50 p.
- FAO. 2015. La Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación Producción Mundial de Cereales.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene for gene concept. *Annu. Rev. Phytopathology*. 9: 275-296.
- Giri, A., Ahuja, P., Ajaykumar, P. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Aconitum heterophyllum* Wall. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 213-218.
- González-Benito M. E. C. Martín. 2011. *In vitro* preservation of Spanish biodiversity. *In vitro Cell. Develop. Biol.-Plant*. 47: 46-54.



- Hernández, M. E. 2008. Regeneración *in vitro* de *Heliconia* spp vía organogénesis directa. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 96 p.
- Hernández, V.J. y Alvarado P. D. 2011. Descripción de las Variedades de Trigo para el Valle de Mexicali, B.C. y Norte de Sonora 18: 100-23
- Huerta-Espino, J. and A. P. Roelfs. 1989. Physiological specialization on leaf rust on durum wheat. *Phytopathology* 70:1218
- Huerta- Espino J. y R. P. Singh. 2000. Las royas del trigo. *In: El trigo de temporal en México.* Villaseñor M., H. E. y E. Espitia R. (eds.) SAGARPA, INIFAP. CIP-CENTRO y CEVAMEX, México. Pp. 231-251.
- Huerta-Espino J.y B.Skovmand. 2000. Origen, Botánica y taxonomía del trigo. *In: El trigo de temporal en México.* Villaseñor M., H.E. y E. y E. Espitia R. (Eds.) SAGARPA, INIFAP. CIR-CENTRO y CEVAMEX, México. Pp. 25-38.
- Jelenic, S., J. Berljak, P. Drazena and S. Jelaska. 2001. Mixploidy and chimeric structures in somaclones of potato (*Solanum tuberosum*, L.) cv. Basrai. *Fruits*, 56: 67-74.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47: 91-110.
- Karp, A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302.
- Krikorian, A. D. 1991. Medios de cultivo: generalidades y preparación Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, WM y Mroginski LA (eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.* CIAT, Cali. Pp.41-59.
- Krikorian, A., and Simola. K.1999. Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1993-1973) *Physiol. Plant.* Pp.105-355.
- Kathiravan, K., Vengedesan, G; Singe, S; Steinitz B; Paris, HS; Gaba, V. 2006. Adventitious regeneration *in vitro* occur across a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 285-295.
- Larkin, P.J. 2004. Somaclonal variation: origins and causes. *In "Encyclopedia of Plant and Crop Science"* (R. M. Goodman, Ed.). Marcel Dekker, New York. NAS. NAS Report- Safety of Genetically. Pp. 1185-1161.
- Leifert, C., Morris, C. E., y Waites, W, M. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 13: 139-183.
- Litz, R.E., and Jarret, R. L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, WM y Mroginski LA (eds). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.* CIAT, Cali. Pp. 143-172.
- Mazzilli, S., Pérez, C., Ernst, O. 2007. Fusariosis de la espiga en trigo: características de la enfermedad y posibilidades de uso de modelos de predicción para optimizar el control químico. *Agrociencia*, 9: 11-21.

- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-493.
- Pospisilova, J., I. Ticha, S., Kadlecěk, D., Haisel, and S. Pizakova. 1999. Acclimatization of micropropagated cultures, *Physiologia Plantarum* 15: 473-493.
- Preece, J. E., y Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. In: Debergh P.C., Zimmerman, R. H. Micropropagation technology and application. Editorial Dordrech Klumer Academic Press. Pp. 71-93.
- Quintero, T.A. 1995. Documento de Decisión del comité Ejecutivo de la NAPPO. p. 50.
- Razdan, M.K. 2003. Introduction to plant tissue culture. 2nd (ed) Science Publishers. Inc. Enfield, NH, USA. p.388.
- Reynolds, M. P., Trethowan, R., Crossa, J., Vargas, M. y Sayre, K. D. 2014. Physiological factors associated with genotype by environment interaction wheat. *Field Crops Research*. 75: 140-141.
- Riquelme, C., M. Guizazú., y Tiziio, R. 1991. Pre acondicionamiento y aclimatación en condiciones de invernáculo de plantas micropropagadas de frutilla de menta y papa 52(1): 73 –82.
- Rodríguez, G. M. F., Huerta–Espino, J., y Villaseñor, M. H. E. 2008. Nomenclatura de razas fisiológicas de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritricina* en México. In: Congreso Nacional de Fitogenética. Chapingo, México. Septiembre 2008.
- Rodríguez-García M.F., Huerta-Espino J, Visalleñor-Mir H.E. 2009 Virulencia de la roya amarilla de trigo en las principales zonas productoras de riego en México, INIFAP. CIR-CENTRO y CEVAMEX, México. pp. 20-31.
- Rodríguez-Algaba J., Walter S., Sorensen C.K., Hovmoller, M.S., y Justesen, A.F. 2014. Sexual structures and recombination of the wheat rust fungus *Puccinia striiformis* (letra cursiva) on *Berberis vulgaris* *Fungal Genetics and Biology* 70: 77-85.
- Roelfs, A. P. 1978. Estimated losses caused by rust in small grain cereals in the United States. 1918-1976. Misc. Publ. U. S. Dept. Agric. 1363: 1-85.
- Rout. G.R., and Senapati, S.K. 2008. Study of culture conditions for improved micropopagation of hybrid rose. *Plant Biotechnology Division, Regional Plant Resource Centre, Orissa, India*. pp. 27-34
- SIAP 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx) Consultado el 20 de Abril de 2015
- Shaom, H.B., Chu, L.Y., Shao, M.A., Cheruth, A. M. I., H.M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C.R. Biologies* 331:433.
- Singh, R.P. 1991. Pathogenicity variations of *Puccinia recóndita* f. sp. *Tritici* and *P. graminis* f. sp. *tritricina*. In: wheat-growing áreas of Mexico during 1988 and 1989. *Plant Disease*. 75: 790-794.

- Singh, R.P. and H.J. Dubin 1997. Sustainable control of wheat diseases Mexico. In: Primer Simposio Internacional de trigo Memorias. 7-9 de abril de 1997. Cd. Obregón, Sonora. Pp. 93-102.
- Singh, R.P., Huerta, E.J., and William, M. 2001. Slow rusting genes based resistance to leaf and yellow rust in wheat. Genetics and Breeding at CIMMYT. pp. 103-108. In Wheat Breeding Society of Australia Inc. 10th Assembly Proc. R. Eastwood, G. Hollambuy, T. Rathjen and N. Gororo (eds) pp. 16-21 sep 2001. Mildura, Australia.
- Singh, R.P., E. Bechere and O. Abdalia. 1993. Genetic analysis of resistance to leaf rust in nine durum wheats. Plant Disease 77(5): 460-463.
- Singh, R. P., Huerta-Espino y Roelfs, A.P. 2002. The wheat rusts. In: Bread wheat improvement and production. Series No. 30 B.C. Curtis, S. Rajaram y H. Gómez Macpherson. (eds) FAO Rome, Italy Pp: 227-249.
- Singh, R. P., Huerta-Espino J. and William, H. M. 2005. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. Turkish J. Agric. Forest. 29:121-127.
- Solís, M. E. 2000. Antecedentes de Investigación. In: Trigo de Riego: Origen, Variedades, Manejo del Cultivo, Calidad Industrial. M E Solís, G A Rodríguez (comps.). Celaya, Gto., Mexico. SA- GAR, INIFAP, Campo Experimental Bajío. Libro Técnico Núm. 2. Pp. 21-24.
- Thorpe, T., C. Stasolla, E. C. Yeung, G. J. Llerk, A. Roberts, and E. F. George. 2008. The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk (eds). Plant propagation by tissue culture 3rd Edition Volume 1. The background. Springer, The Netherlands. Pp. 115-173.
- Te-chato, S. and Hilae, A. 2007. High-frequency plant regeneration through secondary somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera). *Journal of Agricultural Technology* 3: 345-357.
- Vargas, T.E., Oropeza, C.M. and de García E. 2006. Propagación *in vitro* de *Hippeastrum* sp. *Agronomía Tropical*, 56: 621-626.
- Villareal, R.L., R.P. Singh and A. Kazi-Mujeeb. 1992. Expression of resistance to *Puccinia recóndita* f. sp. *Triticum* in synthetic hexaploide wheats. *Vonrt. Planzenzucctg.* 24:253-255.
- Von, A. S. 2008. Somatic Embryogenesis. In George F. E (eds). Plant propagation by tissue culture. Tercera edición. Volumen 1. Springer. Dordresht. Netherlands. Pp. 335-354.
- Wang, J., Seliskar D.M. and Gallagher J.K. 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the brackish wetland monoct *Scirpus robustus*. *Aquatic Botany.* 79: 163-174.
- William, M., O. M., J. Huerta E., S. G. Leyva M., E. Villaseñor M., y E. Espitia R. 2003. Análisis de virulencia de la roya de la hoja (*Puccinia triticina* Eriks.) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en los Valles altos de Méico. *Rev. Mex. Fitopatología.* 31(1): 46-62.

## CAPÍTULO I

# GENÉTICA DE LA RESISTENCIA DE TRIGOS CRISTALINOS DE HÁBITO INVERNAL A *Puccinia triticina* Eriks

## CAPÍTULO I. GENÉTICA DE LA RESISTENCIA DE TRIGOS CRISTALINOS DE HÁBITO INVERNAL A *Puccinia triticina* Eriks

### 1.1 Introducción

El trigo (*Triticum turgidum* ssp *Durum*) es un cereal de la familia de las gramíneas, una de las plantas ampliamente cultivadas e importantes para la dieta alimentaria. Contiene una gran variedad de minerales como son el fósforo, calcio, magnesio, silicio y tiene un alto contenido de vitaminas del grupo B, lo cual lo hace un alimento completo de alto aporte energético (Reynolds *et al.*, 2014). Se puede clasificar en diferentes tipos y grupos, en especies silvestres y cultivadas, las cuales se pueden catalogar de acuerdo a caracteres hereditarios que determinan cualidades morfológicas de la planta (Huerta-Espino *et al.*, 2000).

En México de acuerdo con las cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), el volumen de producción estimado de trigo durante los últimos diez años (2002-2012) fue de 37 millones de toneladas, concentrándose cerca de 85% de la producción en los estados de Sonora (35%), Guanajuato (17.5%), Baja California (11.5%), Sinaloa (9.2%), Michoacán (6.4%) y Jalisco (4.4%) (SIAP, 2015).

Sin embargo, uno de los problemas importantes a los que se ha enfrentado este cultivo es la roya de la hoja causada por *Puccinia triticina* E., una enfermedad ampliamente distribuida y devastadora en México y en el mundo (Dubin y Rajaram, 1996). Sus daños pueden causar pérdidas hasta del 100% del rendimiento; ya que, sus infecciones tempranas provocan una disminución significativa en el número de granos por espiga, el peso hectolitrito y la calidad del grano (Quintero, 1995).

La roya de la hoja del trigo tiene muchas razas y una gran capacidad para mutar; es también la más importante en trigos duros o cristalinos (*Triticum turgidum Durum*). En el año 2008 dos razas BBG/BP y CBG/BPC, productos de la evolución de la raza BBG/BNC (Huerta-Espino *et al.*, 2009), vencieron la resistencia de las variedades de trigo denominadas “Jupare C2001” y “Banamichi”; pero no la de “Samayoa”, variedad

que permaneció resistente dentro de la misma línea evolutiva a la raza CBG/BPC pero con virulencia a *Lr2*, *Lr27 + 31* y *Lr72* (Huerta-Espino *et al.*, 2010). Como producto de la evolución de la raza existente antes del año 2001 (Raza BBB/BNG) se identificó la raza BBB/BNJ con virulencia para el gen *Lr61* (Huerta-Espino *et al.*, 2010).

El mejoramiento genético del trigo en México fue encaminado a usar genes de resistencia específica, de plántula o de raza-monogénica a roya de la hoja del trigo (*Triticum durum*). Su selección es relativamente fácil en generaciones tempranas y se usa contra patógenos altamente especializados (McIntosh, 1992); facilitaban la selección al cruzar materiales resistentes por susceptibles o resistentes por resistentes cuya herencia es de forma simple (Huerta-Espino y Singh, 2000).

Las variedades, por lo general, poseen un gen dominante de resistencia a la roya de la hoja *triticina* E., que produce una respuesta de hipersensibilidad, la cual puede durar de 3 a 5 años, dado que se pierde cuando el patógeno evoluciona en nuevas formas de virulencia (Singh y Dubin, 1997). Una alternativa importante en el mejoramiento genético consiste en cruzar una variedad susceptible con una resistente y así determinar tanto el tipo de acción génica, como el número de genes que confieren la resistencia. Es posible que entre genes dominantes y recesivos, o combinaciones, se confiera resistencia en estado de plántula en donde se presentan dos genes recesivos duplicados que pueden ser heredados de forma independiente (Zhang y Knott, 1990). Muchos de los genotipos de trigos duros cultivados en México son resistentes a la roya de la hoja, en estado de plántula y planta adulta debido a la presencia del gen *Lr14a* para el cual aún no existe virulencia reportada en México (Huerta-Espino *et al.*, 2009).

Por consiguiente, es fundamental identificar nuevas fuentes de resistencia a la roya de la hoja del trigo *Puccinia triticina* E., mediante el incremento de diferentes genotipos efectivos contra la raza BBG/BN, generando así diversidad genética y disminuyendo las pérdidas en la producción en variedades de trigos duros.

Con base en estos antecedentes los objetivos de esta investigación fueron:

- 1) Explorar la existencia de resistencia a la roya de la hoja en estado de plántula.
- 2) Examinar el tipo de herencia génica dentro de un grupo selecto de trigos duros de invierno.
- 3) Generar nuevas fuentes de resistencia diferentes a las disponibles para la raza BBG/PC de roya de la hoja.

## 1.2 Materiales y métodos

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades del Trigo (LANARET) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX).

### 1.2.1 Material genético de trigo cristalino

Se evaluaron 51 trigos cristalinos (Cuadro 1) de hábito invernal en estado de plántula en condiciones de invernadero provenientes de diferentes países.

### 1.2.2 Razas del patógeno

Para evaluar la resistencia de las 51 variedades de trigo se usaron las razas de roya BBG/BPC y BBB/BNJ donde la nomenclatura usada por Singh, 1991 se le agregó un sexto juego de diferenciales (*Lr14a*, *Lr28*, *Lr61* y *Lr72*) para distinguir las razas BBB/BNJ virulento a *Lr61* de BBB/BNG que es avirulenta. La fórmula de avirulencia/virulencia para **BBG/BPC** fue: *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr9*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr21*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr30*, *Lr32*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr61* /*Lr10*, *Lr11*, *Lr12*, *Lr14b*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr27*, *Lr31*, *Lr33*, *Lr72*. Mientras que para la raza **BBB/BNJ** fue: *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr9*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr21*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr29*, *Lr30*, *Lr32*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr72*/*Lr10*, *Lr11*, *Lr14b*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr28*, *Lr33*, *Lr61*.

### 1.2.3 Genética de la resistencia

Se realizaron cruza directas entre materiales susceptibles y resistentes a la raza BBG/BP y BBB/BNJ de roya de la hoja *Puccinia triticina* E. Los cruzamientos se hicieron de forma manual entre el progenitor “Atred” de primavera y dos de las 51 líneas de trigo de invierno que se sometieron a vernalización por un periodo de seis semanas a temperatura de 6 °C; para luego sembrarlas junto con el progenitor susceptible de primavera. Para sincronizar la etapa de espigamiento, se efectuaron siembras en tres fechas del progenitor de primavera “Atred” con un intervalo de 10 d. También se hizo la cruza entre los progenitores evaluados como resistentes después del cruzamiento inicial (“Mirlo 26” y “Elinia 48”) para hacer las pruebas de alelismo.

**Cuadro 1. Genotipos de trigos cristalinos de hábitos invernales evaluados en plántula por su resistencia a la roya de la hoja.**

Entrada	Cid	Sid	Gid	Genotipos de trigos duros
1	346839	4	5163946	ALIY PARUS
2	346858	3	5163941	CHERNOMOR
3	150694	4	5217481	DELTA-DW
4	346857	3	5163943	ICEBERG
5	346856	2	5163944	KORALL
6	346877	9	5163930	UKR-OD 1231.93
7	346879	4	5163929	UKR-OD 1374.93
8	346864	10	5163937	UKR-OD 1557.91
9	346883	2	5163926	UKR-OD 1645.94
10	346884	4	5163925	UKR-OD 1704.94
11	346875	3	5163932	UKR-OD 795.93
12	5790	5	5240543	YANTAR
13	240291	2	5194134	ZHEMCHUG
14	125925	5	5220585	D86135
15	264779	3	5183416	6107
16	346911	3	5163915	WD 143.83/142.83
17	346795	2	5163960	MVTD 28-94
18	346796	2	5163959	MVTD 29-94
19	346798	2	5163958	MVTD 32-94



...Continuación Cuadro 1

Entrada	Cid	Sid	Gid	Genotipos de trigos duros
20	144430	8	5217709	DF1014.83
21	144275	10	5217726	DF28.82.84
22	378179	3	5154224	DIDGORI
23	123868	14	5220908	SURFBIRD
24	123552	154	5220926	URRACA
25	144293	5	5217719	PARUS-DW
<b>26</b>	<b>127532</b>	<b>53</b>	<b>5220374</b>	<b>SN TURK MI82-83 90=Mirlo 26</b>
27	743	14	5241615	CAMBRIDGE 20
28	144272	9	5217731	WDNEB35
29	144245	2	5217733	OSU-3910236
30	144264	4	5217732	OSU-3920017
31	166634	126	5215419	DF28.82.84//SRN_3/AJAIA_15
32	166511	128	5215434	CLICO/BIDI17//CPP/3/BKM/4/LAPDY_25
33	166537	43	5215421	URA/ESPE
34	376499	6	5156963	SN TURK MI82-83 90/5/AOS/SNIP/3/MEDIUM/KIF//SAPI/4/ALTAR 84
35	347077	121	5163903	OSU-3910096//HIMAN_9/BEJAH_6
36	308662	43	5173399	SDAY2/3/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13
37	308715	86	5173371	CAM20/URA
38	455603	-1	5081887	SOLDUR
39	480638	-1	5044366	WPB881/ICEBERG
40	480639	-5	5044354	QFN/ALIPARUS
41	480648	-2	5044337	BRINDUR/DF 38-86
42	480730	20	4959812	BAB/RENVILLE//H7092-12
43	480700	20	4970026	VIC/BRINDUR//BAB
44	480702	40	4970033	VIC/D.142-50//H7092-12
45	480688	10	4970020	WPB881/PARUS//BAB
46	480722	12	4970072	84004/VLNV//CASOAR/4/7-5 5//VLGR/EDM/3/SOD211
47	480715	8	4959739	H7092-11/WPB881//SOD211
<b>48</b>	<b>480723</b>	<b>12</b>	<b>4974670</b>	<b>7-5/VLGR//EDM/3/TOPAZ/4/SN TURK MI83-84 503= Elinia 48</b>
49	480733	12	4974682	SOD211/4/7-5/VLGR//EDM/3/TOPAZ
50	480726	36	4970091	QFN//H7092-11/WPB881/3/DF82.85
51	480710	32	4977870	WPB881/5/7-5/VLGR//EDM/3/TOPAZ/4/SN TURK MI83-84 503/SRN

Cid= Identificación de Cruza. Sid= Identificación de historial de selección. Gid= Identificación de germoplasma.

#### 1.2.4 Obtención de F1, F2 y familias F3

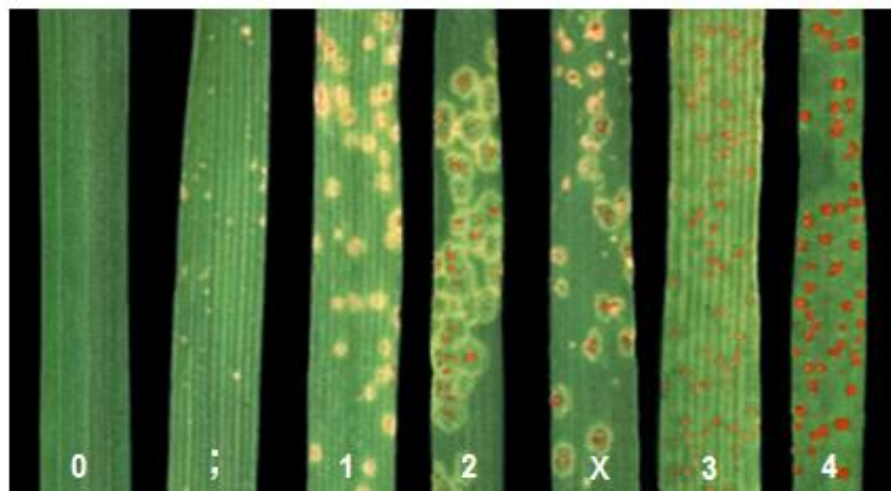
Las semillas F1, obtenidas en cada cruce, se sembraron en cinco macetas con tres semillas cada una. Se cosecharon las tres plantas con mejores características de grano con el fin de obtener semilla para la generación F2, el resto del material fue guardado como reserva. La semilla proveniente de una planta F2 de las cruces de los genotipos susceptibles por resistentes (“Atred” x “Mirlo 26” y “Atred” x “Elinia 48”) y resistente por resistente (“Elinia 48” x “Mirlo 26”) fueron sometidas a vernalización por un periodo de seis semanas a 6 °C para obtener semillas F3 y evaluarlas.

#### 1.2.5 Evaluación de genotipos, líneas F2 y familias F3

Los 51 genotipos de trigos duros de hábito invernal fueron sembrados en charolas de plástico de 20 cm de largo x 30 cm de ancho x 6 cm de profundidad, en una mezcla de sustrato (tierra + peat moss, proporción 1:1) marcando 48 orificios con una plancha de acero de 8 hileras y 6 columnas, de 1 cm de diámetro x 2 cm de profundidad. Se sembraron diez semillas de cada uno de los genotipos. Las charolas se etiquetaron y colocaron en invernadero durante diez días hasta que se extendió completamente la hoja primaria de las plántulas. Las charolas fueron mantenidas en el invernadero a una temperatura de  $18 \pm 2$  °C durante la noche y  $20 \pm 2$  °C en el día. Las plántulas se fertilizaron con la fórmula 17-17-17 (N-P-K) soluble en agua usando 125 mL por charola. La inoculación se hizo a los diez días después de la siembra, cuando se extendió la hoja primaria asperjando cada charola con una suspensión de urediniosporas en aceite mineral (Sotrol®170) de las razas BBG/BP y BBB/BNJ y asperjando sobre la lámina de las hojas. Las plantas inoculadas se dejaron secar por 20 minutos, después se colocaron en cámara húmeda, donde se sometieron a 12 h de rocío y posteriormente se trasladaron al invernadero cuya temperatura oscilaba entre 20 °C y 24 °C hasta la aparición de los signos de la enfermedad. La semilla F2 de las cruces se sembró bajo condiciones de invernadero, para evaluar las características de resistencia o susceptibilidad en estado de plántula. Las plantas fueron evaluadas a los

9 y 10 días después de la inoculación basadas en la escala de 0,4 propuesta por Roelfs *et al.* (1992) (Figura 3; Cuadro 2)

**Figura 3. Escalas para evaluar el tipo de infección de la roya de la hoja *Puccinia triticina* E. (Roelfs *et al.*, 1992)**



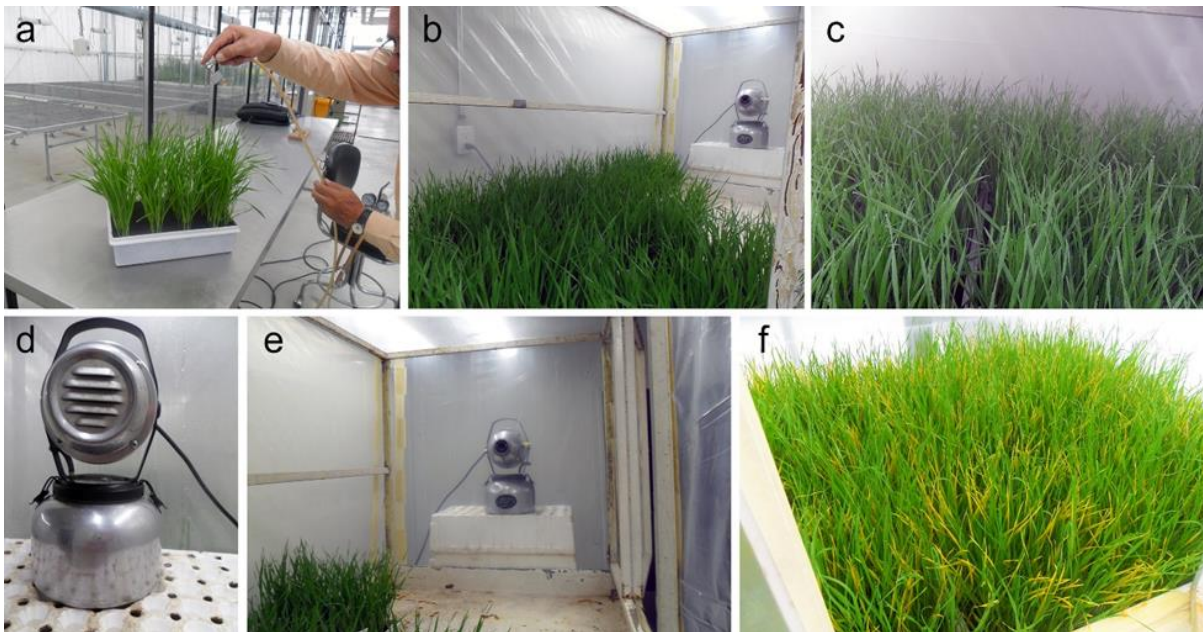
**Cuadro 2. Respuesta del hospedante y reacciones producidas por la infección de la roya de la hoja *Puccinia triticina* E. (Roelfs *et al.*, 1992).**

Respuesta del hospedante (Clase)	Reacción de infección	Síntoma de la enfermedad*
Inmune	0	Ningún uredinias presente
Casi inmune	;	No uredinias, pecas cloróticas o necróticas presentes que indican hipersensibilidad
Muy resistente	1	Uredinias pequeños rodeados por necrosis
Moderadamente resistente	2	Uredinias pequeños o de tamaño mediano a menudo rodeados por clorosis o necrosis; puede haber una isla verde rodeada por un borde clorótico o necrótico
Heterogénea	X	Uredinias de tamaño variable (todos los tipos de infección en la misma hoja)
Moderadamente susceptible	3	Uredinias de tamaño mediano que está asociado con cierta clorosis.
Susceptible	4	Uredinias grandes sin clorosis.

\*Detalles de la infección: = uredinias muy pequeños en la reacción de infección; uredinias algo pequeños en la reacción de infección; + uredinias grandes en la reacción de infección; ++, uredinias muy grandes en la reacción de infección; C indica más clorosis de lo normal; N presencia de necrosis en la reacción de infección.

### 1.2.6 Inoculación de plantas F2 y Familias F3

Las plantas F2 se sembraron de la misma forma que los progenitores de invierno; solo que una sola semilla fue depositada en cada uno de los 48 orificios de la charola de plástico. Además de las semillas F2, también se sembraron los progenitores susceptibles y resistentes. A los 16 d después de la siembra, las plántulas fueron inoculadas con una suspensión de urediniosporas de roya de la hoja de la raza BBG/BPC o BBB/BNJ respectivamente. Las esporas fueron suspendidas en aceite mineral (Soltrol®170) con una concentración de 2-3 mg mL<sup>-1</sup> de aceite (Herrera-Foessel *et al.*, 2003). La inoculación en las plántulas se realizó cuando presentaron la primera hoja extendida, se asperjaron de manera uniforme, tratando de cubrir toda la plántula, usando un atomizador conectado a un compresor de aire (FELISA®, Modelo FE-1500L). Una vez que las plantas se inocularon, se dejaron secar por 20 minutos y luego se colocaron por 16 h en una cámara húmeda con humidificador (Hydrofogger) a 100% de humedad relativa. Posteriormente se trasladaron al invernadero donde se mantuvieron entre 20 y 24 °C de temperatura, hasta la aparición de los signos de la enfermedad (Figura 4). Para la evaluación de la F3 las semillas se sembraron en charolas de plástico que contenían suelo esterilizado como ya se describió anteriormente; pero solo se sembraron 10 familias por charola para generar uniformidad. Cada familia F3 estuvo representada por 25-30 semillas para poder identificar las familias homocigóticas resistentes; familias homocigóticas susceptibles y familias segregantes.



**Figura 4. Proceso de inoculación de la roya *Puccinia triticina* E:** (a) Inoculación de la roya en charolas con 48 orificios (b) Cámara de humidificación. (c) Inicio de rocío. (d) Humificador (Hydrofogger). (e) Plantas después de 16 h de rocío posterior a la aplicación de rocío. (f) Aparición de signos de la roya de la hoja.

### 1.2.7 Variables medidas

Las lecturas se llevaron a cabo 12 d después de la inoculación, cuando los signos fueron visibles. La evaluación de las plántulas F2, se llevó a cabo 12 d después de la inoculación de manera visual una vez que los signos fueron visibles, de acuerdo al tipo de infección producida por el patógeno en la hoja inoculada, se usó la escala de 0 - 4 (Roelfs *et al.*, 1992). Posteriormente se contabilizó el número de plántulas resistentes y el número de plántulas susceptibles por genotipo. Se consideraron dos grupos de genotipos, los susceptibles (3 a 3 + o 4), y los resistentes que involucraron plantas con reacción intermedia o resistentes (0, ; , 1 y 2). En el caso de las familias F3 se clasificaron en familias resistentes, susceptibles y segregantes.

### 1.2.8 Obtención de líneas resistentes con hábito de primavera

Se seleccionaron plantas F2 resistentes con hábito de primavera, y se sembraron como se indica en el inciso 1.2.5 para obtener familias F3. Las cuales fueron una vez más inoculadas siguiendo los procedimientos previamente descritos.

### 1.2.9 Análisis estadístico

Los análisis se realizaron mediante Ji-cuadrada ( $X^2$ ), de acuerdo al número de genes esperados, se realizaron pruebas de bondad de ajuste. El valor de tablas y la significancia fue determinado de acuerdo a la  $X^2$  que obtuvieron las proporciones de las familias de cada cruce. Para sacar el valor de tablas se tomaron dos grados de libertad (n-1) en donde n es el número de grupos de F2 (Infante-Gil y Zárate de Lara, 1990) (Figura 5).

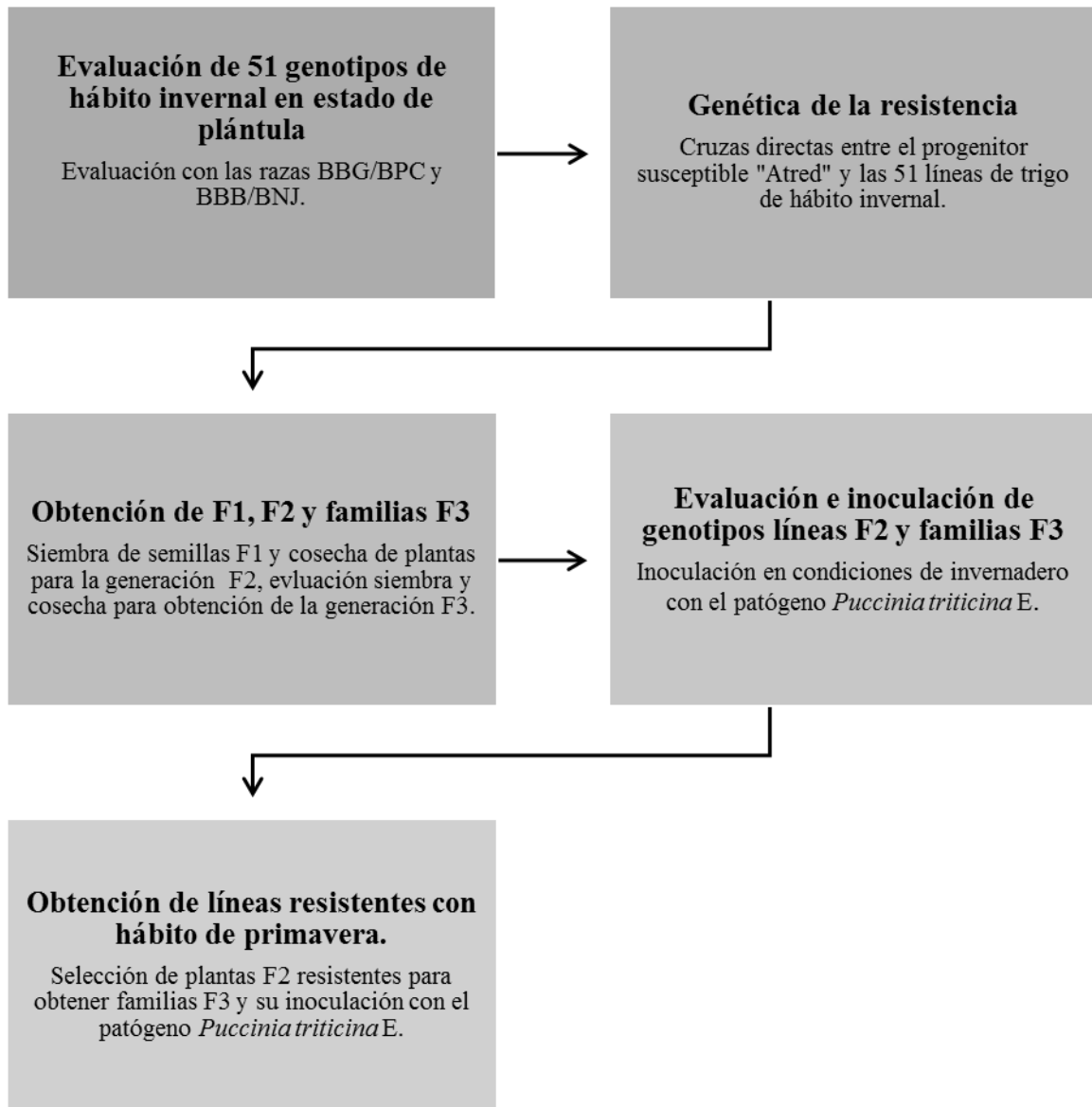
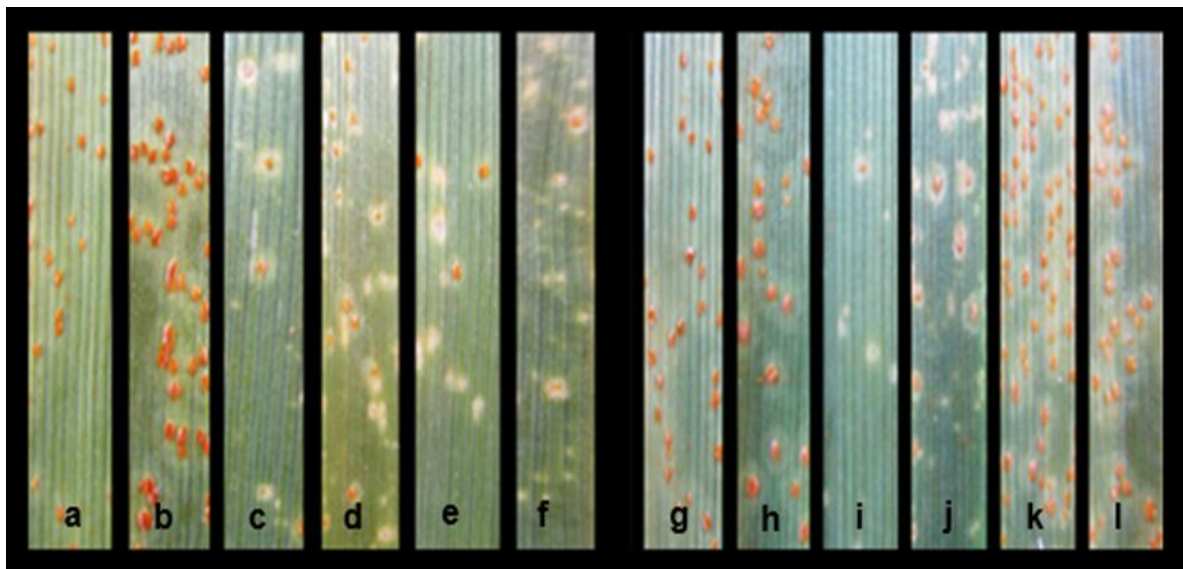


Figura 5. Protocolo para la evaluación y obtención de la resistencia de trigos cristalinos de hábito invernal a *Puccinia triticina* Eriks.

### 1.3 Resultados y discusión

De los 51 genotipos de trigos duros de hábito invernal evaluados en estado de plántula solo “Mirlo 26” y “Elinia 48” resultaron resistentes a la raza de roya BBG/BPC y uno a la raza BBB/BNJ (Figura 6), lo cual permitió clasificar a los genotipos en susceptibles y resistentes (Apéndice 1) para examinar e identificar el tipo de herencia génica y el gen que condiciona la resistencia mediante los cruzamientos entre las líneas seleccionadas y el genotipo susceptible “Atred” (Cuadro 3).



**Figura 6. Clasificación de los genotipos para la raza BBB/BNJ de *Puccinia triticina* E., “Atred” (a) Primera hoja. (b) Segunda hoja. “Elinia 48” (c) Primera hoja. (d) segunda hoja. “Mirlo 26” (e) Primera hoja. (f) Segunda hoja. Para la raza BBG/BP: “Atred” (g) Primera hoja. (h) Segunda hoja. “Elinia 48” (i) Primera hoja. (j) Segunda hoja. “Mirlo 26” (k) Primera hoja. (l) Segunda hoja.**



**Cuadro 3. Respuesta de los 51 genotipos de trigos duros en estado de plántula a las razas de roya de la hoja BBB/BNJ y BBG/BPC**

Entrada	Genotipos de trigos duros	BBG/BPC	BBB/BNJ
1	ALIY PARUS	4	4
2	CHERNOMOR	4	4
3	DELTA-DW	4	4
4	ICEBERG	4	4
5	KORALL	4	4
6	UKR-OD 1231.93	4	4
7	UKR-OD 1374.93	4	4
8	UKR-OD 1557.91	4	4
9	UKR-OD 1645.94	4	4
10	UKR-OD 1704.94	4	4
11	UKR-OD 795.93	4	4
12	YANTAR	4	4
13	ZHEMCHUG	4	4
14	D86135	4	4
15	6107	4	4
16	WD 143.83/142.83	4	4
17	MVTD 28-94	4	4
18	MVTD 29-94	4	4
19	MVTD 32-94	4	4
20	DF1014.83	4	4
21	DF28.82.84	4	4
22	DIDGORI	4	4
23	SURFBIRD	4	4
24	URRACA	4	4
25	PARUS-DW	4	4
<b>26</b>	<b>SN TURK MI82-83 90=Mirlo 26</b>	<b>X</b>	<b>4</b>
27	CAMBRIDGE 20	4	4
28	WDNEB35	4	4
29	OSU-3910236	4	4
30	OSU-3920017	4	4
31	DF28.82.84//SRN_3/AJAIA_15	4	4
32	CLICO/BIDI17//CPP/3/BKM/4/LAPDY_25	4	4
33	URA/ESPE	4	4

## ...Continuación Cuadro 3

Entrada	Genotipos de trigos duros	BBG/BPC
34	SN TURK MI82-83 90/5/AOS/SNIP/3/MEDIUM/KIF//SAPI/4/ALTAR 84	4
35	OSU-3910096//HIMAN_9/BEJAH_6	4
36	SDAY2/3/AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13	4
37	CAM20/URA	4
38	SOLDUR	4
39	WPB881/ICEBERG	4
40	QFN/ALIPARUS	4
41	BRINDUR/DF 38-86	4
42	BAB/RENVILLE//H7092-12	4
43	VIC/BRINDUR//BAB	4
44	VIC/D.142-50//H7092-12	4
45	WPB881/PARUS//BAB	4
46	84004/VLNV//CASOAR/4/7-5 5//VLGR/EDM/3/SOD211	4
47	H7092-11/WPB881//SOD211	4
<b>48</b>	<b>7-5/VLGR//EDM/3/TOPAZ/4/SN TURK MI83-84 503=Elinia 48</b>	<b>X</b>
49	SOD211/4/7-5/VLGR//EDM/3/TOPAZ	4
50	QFN//H7092-11/WPB881/3/DF82.85	4
51	WPB881/5/7-5/VLGR//EDM/3/TOPAZ/4/SN TURK MI83-84 503/SRN	4

En la cruce de las variedades “Atred” x “Mirlo 26” las proporciones fueron de 1:3 de resistentes y susceptibles, respectivamente. Estos valores indican que la resistencia en “Mirlo 26” es conferida por un gen recesivo en respuesta a la inoculación con la raza BBG/BPC (Cuadro 4). En la cruce entre “Atred” x “Elinia 48”, inoculada con la misma raza, la proporción fue 13:3 de plantas resistentes y susceptibles que indicaron que la resistencia en “Elinia 48” fue conferida por dos genes: uno dominante y otro recesivo.

**Cuadro 4. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en plantas F2 de la cruza entre las variedades Atred y Mirlo 26 en respuesta a la raza BBG/BPC de roya de la hoja.**

Cruza	Total de plantas Núm.	Núm. de plantas				Proporción fenotípica	X <sup>2</sup>	Probabilidad
		Resistentes		Susceptibles				
		Obs.	Esp.	Obs.	Esp.			
Atred/Mirlo26, 1F1	119	23	29.75	96	89.25	1:3	2	0.90
Atred/Mirlo26, 2F1	99	28	24.75	71	74.25	1:3	0.5	0.90
1F1+2F1	218	51	54.5	167	163.5	1:3	0.27	0.90

Obs.= Observados; Esp.= Esperados.

Sin embargo, al inocular las plantas de la cruza “Atred” x “Mirlo 26” con la raza BBB/BNJ no se encontraron plantas resistentes mientras que en las plantas de la cruza entre “Atred” y “Elinia 48” la proporción fenotípica 3:1 señala la presencia del gen de resistencia dominante en “Elinia 48” (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en plantas F2 de la cruza entre las variedades Atred y Elinia 48 en respuesta a la raza BBG/BPC de roya de la hoja**

Cruza	Total de plantas Núm.	Núm. de plantas				Proporción fenotípica	X <sup>2</sup>	Probabilidad
		Resistente		Susceptible				
		Obs.	Esp.	Obs.	Esp.			
Atred/Elinia 48, 1F1	154	127	125.1	27	28.8	13:3	0.13	0.90

Obs.= Observados; Esp.= Esperados.

Las plantas resistentes a la raza de la roya BBG/BPC, obtenida del cruzamiento de los genotipos “Elinia 48” y “Mirlo 26” (1 F1), resultaron de hábito invernal, que fueron descartadas seleccionando sólo las de características de hábito de primavera ya que no se observaron plantas susceptibles. Mientras que para “Atred” x “Mirlo 26” y “Atred x “Elinia 48” la selección fue similar obteniendo 135 plantas; las cuales fueron evaluadas una vez con las razas BBG/BPC y BBB/BNJ (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Comportamiento de la resistencia a roya de la hoja en plantas F1 con las cruza con Elinia 48/Mirlo 26 y la raza BBG/BPC**

Cruza	Total de plantas Núm.	Núm. de plantas				Proporción fenotípica	X <sup>2</sup>	Prob.
		Resistente		Susceptible				
		Obs.	Esp.	Obs.	Esp.			
Elinia 48/Mirlo 26 1F1	135	135	-	-	0	-	-	-

Obs.= Observados; Esp.= Esperados; Prob.= Probabilidad.

En la cruza entre las variedades “Atred” y “Mirlo 26” (3 F1) se obtuvieron 100 plantas; sin embargo, el cruzamiento de “Atred” y “Elinia 48” (2 F1) evaluado con la raza la proporción fenotípica se ajustó a 3:1 de resistentes y susceptibles lo cual indicó que la resistencia estuvo conferida por un gen dominante (Cuadros 7 y 8).

**Cuadro 7. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en plantas F2 de la cruza entre “Atred” y “Mirlo 26” y “Atred” y “Elinia 48” en respuesta a la raza BBB/BNJ.**

Cruza	Total de plantas Núm.	Núm. de plantas				Proporción fenotípica	X <sup>2</sup>	Prob.
		Resistentes		Susceptibles				
		Obs.	Esp.	Obs.	Esp.			
Atred/Mirlo 26 3F1	100	0	-	100	-	-	-	-
Atred /Elinia 48 2F1	100	74	75	26	25	3:1	0.05	0.90

Obs.= Observados; Esp.= Esperados; Prob.= Probabilidad.

**Cuadro 8. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en plantas F2 de la cruza entre “Mirlo 26” y “Elinia 48” en respuesta a la raza BBB/BNJ.**

Cruza	Total de plantas Núm.	Núm. de plantas				Proporción fenotípica	X <sup>2</sup>	Prob.
		Resistentes		Susceptibles				
		Obs.	Esp.	Obs.	Esp.			
Mirlo26/Elinia48, 2F1	123	93	92.2	30	30.7	3:1	0.016	0.90

Obs.= Observados; Esp.= Esperados; Prob.= Probabilidad.

Al evaluar la progenie de la cruza “Elinia 48” y “Mirlo 26” con la raza BBG/BPC no se observaron plantas susceptibles lo indica una autofecundación o bien que ambos

progenitores tienen un gen en común. Sin embargo al evaluar la progenie con la raza BBB/BNJ a la cual “Mirlo 26” es susceptible los datos muestran una segregación de 1:2:1 para un gen dominante, por lo tanto se puede inferir que el gen en común entre “Mirlo 26” y “Elinia 48” es el recesivo (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Relaciones fenotípicas observadas y esperadas en familias F3 de la cruce Mirlo 26/Elinia 48 en respuesta a la raza BBB/BNJ.**

Cruza	Núm. total de plantas	Núm. de familias						Proporción fenotípica	X <sup>2</sup>	Prob
		R.		S.		Seg.				
		Ob	Esp	Ob	Esp	Ob	Esp			
<b>Elinia48/ Mirlo26 1F1</b>	135	37	33.8	64	67.5	34	33.8	1:2:1	0.5	0.90

Ob.= Observados; Esp.= Esperados; Prob.= Probabilidad; R.= Resistentes; S.= Susceptibles; Seg.= Segregantes

Zhang y Knott (1990) reportaron la presencia de un gen dominante (*Lr17*) en la variedad “Quilafen” en sus estudios de ocho cultivares de trigo duro resistente a roya de la hoja de diversos orígenes. Los resultados mostraron que genes dominantes y recesivos, o combinaciones de ellos, confirieron resistencia en estado de plántula, esto indica la presencia de genotipos resistentes a roya de la hoja de trigo cristalino de hábito invernal entre los trigos criollos disponibles en Europa y en el banco de germoplasma del CIMMYT. De los dos genotipos resistentes a la raza BBG/BP identificados, la resistencia en “Elinia 48” puede provenir de trigos cristalinos de primavera de acuerdo con los progenitores involucrados en la cruce (Herrera- Foessel *et al.*, 2014).

De los más de 72 genes de resistencia identificados y catalogados en trigo (McIntosh *et al.*, 1992) solo *Lr30* ha sido catalogado como recesivo; los demás, son reportados como dominantes o parcialmente dominantes (McIntosh *et al.*, 1995). Sin embargo, la resistencia es condicionada por genes recesivos en trigos cristalinos como lo indican Stanfield (1983) y Fitzgerald *et al.*

(1957) quienes identificaron la presencia de dos genes recesivos duplicados, confiriendo resistencia a la raza 65 los cuales fueron designados como *Lr7* y *Lr8* heredados de forma independiente. El uso de estos genes en un programa de mejoramiento para resistencia a la roya de la hoja, ha sido difícil porque se tiene que incrementar considerablemente el tamaño de la población además de no disponer de progenitores o genotipos portadores de estos genes. El gen recesivo que otorga la resistencia en “Mirlo 26” en respuesta a la raza BBG/BPC es ineficiente para la raza BBB/BNJ y ese aspecto limita su uso. Mientras la raza dominante en México sea BBG/BPC como hasta ahora, el gen recesivo identificado tendrá cierta utilidad siempre y cuando este acompañado del gen *Lr72* presente en las variedades “Altar C84” y “Atil C2001”, entre otras.

En general, las variedades poseen un gen dominante; Aguilar *et al.* (2000) reportaron que la resistencia ha sido conferida por la acción independiente de un gen dominante y un gen recesivo identificados por la proporción 13:3 comparable con el correspondiente a la segregación del gen recesivo para trigos sintéticos hexaploides (*Triticum turgidum* x *Triticum tauschii*), lo que demostró que la resistencia fue conferida por un gen dominante. Lo anterior coincide con lo encontrado en “Elinia 48” en contra de la raza BBG/BPC; con solo un gen dominante cuando la raza BBB/BNJ dominó la resistencia del gen recesivo. La resistencia conferida por un gen dominante es más común tanto en trigos harineros como en trigos cristalinos como en el caso de *Lr10* (Aguilar *et al.*, 2000), *Lr14a* (Herrera-Foessel *et al.*, 2014), *Lr16* (Zhang *et al.*, 2008), *Lr23* (Aguilar *et al.*, 1999), *Lr61Lr72* (Herrera-Foessel *et al.*, 2014) y otros genes no catalogados que se han identificado en genotipos de trigo cristalino acriollados en Oaxaca (Huerta *et al.*, 2010). El gen dominante identificado en “Elinia 48”, resistente no solo a las razas BBG/BPC y BBB/BNJ sino también a las otras razas de roya que logran afectar a trigos cristalinos identificadas en México y en conjunto con otros genes, podrían proveer de mayores niveles de resistencia en los trigos cristalinos cultivados en México. La resistencia a roya de la hoja conferida por genes recesivos también ha sido reportada en genotipos de trigos cristalinos contra las razas BBG/BP (Zhang *et al.*, 2008). Como resultado de las cruces del trigo susceptible de primavera

con los progenitores resistentes de hábito invernal, fue posible identificar genotipos resistentes con hábito de primavera, los cuales poseen un buen tipo agronómico. Estas líneas identificadas, pueden usarse como fuentes de resistencia a roya de la hoja en un programa de mejoramiento y emplear el gen dominante que permanece efectivo en contra de la raza de roya más común ahora en México (BBG/BPC) en combinación con otros genes.

### 1.3 Conclusiones

- La genética de la resistencia de la roya de la hoja se comprobó mediante el estudio con los progenitores “Mirlo 26” y “Elinia 48” en estado de plántula y los cruzamientos con el progenitor susceptible “Atred”.
- El tipo de acción génica que opera en los dos trigos invernales “Mirlo 26” y “Elinia 48” fue de dominancia y recesividad repentina; por lo que la genética de la resistencia a la roya de la hoja causada por *Puccinia triticina* Ericks es de herencia simple. En estado de plántula el genotipo “Mirlo 26” tiene un gen recesivo que otorga tal resistencia mientras que en “Elinia 48” la resistencia es conferida por un gen dominante a la raza BBG/BPC.
- En la F3, se obtuvieron genotipos de primavera que poseen el gen dominante y el recesivo a partir del cruzamiento entre progenitores invernales resistentes con progenitores de primavera; por lo que los progenitores “Mirlo 26” y “Elinia 48” podrían usarse como fuentes de resistencia a la roya de la hoja en programas de mejoramiento genético de trigos de primavera.

### 1.4 Recomendaciones

- Para la obtención de genotipos de primavera resistentes a la roya de la hoja *Puccinia triticina* E., es conveniente realizar cruzamientos mediante progenitores invernales con progenitores de primavera que posean ambas el gen dominante y el recesivo.

- Se sugiere usar un sexto juego de diferenciales de roya de la hoja (*Lr14a*, *Lr28*, *Lr61* y *Lr72*); que implica adicionar una sexta letra a la nomenclatura para diferenciar las razas BBB/BN; una que es avirulenta a *Lr61* (BBB/BNG) y otra que es virulenta (BBB/BNJ), como se usó en el presente estudio.



## 1.6 Literatura citada

- Aguilar, R.V.H., R.P. Singh y J.D. Molina G. 1999. Genética de la resistencia a la roya de la hoja de cuatro trigos sintéticos hexaploides. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 22: 215-226.
- Aguilar, R. V. H., Singh, R. P., Molina, G. J. D. y Huerta-Espino J. 2000. Herencia de la resistencia de la roya de la hoja en cuatro trigos sintéticos hexaploides. *Agrociencia*. 34: 235-245.
- Dubin, H. J., and S. Rajaram 1996. Breeding disease-resistant wheat for tropical highlands and lowlands. *Annu. Rev. Phytopath.* 34: 503-26.
- Fitzgerald, P.J.Caldwell, R. M, and Nelson, O.E. 1957. Inheritance of resistance to certain races of leaf rust of wheat. *Agronomy Journal* 49: 539-543.
- Herrera-Foessel, S.A., Singh, R.P., J.Huerta-Espino, J. Yuen, and A. Djurle. 2003. Diversity of resistance to leaf rust in five CIMMYT germoplasm derived durum wheats. *In: Procceding of the Tenth International Wheat Genetics Symposium 1-6 September 2003. Paesetum, Italy. Volume 1: 361-363.*
- Herrera-Foessel, S. A., J. Huerta-Espino, V. Calvo-Salazar, C.X. Lan, R.P. Singh. 2014. Lr72 confers resistance to leaf rust in durum wheat cultivar Atil C2000 *Plant Disease* 98: 631-635.
- Huerta- Espino J. y R. P. Singh. 2000. Las royas de trigo. *In: El trigo de temporal en México. Villaseñor M., H. E. y E. Espitia R. (Eds.) SAGARPA, INIFAP. CIP-CENTRO y CEVAMEX, México. Pp 231-251.*
- Huerta-Espino J, R P Singh, S. A.Herrera Foessel, B, P Figueroa-López. 2009. First detection of virulence in *Puccinica triticina* to resistance genes Lr27 + Lr31 present in durum wheat in México. *Plant Disease*. 93: 110-120.
- Huerta, E. J., R. P. Singh, H. E. Villaseñor M., E. Solís M., E. Espitia R., y S. G. Leyva M. 2010. Transferencia del gen Lr14a de trigos harineros a trigos cristalinos y expresión de la resistencia a roya de la hoja. *Rev. Fitotecnia. Mex.* 33: 29-36.
- Infante-Gil, S., y G. P. Zárate de Lara. 1990. *Métodos Estadísticos*. Ed. Trillas, México. 643 p.
- McInosh, R.A. 1992. Close genetic linkage of genes conferring adult-plant resistance to leaf rust and stripe rust in wheat. *Plant pathol.* 41: 523-527.
- McIntosh, R. A., C. R. Wellings, and R. F. Park. 1995. *Wheat Rusts: An atlas of resistance genes*. CSIRO Australia.200 p.
- Quintero, T.A. 1995. Documento de Decisión del comité Ejecutivo de la NAPPO. p.50.
- Reynolds, M.P; Trethowan, R; Crossa, J., Vargas, M. Sayre, K. D. 2014. Physiological factors associated with genotype by environment interaction wheat. *Field Crops Research*, 75:140-141.

- Roelfs, A. P., R. P. Singh y E. E. Saari. 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. México, D.F.: CIMMYT. pp.81.
- SIAP 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx). Consultado el 20 de Abril de 2015.
- Singh, R.P. and H.J. Dubin. 1997. Sustainable control of wheat diseases Mexico. *In: Primer Simposio Internacional de trigo Memorias*. 7-9 de abril de 1997. Cd. Obregón, Sonora. 93-102.
- Stanfield, W.D. 1983. Shaum's Outline series theory and problems of Genetics 2/ed. Mc Grow-Hill Inc., U. S. A. 574 p.
- Zhang, H. and D. R. Knott. 1990. Inheritance of leaf rust resistance in durum wheat. *Crop Sci.* 30: 1218-1222.
- Zhang, J. X., R. P. Singh, J. A. Kolmer, J. Huerta-Espino, and A. Anderson. 2008. Inheritance of leaf rust resistance in CIMMYT Wheat Weebill 1. *Crop Sci.* 48: 1037-1047.

## CAPÍTULO II

### RESISTENCIA *in vitro* EN TRIGOS CRISTALINOS DE HÁBITO INVERNAL A *Puccinia triticina* Eriks

## CAPITULO II. RESISTENCIA *in vitro* EN TRIGOS CRISTALINOS DE HÁBITO INVERNAL A *Puccinia triticina* Eriks

### 2.1 Introducción

El trigo ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre, es considerado un alimento con un gran aporte energético; el 20% de las calorías alimenticias en el mundo provienen del trigo, es un alimento básico de la mayoría de las civilizaciones de Europa, Oeste de Asia y Norte de África, representando la base de su alimentación. Sin embargo, gran parte de este cultivo se destina a la alimentación animal y subproductos de la transformación industrial. El trigo se cultiva en todo el mundo y sus volúmenes de producción superan a los de otros cultivos importantes como la papa y el maíz. Por lo que la principal producción de trigo a nivel nacional de forma comercial son los trigos harineros y los duros que son reconocidos por sus características en la textura del grano (Reynolds *et al.*, 2014).

La especie *Triticum turgidum* var. *Durum* conocida como trigo duro o cristalino, es el resultado de cruzamientos naturales de dos especies diploides originarias probablemente en el mediterráneo (Huerta y Skovmand, 2000). Se caracteriza por tener un tipo de grano muy duro, un endospermo con alto contenido de pigmento amarillo (carotenoides) y un gluten fuerte (no extensible) por lo que generalmente se usa en la industria de pastas alimenticias (Hernández y Alvarado, 2011).

En México el trigo duro es importante en la parte Noroeste, donde es cultivado bajo condiciones de riego, específicamente en los Valles del Yaqui y del Mayo, en el estado de Sonora, y en los Valles del Carrizo y del Fuerte, en Sinaloa. En estas regiones se siembran durante el ciclo otoño-invierno y se obtienen cerca de 1, 654,879 toneladas de las cuales, alrededor de 600,000 toneladas se destinan a la industria nacional, ya que los productores que siembran este trigo han encontrado un mercado importante para su producto en las exportaciones hacia otros países (AOASS, 2015).

El 90% del trigo de temporal que se produce en México se siembra durante la primavera o al inicio del verano; coincide con la época de lluvias, en donde uno de los factores que más contribuyen al proceso infectivo de muchas enfermedades del trigo es la presencia de humedad en forma de rocío; ésta favorece la aparición de enfermedades causadas por hongos entre las que se encuentran las royas (Huerta y Singh, 2000). La más común de las royas del trigo es llamada roya de la hoja o café causada por el hongo *Puccinia triticina* E., la cual se presenta en las láminas de las hojas, y las vainas que también pueden ser infectadas cuando son favorables las condiciones como las densidades del inóculo y la susceptibilidad del genotipo. La existencia de una nueva raza fisiológica de la roya de la hoja (BBG/BN) fue detectada en el Noroeste de México en el 2001; infecta preferentemente a trigos duros y está presente en la mayoría de las zonas trigueras del país, por ello la importancia de la búsqueda de variedades de trigos duros que muestren casi inmunidad a todas las razas fisiológicas (Huerta y Skovmand, 2000).

En México, la generación de variedades resistentes a la roya de la hoja en los inicios del mejoramiento fue encaminada a usar genes de resistencia específicos que facilitarían la selección al cruzar variedades resistentes x susceptibles o resistentes x resistentes, y se heredaban en forma simple. Estas variedades, por lo general, poseen un gen dominante de resistencia que produce una respuesta de hipersensibilidad; al cruzar una variedad susceptible por un resistente, en su progenie es posible determinar tanto el tipo de acción génica como el número de genes que confieren la resistencia y por lo tanto, la identificación de nuevas fuentes de resistencia que logran ser de importancia económica (Huerta y Singh, 2000).

El mejoramiento convencional ha sido la mejor alternativa para la obtención de líneas resistentes a esta enfermedad; sin embargo, existen diferentes opciones para optimizar la evaluación de plantas resistentes y susceptibles a roya de la hoja. En la actualidad una opción viable para la evaluación de nuevas variedades con características agrícolas ventajosas es mediante las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, puesto que a partir de un segmento de tejido vegetal se induce la formación de una planta adulta. Con esta técnica es posible evaluar variedades con resistencia a la roya de la hoja en trigo *in*

*in vitro* en un tiempo menor comparado con la selección convencional en un espacio menor y de manera eficaz. Además, se puede obtener una gran cantidad de plantas genéticamente uniformes y libres de enfermedades y virus (Shaom *et al.*, 2008). El método de evaluación de roya de la hoja en plantas obtenidas bajo condiciones *in vitro* brinda ventajas en el cultivo de trigo ya que permite la obtención de miles de plantas a partir de un genotipo, conservando la estabilidad genética. La producción convencional del trigo genera una planta por semilla; sin embargo, con el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es posible obtener gran cantidad de plantas sanas disponibles para diversos estudios.

Con base en estos antecedentes, la presente investigación tuvo como objetivos:

1. Caracterizar la respuesta de los genotipos de trigo “**Atred**” (**Susceptible, S**), “**Mirlo 26**” (**Resistente, R**) y “**Elinia 48**” (**Resistente, R**) a la roya de la hoja *Puccinia triticina* E. que hayan sido seleccionadas a nivel de campo.
2. Evaluar plantas aclimatadas en invernadero inoculadas con *Puccinia triticina* E.
3. Comparar la producción de plantas *in vitro* e *in vivo*.
4. Inocular y evaluar plantas de trigo *in vitro* con roya de la hoja *Puccinia triticina* E.

## 2.2 Materiales y métodos

La presente investigación se desarrolló en los Laboratorios de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad Genética, del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y en el Laboratorio Nacional de Royas y otras Enfermedades del Trigo (LANARET) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX).

### 2.2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de tres genotipos experimentales: “Atred” con características de susceptibilidad, “Elinia 48” y “Mirlo 26” como resistentes a *Puccinia triticina* E., provenientes del invernadero del LANARET.

### 2.2.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo básico empleado estuvo constituido por sales minerales de Murashige y Skoog (MS, 1962), (Sigma Aldrich® M5519, 4.4 g L<sup>-1</sup>), adicionado con sacarosa (Sigma® SA79031, 30 g L<sup>-1</sup>), con un pH de 5.7 ± 0.1 ajustado con NaCl o HCl 1N, mediante un potenciómetro (Orión pH meter modelo 420). Posteriormente se agregó phytigel (Sigma® P8169, 2.5 g L<sup>-1</sup>) como agente gelificante. Se sirvieron 10 mL del medio de cultivo en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad. La esterilización del medio de cultivo se hizo en una autoclave vertical (AESAS®, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 min.

Los frascos de cultivo con el material sembrado se mantuvieron en el cuarto de incubación con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad proporcionado por lámparas de luz blanca fluorescente de 75 W, con irradiación fotosintética de 45 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> con temperatura de 26 ± 2 °C y humedad relativa de 30%.

## 2.2.3 Germinación *in vitro*

### 2.2.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico

De cada genotipo se seleccionaron semillas de tamaño uniforme y libre de algún daño biológico o mecánico. Se colocaron en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad y se lavaron con detergente en polvo durante 15 minutos con agua corriente y al final un lavado con agua destilada esterilizada. Después se establecieron tres tratamientos de desinfección con variaciones en tiempo y combinaciones de peróxido de hidrógeno<sup>®</sup> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merck<sup>®</sup>) con el objetivo de inducir la imbibición, plata coloidal, hipoclorito de sodiocomercial (NaOCl), Tween<sup>®</sup>20 y los fungicidas Benlate<sup>®</sup>, Captán<sup>®</sup> y Vitavax<sup>®</sup> 300 (Cuadro 10). Las semillas se enjugaron con agua destilada esterilizada para eliminar el exceso de desinfectantes. El proceso de desinfección de las semillas se hizo en una campana de flujo laminar horizontal.

**Cuadro 10. Tratamientos probados para la desinfección de semillas de los genotipos de trigo “Atred”(S), “Elinia 48” (R) y “Mirlo 26” (R).**

	Tratamiento (Núm.)	T1 (min)	T2 (min)	T3 (min)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (2% v/v)		21	21	22.5
Plata coloidal(10%v/v)+Tween <sup>®</sup> 20 (4%v/v)+NaClO (50% v/v)		30	30	40
Benlate <sup>®</sup> (8g L <sup>-1</sup> ) +Captán <sup>®</sup> (8g L <sup>-1</sup> )		30	30	50
Vitavax 300 (0.5g L <sup>-1</sup> )		0	20	0

### 2.2.3.2 Inducción de la germinación

Para inducir la germinación *in vitro*, las semillas de las tres variedades de trigo se sembraron en frascos de vidrio de 30 mL conteniendo 15 mL del medio básico MS (1962) y las condiciones indicadas en el inciso 2.2.2 con diferentes concentraciones y combinaciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (Kin) (Cuadro 11) para cada tratamiento. La siembra se hizo con la región del meristemo radicular sumergido 3 mm dentro del medio de cultivo.



**Cuadro 11. Dosis de 2, 4-D y cinetina adicionadas al medio de cultivo MS (1962) en la germinación de los genotipos de trigo “Atred” (S), “Elinia 48” (R) y “Mirlo 26”(R).**

Tratamiento (Núm.)	2,4-D		Kin	
	mg L <sup>-1</sup>	μM	mg L <sup>-1</sup>	μM
1(Testigo)	0	0	0	0
2	2.5	15	0	0
3	4.5	20.35	1.25	5.8
4	4.5	20.35	0	0
5	4.5	20.35	2.70	12.5

### 2.2.3.3 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Cada tercer día durante tres semanas después de la siembra se evaluaron, en cada variedad, los porcentajes de contaminación y germinación. El experimento se condujo bajo un diseño completamente al azar con 15 repeticiones por genotipo. Cada repetición estuvo constituida por una semilla sembrada en cada frasco de cultivo. El análisis de varianza se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 2.2.4 Inducción de callos

Para esta fase se seleccionaron semillas de tamaño uniforme y libre de cualquier daño mecánico de los tres genotipos de trigo: “Atred” (S), “Elinia 48” (R), y “Mirlo 26” (R). Se sembraron en medio MS (1962) suplementado con diferentes dosis de 2,4-D y cinetina (Cuadro 12). Los cultivos se incubaron en las condiciones indicadas en el inciso 2.2.2.

**Cuadro 12. Concentraciones de 2,4-D y cinetina evaluadas en la inducción de callos de los genotipos de trigo “Atred” (S), “Elinia 48”(R) y “Mirlo 26” (R).**

Tratamiento (Núm.)	2,4-D		Kin	
	mg L <sup>-1</sup>	µM	mg L <sup>-1</sup>	µM
1	4.5	20.35	1.25	5.8
2	4.5	20.35	0	0
3	4.5	20.35	2.70	12.5

A los 30 días después de la siembra se evaluaron el peso fresco inicial y final (g) de callo así como el porcentaje de producción de callos. El análisis de varianza se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## 2.2.5 Regeneración de plantas vía organogénesis directa e indirecta

### 2.2.5.1 Organogénesis directa

A partir de plántulas de un mes de edad que fueron germinadas *in vitro* de las cuales se emplearon como explantes secciones transversales basales de tallo [thin cell layer (capas finas de células)], de 6-9 mm de diámetro y de 1-2 mm de grosor. Los explantes se sembraron en frascos de vidrio de 240 mL de capacidad con medio cultivo básico MS (1962) (composición en el inciso 2.2.2) suplementado con BA (11.1 µM) y AIA (1.0 µM) (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Dosis de BA y AIA evaluadas en la inducción de brotes en la organogénesis directa e indirecta de los genotipos de trigo “Atred”(S), “Elinia 48”(R) y “Mirlo 26”(R)**

Tratamiento (Núm.)	BA		AIA	
	mg L <sup>-1</sup>	µM	mg L <sup>-1</sup>	µM
1	2.5	11.1	0	0
2	2.5	11.1	0.17	1.0
3	3.5	15.5	0.17	1.0

### 2.2.5.2 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Las variables respuesta evaluadas a los 30 días después de la siembra fueron: a) Porcentaje de brotación, b) Número de brotes y c) Longitud (cm) de los brotes d) Número de hojas. El experimento se condujo en un diseño completamente al azar, con 20 repeticiones por genotipo. Cada repetición estuvo constituida por un frasco de cultivo con cinco explantes en cada frasco. El análisis de varianza se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 2.2.5.3 Organogénesis indirecta

Se usaron como explantes callos de 60 días de edad obtenidos de semillas de los genotipos “Atred” (S), “Elinia 48” (R) y “Mirlo 26” (R) (inciso 2.2.4). Se sembraron en frascos de vidrio de 240 mL de capacidad con medio cultivo MS (1962) suplementado con BA (11.1  $\mu\text{M}$ ) y AIA (1.0  $\mu\text{M}$ ), las mismas dosis evaluadas en la organogénesis directa (Cuadro 13). A los 30 días después de la siembra se evaluaron las mismas variables del experimento de organogénesis directa mencionada en el apartado 2.2.5.2. El análisis de varianza se hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) se usó para comparar las medias.

### 2.2.6 Enraizamiento *in vitro*

En la regeneración de plantas vía organogénesis directa e indirecta se evaluó la obtención de raíces en los tres tratamientos probados. Se usó el medio de cultivo MS (1962) (composición en el inciso 2.2.2) suplementado con BA (11.1  $\mu\text{M}$ ) y AIA (1.0  $\mu\text{M}$ ). Las variables evaluadas 30 días después de la siembra fueron el número y longitud de raíces (cm). El experimento se condujo en un diseño completamente al azar, con 20 repeticiones por genotipo. Cada repetición estuvo constituida por un frasco de cultivo con cinco explantes de secciones transversales basales de tallo. El análisis de varianza se

hizo con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### 2.2.7 Aclimatación de plántulas

Plántulas enraizadas de los tres genotipos de trigo se seleccionaron por tamaño: cinco plantas con una altura de 5 cm, cinco con una altura de 10 cm y otras cinco con una altura de 15 cm. Las plántulas se extrajeron de los frascos y las raíces se lavaron con agua destilada estéril para eliminar cualquier residuo de medio de cultivo. Las plántulas se trasplantaron a vasos de unicel de 237 mL de capacidad con una mezcla de agrolita y peat-moos (proporción 1:1) como sustrato.

Las plantas se colocaron a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C en un área favorable a la luz y después de 15 días se trasladaron a un invernadero con una temperatura de  $22 \pm 2$  °C (Mujeeb, 2000), fueron regadas cada tercer día con la solución del medio básico MS (1962).

### 2.2.8 Inoculación de *Puccinia triticina* E.

#### 2.2.8.1 Raza del patógeno

Para evaluar de la resistencia de los tres genotipos, se usaron las raza de roya BBG/BPC donde la fórmula de avirulencia/virulencia para **BBG/BPC** fue: *Lr1, Lr2a, Lr2b, Lr2c, Lr3, Lr3bg, Lr3ka, Lr9, Lr13, Lr14a, Lr15, Lr16, Lr17, Lr18, Lr19, Lr21, Lr24, Lr25, Lr26, Lr28, Lr29, Lr30, Lr32, Lr35, Lr36, Lr61 /Lr10, Lr11, Lr12, Lr14b, Lr20, Lr23, Lr27, Lr31, Lr33, Lr72*.

#### 2.2.8.2 Inoculación en las plantas

A los 16 días después de la aclimatación las plántulas fueron inoculadas con una suspensión de urediniosporas de roya de la hoja de la raza BBG/BPC. Las esporas

fueron suspendidas en aceite mineral (Soltrol® 170) con una concentración de 2-3 mg mL<sup>-1</sup> de aceite (Herrera-Foessel *et al.*, 2003). La inoculación se realizó cuando las plántulas presentaron la primera hoja extendida, se asperjaron de manera uniforme, tratando de cubrir toda la plántula, usando un atomizador conectado a un compresor de aire (FELISA®, Modelo FE-1500L). Una vez que las plantas se inocularon, se dejaron secar por 20 minutos y luego se colocaron por 16 h en una cámara húmeda (Hydrofogger®) con humedad relativa de 100%. Posteriormente se trasladaron al invernadero donde se mantuvieron entre 24 ± 2 °C de temperatura, hasta la aparición de los signos de la enfermedad. Después de 10 días las plantas con características de interés fueron seleccionadas y trasplantadas en macetas de 20 cm de diámetro y una altura de 28 cm hasta obtener semilla.

### 2.2.8.3 Variables cuantificadas y análisis estadístico

La evaluación se llevó a cabo a los 12 días después de la inoculación, una vez que los signos fueron visibles. Dicha evaluación se hizo de manera visual, de acuerdo al tipo de infección producida por el patógeno en cada hoja inoculada. Se utilizó la escala de Roelfs *et al.* (1992) (Cuadro 2). Posteriormente se efectuó la comparación de plántulas *in vitro* con el material de campo y se contabilizó el número de plantas (genotipos susceptibles y resistentes).

### 2.2.9 Inoculación de roya *in vitro*

#### 2.2.9.1 Inoculación de roya de la hoja con rocío

Después de 30 días de su siembra, las plantas fueron seleccionadas con altura de 5.0 cm, 10.0 cm y 15.0 cm, las cuales fueron transportadas al invernadero (LANARET). Los frascos que contenían las plantas estuvieron dos días en el invernadero a 26.0 ± 2 °C. La inoculación se realizó con una suspensión de urediniosporas de roya de la hoja de la raza BBG/BPC. Las esporas fueron suspendidas en aceite mineral (Soltrol® 170), donde la concentración fue de 2-3 mg mL<sup>-1</sup> de aceite.

Después se hizo la inoculación con un pincel fino de pelo de camello previamente esterilizado, el cual se sumergió en la solución y se pasó sobre cada hoja de la planta que se encontraba dentro del frasco de vidrio.

Las plantas se dejaron secar por 20 minutos para que el exceso de aceite se evaporara. Posteriormente las plantas fueron colocadas en una cámara húmeda por 3 horas en una (Hydrofogger®) con humedad relativa de 100%. Se pasaron al invernadero de las instalaciones del INIFAP donde la temperatura fue de  $22 \pm 2$  °C con los frascos cerrados después de la aplicación del rocío. La evaluación de los síntomas de la enfermedad se llevó a cabo a los cinco días después de la inoculación, una vez que los signos fueron visibles. La variable que se evaluó fue la presencia o ausencia de pústulas de roya de la hoja.

#### 2.2.9.2 Inoculación de roya de la hoja sin exposición a rocío

De los tres genotipos, se seleccionaron plántulas *in vitro* de 5.0 cm, 10.0 cm y 15.0 cm de altura las cuales fueron inoculadas con el patógeno de la roya de la hoja. Las esporas fueron suspendidas en 200 mL de agua destilada y se aplicaron en tres concentraciones de roya de 0.01, 0.03 y 0.05 mg mL<sup>-1</sup>. También se evaluaron cuatro concentraciones de sacarosa (10, 15, 20 y 30 g L<sup>-1</sup>) en el medio de cultivo MS (1962) con la finalidad de evaluar su respuesta en el crecimiento de las esporas que se depositaran en el medio.

Los frascos de cultivo con el material inoculado con el patógeno se mantuvieron en el cuarto de incubación con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad proporcionado por lámparas de luz blanca fluorescente de 75 W, con irradiación fotosintética de 45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con temperatura de  $26 \pm 2$  °C y humedad relativa de 30% durante 30 días. Al término de este tiempo se evaluó la presencia o ausencia de pústulas de roya de la hoja (Figura 7).

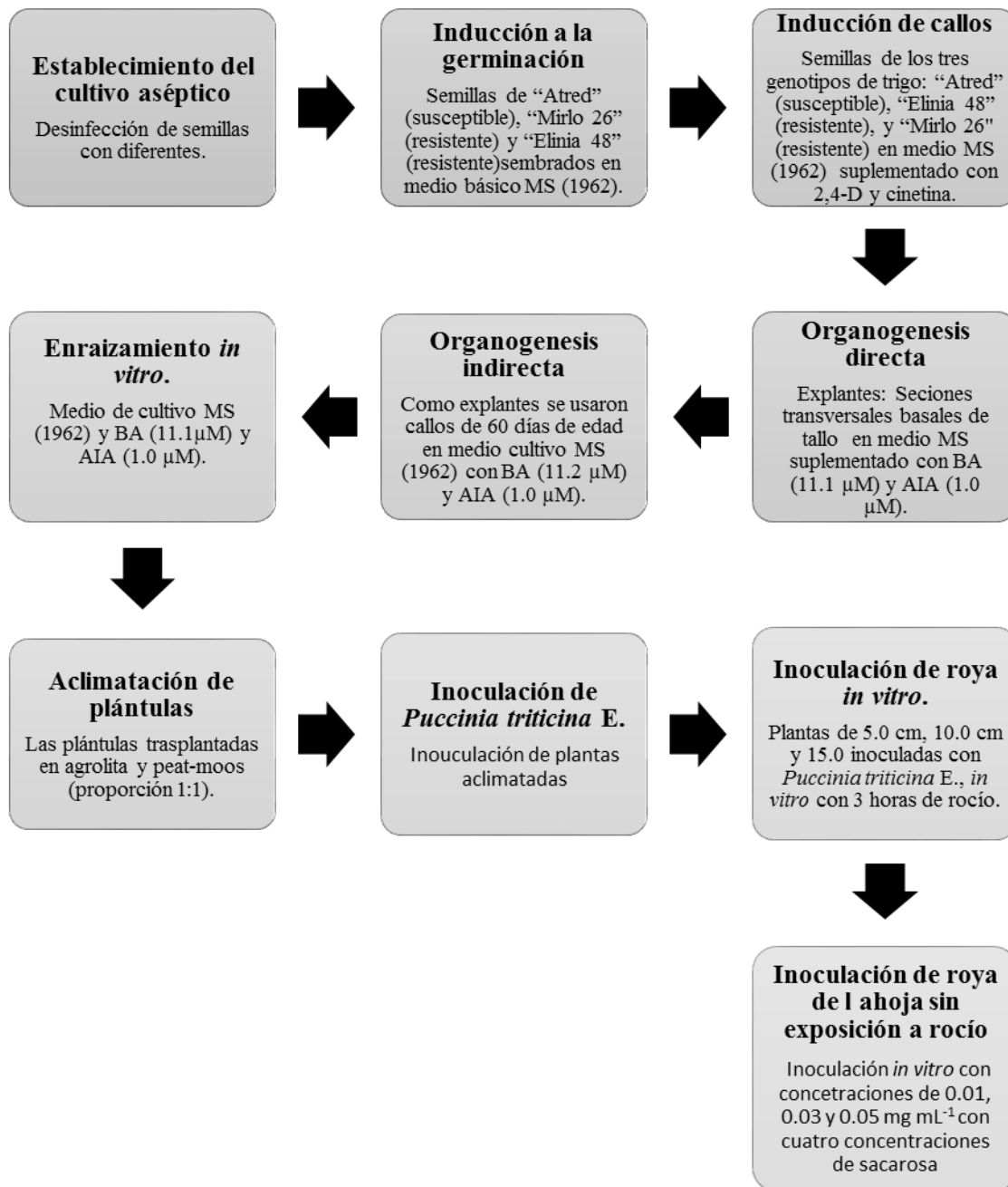


Figura 7. Protocolo empleado para la regeneración de plantas de trigo *Triticum Durum* y la inoculación de roya de la hoja.

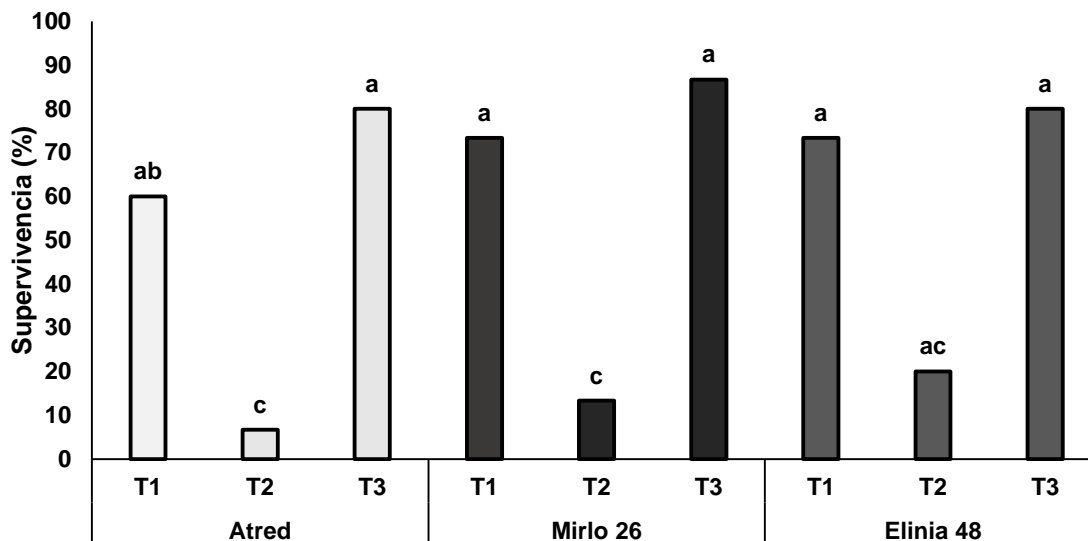
## 2.3. Resultados y discusión

### 2.3.1 Establecimiento del cultivo aséptico

Uno de los principales problemas que puede limitar la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es la presencia de agentes contaminantes, principalmente hongos y bacterias, debido a que el medio de cultivo cuenta con las condiciones favorables para su crecimiento. Es indispensable evitar la contaminación con estos microorganismos porque compiten con los explantes retrasando su desarrollo o generando modificaciones en el medio de cultivo que afectan negativamente su supervivencia (Romero, 2000).

La evaluación de los diversos tratamientos en el establecimiento del cultivo aséptico con desinfectantes y tiempos de exposición a ellos mostraron respuestas significativas ( $P \leq 0.05$ , Apéndice 2). El tratamiento que mostró resultados favorables consistió en el uso de  $H_2O_2$  (2% v/v) por 22.5 h; solución de plata coloidal estable (10% v/v) + NaClO (50% v/v) + Tween 20 (4% v/v) durante 50 minutos, y la mezcla de Benlate ( $8 \text{ g L}^{-1}$ ) y Captán ( $8 \text{ g L}^{-1}$ ) por 50 min. Con este método la tasa de supervivencia promedio, en los tres genotipos de trigo, fue 85%; mientras que la contaminación por bacterias fue de 5% y 10% por hongos. Se observó que a medida que aumenta la concentración y el tiempo de inmersión en el antiséptico y fungicidas disminuye el porcentaje de contaminación (Figura 8).





**Figura 8.** Supervivencia de semilla de tres variedades de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a los 15 días después de siembra. (T1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2% v/v) 21 min, Plata coloidal (10% v/v)+Tween<sup>®</sup>20 (4% v/v)+NaClO (50% v/v) 30 min, Benlate<sup>®</sup> (8g L<sup>-1</sup>) +Captán<sup>®</sup> (8g L<sup>-1</sup>) 30 min. (T2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2% v/v) 21 min, Plata coloidal (10% v/v)+Tween<sup>®</sup>20 (4% v/v)+NaClO (50% v/v) 30 min, Benlate<sup>®</sup> (8g L<sup>-1</sup>) +Captán<sup>®</sup> (8g L<sup>-1</sup>) 30 min., Vitavax<sup>®</sup> 300, 20 min. (T3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2% v/v) 22.5, Plata coloidal (10%v/v)+Tween<sup>®</sup>20 (4%v/v)+NaClO (50% v/v) 40 min, Benlate<sup>®</sup> (8g L<sup>-1</sup>) +Captán<sup>®</sup> (8g L<sup>-1</sup>) 50 min.

En el tratamiento compuesto por inmersión en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2% v/v) por 21 h; plata coloidal estable (10% v/v) + NaClO (50% v/v) + Tween 20 (4% v/v) durante 50 minutos, y con la sumersión en mezcla de Benlate (8 g L<sup>-1</sup>) y Captan (8 g L<sup>-1</sup>) por 50 min y 0.2 g de Vitavax<sup>®</sup>300 la germinación *in vitro* sólo se presentó en 10% de la semillas pero el control de hongos y bacterias fue eficiente; esto indica si bien este tratamiento de desinfección puede inhibir el crecimiento de microorganismos, tiene efectos negativos sobre la germinación. La posible inhibición de la germinación causada por el Vitavax<sup>®</sup> 300 (Carboxin 17% + Thiram 17%), pudo deberse a los compuestos que lo integran, ya que combina la acción sistémica del Carboxin con la acción de contacto del Thiram para controlar los patógenos (Pierik, 1990). También se pudo observar que la principal fuente de contaminación fueron hongos y bacterias. Esto concuerda lo señalado por Folguera *et al.* (2009); Das y Pal, (2005) y Rodríguez *et al.* (2008) quienes indican que los contaminantes más comunes durante el establecimiento *in vitro* procedentes de semillas

son los hongos y las bacterias que se encuentran de manera habitual en el cultivo en condiciones naturales.

### 2.3.2 Inducción de la germinación

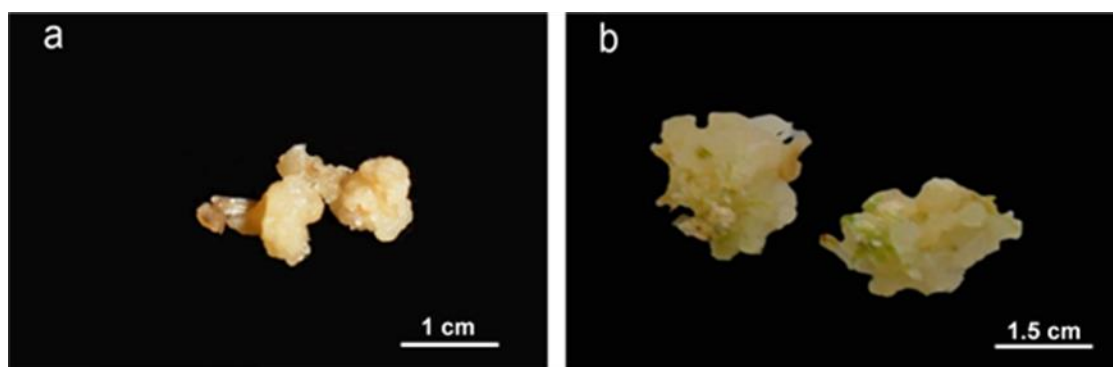
Después de obtener el mejor método de desinfección de las semillas para los tres genotipos de trigo: “Atred” (S), “Elinia 48” (R) y “Mirlo 26” (R), se probaron cinco tratamientos con diferentes fitohormonas para estimular la germinación de la semilla. El análisis de varianza no reveló diferencias significativas entre los cinco tratamientos evaluados (Apéndice 2); sin embargo, la mayor tasa de germinación se alcanzó en los tratamientos donde se emplearon las concentraciones de 2,4-D (11.3  $\mu$ M) y Kin (5.8  $\mu$ M) para los tres genotipos de trigo. Esto indica que la germinación de trigo podría ser factible con el 2,4-D en combinación con la cinetina, ya que por ser una citocinina su función principal es promover la división celular. En general, la tasa de germinación de los tres genotipos fue de 79% (Cuadro 14).

**Cuadro 14. Germinación *in vitro* de semillas de tres genotipos de trigo, tres semanas después de la siembra en medio de cultivo MS (1962) y diferentes dosis de 2,4-D y Kin.**

Genotipo	Tratamiento (Núm.)	Hormona ( $\mu$ M) 2,4-D + Cinetina	Respuesta de germinación (%)
<b>Atred</b>	1	Testigo	87 a
	2	11.3 + 0	73 a
	3	20.35 + 5.8	93 a
	4	20.35 + 0	53 a
	5	20.35 + 12.5	60 a
<b>Mirlo 26</b>	1	Testigo	93 a
	2	11.3 + 0	87 a
	3	20.35 + 5.8	100 a
	4	20.35 + 0	80 a
	5	20.35 + 12.5	67 a
<b>Elinia 48</b>	1	Testigo	80 a
	2	11.3 + 0	80 a
	3	20.35 + 5.8	80 a
	4	20.35 + 0	73 a
	5	20.35 + 12.5	80 a

### 2.3.3 Inducción de callos

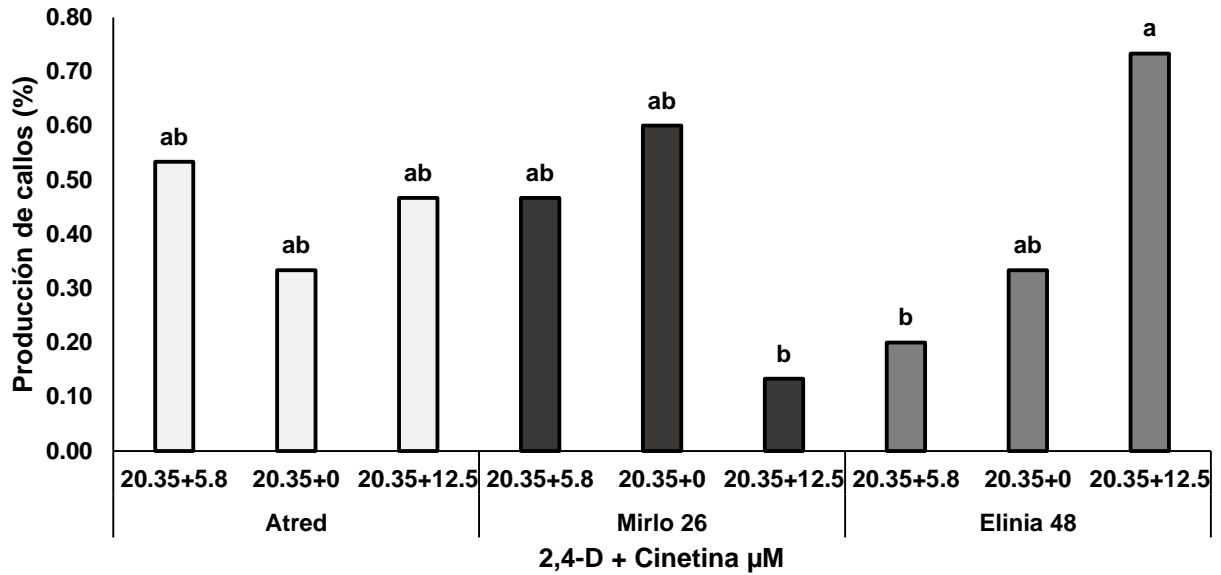
En las gramíneas, los explantes capaces de formar callo son embriones inmaduros, maduros, segmentos de inflorescencias, hojas jóvenes y segmentos de tallo (Armstrong y Green, 1985) lo cual indica la posible producción de callos a partir de semillas de trigo a través de - las fitohormonas 2,4-D y Cinetina (Montilla *et al.*, 2005) (Figura 9).



**Figura 9. Inducción de callos en el genotipo “Atred” (S) con 2,4-D (11.3 µM) y Kin (5.8 µM). (a) Callos de trigo a los 60 días de su siembra. (b) Callos con diferenciación de brotes.**

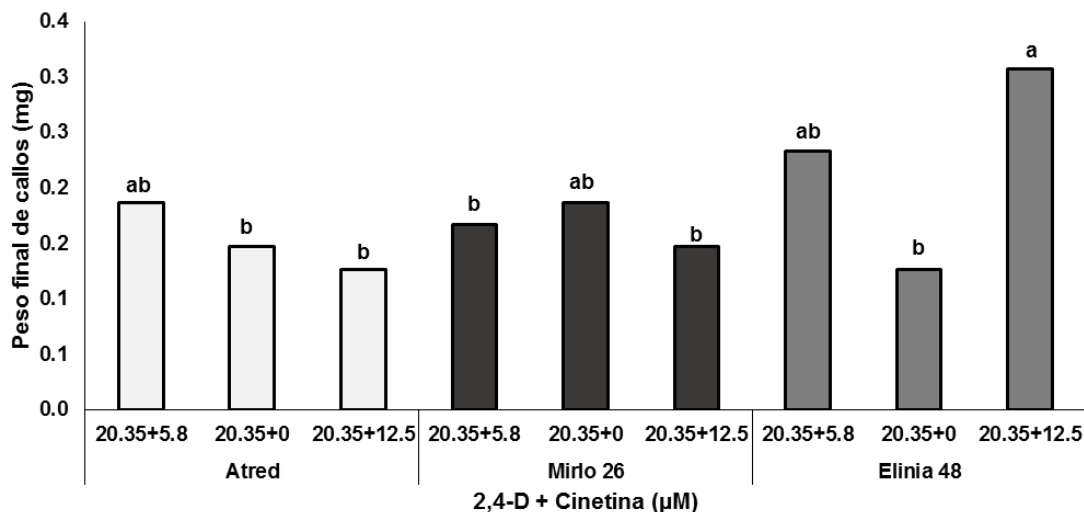
La obtención de callos a partir de semilla se realizó con la finalidad de reducir el tiempo en respuesta organogénica por lo cual se adicionó el 2,4-D para la iniciación y producción; ya que es un inductor efectivo de callos, que pueden ser o no organogénicos y/o embriogénicos (Pierik, 1990), sobre todo cuando se emplea en concentraciones de 12 y 24 µM, ya que ejerce un fuerte estrés sobre las células (Kikuchi *et al.*, 2006). El 2,4-D una auxina que se usa en el cultivo *in vitro* para la formación de callos, se ha utilizado como fitohormona en diversas gramíneas como el maíz y el trigo (Riero *et al.*, 2008).

El análisis de varianza mostró resultados diferentes para cada genotipo y en la formación de callos entre cada tratamiento ( $P \leq 0.05$ ; Apéndice 3). Se observó que la mayor producción de callos se obtuvo con el 2,4-D combinado con la cintenina. La proliferación de callos fue mayor para el genotipo “Elinia 48” (R) con 20.35 µM de 2,4-D y 12.5 µM de cinetina. Para “Mirlo 26” (R) fue sólo con 20.35 µM de 2,4-D sin cinetina; mientras que en “Atred” (S) con 20.35 µM de 2,4-D y 5.8 µM de cinetina (Figura 10).



**Figura 10. Producción de callos *in vitro* en semillas de genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a los 30 d después de la siembra en medio de cultivo MS (1962) y diferentes concentraciones de 2,4-D y cinetina.**

En esta etapa tiene importancia la formación y el peso de materia fresca de callo, existe una capacidad organogénica con diferencias significativas para el genotipo “Elinia 48” (R) con el tratamiento compuesto por 2,4-D (20.35 µM) y Kin (12.5 µM) que tuvo mayor peso en comparación con los otros genotipos y tratamientos, siendo el mejor tratamiento para este genotipo (Figura 11). El porcentaje de material que no formó callos (explantos oscurecidos, sin respuesta) no fue mayor del 40% por lo que se puede decir que las fitohormonas y las dosis fueron adecuadas para el crecimiento de los callos (Takamura *et al.*, 2005).



**Figura 11. Peso final de callos de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R), “Elinia 48” (R) en la inducción de callos a los 30 días después de ser cultivados *in vitro*. n = 20.**

La obtención de callos organogénicos es una alternativa para la propagación de plantas de trigo y la selección *in vitro* para investigaciones de mejoramiento genético (Pérez *et al.*, 2010).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y la producción de callos han permitido, entre muchos aspectos el aislamiento de células y protoplastos, la producción de metabolitos secundarios de interés biológico, la conservación de germoplasma y la introducción de nueva variabilidad genética. Por tal motivo el método para regenerar genotipos de trigo así como los reportados por Huang y Shaolin (2002) en regeneración de gramíneas como arroz, trigo y maíz es de interés comercial mediante la regeneración de plantas.

En la mayoría de las especies las fitohormonas tienen un papel importante en la propagación de cultivos *in vitro*, con diferentes respuestas para cada especie. La utilización de citocininas como la cinetina genera la formación de callos en cereales de trigo, variedad *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* y *Triticale* spp., sorgo y arroz (Przetakiewicz *et al.*, 2003). Sin embargo; las mejores respuestas para la formación de callos en cereales se han obtenido con bajas concentraciones de auxinas como 2,4-D y Dicamba (<3 mg L<sup>-1</sup>) (Nathan *et al.*, 1992).

## 2.3.4 Regeneración de plantas vía organogénesis directa e indirecta

### 2.3.4.1 Organogénesis directa

Después de tres semanas de la germinación se obtuvieron plántulas de los genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) que se emplearon como fuente de explantes para evaluar la inducción de organogénesis directa mediante segmentos de hojas y secciones transversales de tallos (Figura 12).



**Figura 12. Obtención de plántulas vía organogénesis directa para el genotipo “Atred” (S). (a) Sección transversal basal de tallo. (b) Planta de trigo con un aproximado de 12 hojas. (c) Plantas de trigo con una altura máxima 4 cm.**

El análisis estadístico reveló que las variables de brotación fueron afectadas significativamente por el tipo de explante en los tres genotipos de trigo evaluados. Las secciones transversales de tallo fueron los únicos explantes que mostraron respuesta morfogénica mientras que en las hojas no hubo respuesta (Figura 13). En las secciones transversales de tallo la brotación se presentó diez días después de la siembra, y la mayor producción de brotes se obtuvo con 11.1  $\mu\text{M}$  de BA y 1.0  $\mu\text{M}$  de AIA en los tres genotipos.

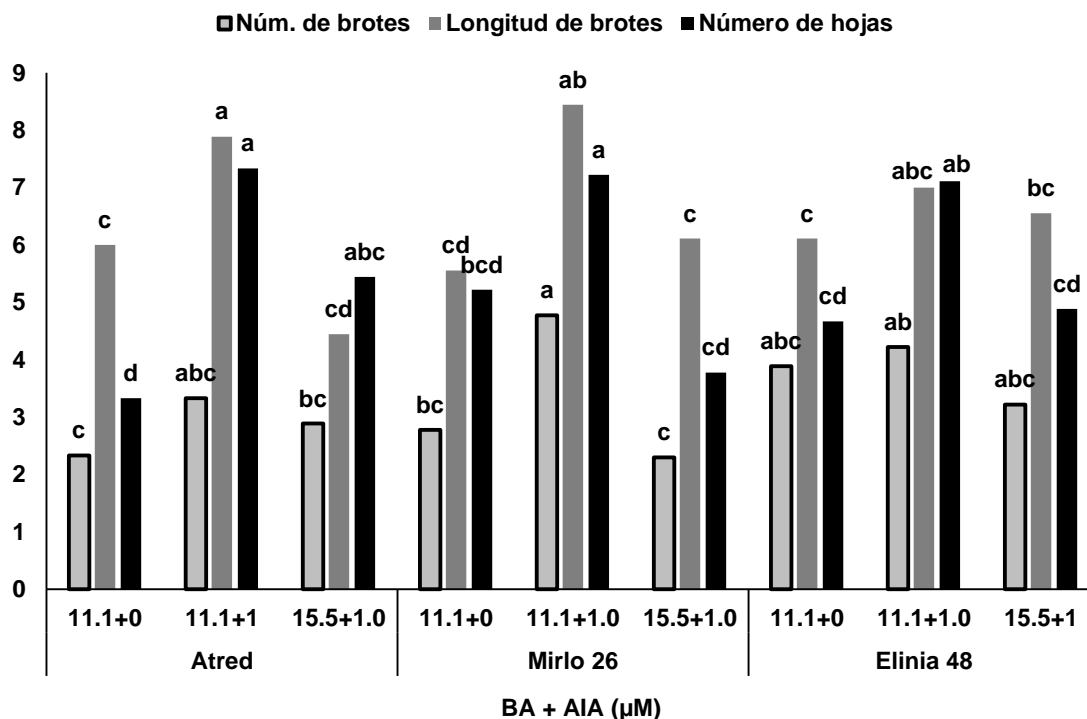


Figura 13. Respuesta de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R), “Elinia 48” (R) en organogénesis directa a partir de explantes de secciones transversales basales de tallo. n = 20.

Existe una dependencia entre los genotipos de trigo y la respuesta morfogénica. Los genotipos respondieron de diferente forma en relación con la producción de brotes, longitud y número de hojas. Aunque las concentraciones hormonales, temperatura, tiempo de incubación en los tres genotipos de trigo evaluados fueron similares, los resultados fueron diferentes en cada uno debido a las características genéticas y este comportamiento *in vitro* se ha observado en especies de gramíneas (Moreno y Villaseñor, 1993).

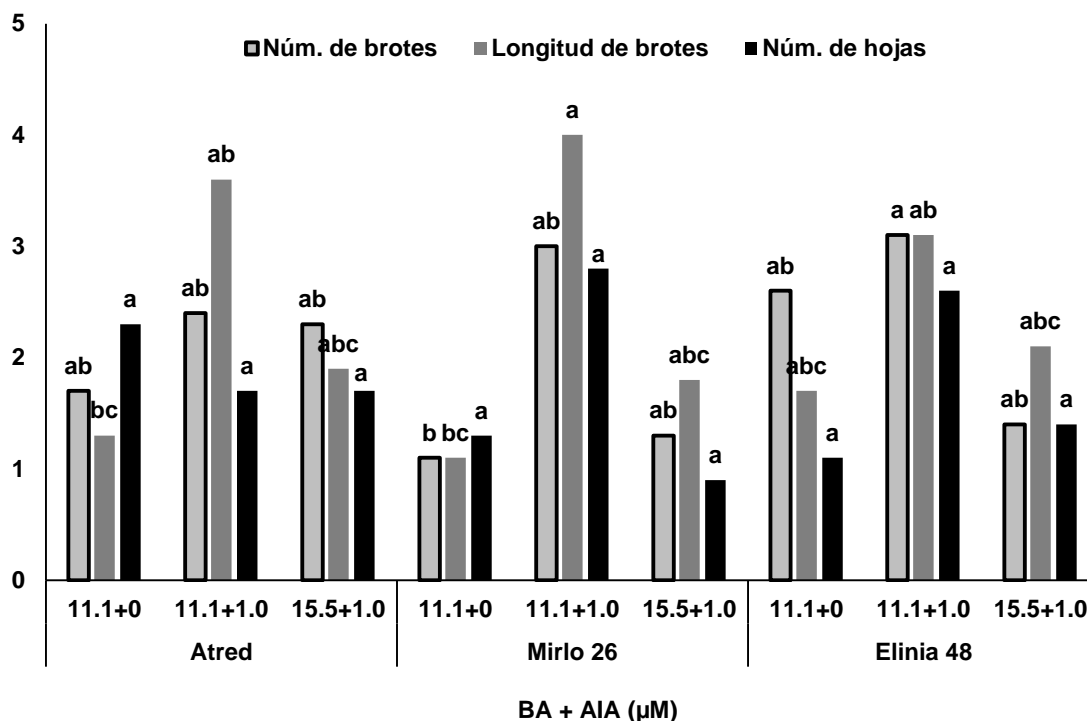
La BA es ampliamente usada para la multiplicación de cereales *in vitro*, ya que estimulan la formación de brotes. Patiño (2010) indicó que la adición de esta hormona genera un incremento significativo del número de brotes, longitud y número de hojas. El BA logra estimular la proliferación de brotes en muchos protocolos de cultivo de tejidos de otros

cereales como arroz y cebada (Patiño *et al.*, 2007). En los resultados obtenidos en los tres genotipos de trigo evaluados se observó que la respuesta a la citocinina fue diferente; con dosis bajas de BA (11.1  $\mu\text{M}$ ) el número de brotes, longitud de hojas y número de hojas aumentó considerablemente. La dosis de AIA pudo generar una diferencia en el número de explantes cuando se adiciona dicha hormona. Ya que la combinación de BA y AIA produjo una mayor respuesta en las variables de organogénesis cuantificadas. El efecto de citocininas y auxinas en la morfogénesis *in vitro* es diferente entre especies y variedades, se ha sugerido que el nivel endógeno de tales fitohormonas en la planta también influyen en las repuestas morfogénicas *in vitro* (Britto *et al.*, 2003).

#### 2.3.4.2 Obtención de brotes a partir Organogénesis indirecta

Para la obtención de plántulas se usaron callos de las semillas de los tres genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) que fueron establecidos en medio de cultivo MS (1962) con diferentes concentraciones de BA y AIA. Después de 60 días de la siembra de callos generados a partir de semillas se observó la regeneración de plántulas. La máxima respuesta de producción de brotes se observó en el tratamiento con BA (11.1  $\mu\text{M}$ ) y AIA (1.0  $\mu\text{M}$ ) ( $p \leq 0.05$ ; Apéndice 5) para el genotipo “Elinia 48” (R) pero con una longitud menor comparado con “Atred” (S) y “Mirlo 26” (R) una altura significativa en el caso de “Mirlo 26” (R) y una cantidad de hojas sin diferencias para ningún genotipo lo que indica que cualquier tratamiento puede utilizarse sin variación en cantidad de hojas pero si para número de brotes y longitud. El porcentaje de brotación fue del 45% en la evaluación de los tres tratamientos (Figura 14).





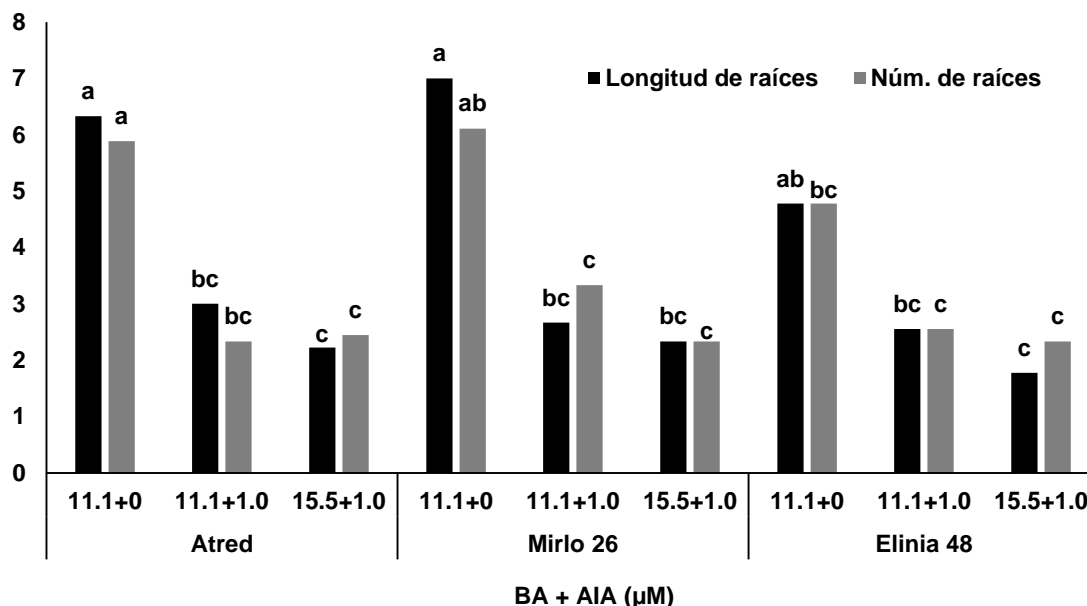
**Figura 14. Respuesta *in vitro* de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) en la organogénesis indirecta. n = 20.**

Gómez *et al.*, (2006) y Smith (2012) han relacionado el tipo y peso de callo con la respuesta organogénica presente en cada especie siendo un indicador importante en la producción y formación de brotes. En los tres genotipos de trigo evaluados se observó que la producción de brotes mediante organogénesis indirecta fue menor en comparación con la organogénesis directa. La mayor cantidad de brotes y plántulas completas regeneradas proponen a la organogénesis directa como la mejor ruta morfogénica en el genotipo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R), siendo “Mirlo 26” (R) el genotipo con mayor producción de brotes.

### 2.3.5 Enraizamiento *in vitro*

El enraizamiento *in vitro* se logró en el mismo medio usado para el establecimiento del proceso de regeneración de plántulas *in vitro* vía organogénesis directa e indirecta en los tres genotipos. Sin embargo; el número y longitud de raíces para cada medio de cultivo utilizado así como para cada genotipo tuvo diferente respuesta ( $P \leq 0.05$ ; Apéndice 6).

Los mayores valores de número y longitud de raíces se obtuvieron en el tratamiento compuesto por 11.1  $\mu$ M de BA y 1.0  $\mu$ M de AIA en los tres genotipos (Figura 15).



**Figura 15 . Respuesta de tres genotipos de trigo “Atred (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) en el enraizamiento *in vitro*. n = 20.**

Los resultados obtenidos en los tratamientos evaluados demostraron que el enraizamiento observado fue posible utilizando sólo BA sin la auxina AIA en los tres genotipos. La concentración de auxina tiene un papel decisivo en la inducción de raíces, en combinación con las sales MS. Los resultados obtenidos muestran relación con el tipo y la concentración de auxina utilizada, ya que hubo menor crecimiento radical con AIA que con la citocinina BA (Ortega *et al.*, 2003)

### 2.3.6 Aclimatación de plántulas

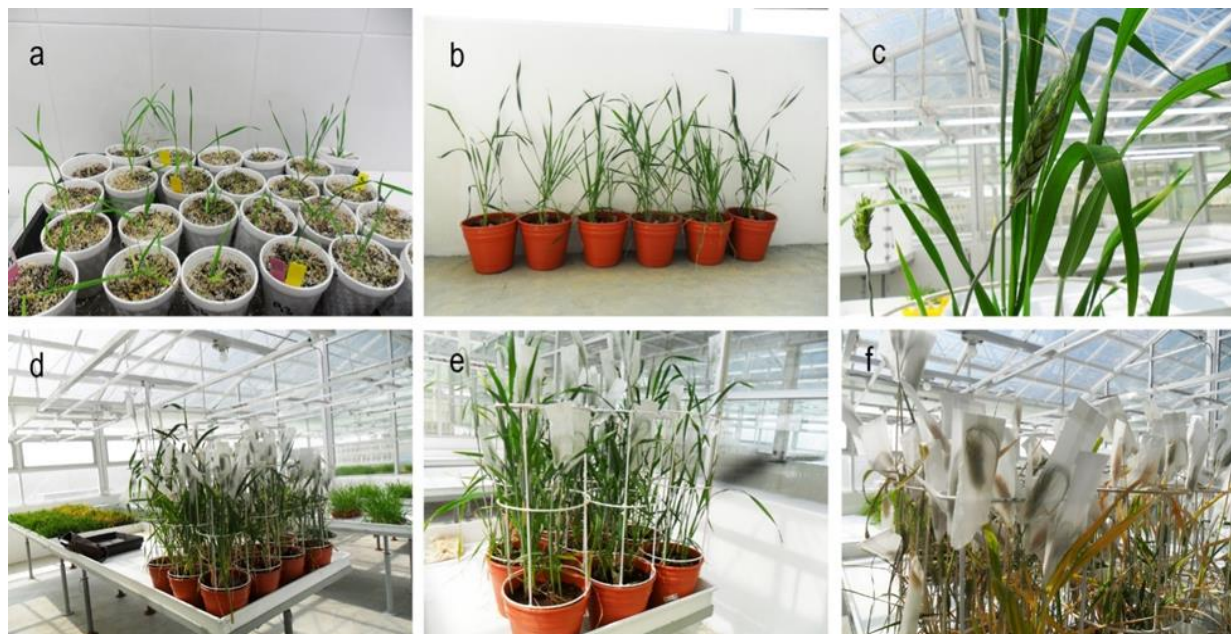
La supervivencia de las plantas obtenidas *in vitro*, en la fase de aclimatación depende fundamentalmente de las características fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto de las condiciones de cultivo *in vitro*, las cuales proporcionan elevada humedad relativa, baja intensidad luminosa e intercambio

gaseoso, disponibilidad de nutrientes, fuente de carbono y temperatura óptima (Ortuño *et al.*, 1995; Aloisio y Comerio, 1997; Preece y Sutter, 1993)

Para el éxito de la aclimatación de plántulas de trigo se siguió la metodología propuesta por Mujeeb, (2000) quien menciona que la mezcla de peat moos + agrolita, en proporción 1:1, es la mezcla de sustrato conveniente para la aclimatación de plantas de trigo (*Triticum aestivum*); ya que tiene un alto contenido de materia orgánica que favorece la adaptación de las plantas; brinda buena retención de agua y una excelente aireación, propiedades que favorecen la supervivencia a los 10 días después del trasplante (Pospisilova *et al.*, 1999).

El porcentaje de supervivencia en la aclimatación de plantas de los tres genotipos de trigo “Atred” (S) “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) fue del 90% en condiciones de invernadero. Se seleccionaron plantas con un desarrollo del sistema radicular *in vitro* con una longitud aproximada de 5.0 cm lo que facilitó el trasplante con una altura de planta correspondiente a 5.0 cm, 10.0 cm y 15.0 cm con un porcentaje de supervivencia similar para cada tamaño de plántula, la aclimatación se realizó a los 10 días después de su trasplante para cada genotipo tiempos similares para cada longitud de plántula.

El alto porcentaje de plantas aclimatadas indica que el procedimiento seguido resultó óptimo para los tres genotipos de trigo en su aclimatación a condiciones de invernadero. Sin embargo, no siempre es factible debido a que no todas las especies responden de forma similar ya que se presentan diferencias al pasar de la condiciones *in vitro* a *in vivo* (invernadero) siendo el objetivo principal de la aclimatación reducir el mínimo porcentaje de pérdida para ser un método de micropropagación y aclimatación adecuada (Figura 16) (Preece y Sutter, 1993).

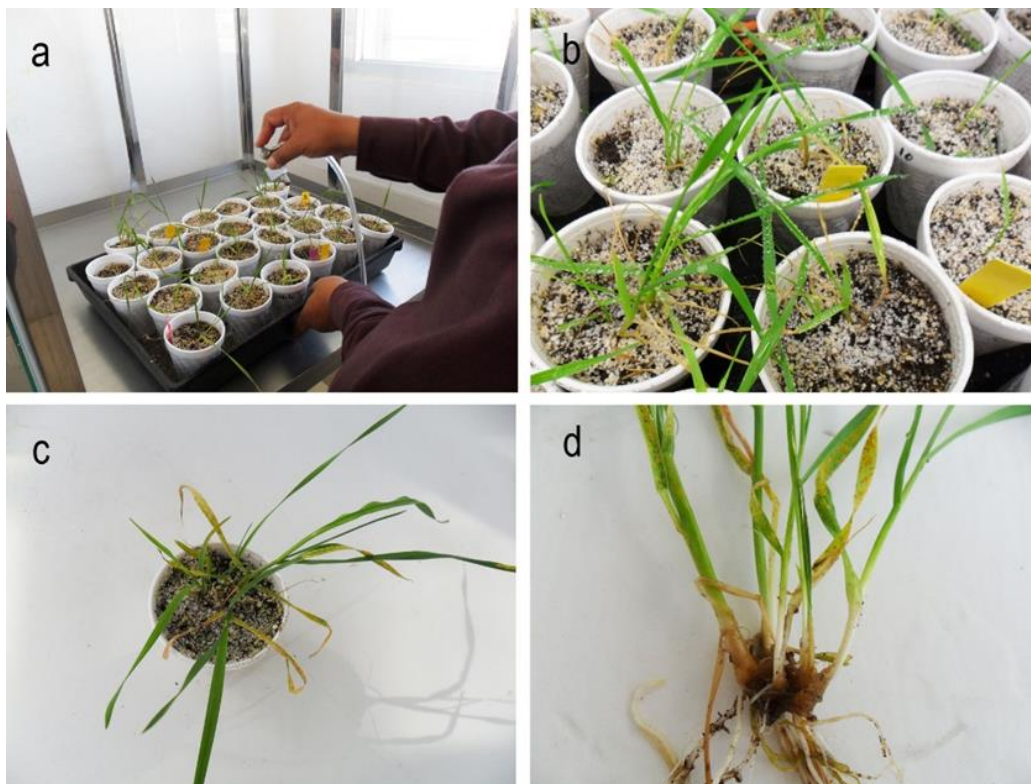


**Figura 16.** Aclimatación de plantas de los genotipos de trigo “Atred” (S), “Elinia 48” (R) y “Mirlo 26” (R). (a) Plantas del genotipo “Atred” (S) a los 10 días después de su aclimatación. (b) Plantas del genotipo “Elinia 48” (R) a los 30 días después de su aclimatación. (c) Plantas en fase de espigamiento a los 40 días después de su aclimatación. (d,e) Plantas de “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) con 90% de espigamiento a los 50 días después de su aclimatación. (f) Plantas de “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) próximas a la cosecha a los 90 días después de su aclimatación.

### 2.3.7 Inoculación de *Puccinia triticina* E., en plantas aclimatadas de trigo

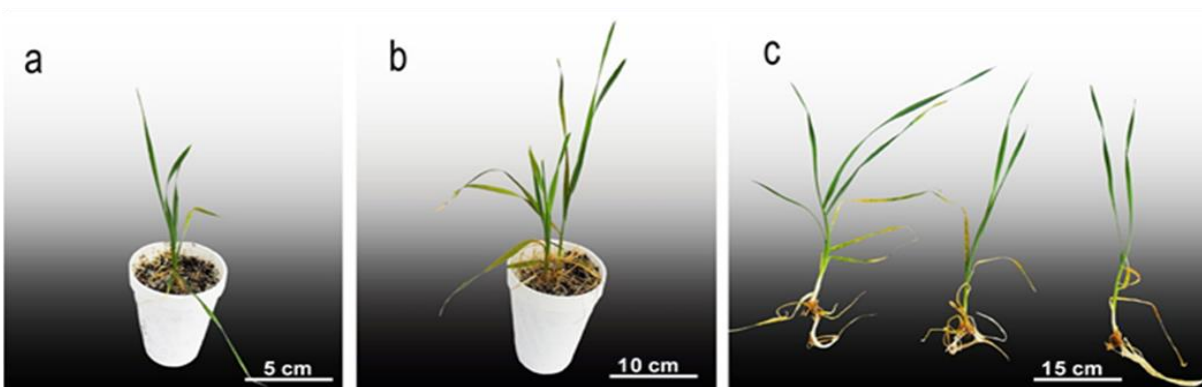
Plantas aclimatadas de los tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) fueron trasladadas al invernadero a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C e inoculadas con la roya de la hoja *Puccinia graminis* E. Después de cuatro días de la inoculación los síntomas de la enfermedad comenzaron a ser visibles, iniciaron con pequeñas manchas cloróticas en las hojas inoculadas, esto debido a la interacción entre el hospedante y el patógeno generando una respuesta ostensible de resistencia (Álvarez, 1995). Después de siete días, el período de germinación y la esporulación del hongo comenzó a

desarrollarse (Stubs1986) teniendo las mismas características de reproducción del patógeno con el material evaluado *in vivo* (Figura 17).



**Figura 17. Plantas aclimatadas del genotipo “Atred” (S) inoculadas con roya de la hoja. (a) Inoculación de *Puccinia triticina* E. (b) Plantas con rocío (c,d) Planta con signos de roya.**

En la evaluación realizada a los 12 días después de la inoculación existió una variación inesperada en la respuesta comparada con la de las plántulas obtenidas *in vivo* y las que fueron regeneradas bajo organogénesis indirecta donde hubo cambios en la respuesta a la roya de la hoja BBG/BPC (Figura 18).



**Figura 18. Respuestas de dos genotipos de trigo a la inoculación con *Puccinia triticina* E. (a) “Atred” (S) genotipo con características de resistencia, plántula con 5 cm de altura. (b) “Elinia 48” (R) genotipo con características de susceptibilidad plántula con 10 cm de altura. (c) Plántulas del genotipo susceptible “Atred” sin síntomas de susceptibilidad cambios en su respuesta, plántulas con 15 cm de altura.**

Para los genotipos resistentes “Elinia 48” y “Mirlo 26” existió el 10% para cada genotipo que presentaron respuestas de susceptibilidad, perdiendo la resistencia el 90% de plantas. En el caso de “Atred” material con respuesta de susceptibilidad existieron plantas con resistencia a roya de la hoja con un porcentaje del 21% siendo un progenitor de primavera utilizado para los cruzamientos de nuevas líneas de resistencia a *Puccinia triticina* en el mejoramiento convencional (Figura 19).

El porcentaje de genotipos cristalinos resistentes a roya de la hoja en un grupo de hábito invernal solo representan alrededor del 4% (Cubero, 2003). La respuesta obtenida en “Atred” (S) es una opción para generar resistencia e incrementar líneas con características importantes para la roya de la hoja en trigos harineros de invierno. Esta respuesta constituye un nuevo aporte para fitomejoradores ya que puede ser una variante cuyas características esenciales conviene conservar.



**Figura 19.** Respuesta de roya de la hoja en plántulas de trigo aclimatadas bajo condiciones de invernadero. (a) Reacción de sensibilidad en “Elinia 48” (R). (b) Reacción de susceptibilidad para “Elinia 48” (R) (c) Reacción de resistencia para “Atred” (S) a los 12 días después de la inoculación.

La resistencia en “Mirlo 26” fue conferida por un gen recesivo en respuesta de la inoculación de la raza BBG/BPC y la resistencia en “Elinia 48” (R) por un gen dominante y otro recesivo en materiales obtenidos bajo condiciones de invernadero. Es necesario corroborar la presencia o ausencia de estos genes característicos de las líneas evaluadas *in vivo* en materiales obtenidos bajo condiciones *in vitro* puesto que en muchas plantas obtenidas bajo este método se presentan diferencias fenotípicas, morfológicas o bioquímicas en comparación con las plantas donadoras de los explantes. Larkin y Scowcroft (1981) distinguieron dos tipos de causas: la variación epigenética transitoria, debida a las condiciones de estrés propias del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y las variaciones genéticas “verdaderas”, producto de mutaciones azarosas. Ambos casos son conocidos como variaciones somaclonales.

Es probable que los resultados obtenidos en las tres variedades evaluadas de trigo “Atred” (S) “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) sean atribuidos a las variaciones epigenéticas; ya que el tiempo de cultivo *in vitro* fue relativamente corto para producir un efecto por

variación somaclonal. En algunas especies cultivadas se han detectado variaciones somaclonales, y se ha demostrado mediante pruebas genéticas o análisis de ADN.

Los posibles cambios en la respuesta hacia la roya de la hoja para la raza BBG/BPC de “Atred” (S) “Elinia 48” (R), “Mirlo 26” (R) (Apéndice 7, 8 y 9) podrían atribuirse a efecto de una posible variación somaclonal, fenómeno natural que puede presentarse en los sistemas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* donde interviene una fase de callos. En algunas ocasiones puede ser una limitante, pero en otras, como es lo ocurrido en este estudio, pueden recuperarse plantas con genotipos que logran mostrar o no ventajas adaptativas y es una herramienta factible de aplicarse en la selección de plantas y el mejoramiento genético (Cruz y Alvarez, 1995).

Existen diferentes factores que inciden en la obtención de variación somaclonal (Karp 1995, Jain 2001) y como regla general entre mayor sea el nivel de desorganización del tejido del explante y el tiempo que permanezcan en la fase de cultivo *in vitro*, mayores serán las probabilidades de generar variación somaclonal. Ésta es influenciada por la constitución genotípica y los niveles de ploidía del explante; si se considera un mismo grado de ploidía, algunos genomas pueden ser más estables que otros.

El tipo y la concentración de fitohormonas en el medio de cultivo influyen también en la generación de variación somaclonal ya que pueden actuar como agentes mutágenos o influir sobre la división celular, el grado de crecimiento desorganizado y la proliferación selectiva de tipos celulares específicos.

Por último, generalmente se observa que entre más adulto y más especializado es el explante, mayor es la posibilidad de inducir variación en las plantas regeneradas. Jelenic *et al.* (2001) plantearon la importancia de las condiciones ambientales durante el cultivo y la presencia o ausencia de agentes selectivos *in vitro*, como generadores de variación.

La respuesta de susceptibilidad y resistencia en los genotipos “Atred” (S), “Elinia 48”(R) y “Mirlo 26” (R) sería inestable y se revertiría con alta frecuencia si fuera un cambio epigenético (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009); por lo que es necesaria la evaluación de



la progenie de estos materiales mediante la inoculación del patógeno *in vivo* de *Puccinia triticina* E. Por el contrario, si la progenie tiene respuestas similares sería una respuesta somaclonal que se transmite y expresa en la descendencia de las plantas regeneradas una variabilidad genética para la creación de plantas con características agronómicas superiores.

Las mutaciones espontáneas ocurren con una frecuencia extremadamente baja; sin embargo, la variación somaclonal constituye una herramienta potencial para lograr un rápido incremento en la variabilidad genética de las especies cultivadas (Okole *et al.*, 2000). En tomate (*Lycopersicon esculentum* (Bhatia *et al.*, 2004) las variaciones somaclonales a nivel de planta han aportado mayor resistencia a cualquier tipo de enfermedades que pueden ser adquiridas de manera estable o tener variación en la viabilidad de la heredabilidad de la resistencia o susceptibilidad.

El mejoramiento genético a través del cultivo *in vitro* en trigo tiene ventajas importantes en comparación con la producción y el mejoramiento genético tradicional; ya que el trigo de forma convencional solo logra generar una planta por semilla, mientras que; con el cultivo *in vitro* se logra obtener un gran número de plántulas por explante; a partir de secciones transversales basales de tallo se pueden producirse en 40 días de cultivo 25 plántulas aclimatadas a condiciones de invernadero.

El número de plantas que se regeneren en un explante y el tiempo de cultivo, dependen de la especie vegetal, en plantas herbáceas pueden producirse un gran número de plántulas por explante en no más de 60 días de cultivo, pero en plantas leñosas o arbóreas solamente unas cuantas y puede lograrse hasta los 180 días, esto comparado con la producción de trigo mediante cultivo *in vitro* indica que es una gramínea con un alta capacidad de adaptación y reproducción (Engelmann *et al.*, 1997).

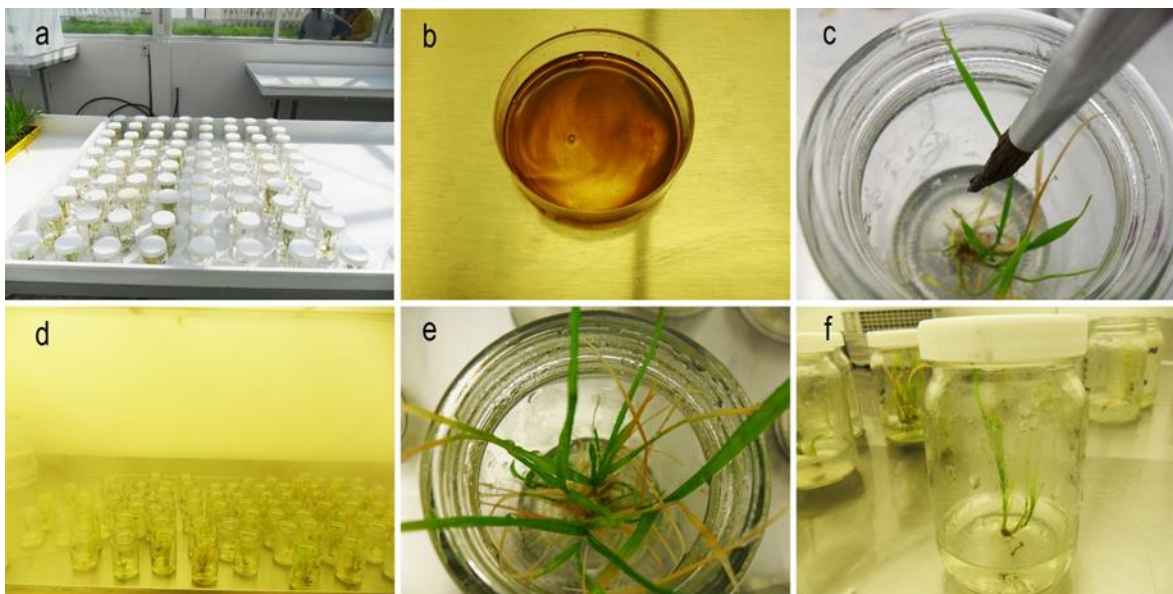
La producción en cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una herramienta que permite la regeneración de plantas en corto tiempo. En la literatura sólo se reportan técnicas de regeneración *in vitro* a partir de dobles haploides en trigo mediante cruces intergenéricas con maíz con fines de mejoramiento genético; sin embargo, es posible la regeneración a

partir de tallo, hoja, cotiledón, raíz, espiga, gluma, etc., generando plantas en menor tiempo libres de enfermedades (Weber *et al.*, 2000; Kathiravan *et al.*, 2006)

El espigamiento es una etapa clave de desarrollo, se presentó de manera normal con tallos gruesos y una altura promedio de 70 cm aunque existió segregación para este parámetro y cuatro espigas por planta que cuentan con un buen vigor agronómico, el llenado de grano fue favorable para cada planta desarrollándose con ventaja de 10 días en comparación con las plantas evaluadas *in vivo*.

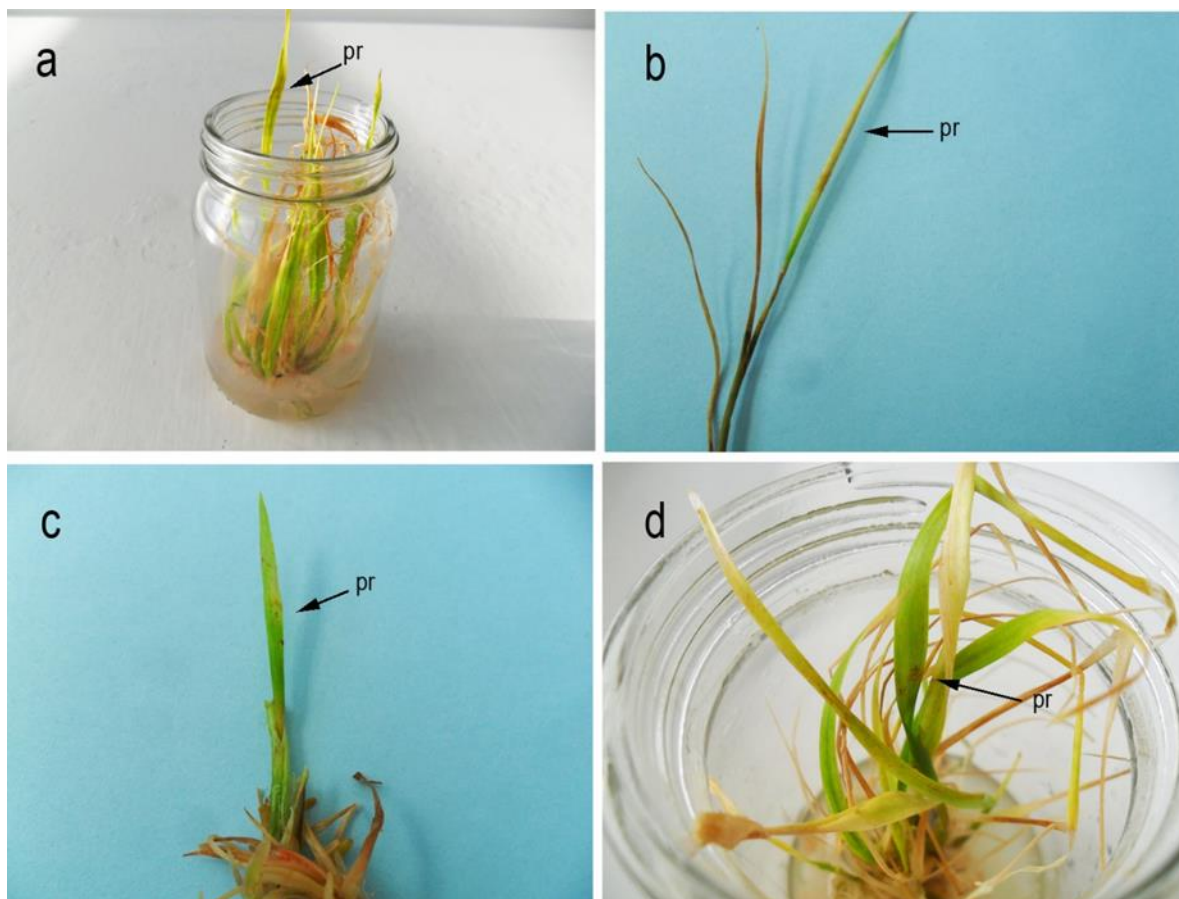
### 2.3.8 Inoculación de roya de la hoja con rocío

Los primeros signos de roya de la hoja se observaron a los cinco días después de su inoculación con pústulas muy pequeñas presentes en algunas hojas de las plantas que lograron tener reacción. Los resultados obtenidos muestran que el genotipo “Atred” (S) tuvo signos de susceptibilidad ya que se presentó en un 10% la aparición de pústulas de forma mayor en comparación con el material resistente “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) donde se presentó en un 4% para cada genotipo la presencia de pústulas, pero no se logró clasificar mediante la escala de Roelfs *et al.*, (1992) (Figura 20).



**Figura 20.** Proceso de inoculación de la roya *Puccinia triticina* E. *in vitro* en los genotipos de trigo “Atred” (S) “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R). (a) Frascos en invernadero a temperatura de  $26.0 \pm 2$  °C. (b) Esporas suspendidas con aceite mineral. (c) Inoculación de las esporas. (d) Frascos colocadas en cámara de humedad. (e) Plantas después de 3 h de rocío. (f) Frascos cerrados con rocío.

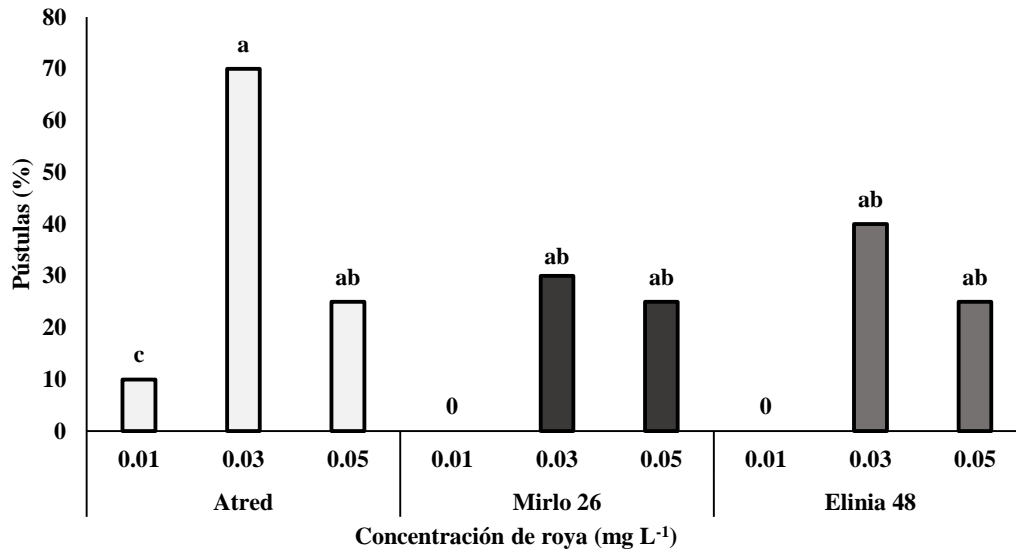
El porcentaje de pústulas fue mínimo, ya que la utilización de rocío generó contaminación en un 92% del material mediante hongos y bacterias en el medio de cultivo lo que impidió una evaluación precisa de cada genotipo. El medio de cultivo básico MS (1962) contenía fitohormonas y sacarosa siendo un medio nutritivo que generó la contaminación rápida por hongos que afectó las plántulas. La contaminación por bacterias, se desarrolló en el medio de cultivo afectando el desarrollo y supervivencia de las plantas y por lo tanto su evaluación (Figura 21).



**Figura 21. Resultados de la inoculación de roya de la hoja con rocío *in vitro*. (a) Material susceptible “Atred” con pústula de *Puccinia triticina* E. (b) Material resistente “Elinia 48”. (c) Material resistente “Mirlo 26” con pústulas de roya de la hoja. (d) “Atred” (S) con pústulas en la parte superior de la hoja. pr: pústula de roya.**

### 2.3.9 Inoculación de roya de la hoja sin exposición a rocío

Las plántulas sometidas tratadas con las concentraciones de *Puccinia triticina* E. de 0.01, 0.03 y 0.05 mg L<sup>-1</sup> exhibieron respuestas diferentes ( $p \leq 0.05$ ; Apéndice 10). Para el genotipo “Atred” (S), considerado susceptible, la concentración de 0.03 mg L<sup>-1</sup> fue suficiente para observar la presencia de pústulas en las plantas cultivadas con 30 g de sacarosa y 2.5 g de phytigel (Figura 22).



**Figura 22.** Respuesta de plántulas de tres genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) de trigo a la roya de la hoja *Puccinia triticina* E., a los 20 días después de su inoculación.

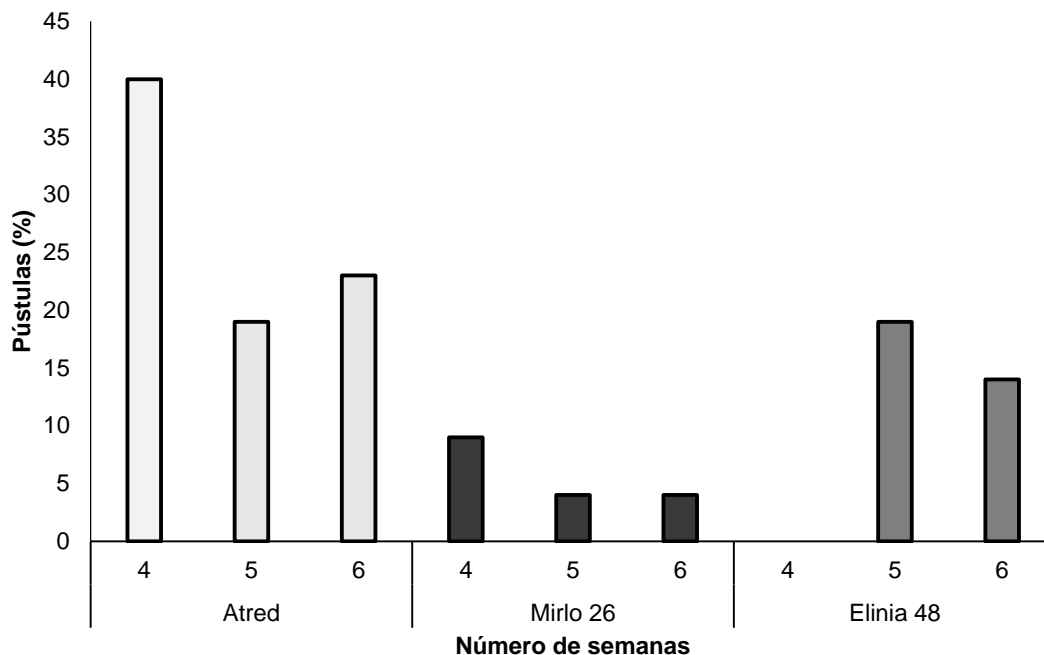
El análisis de varianza no reveló diferencias significativas entre los cuatro tratamientos evaluados, la mayor contaminación se presentó con la concentración de 10 g L<sup>-1</sup> de sacarosa para los tres genotipos de trigo (P≤0.05; Apéndice 11). Esto indica que la contaminación después de la inoculación se puede controlar con 10 g de sacarosa (Cuadro 15).

**Cuadro 15. Contaminación *in vitro* de tres genotipos “Atred” (S). “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) de trigo a los cinco días después de la inoculación del patógeno *Puccinia triticina* E.**

Genotipo	Tratamiento (Núm.)	Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )	Respuesta de contaminación* (%)
<b>Atred</b>	1	10	15 a
	2	15	20 a
	3	20	25 a
	4	30	25 a
<b>Mirlo 26</b>	1	10	14 a
	2	15	15 a
	3	20	30 a
	4	30	25 a
<b>Elinia 48</b>	1	10	15 a
	2	15	35 a
	3	20	30 a
	4	30	20 a

\*Valores con la misma letra en la columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

En las plantas de trigo susceptibles, las esporas inician la germinación dentro de los 30 minutos después que han hecho contacto con la superficie de la hoja y una pequeña gota de rocío. El periodo entre la germinación de las esporas, la penetración, el establecimiento de la colonia y el momento de esporulación en el campo puede abarcar de 8 a 10 días bajo temperaturas óptimas y constantes de 20 a 24 °C y por tal motivo se evaluaron en tiempos diferentes para observar el comportamiento del patógeno en los genotipos de trigo *in vitro* (Figura 23).



**Figura 23. Respuesta de plántulas de tres genotipos de trigo “Atred” (S) “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a la roya de la hoja *Puccinia triticina* a las cuatro semanas de inoculación.**

Los primeros síntomas que causan la roya de la hoja son la aparición de pequeñas pecas o diminutas manchas de color blanco aproximadamente entre los 7-10 días (McIntosh *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2004) después de que ocurre la infección. En los genotipos inoculados *in vitro*, los signos aparecieron 20 días después de su inoculación, por lo tanto la enfermedad tiene un desarrollo más lento comparado con la infección en plantas de campo o invernadero (Figura 24).

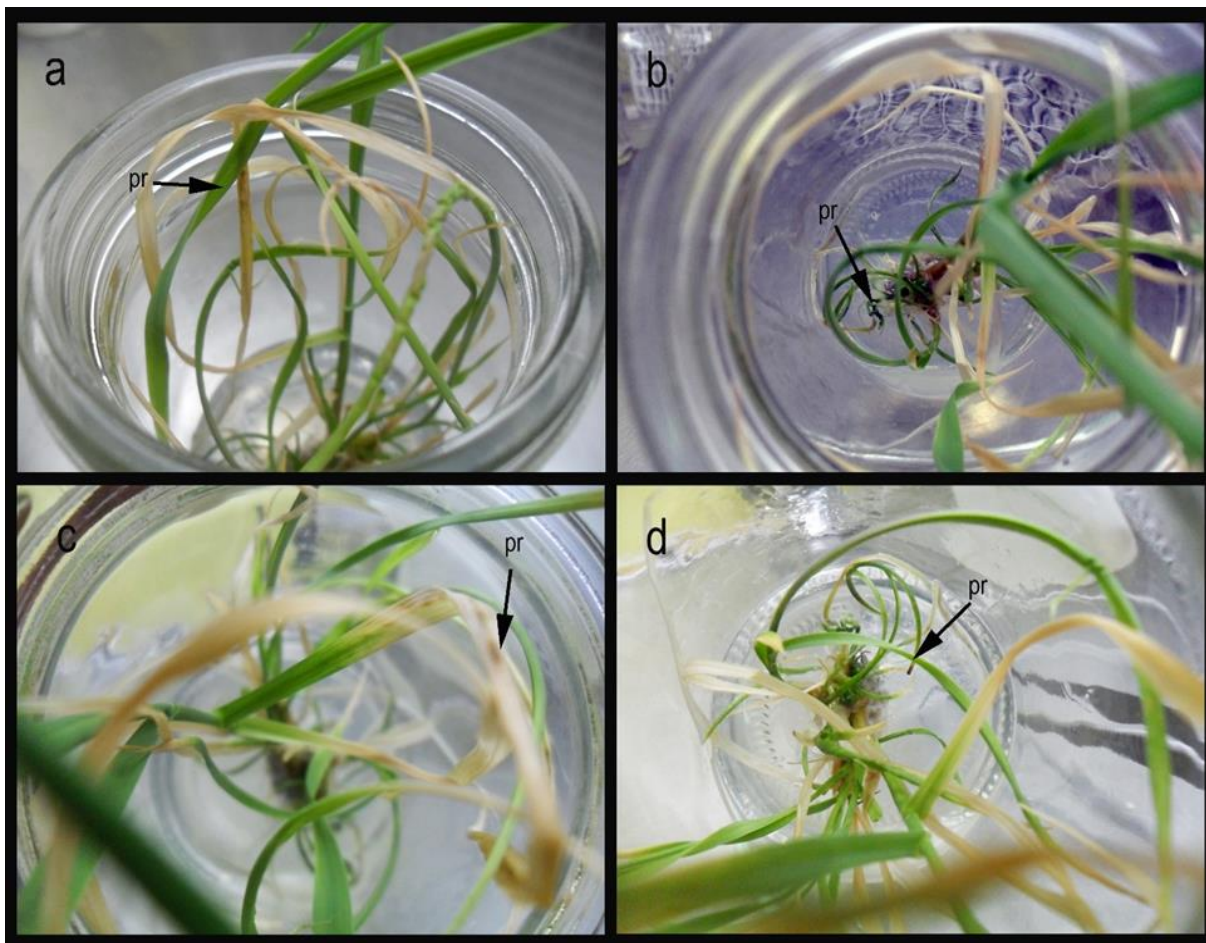


**Figura 24. Respuesta de sensibilidad en el genotipo “Atred” (S). (a) Plántula con humedad presente en el frasco. (b y c) Aparición de pecas de color blanco en las hojas.**

La formación de pústulas en condiciones de invernadero se presenta bajo temperaturas 20 a 24 °C, alargándose este proceso si la temperatura está por debajo de los 16 °C. Estos aspectos coinciden con la respuesta obtenida bajo inoculación *in vitro* con una temperatura constante las 24 horas del día de  $26 \pm 2$  °C y humedad relativa de 30% con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad.

Para los genotipos inoculados *in vitro* no fue necesario colocar las plantas bajo cámara de rocío ni disminuir la temperatura ya que los frascos se mantuvieron en el cuarto de incubación sin cambios en luz, temperatura y humedad. El rocío se presentó con la humedad que cada frasco logró tener en su ambiente hermético, lo que facilitó la aparición de la roya de la hoja (Figura 25).





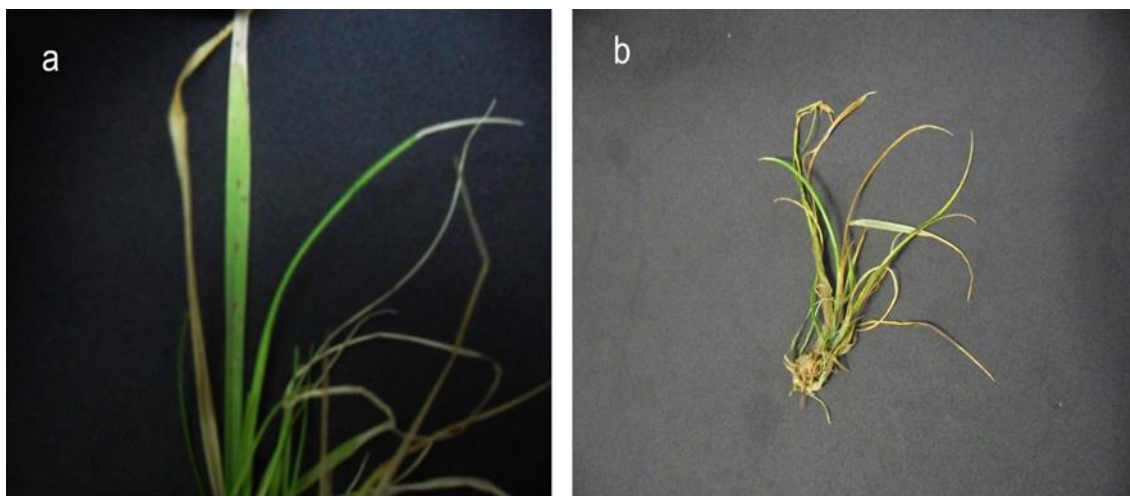
**Figura 25. Roya de la hoja *in vitro* sin rocío a los 20 días después de la inoculación de *Puccinia triticina* E. (a) Aparición de pústulas del patógeno en el genotipo “Atred” (S). (b) Pústula del patógeno en la base de la planta del genotipo “Mirlo 26” (R). (c) Pústula a los 25 días después de su inoculación con muerte de hoja en el genotipo “Atred” (S). (d) Pústula en la parte inferior de la planta del genotipo “Elinia 48” (R). pr pústula de roya.**

En la literatura no existen reportes de procedimientos de inoculación de la roya de la hoja bajo condiciones *in vitro*. La metodología desarrollada es el primer estudio que se hace de ello, lo cual puede ser útil en la caracterización de los genotipos evaluados para que puedan ser seleccionados y utilizados en programas de mejoramiento genético para la obtención de variedades resistentes a este patógeno.

Por tal motivo la evaluación de roya de la hoja bajo condiciones *in vitro* genera alternativas importantes para el mejoramiento genético siendo *Puccinia triticina* E. el

agente selectivo, lo que hace factible realizar la selección *in vitro* sin necesidad de la regeneración de plantas en invernadero o campo.

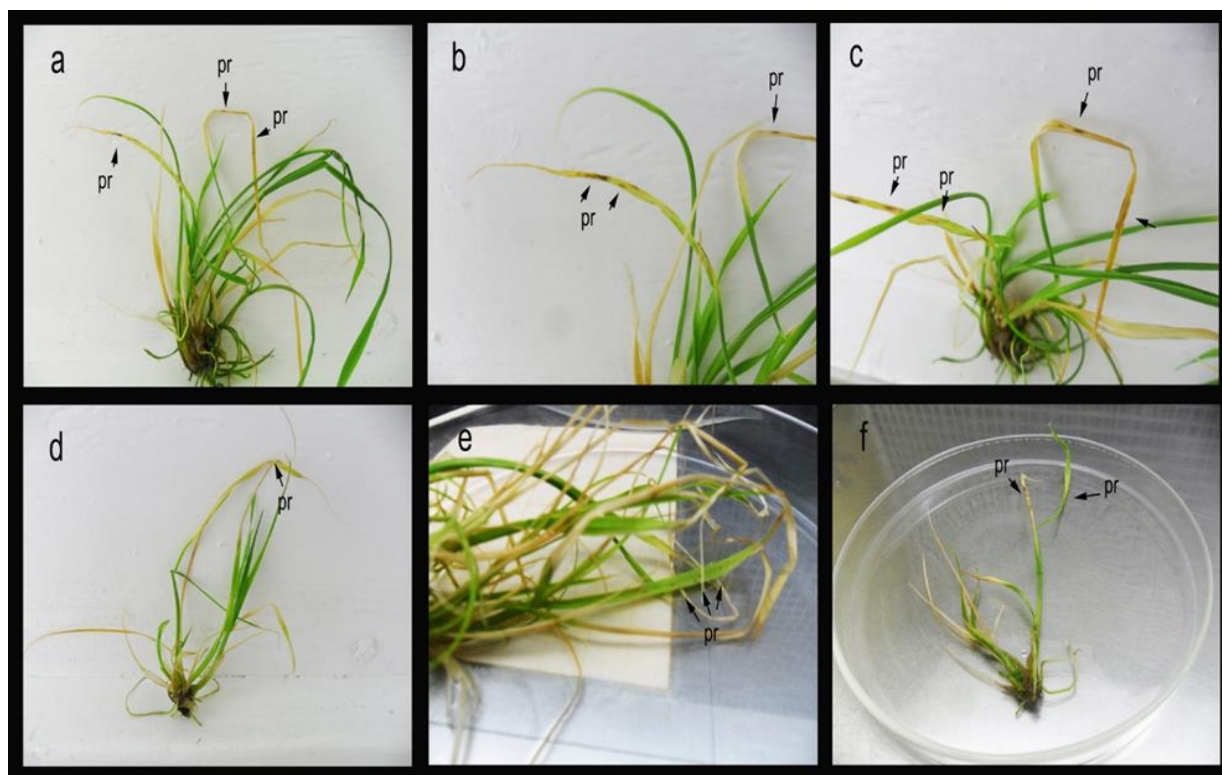
Bajo la premisa que el comportamiento de las plantas obtenidas *in vitro* hacia el patógeno es similar al de las plantas madre de donde se extrajeron los explantes, se facilitaría considerablemente el proceso de selección en resistencia a roya de la hoja. La selección *in vitro* hacia la roya de la hoja se llevó a cabo mediante diferentes concentraciones del agente selectivo *Puccinia triticina* E. Esto coincide con Cubero (2003) quien menciona que este método es simple y eficiente, ya que las células sensibles al agente mueren, permitiendo el crecimiento de los genotipos tolerantes y tal vez con el mayor nivel de diferenciación hubiesen sido capaces de regenerar plantas tolerantes (Figura 26)



**Figura 26. Plántulas *in vitro* sensibles a roya de la hoja. (a) Genotipo “Atred” (S) con pústulas de roya a los 20 días después de su inoculación. (b) Muerte del genotipo “Atred” (S) después de la aparición de roya de la hoja *in vitro*.**

A los cinco días después de la aparición de las pústulas del patógeno las plantas comenzaron a morir empezando con la necrosis de las hojas que contenían pústulas puesto que *Puccinia triticina* generó un elevado nivel de estrés *in vitro*, suponiendo que sólo las plantas que sobrevivieron y no tuvieron presencia de pústulas son resistentes, respuesta que coincide con lo obtenido en los materiales evaluados *in vivo*.

La selección *in vitro* de roya de la hoja puede representar ventajas con la posibilidad de obtener genotipos que muestren tolerancia a esta enfermedad. No obstante, se puede obtener información que se podría aplicar en el mejoramiento genético, así como incrementar la supervivencia y crecimiento de las plántulas bajo dichas condiciones (Figura 27).



**Figura 27. Comportamiento de la aparición de pústulas en plántulas de trigo *in vitro*. (a, b y c) Genotipo "Atred" (S) a las cuatro semanas después de su inoculación. (d) Genotipo "Mirlo 26" (R). (e) Genotipo "Atred" (S) a las cinco semanas de su inoculación. (f) Genotipo "Elinia 48" (R) a las cuatro semanas después de su inoculación**

Las ventajas que se tienen mediante la inoculación de roya de la hoja *in vitro* comparada con la selección que se hace *in vivo* son que se pueden aplicar en cualquier época del año, permite mantener un control de las condiciones ambientales de prueba, se requiere de poco espacio, es factible evaluar muchos genotipos a la vez y se pueden llevar a cabo múltiples evaluaciones de forma paralela (Gunn y Day, 1986).

## 2.4 Conclusiones

- El establecimiento del cultivo aséptico del trigo se logró con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% v/v) por 22.5h + solución de plata coloidal estable (10% v/v) + hipoclorito de sodio comercial (NaClO, al 50% v/v) + Tween 20 (4% v/v) durante 50 minutos, y la mezcla de Benlate (8 g L<sup>-1</sup>) y Captán (8 g L<sup>-1</sup>) por 50 min, lo cual generó el 85% de supervivencia con 5% de bacterias y 10% de hongos.
- La germinación se obtuvo con concentraciones de 2,4-D (11.3 μM) y Kin (5.8 μM) para los tres genotipos de trigo con una tasa de germinación promedio de 79%, la germinación del 100% se presentó en el genotipo “Mirlo 26” (R), seguida por “Atred” (S) “Elinia 48” (R).
- La mayor producción de callos se obtuvo con el 2,4-D y cinetina. La proliferación de callos fue mayor para el genotipo “Elinia 48” (R) con 20.35 μM de 2,4-D y 12.5 μM de cinetina. Para “Mirlo 26” (R) fue sólo con 20.35 μM de 2,4-D sin cinetina; mientras que en “Atred” (S) fue con 20.35 μM de 2,4-D y 5.8 μM de cinetina.
- La mayor producción de brotes se obtuvo con 11.1 μM de BA y 1.0 μM de AIA con un porcentaje de brotación para “Mirlo 26 (R) de 48%, seguido de “Elinia 48” (R) con 42% y “Atred” (S) con 33%.
- La máxima respuesta de obtención de plántulas vía organogénesis indirecta se observó con BA (11.1 μM) y AIA (1.0 μM); para el genotipo “Atred” (S) la producción fue del 24%; “Mirlo 26” (R) 30% y “Elinia 48” (resistente) 31%.
- El enraizamiento *in vitro* se logró con 11.1 μM de BA y 1.0 μM de AIA en los tres genotipos, las mismas concentraciones de hormonas que favorecieron la organogénesis directa e indirecta.
- La aclimatación de los genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) fue del 90% con peat moss + agrolita en una proporción 1:1.

- En la evaluación de roya de la hoja en plantas aclimatadas se presentó una variación inesperada en la respuesta a roya de la hoja *Puccinia triticina* E. En el genotipo “Atred” (S), tuvo el 47.6% de plantas con presencia de resistencia en la evaluación *in vitro*. Para “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R), genotipos resistentes, se presentó el 23.8% para cada uno con presencia de susceptibilidad
- En la evaluación de roya de la hoja *in vitro* con rocío se observaron pústulas de patógeno pero en un porcentaje mínimo debido a la contaminación presente en los medios de cultivo, lo que impidió la evaluación precisa para cada genotipo.
- La roya de la hoja *in vitro* sin rocío tuvo presencia de pústulas en mayor tiempo comparado con la roya de la hoja *in vivo* pero se logró caracterizar el material lo que implica que se puede aplicar en cualquier época del año en espacios reducidos para su evaluación.
- Esta es la primera a investigación donde se aplican las Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* para evaluar genotipos susceptibles y resistentes a la roya de la hoja obtenidos por métodos de mejoramiento genético en campo

## 2.5 Recomendaciones

- Evaluar la progenie del trigo seleccionado que tuvo características de susceptibilidad o resistencia diferentes a las plantas donantes para corroborar o descartar algún cambio epigenético o de variación somaclonal mediante la inoculación del patógeno a la nueva generación
- Valorar las plantas por medio de estudios citogenéticos puesto que la variación somaclonal está asociada a cambios cromosómicos de diferente tipo y niveles o bien estudios moleculares para corroborar y analizar cualquier cambio genético.

## 2.6 Literatura citada

- Álvarez, Z. R. 1995. Patogénesis de *Puccinia recondita* Rob. Ex Desm. F. sp. *Tritici* y la resistencia en trigo. Tesis de Doctorado en ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 76 p.
- Aloísio, X. e J. Comerio. 1997. Enraizamiento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e *alongadas in vitro*. Scientia Forestal 59: 29-36.
- Armstrong, C.L., and Green C. E. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Plant 164 :207-214.
- AOASS. 2015. Asociación de Organización de Agricultores del Sur de Sonora. Consultado 25 de mayo del 2015.
- Bhatia, P. A, Santos, A. P. Mtos, R. S. Cabral and M. Arzola. 2004. A First attempt to use a *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resitant to fusariose disease. Plant Breeding, 120: 435-438.
- Britto, S. J., Natarajan, E., and Arockiasamy, D. I. 2003. *In vitro* flowering and shoot multiplication from nodal explants of *Ceropegia bulbosa* Roxb. var. *bulbosa*. 48: 106-111.
- Cruz, U.A., Alvarez, E. I. 1995. Estudio de regeneración *in vitro* de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.) variedades Salamanca y Tamazula. Tesis de Licenciatura. Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. México. 69 p.
- Cubero, J.I. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal (2da ed.). Madrid. 30 p.
- Das, M., Pal, A. 2005. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcoa* Roxb. Factors affecting changes of morphogenetic competence in axillary buds. Plant Cell Tissue and Organ Culture 81: 109-112.
- Engelmann, F., and González-Arno, M. T. 1997. Introducción a la conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales. En América Latina y el Caribe, 25 p.
- Folguera, M., Rodríguez, S., Morales, L., Dávida, J.E., Ramos, L. 2009. *Trichoderma* spp., hongo rival para el combate de patógenos. Ciudad Habana. Cuba. 100 p.
- Gómez, C., Uribe, B., Rios, D., Sanchez M. 2006. Inducción de callo embriogénico en *Eucaliptus globulus* Labill. Interciencia 31: 734-738.
- Gunn, R. E., Day, R. r. 1986 *In vitro* culture in plant breeding. In: L A Withers, P. G. Alderson (eds). Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. Butterworths, UK. Pp: 313-327
- Huang, T., Shaolin, D. 2002. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69: 141-146,

- Herrera-Foessel, S.A., R.P. Singh, J. Juerta-Espino, J.Yuen, and A. Djurle 2003. Diversity of resistance to leaf rust in five CIMMYT germoplasm derived durum Wheats. *In: Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium 1-6 september 2003. Paesetum, Italy. Volme 1: 361-363.*
- Hernández, V.J. y Alvarado P. D. 2011. Descripción de las Variedades de Trigo para el Valle de Mexicali, B.C. y Norte de Sonora 18: 100-23
- Huerta, E., Singh, R y B. 2000. Las royas Del trigo. In: El trigo de temporal en México. Villaseñor M., H. E. y E. Espitia R. (Eds.) SAGAR, INIFAP. CIP-CENTRO y CEVAMEX, México. pp 231-251
- Huerta-Espino J.y B.Skovmand. 2000. Origen, Botánica y taxonomía del trigo. In: El trigo de temporal en México. Villaseñor M., H.E. y E. y E. Espitia R. (Eds.) SAGARPA, INIFAP. CIR-CENTRO y CEVAMEX, México. Pp. 25-38.
- Jain, S., M. 2001. Tissue culture derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.
- Jelenic, S., J. Berljak, D. Papes; Jelaska. 2001. Mixoploidy and chimeric structures in somaclones of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Bintje. *Food Technol. Biotechnol.* 39: 13-17.
- Jiménez, V. 2009. El cultivo de protoplastos en cítricos y su potencial para el mejoramiento genético. *Agronomía costarricense.* 20: 187-204.
- Karp, A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302.
- Kikuchi, K., Nagai, T., Ding, J., Yamauchi, N., Noguchi, J., and Izaike, Y. (1999). Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase I. *J. Reprod. Fertil.* 116 p.
- Kathiravan, K., Vengedesan, G; Singe, S; Steinitz B; Paris, HS; Gaba, V. 2006. Adventitious regeneration *in vitro* occur across a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 85: 285-295
- Kikuchi, A, N., Sanuki, K; Higashi, T., Koshib, H., Kamada. 2006. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* 223 :637–645
- Larkin, P., Scowcroft J., W. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor Appl Genet*, 60: 197-214.
- McIntosh, R. A., C. R. Wellings, and R. F. Park. 1995. *Wheat Rusts: An atlas of resistance genes.* CSIRO Australia. 200 p.
- Montilla, J., Pineda, J., Rodríguez, D. 2005. Microflora de la filosfera de árboles de *Eucalyptus camaldulensis*. *Fitopatología Venezolana. In: Congreso Venezolano de Fitopatología. Barquisimeto, VE, Universidad de Zulia. Pp. 30-35*
- Moreno, G., R.Villaseñor, M. 1993. Trigo de Temporal. In: Márquez S., F. (eds). *Producción y genotecnia de plantas autógamias.* México, D. F., México, AGT Editor. 195-209.

- Mujeeb, K., A. 2000. An analysis of the use of haploidy in wheat improvement. In: M. M. Kohli and M. Francis (eds.) Application of Biotechnologies to wheat breeding, La Estanzuela, Uruguay. Pp. 33-48.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-493.
- Nathan, M., Goh, C. and Kumar, P. 1992 *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culte. *HortScience* 27:450-452.
- Okole, B., Memela, C., Rademan, S., Kunert, K. 2000. Non convencional breeding approaches for banana and plantain improvement agains fungal diseases at Aeci. *Acta Hort.* 540: 207-214.
- Ortega, N., Behonick, D., Stickens, D., & Werb, Z. 2003. How proteases regulate bone morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 995(1): 109-116.
- Ortuño, O. L., Manzo, G. A., Peña, L., A 1995. Cultivo de anteras en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura.* pp. 4: 39
- Patiño, C. R., Sánchez, H. L., Afanador, K. 2007. Selección y regeneración *in vitro* de somaclones de tomate de árbol (*Solanum betacea* cav. Sendt) utilizando filtrados de cultivo de *Colletotrichum acutatum* con actividad pectinase. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 60: 3923-3937.
- Patiño, T.C. 2010. Producción *in vitro* de pectinasas por *Colletotrichum acutatum*. *Acta Agronómica* 59: 80-90. Pierik R L M (1990) Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi, Prensa. Madrid, España. pp 209–226.
- Pérez, A., Saucedo, O., Iglesias, J., Wencomo, H., Reyes, F., Oqundo, G., Millan., I. 2010. Caracterización y potencialidades del grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L.). *Pastos y Forrajes.* 33 (1): 1-17.
- Pospisilova, J., I. Ticha, S., Kadlecek, D., Haisel, and S, Pizakova. 1999. Aclimatizationof micropropagated cultures, *Physiologia Plantarum* 15: 473-493.
- Pierik R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 301 p.
- Przetakiewicz, A., Orczyk, W., Nadolska, A. 2003. The effect of auxin on plant regeration of wheat, barley and triticales. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73:245-256.
- Preece, J.E., Sutter, E.J. 1993. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; Zimmeran, R.H. (Ed.) *Micropropagation, technology and application.* London: Kluwer Academic. Pp 71-93.
- Reynolds, M. P., Trethowan, R., Crossa, J., Vargas, M. y Sayre, K. D. 2014. Physiological factors associated with genotype by environment interaction wheat. *Field Crops Research.* 75: 140-141.



- Rodríguez, G. M. F., Huerta-Espino, J., y Villaseñor, M. H. E. 2008. Nomenclatura de razas fisiológicas de *Puccinia striiformis* f. sp. *triticina* en México. In: Congreso Nacional de Fitogenética. Chapingo, México. Septiembre 2008. Químico. Agrociencia, 9: 11-21.
- Riero, Q. Y., Wu, G. M., Lai, L., Park, K. W., Cabot, R., Cheong, H. T., Day, B. N., Prather, R. S., and Schatten, H. 2008. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. 50 p.
- Romero, D. 2000. Control de la oxidación y contaminación en explantes foliares de guanábana (*Annona muricata* L.) Acta científica Venezolana. pp. 51:7.
- Roelfs, A. P., R. P. Singh, E. E., Saari. 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. México, D.F.: CIMMYT. pp 81.
- Sánchez, C. N., Jiménez, V. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. Agronomía Mesoamericana 20. 1: 135-151.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT User's Guide. (Release 9.1). Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Sharma, H.C., Sharma, R. R., Goswami, A. M. 1995. Effect of etiolation on polyphenoxidase activity in shoots of grape and its subsequent *in vitro* survival. Indian. 52: 104-107.
- Stubbs, R. W., Bruin, T. 1986. Bestrijding van gele roest met het systemische fungicide oxycaroxin Plantas. Gewasbescherming 1: 9-104.
- Shaom, B., Chu, L.Y., Shao, M.A., Cheruth, A. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. C.R. Biologies. pp 331:433.
- Smith R. 2012. Plant tissue culture: Techniques and experiments. Londres, UK. Academic Oress Elsevier. 208 p.
- Singh, R. P., Huerta-Espino y Roelfs, A.P. 2004. The wheat rusts. In: Bread wheat improvement and production. Series No. 30 B.C. Curtis, S. Rajaram y H. Gómez Macpherson. (eds) FAO Rome, Italy pp: 227-249.
- Takumara, T. A., Vassena, R., Francisci, C., and Gandolfi, F. 2005. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. Biol. Reprod. 72, 1218–1223.
- Weber, S., Horn, R., Friedt, W. 2000. High regeneration potential *in vitro* of sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines derived from interspecific hybridization. Euphytica 116: 271-280.
- William, M., O. M., J. Huerta E., S. G. Leyva M., E. Villaseñor M., y E. Espitia R. 2003. Análisis de virulencia de la roya de la hoja (*Puccinia triticina* Eriks.) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en los Valles altos de Méico. Rev. Mex. Fitopatología. 31(1): 46-62.

## CONCLUSIONES GENERALES

- La presencia de un gen resistente a roya de la hoja se corroboró mediante los cruzamientos de “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) en estado de plántula utilizando como progenitor susceptible “Atred”. Los resultados de resistencia y susceptibilidad, la cual se generó de forma repentina. “Mirlo 26” (R) y un gen dominante en “Elinia 48”, materiales disponibles para usarse en el mejoramiento genético de trigos.
- Mediante segmentos basales de tallo se lograron regenerar plantas vía organogénesis directa e indirecta en los genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26”(R) y “Elinia 48”(R) cultivados en medio de cultivo MS (1962) suplementado con BA (11.1  $\mu$ M) y AIA (1.0  $\mu$ M). La mejor ruta para la propagación resultó la organogénesis directa con un 45% de brotación en los tres genotipos.
- La aclimatación de plántulas de los genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R), fue viable en invernadero con un 90% de supervivencia en sustrato de peat-moos y agrolita.
- La evaluación de roya de la hoja mediante plantas aclimatadas tuvo porcentajes de infección en los genotipos “Atred” (S) 21%, “Mirlo 26” (R) 10% y “Elinia 48” (R) 10%. Estas respuestas fueron diferentes a las evaluaciones hechas en campo, lo que indica una posible variación somaclonal o epigenética que necesita ser corroborada en la progenie de cada genotipo mediante inoculación del patógeno o bien con pruebas genéticas que indiquen la existencia de cualquier tipo de cambio genético o epigenético.
- Mediante la inoculación de la roya de la hoja con roció *in vitro* no se logró evaluar los tres materiales ya que la contaminación impidió resultados precisos para su evaluación.

- La evaluación de roya de la hoja *in vitro* sin exposición al rocío mostró respuestas de infección a los 20 día. El genotipo “Atred” (S), no resistió el estrés que ocasionó este patógeno.
- La evaluación *in vitro* de roya de la hoja fue eficiente en los genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (S), la cual se realizo mediante muerte o supervivencia de las plantas para poder clasificarlas, esto representa una alternativa para la selección *in vitro* de trigo.
- Las técnicas del Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* son una herramienta para el mejoramiento genético convencional para distinguir genotipos seleccionados en campo de materiales susceptibles o resistentes a enfermedades.
- Esta es la primera a investigación donde se aplican las Técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* para evaluar genotipos susceptibles y resistentes a la roya de la hoja obtenidos por métodos de mejoramiento genético en campo.

## APÉNDICE

### 1.Respuesta de genotipos en estado de plántula con la raza BBB/BNJ y BBG/BPC

Entrada	Origen	Progenitor	BBG/BPC	BBG/BPC	BBB/BNJ	BBB/BNJ
1	1 GH	Atred/ Mirlo 26	X= <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	3+	S <sup>4</sup>
2	2 GH	Atred/ Mirlo 26	6P3+ 2PX <sup>1</sup>	SEG <sup>3</sup>	3+	S
3	3 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	3+	S
4	4 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	3+	S
5	5 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	3+	S
6	6 GH	Atred/ Mirlo 26	6PX=2P3+	SEG	3+	S
7	7 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	3+	S
8	8 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	3+	S
9	9 GH	Atred/ Mirlo 26	X=1-	R	3+	S
10	10 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	3+	S
11	11 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	3+	S
12	12 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	3+	S
13	13 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	3+	S
14	14 GH	Atred/ Mirlo 26	6P3+1PX=SEG 3+(1P)	SEG	3+	S
15	15 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	4	S
16	16 GH	Atred/ Mirlo 26	;1-	R	4	S
17	17 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	4	S
18	18 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	4	S
19	19 GH	Atred/ Mirlo 26	6P3+1PX=SEG 3+(1P)	SEG	3+(1P)	S
20	20 GH	Atred/ Mirlo 26	;1-	R	4	S
21	21 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	4	S
22	22 GH	Atred/ Mirlo 26	X=	R	4	S
23	23 GH	Atred	4	S	4	S
24	24 GH	Mirlo 26	X+	R	4	S
25	1 GH	Elinia/48	X	R	6PX, 1P4	SEG

1: Tipo de Infección; 2: Familia resistente; 3: Familia segregante; 4: Familia susceptible; 1h: Tipo de infección en la primera hoja; 2h: Tipo de infección en la segunda hoja.

**Continuación 1...**

<b>Entrada</b>	<b>Origen</b>	<b>Progenitor</b>	<b>BBG/BPC</b>	<b>BBG/BPC</b>	<b>BBB/BNJ</b>	<b>BBB/BNJ</b>
26	2 GH	Atred/ Elinia 48	X	S	3P3+,5PX	SEG
27	3 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
28	4 GH	Atred/ Elinia 48	4P3+,4PX	SEG	3P3,4PX	SEG
29	5 GH	Atred/ Elinia 48	5PX,3P3+	SEG	8PX1P3+	SEG
30	6 GH	Atred/ Elinia 48	5PX,3P3+	SEG	1hX+2hX	R
31	7 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	6PX 2P3+	SEG
32	8 GH	Atred/ Elinia 48	8PX,1P3+	SEG	6PX,2P3+	SEG
33	9 GH	Atred/ Elinia 48	7PX,P3+	SEG	1hX+,2hX	R
34	10 GH	Atred/ Elinia 48	1PX	R	2PX	R
35	11 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
36	12 GH	Atred/ Elinia 48	6PX,2P3+	SEG	6PX,2P3+	SEG
37	13 GH	Atred/ Elinia 48	4PX3P3+	SEG	5PX,2P3+	SEG
38	14 GH	Atred/ Elinia 48	6PX,2P3+	SEG	5PX,3P4	SEG
39	15 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	8PX,1P3+	SEG
40	16 GH	Atred/ Elinia 48	2PX,2P3+	SEG	6PX+1P4	SEG
41	17 GH	Atred/ Elinia 48	7PX,2P3+	SEG	4P;1-,3P4	SEG
42	18 GH	Atred/ Elinia 48	X=	R	X	R
43	19 GH	Atred/ Elinia 48	4PX,4P3+	SEG	7PX,1P4	SEG
44	20 GH	Atred/ Elinia 48	5PX,3P3+	SEG	5PX,3P3+	SEG
45	21 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	3P4	S
46	22 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	SP1hX+2hX	R
47	23 GH	Atred/ Elinia 48	X1h,2hX=	R	1hX,2hX=	SEG
48	24 GH	Atred/ Elinia 48	3+	S	4	S
49	25 GH	Atred/ Elinia 48	3P3+,5PX	SEG	6PX,2P4	SEG
50	26 GH	Atred/ Elinia 48	4PX,4P3+	SEG	6PX,2P4	SEG
51	27 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
52	28 GH	Atred/ Elinia 48	1hX+,2hX=	R	1hX+,2hX=	R
53	29 GH	Atred/ Elinia 48	7PX,1P3+	SEG	5PX,2P4	SEG

1: Tipo de Infección; 2: Familia resistente; 3: Familia segregante; 4: Familia susceptible; 1h: Tipo de infección en la primera hoja; 2h: Tipo de infección en la segunda hoja.

**Continuación...**

Entrada	Origen	Progenitor	BBG/BPC	BBG/BPC	BBB/BNJ	BBB/BNJ
54	30 GH	Atred/ Elinia 48	7PX,P3+	SEG	5PX,2P4	SEG
55	31 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
56	32 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
57	33 GH	Atred/ Elinia 48	6P1hX+,2hX	SEG	5P1hX+2hX 3P4	SEG
58	34 GH	Atred/ Elinia 48	7PX,1P3+	SEG	X	R
59	35 GH	Atred/ Elinia 48	7PX,1P3+	SEG	6PX,2P4	SEG
60	36 GH	Atred/ Elinia 48	6PX,2P3+	SEG	6PX,3P4	SEG
61	37 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
62	38 GH	Atred/ Elinia 48	5PX,3P3+	SEG	6PX,1P4	SEG
63	39 GH	Atred/ Elinia 48	6P1hX+2hX 2P 3+	SEG	5PX,3P4	SEG
64	40 GH	Atred/ Elinia 48	6PX,2P3+	SEG	5PX,3P4	SEG
65	41 GH	Atred/ Elinia 48	6PX,3P4	SEG	X	R
66	42 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
67	43 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
68	44 GH	Atred/ Elinia 48	4P3+4PX	SEG	7P1hX+2hX 1P4	SEG
69	45 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
70	46 GH	Atred/ Elinia 48	6PX,3P4	SEG	6PX,2P4	SEG
71	47 GH	Atred/ Elinia 48	5PX,2P4	SEG	5PX,3P4	SEG
72	48 GH	Atred/ Elinia 48	7PX,1P3+	SEG	5PX,3P4	SEG
73	49 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
74	50 GH	Atred/ Elinia 48	5PX,3P+	SEG	5PX,3P4	SEG
75	51 GH	Atred/ Elinia 48	6PX,2P4	SEG	8P1hX+3,2hX 1P4	SEG
76	52 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
77	53 GH	Atred/ Elinia 48	6PX,2P4	SEG	6PX=2P4	SEG
78	54 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
79	55 GH	Atred/ Elinia 48	6PX,3P4	SEG	4PX,2P4	SEG
80	56 GH	Atred/ Elinia 48	X	R	X	R
81		Atred	4	S	4	S
82		Elinia 48	X	R	X	R
83		Elinia 48	X	R	X	R
84		Mirlo 26	X	R	4	S

1: Tipo de Infección; 2: Familia resistente; 3: Familia segregante; 4: Familia susceptible; 1h: Tipo de infección en la primera hoja; 2h: Tipo de infección en la segunda hoja.

**2. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de contaminación y supervivencia *in vitro* de los genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R).**

Fuente de variación	Contaminación	Supervivencia
Tratamiento	1.54	0.23
Repetición	0.27	0.25
Error	0.15	0.15
C.V.	71.46	49.68
R <sup>2</sup>	0.48	0.18
Media	0.54	0.79

**3. Respuesta de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a la inducción de callos embriogénicos cultivados *in vitro*. Promedio de 20 repeticiones, con una semilla cada unidad experimental. Porcentaje de callos (PC), Peso de callos (PDC).**

Fuente de variación	PC	PDC
Tratamiento	0.05	0.55
Repetición	0.07	0.41
Error	0.01	0.2
C.V.	71.01	106.65
R <sup>2</sup>	0.44	0.31
Media	0.18	0.42

**4. Respuesta organogénica de tres genotipos de trigo “Atred”(S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) sometidos a diferentes concentraciones de Benciladenina (BA) medida en número de brotes por explante (BE) , Logitud de brotes (LB), Número de hojas por explante (NH) de los genotipos mediante la evaluación en organogénesis directa.**

Fuente de variación	BE	LB	NH
Tratamiento	6.41	13.06	19.91
Repetición	17.71	29.54	28.11
Error	1.12	1.01	1.74
C.V.	32.11	32.11	24.27
R <sup>2</sup>	0.72	0.83	0.77
Media	3.3	6.45	5.44

**5. Respuesta organogénica de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (resisntete) y “Elinia 48” (R) sometidos a diferentes concentraciones de Benciladenina (BA) medida en número de brotes por explante (BE), Longitud de brotes (LB), Número de hojas por explante (NH) de los genotipos mediante la evaluación en organogénesis indirecta.**

Fuente de variación	B	LB	NH
Tratamiento	4.94	9.39	3.91
Repetición	1.75	3.83	2.6
Error	1.56	2.44	1.57
C.V.	59.34	68.49	71.63
R2	0.34	0.4	0.34
Media	2.11	2.28	1.75

**6. Enraizamiento de tres genotipos de trigo genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) sometidos a diferentes concentraciones de Benciladenina (BA) medida en número de raíces (NR) , Logitud de raíces (LR).**

Fuente de variación	NR	LR
Tratamiento	22.76	33.25
Repetición	6.34	4.75
Error	2.98	3.76
C.V.	48.42	53.45
R2	0.54	0.55
Media	3.56	19



**7. Respuesta de las 48 líneas en estado de plántula con la raza BBB/BNJ.**

<b>Entrada (Núm.)</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Respuesta invernadero</b>	<b>Respuesta <i>in vitro</i></b>
1	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
2	Atred	4	Susceptible	Susceptible
3	Atred	4	Susceptible	Resistente
4	Atred	4	Susceptible	Susceptible
5	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
6	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
7	Atred	4	Susceptible	Susceptible
8	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
9	Atred	4	Susceptible	Susceptible
10	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
11	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
12	Atred	4	Susceptible	Susceptible
13	Atred	4	Susceptible	Susceptible
14	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
15	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
16	Atred	4	Susceptible	Susceptible
17	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
18	Atred	4	Susceptible	Susceptible
19	Atred	4	Susceptible	Susceptible
20	Atred	4	Susceptible	<b>Resistente</b>
21	Atred	4	Susceptible	Susceptible

**8. Respuesta de las 48 líneas en estado de plántula con la raza BBB/BNJ**

<b>Entrada No.</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Respuesta invernadero</b>	<b>Respuesta <i>in vitro</i></b>
43	Elinia 48	4	Resistente	<b>Susceptible</b>
44	Elinia 48	4	Resistente	Resistente
45	Elinia 48	4	Resistente	Resistente
46	Elinia 48	4	Resistente	<b>Susceptible</b>
47	Elinia 48	4	Resistente	Resistente
48	Elinia 48	X	Resistente	Resistente
49	Elinia 48	X	Resistente	Resistente
50	Elinia 48	4	Resistente	Resistente
51	Elinia 48	X	Resistente	Resistente
52	Elinia 48	X	Resistente	<b>Susceptible</b>
53	Elinia 48	X	Resistente	Resistente
54	Elinia 48	3	Resistente	Resistente
55	Elinia 48	X	Resistente	Resistente
56	Elinia 48	X	Resistente	<b>Susceptible</b>
57	Elinia 48	3	Resistente	Resistente
58	Elinia 48	X	Resistente	Resistente
59	Elinia 48	X	Resistente	Resistente
60	Elinia 48	X	Resistente	<b>Susceptible</b>
61	Elinia 48	X	Resistente	Resistente
62	Elinia 48	X	Resistente	Resistente
63	Elinia 48	X	Resistente	Resistente

### 9. Respuesta de las 48 líneas en estado de plántula con la raza BBB/BNJ

Entrada	Genotipo	Respuesta	Respuesta invernadero	Respuesta <i>in vitro</i>
64	Mirlo 26	1	Resistente	<b>Susceptible</b>
65	Mirlo 26	2	Resistente	Resistente
66	Mirlo 26	1	Resistente	<b>Susceptible</b>
67	Mirlo 26	2	Resistente	Resistente
68	Mirlo 26	2	Resistente	<b>Susceptible</b>
69	Mirlo 26	;	Resistente	Resistente
70	Mirlo 26	X	Resistente	Resistente
71	Mirlo 26	X	Resistente	Susceptible
72	Mirlo 26	4	Resistente	Resistente
73	Mirlo 26	X	Resistente	Resistente
74	Mirlo 26	X	Resistente	Resistente
75	Mirlo 26	D	Resistente	Resistente
76	Mirlo 26	;	Resistente	Resistente
77	Mirlo 26	4	Resistente	<b>Susceptible</b>
78	Mirlo 26	1	Resistente	Resistente
79	Mirlo 26	D	Resistente	Resistente
80	Mirlo 26	X	Resistente	Resistente
81	Mirlo 26	X	Resistente	Resistente
82	Mirlo 26	X	Resistente	<b>Susceptible</b>
83	Mirlo 26	X	Resistente	Resistente
84	Mirlo 26	X	Resistente	Resistente

1h: Tipo de infección en la primera hoja; 2h: Tipo de infección en la segunda hoja; 3h: Tipo de infección en la tercera hoja.

**10. Respuesta de tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) a la inoculación de roya de la hoja *Puccinia triticina* E., con rocío metodología *in vitro*.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Presencia de pústula</b>
Tratamiento	0.5
Repetición	0.51
Error	0.1
C.V.	95.74
R <sup>2</sup>	0.69
Media	0.33

**11. Cuadrados medios y su significancia del análisis de varianza de la tasa de contaminación y supervivencia *in vitro* de los genotipos “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R).**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Contaminación</b>
Tratamiento	0.18
Repetición	0.07
Error	0.24
C.V.	157.7
R <sup>2</sup>	0.22
Media	0.31