

## Resistencia *in vitro* de trigos cristalinos de hábito invernal a *Puccinia triticina* Eriks\*

### Resistance *in vitro* of durum wheat of winter habit to *Puccinia triticina* Eriks

Laura Marisa Delgado-Sánchez<sup>1</sup>, María Cristina Guadalupe López-Peralta<sup>1§</sup> y Eleodoro Hernández-Meneses<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad- Genética-Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Tel: (595) 9520200 Ext. 1540.

<sup>§</sup>Autora para correspondencia: cristy@colpos.mx.

#### Resumen

El cultivo del trigo en México actualmente enfrenta la roya de la hoja (*Puccinia triticina* E.) que ocasiona pérdidas hasta de 100% del rendimiento. Esta investigación evaluó la respuesta de tres genotipos de trigo: “Mirlo 26”, “Elinia 48” y “Atred” a la roya de la hoja BBG/BPC bajo condiciones *in vitro*. Los dos primeros, considerados tolerantes (R) y el tercero susceptible (S). La germinación *in vitro* de los tres genotipos se logró en medio de cultivo MS (1962) adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>); 2,4-D (20.3 µM) y Kin (5.8 µM). Además de generar plántulas, las semillas formaron callos. De las plántulas se disecaron secciones transversales basales de tallo y se sembraron en medio MS (1962) con BA (11.1 µM) y AIA (1.0 µM) para inducir organogénesis directa. En este mismo medio se sembraron los callos para inducir organogénesis indirecta. La regeneración de plántulas enraizadas se logró en ambas rutas morfogénicas en el mismo medio de cultivo y concentraciones hormonales a las cuatro semanas. La aclimatación fue 90% en sustrato de agrolita y peat-moss (1:1). La evaluación de roya de la hoja en plantas aclimatadas tuvo porcentajes de infección de 21% en el genotipo “Atred” (S), 10% en “Mirlo 26” (R) y 10% en “Elinia 48” (R). En plántulas *in vitro* los porcentajes fueron de 70% para “Atred”, 40% para “Mirlo 26” y 30% para “Elinia 48” al aplicar 0.03 mg mL<sup>-1</sup> de esporas. Este

#### Abstract

The cultivation of wheat in Mexico currently facing leaf rust (*Puccinia triticina* E.) causes losses of up to 100% performance. This research evaluated the response of three wheat genotypes "Mirlo 26", "Elinia 48" and "Atred" to rust BBG/BPC sheet under *in vitro* conditions. The first two, considered tolerant (R) and the third susceptible (S). The *in vitro* germination of the three genotypes was achieved in medium MS (1962) supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>); 2,4-D (20.3 µM) and Kin (5.8 µM). Besides generating seedlings, seeds formed calluses. Seedling basal stem cross sections were dissected and plated on medium MS (1962) with BA (11.1 µM) and AIA (1.0 µM) to induce direct organogenesis. In this same medium calluses they were seeded to induce indirect organogenesis. The rooted plantlets regeneration was achieved in both morphogenic routes in the same culture medium and hormonal concentrations at four weeks. The acclimation was 90% in perlite substrate and peat-moss (1:1). The evaluating leaf rust acclimated plants had infection rates 21% in genotype "Atred" (S), 10% in "Mirlo 26" (R) and 10% in "Elinia 48" (R). In *in vitro* plantlets percentages were 70% for "Atred" 40% for "Mirlo 26" and 30% "Elinia 48" by applying 0.03 mg mL<sup>-1</sup> of spores. This study is the first report assessing the tolerance of wheat genotypes to leaf rust using plant tissue culture *in vitro*.

\* Recibido: enero de 2016  
Aceptado: marzo de 2016

estudio es el primer reporte que evalúa la tolerancia de genotipos de trigo a la roya de la hoja usando el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

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

## Introducción

La variedad *Durum* de *Triticum turgidum* L., conocida como trigo duro o cristalino, es resultado de cruza naturales de dos especies diploides originarias del mediterráneo (Huerta y Skovmand, 2000). El 90% del trigo de temporal que se produce en México se siembra durante la primavera o al inicio del verano; meses que coinciden con la época de lluvias y la humedad es el factor que más contribuye al proceso infectivo enfermedades del trigo causadas por hongos. La roya de la hoja o roya café es la más común del trigo y es causada por el hongo *Puccinia triticina* E., principalmente afecta las láminas foliares y la severidad depende de las densidades del inóculo y la susceptibilidad del genotipo (Huerta y Singh, 2000).

La presencia de una nueva raza de la roya de la hoja (BBG/BN), detectada en el Noroeste de México en el año 2001, se caracteriza por infectar trigos duros. Por ello, es de suma importancia desarrollar variedades de trigos duros que muestren resistencia a todas las razas de roya de la hoja (Huerta y Skovmand, 2000). El mejoramiento genético convencional ha sido la mejor vía para la obtención de líneas resistentes a la roya; producto de ello se han liberado en México las variedades "Jupare C2001", "Banamichi" y "Samayoa" (Huerta y Skovmand., 2000). Las cruza de trigo susceptible de primavera con progenitores resistentes de hábito invernal han permitido identificar genotipos resistentes con hábito de primavera, los cuales poseen un buen tipo agronómico. Estas líneas pueden usarse como fuentes de resistencia a roya 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.

Una estrategia importante en el mejoramiento genético en trigo ha sido 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

**Keywords:** *in vitro*, rust, selection, susceptibility, somaclonal variation.

## Introduction

The *Durum* of *Triticum turgidum* L. variety, known as hard or durum wheat is the result of natural cross of two diploid species native to the Mediterranean (Huerta and Skovmand, 2000). The 90% of rainfed wheat produced in Mexico is sown in spring or early summer; months that coincide with the rainy season and the humidity is the most important factor contributing to the process wheat infectious diseases caused by fungi. The leaf rust or rust brown is the most common wheat and is caused by the fungus *Puccinia triticina* E., mainly it affects the leaf blades and severity depends on the inoculum densities and susceptibility genotype (Huerta and Singh, 2000).

The presence of a new breed of leaf rust (BBG/BN), detected in Northwestern Mexico in 2001, is characterized by infecting hard wheats. It is therefore important to develop varieties of durum wheats that show resistance to all races of leaf rust (Huerta and Skovmand, 2000). Conventional breeding has been the best way to obtain lines resistant to rust. This product has been released varieties in Mexico "Jupare C2001", "Banamichi" and "Samayoa" (Huerta and Skovmand, 2000). Crosses of susceptible spring wheat winter habit resistant parents have identified resistant genotypes with spring habit, which have good agronomic type. These lines can be used as sources of rust resistance in a breeding program and use the dominant gene, which remains effective against the most common rust race now in Mexico (BBG/BPC), in combination with other genes.

An important wheat breeding strategy has been crossed with a susceptible variety resistant and thus determine both the type of gene action, as the number of genes that confer resistance. It is possible that between dominant and recessive genes, or combinations, resistance in seedling stage where two duplicate recessive genes that can be inherited independently (Zhang and Knott, 1990) are presented is granted. Thus genotypes were generated "Mirlo 26" and "48 Elinia" identified as resistant, crossed with genotype "Atred" susceptible to rust.

The plant tissue culture *in vitro* is an option to optimize the evaluation of resistant and susceptible to leaf rust plants. With its various techniques it is possible to evaluate the

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). Así se generaron los genotipos “Mirlo 26” y “Elinia 48”, identificados como resistentes, cruzados con el genotipo “Atred”, susceptible a la roya.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es una opción para optimizar la evaluación de plantas resistentes y susceptibles a roya de la hoja. Con sus diversas técnicas es posible evaluar la respuesta de variedades de trigo a la roya en condiciones *in vitro* en un espacio reducido y de manera eficaz comparada con las evaluaciones en campo e invernadero. A partir de un segmento de tejido se puede obtener gran cantidad de plantas genéticamente uniformes y libres de enfermedades (Shaom *et al.*, 2008). En campo, una semilla genera una planta; sin embargo, con las técnicas *in vitro* se obtienen lotes de plantas sanas útiles para diversos estudios. Con base en estos antecedentes, la presente investigación tuvo como objetivo 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., inoculada en plantas aclimatadas obtenidas vía organogénesis y en plántulas mantenidas en condiciones *in vitro*.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se utilizaron semillas de los genotipos “Atred (S)”, “Elinia 48 (R)” y “Mirlo 26 (R)”. El primero con características de susceptibilidad a la roya de la hoja y los dos restantes considerados resistentes. Las semillas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX).

### Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo básico empleado estuvo constituido por sales minerales del medio Murashige y Skoog (1962) (Sigma Aldrich® M5519, 4.4 g L<sup>-1</sup>), adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>). El pH fue de 5.7 ± 0.1 ajustado con NaOH o HCl 1N, mediante un potenciómetro (Thermo Scientific® Orion 3 Star meter). Se agregó phytigel (Sigma®, 2.5 g L<sup>-1</sup>) como agente gelificante. La esterilización del medio de cultivo se hizo en autoclave vertical (AESAS®, modelo 300) a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 min.

response of wheat varieties to rust *in vitro* conditions and in a reduced effectively compared with assessments in field and greenhouse space. From a segment of tissue you can get lots of plants genetically uniform and free of disease (Shaom *et al.*, 2008). In field, generates a seed plant; however, *in vitro* techniques useful batches of healthy plants are obtained for various studies. Based on this background, this study aimed to characterize the response of wheat genotypes "Atred" (susceptible, S), "Mirlo 26" (resistant, R) and "Elinia 48" (resistant, R) to leaf rust *Puccinia triticina* E., acclimated inoculated plants obtained via organogenesis and seedlings kept in conditions *in vitro*.

## Materials and methods

### Vegetal material

The seeds of genotypes "Atred (S)", "Elinia 48 (R)" and "Mirlo 26 (R)" were used. The first characteristic of susceptibility to leaf rust and the remaining two considered resistant. The seeds were provided by the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP) Field Experimental Valley of Mexico (CEVAMEX).

### Culture medium and incubation conditions

The basic culture medium used consisted of mineral salts Murashige and Skoog (1962) (Sigma Aldrich® M5519, 4.4 g L<sup>-1</sup>), supplemented with sucrose (30 g L<sup>-1</sup>). The pH was 5.7 ± 0.1 adjusted with NaOH or HCl 1N, by a potentiometer (Thermo Scientific® Orion 3 Star meter). The phytigel was added (Sigma®, 2.5 g L<sup>-1</sup>) as a gelling agent. The sterilization of the culture medium was autoclave vertically (AESAS®, modelo 300) at 121 C and 1.5 kg cm<sup>-2</sup> pressure for 20 min.

The cultures were incubated with photoperiod of 16/8 h light/dark provided by fluorescent lamps 75 W white light, with photosynthetic irradiation of 45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperature of 26 ± 2 °C and relative humidity of 30%.

### Establishment of aseptic culture

Of the three wheat genotypes uniform size seeds without biological or mechanical damage were selected. They were washed with detergent powder for 15 min with tap water and finally a wash with sterile distilled water. After disinfection treatments were established hydrogen peroxide® (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),

Los cultivos se incubaron con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad proporcionado por lámparas de luz blanca fluorescente de 75 W, con irradiación fotosintética de  $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y humedad relativa de 30%.

### Establecimiento del cultivo aséptico

De los tres genotipos de trigo se seleccionaron semillas de tamaño uniforme y sin daño biológico o mecánico. Se lavaron con detergente en polvo durante 15 min con agua de la llave y al final un lavado con agua destilada esterilizada. Después se establecieron tratamientos de desinfección con peróxido de hidrógeno<sup>®</sup> ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), plata coloidal, hipoclorito de sodio comercial ( $\text{NaOCl}$ ), Tween<sup>®</sup> 20 y los fungicidas: Benlate<sup>®</sup>, Captán<sup>®</sup> y Vitavax 300<sup>®</sup> (Cuadro 1).

#### Cuadro 1. Tratamientos probados en la desinfección de semillas de los genotipos de trigo "Atred"(S), "Elinia 48" (R) y "Mirlo 26" (R).

Table 1. Tested Treatments in the disinfection of seeds of wheat genotypes "Atred" (S), "Elinia 48" (R) and "Mirlo 26" (R).

Tratamiento (Núm.)	T1	T2	T3
$\text{H}_2\text{O}_2$ (2% v/v)	21 h	21 h	22.5 h
Plata coloidal(10%v/v)+Tween <sup>®</sup> 20 (4%v/v)+NaClO (50% v/v)	30 min	30 min	40 min
Benlate <sup>®</sup> (8g L <sup>-1</sup> ) +Captán <sup>®</sup> (8g L <sup>-1</sup> )	30 min	30 min	50 min
Vitavax 300 (0.5g L <sup>-1</sup> )	–	20 min	–

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 (VECO<sup>®</sup>). La siembra se hizo en medio básico (Murashige y Skoog 1962) sin hormonas con 15 repeticiones por tratamiento. A las tres semanas de cultivo se evaluaron los porcentajes de contaminación y germinación.

### Germinación e inducción de callos

Para inducir la germinación *in vitro*, las semillas de los tres genotipos de trigo se sembraron en medio básico Murashige y Skoog (1962) adicionado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y cinetina (Kin) (Cuadro 2). La siembra se hizo con la región del meristemo radicular sumergido 3 mm en el medio de cultivo. Después de tres semanas de cultivo se evaluó el porcentaje de germinación. Los tratamientos se integraron por 15 repeticiones y cada repetición estuvo constituida por una semilla sembrada en un frasco de cultivo.

colloidal silver, commercial sodium hypochlorite ( $\text{NaOCl}$ ), Tween<sup>®</sup> 20 and fungicides: Benlate<sup>®</sup>, Captan<sup>®</sup> and Vitavax 300<sup>®</sup> (Table 1).

The seeds were rinsed with sterile distilled water to remove excess disinfectant. The process of seed disinfection was done on a horizontal laminar hood (VECO<sup>®</sup>) flow. The planting was done in basic medium (Murashige and Skoog 1962) without hormones with 15 repetitions per treatment. At three weeks of culture contamination and the percentage of germination they were evaluated.

### Germination and callus induction

To induce germination *in vitro*, seeds of three wheat genotypes were planted on basic medium Murashige and Skoog (1962) supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin (KIN) (Table 2). The planting was done with the root meristem region of 3 mm immersed in the culture medium. After three weeks of culture the percentage of germination was evaluated. The treatments were composed of 15 repetitions, and each repetition consisted of a seed planted in a culture flask.

#### Cuadro 2. Dosis de 2, 4-D y cinetina adicionadas al medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) en la germinación de los genotipos de trigo "Atred" (S), "Elinia 48" (R) y "Mirlo 26"(R).

Table 2. Dose of 2,4-D and kinetin spiked to medium Murashige and Skoog (1962) on germination of wheat genotypes "Atred" (S) "Elinia 48" (R) "Mirlo 26" (R).

Tratamiento Núm.	2,4-D		Kin	
	mg L <sup>-1</sup>	$\mu\text{M}$	mg L <sup>-1</sup>	$\mu\text{M}$
1 testigo	–	–	–	–
2	2.5	15	–	–
3	4.5	20.35	1.25	5.8
4	4.5	20.35	–	–
5	4.5	20.35	2.7	12.5

### Plant regeneration via direct organogenesis

From seedlings germinated *in vitro* one month of age, basal stem cross sections were dissected [thin cell layer (thin layers of cells)], 6-9 mm diameter and 1-2 mm thick. The explants were plated on medium staple crop Murashige and Skoog (1962) supplemented with benzyladenine (BA) and 3-indoleacetic acid (AIA) (Table 3). At 30 days they were evaluated: bud break (%), number of buds per explant, shoot length (cm) and number of leaves.

### Regeneración de plantas vía organogénesis directa

A partir de plántulas germinadas *in vitro* de un mes de edad, se disecaron 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 medio cultivo básico Murashige y Skoog (1962) suplementado con benciladenina (BA) y Ácido 3-Indolacético (AIA) (Cuadro 3). A los 30 días se evaluaron: brotación (%), número de brotes por explante, longitud de brotes (cm) y número de hojas.

### Regeneración de plantas vía organogénesis indirecta

Se usaron explantes de callos de 60 días de edad obtenidos de la germinación de semillas de los tres genotipos. Se sembraron en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) suplementado con BA y AIA (Cuadro 3). El tiempo de medición y las variables medidas fueron las mismas que en la organogénesis directa.

### Enraizamiento *in vitro*

Durante la regeneración de plantas vía organogénesis directa e indirecta se evaluó la inducción de raíces en las concentraciones hormonales probadas (Cuadro 3). Las variables evaluadas, 30 días después de la siembra, fueron el porcentaje de enraizamiento y el número y longitud de raíces (cm).

### Aclimatación de plántulas

Se seleccionaron tres lotes de plantas enraizadas de los tres genotipos de trigo de acuerdo a la altura: cinco plantas de 5 cm, cinco de 10 cm y cinco de 15 cm. Las plantas se extrajeron de los frascos y las raíces se lavaron con agua destilada estéril. Se trasplantaron en vasos de unicel de 237 mL de capacidad con mezcla de agrolita y peat-moss (proporción 1:1). Las plantas se mantuvieron en invernadero con temperatura de  $24 \pm 2$  °C por dos semanas (Mujeeb, 2000) y cada tercer día se regaron con la solución Murashige y Skoog (1962).

### Inoculación de la roya

Para evaluar de la resistencia de los tres genotipos, se usaron las raza de roya BBG/BPC donde la fórmula de avirulencia/virulencia 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*.

### Cuadro 3. Dosis de BA y AIA evaluadas en la organogénesis directa e indirecta de los genotipos de trigo "Atred"(S), "Elinia 48"(R) y "Mirlo 26"(R).

**Table 3. Dose of BA and AIA evaluated in direct and indirect organogenesis of wheat genotypes "Atred" (S), "Elinia 48" (R) and "Mirlo 26" (R).**

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

### Regeneration of plants via indirect organogenesis

The callus explants were used of 60 days of age obtained from the germination of the three genotypes. They were seeded in culture medium Murashige and Skoog (1962) supplemented with BA and AIA (Table 3). The measurement time and measured variables were the same as in direct organogenesis.

### Rooting *in vitro*

During regeneration of plants via direct and indirect organogenesis induction of roots in hormone levels tested (Table 3) was evaluated. The variables evaluated 30 days after sowing, were rooting percentage and number and root length (cm).

### Seedling acclimation

Three batches of rooted plants of the three wheat genotypes according to the height are selected: five floors 5 cm, 10 cm and five of five 15 cm. The plants were removed from the jars and roots were washed with sterile distilled water. It transplanted in styrofoam cups of 237 mL capacity with perlite mixed and peat-moss (1:1). The plants were kept in greenhouse temperature of  $24 \pm 2$  °C for two weeks (Mujeeb, 2000) and were watered every other day with the solution Murashige and Skoog (1962).

### Inoculation of rust

To evaluate the resistance of the three genotypes, the rust strain used BBG/BPC where the formula avirulence/virulence was: *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*.

## Inoculación en plantas aclimatadas

A los 16 días después de la aclimatación las plantas de los tres genotipos fueron inoculadas con una suspensión de urediniosporas de roya de la raza BBG/BPC. Se aplicó una concentración de 2-3 mg mL<sup>-1</sup> de esporas en aceite mineral (Soltrol® 170) (Herrera-Foessel *et al.*, 2003). La inoculación se hizo cuando las plántulas presentaron la primera hoja extendida. Con un atomizador (FELISA®, Modelo FE-1500L) se asperjaron uniformemente; se dejaron secar 20 minutos y se colocaron en una cámara (Hydrofogger®) por 16 h con humedad relativa de 100%. Después se trasladaron al invernadero con temperatura de 24 ± 2 °C. A los 10 días se trasplantaron a macetas plantas con características de interés para obtener semilla. A los 12 días de la inoculación se hicieron las evaluaciones con la escala de Roelfs *et al.* (1992).

## Inoculación en plantas *in vitro*

De los tres genotipos se seleccionaron plantas *in vitro* de 5, 10 y 15 cm de altura y se inocularon con la roya de la hoja. Las esporas fueron suspendidas en 200 mL de agua destilada y se aplicaron en tres concentraciones (0.01, 0.03 y 0.05 mg mL<sup>-1</sup>). También se agregaron cuatro concentraciones de sacarosa (10, 15, 20 y 30 g L<sup>-1</sup>) al medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) para evaluar el crecimiento de las esporas que eventualmente cayeran al medio. Las plantas inoculadas se mantuvieron en el cuarto de incubación y a los 20 días se evaluó la presencia o ausencia de pústulas de roya de la hoja.

## Análisis estadístico

Todos los experimentos se condujeron en un diseño completamente al azar. Para cada variable se aplicó un análisis de varianza con el Sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## Resultados y discusión

### Establecimiento del cultivo aséptico

La supervivencia de las semillas en los tres genotipos de trigo estuvo asociada con el tratamiento de desinfección ( $p \leq 0.05$ ). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2% v/v) por 22.5 h, plata coloidal estable (10% v/v) + NaClO (50% v/v) + Tween 20 (4% v/v) durante 50 minutos y la mezcla de Benlate (8 g L<sup>-1</sup>) +

## Acclimatized plants inoculating

At 16 days after acclimatization plants of the three genotypes they were inoculated with a suspension of urediniospores of rust race BBG/BPC. A concentration of 2.3 mg mL<sup>-1</sup> of spores in mineral oil was applied (Soltrol® 170) (Herrera-Foessel *et al.*, 2003). The inoculation was made when the seedlings showed the first extended sheet. With an atomizer (FELISA®, Modelo FE-1500L) were sprayed evenly; they allowed to dry 20 minutes and placed in a chamber (Hydrofogger®) for 16 h with 100% relative humidity. Then they moved to the greenhouse temperature of 24 ± 2 °C. At 10 days potted plants were transplanted with characteristics of interest for seed. At 12 days after inoculation with were made evaluations of scale Roelfs *et al.* (1992).

## Inoculation *in vitro* plants

Of the three genotypes *in vitro* plants of 5, 10 and 15 cm were selected and inoculated with leaf rust. Spores were suspended in 200 mL of distilled water and applied at three concentrations (0.01, 0.03 and 0.05 mg mL<sup>-1</sup>). The four concentrations of sucrose (10, 15, 20 and 30 g L<sup>-1</sup>) were also added to culture medium Murashige and Skoog (1962) to assess the growth of the spores that will eventually fall to the culture medium. Inoculated plants were kept in the incubation room and at 20 days was evaluated the presence or absence of rust pustules leaf.

## Statistic analysis

All experiments were conducted in a completely randomized design. For each variable analysis was applied of variance with SAS Statistical Analysis System (SAS Institute, 2003) and mean comparison was used Tukey test ( $p \leq 0.05$ ).

## Results and discussion

### Establishment of aseptic culture

The survival of the seeds in the three wheat genotypes was associated with disinfection treatment ( $p \leq 0.05$ ). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2% v/v) for 22.5 h, colloidal silver stable (10% v/v) + NaClO (50% v/v) + Tween 20 (4% v/v) for 50 minutes and the mixture Benlate (8 g L<sup>-1</sup>) + Captan (8 g L<sup>-1</sup>) for 50 min was the treatment produced the best results. The average survival rate was 85% in the three genotypes;

Captán ( $8 \text{ g L}^{-1}$ ) por 50 min fue el tratamiento que produjo los mejores resultados. La tasa de supervivencia promedio fue de 85% en los tres genotipos; la contaminación por bacterias fue de 5% y 10% por hongos. En el tratamiento donde se incluyó el fungicida Vitavax®300 sólo germinó 10% de las semillas. Si bien el control de hongos y bacterias fue eficiente; es probable que haya resultado tóxico para las semillas y afectó negativamente la germinación. La contaminación causada por hongos y bacterias es común en el establecimiento *in vitro* de semillas que están presentes de manera habitual en condiciones naturales y se debe definir un método de desinfección eficiente (Das y Pal, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008; Folguera *et al.*, 2009).

### Germinación e inducción de callos

Las diferencias estadísticas detectadas en los cinco tratamientos probados en los tres genotipos de trigo evaluados resultaron no significativas; sin embargo, la mayor tasa de germinación en los tres genotipos se alcanzó con  $20.35 \mu\text{M}$  de 2,4-D y  $5.8 \mu\text{M}$  de cinetina y en promedio fue de 79%. Respecto a la formación de callos a partir de las semillas, hubo diferencias en los tratamientos para cada genotipo ( $p \leq 0.05$ ). La mayor formación de callos fue promovida por el 2,4-D combinado con la cinetina. Para el genotipo "Elinia 48" (R) la mayor tasa (73%) se obtuvo con  $20.35 \mu\text{M}$  de 2,4-D y  $12.5 \mu\text{M}$  de cinetina. Para "Mirlo 26" (R) fue de 60% y se logró sólo con  $20.35 \mu\text{M}$  de 2,4-D sin cinetina; mientras que en "Atred" (S) el mayor porcentaje (53%) se alcanzó con  $20.35 \mu\text{M}$  de 2,4-D y  $5.8 \mu\text{M}$  de cinetina.

En gramíneas, la formación de callos se ha reportado a partir de diferentes explantes, como embriones maduros e inmaduros, segmentos de inflorescencias, hojas jóvenes y segmentos de tallo (Armstrong y Green, 1985). Es por ello que la respuesta observada en las semillas de los tres genotipos de trigo es producto del estímulo del 2,4-D y la cinetina (George y Debergh, 2008).

El cultivo de callos es una herramienta valiosa para la propagación de plantas de trigo y para estudios de selección *in vitro* en programas de mejoramiento genético (Pérez *et al.*, 2010). El cultivo de callos ha permitido 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, la regeneración de plantas de

contaminación por bacteria was 5% and 10% by fungi. In the treatment with the fungicide it was included Vitavax®300 germinated only 10% of the seeds. While controlling fungi and bacteria was efficient; result is likely to be toxic to the seeds and negatively affected the germination. Pollution caused by fungi and bacteria is common in the *in vitro* establishment of seeds that are present regularly in natural conditions and should define an efficient method of disinfection (Das and Pal, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008; Folguera *et al.*, 2009).

### Germination and callus induction

The statistical differences detected in the five tested in the three wheat genotypes evaluated treatments were not significant; however, the higher rate of germination in the three genotypes was achieved with  $20.35 \mu\text{M}$  of 2,4-D and  $5.8 \mu\text{M}$  kinetin and average was 79%. Regarding the formation of callus from seeds, there were differences in the treatments for each genotype ( $p \leq 0.05$ ). Most callus formation was promoted by the 2,4-D combined with kinetin. For genotype "Elinia 48" (R) the highest rate (73%) it was obtained with  $20.35 \mu\text{M}$  of 2,4-D and  $12.5 \mu\text{M}$  of kinetin. For "Mirlo 26" (R) was 60% and was achieved only  $20.35 \mu\text{M}$  of 2,4-D without kinetin; while in "Atred" (S) the highest percentage (53%) was achieved with  $20.35 \mu\text{M}$  of 2,4-D and  $5.8 \mu\text{M}$  of kinetin.

In grasses, callus formation has been reported from different explants, as mature and immature embryos, inflorescences segments, young leaves and stem segments (Armstrong and Green, 1985). That is why the response observed in the seeds of the three genotypes of wheat is the product of stimulus of 2,4-D and kinetin (George and Debergh, 2008).

The callus culture is a valuable tool for the spread of wheat plants and for studies of *in vitro* selection in breeding programs (Pérez *et al.*, 2010). The callus culture has allowed the isolation of cells and protoplasts, the production of secondary metabolites of biological interest, the conservation of germplasm and introducing new genetic variability. Therefore, regeneration of wheat plants may have commercial applications, such as set forth in other grasses including rice, wheat and maize (Huang and Shaolin, 2002).

### Plant regeneration via direct organogenesis

Seedlings three weeks after germination of genotypes "Atred" (S), "Mirlo 26" (R) "Elinia 48" (R) were used as explant source for evaluating the induction of direct organogenesis by leaf segments and sections transverse stem.

trigo puede tener aplicaciones comerciales, tal como se ha establecido en otras gramíneas como arroz, trigo y maíz (Huang y Shaolin, 2002).

### Regeneración de plantas vía organogénesis directa

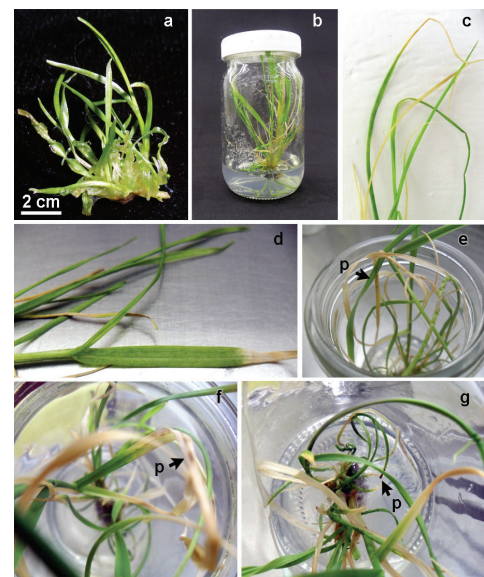
Plántulas de tres semanas de germinadas de los genotipos "Atred" (S), "Mirlo 26" (R) y "Elinia 48" (R) se usaron como fuente de explantes para evaluar la inducción de organogénesis directa mediante segmentos de hojas y secciones transversales de tallos. Las variables de brotación fueron afectadas por el tipo de explante en los tres genotipos de trigo evaluados ( $p \leq 0.05$ ). Las secciones transversales de tallo fueron los únicos explantes que mostraron respuesta morfogénica mientras que en las hojas no hubo respuesta. En las secciones transversales de tallo la brotación se presentó a los diez días de la siembra, y la mayor producción de brotes, y mayor longitud de los mismos, se obtuvo con  $11.1 \mu\text{M}$  de BA y  $1.0 \mu\text{M}$  de AIA en los tres genotipos. En "Mirlo 26" (R) y "Atred" (S) se obtuvieron ocho brotes en promedio, mientras que en "Elinia 48" (R) fueron siete. La longitud promedio de los brotes fue de 7 cm (Figura 1, Cuadro 4).

La BA es ampliamente usada para la multiplicación de cereales *in vitro*, ya que estimula la formación y longitud de brotes, así como el número de hojas (Patiño, 2010); en cereales como arroz y cebada estimula la proliferación de brotes (Patiño *et al.*, 2007). La respuesta de los tres genotipos de trigo a la citocinina fue diferente; con  $11.1 \mu\text{M}$  de BA el número de brotes, longitud de hojas y número de hojas aumentó considerablemente. La adición de AIA afectó el número de brotes, ya que la combinación con BA produjo una mayor respuesta en las variables de organogénesis. El efecto de citocininas y auxinas en la morfogénesis *in vitro* es diferente entre especies y variedades, se ha sugerido que sus niveles endógenos en la planta también influyen en las repuestas morfogénicas *in vitro* (Britto *et al.*, 2003).

### Regeneración de plantas vía organogénesis indirecta

En esta etapa, los callos obtenidos de semillas de los tres genotipos de trigo se establecieron en medio de cultivo MS (1962) con diferentes concentraciones de BA y AIA. Después de 60 días de cultivo se obtuvo la regeneración de plántulas con diferencias entre los genotipos ( $p \leq 0.05$ ). La máxima respuesta de número y longitud de brotes se alcanzó con  $11.1 \mu\text{M}$  de BA y  $1.0 \mu\text{M}$  de AIA en los tres genotipos. Para "Elinia 48" (R) se obtuvieron 4 brotes de 3 cm de longitud; para "Atred" (S)

The sprouting variables were affected by the type of explant in the three wheat genotypes evaluated ( $p \leq 0.05$ ). The stem cross sections were the only explants showed morphogenic response while leaves no response. In the cross sections of stem sprouting was presented to ten days after planting, and increased production of sprouts and greater length thereof was obtained with  $11.1 \mu\text{M}$  of BA and  $1.0 \mu\text{M}$  of AIA in all three genotypes. In "Mirlo 26" (R) and "Atred" (S) eight outbreaks were obtained on average, while in "Elinia 48" (R) was seven. The average length of sprouts was 7 cm (Figure 1, Table 4).



**Figura 1.** Organogénesis de trigo "Atred", "Elinia 48" y "Mirlo 26" y respuesta de plantas aclimatadas e *in vitro* a la roya. (a) plantas regeneradas vía organogénesis directa genotipo "Atred"; (b) plántulas inoculadas del genotipo "Atred"; (c y d) aparición de pecas de color blanco en las hojas; (e) pústulas de roya en el genotipo "Mirlo 26"; (f) muerte de hoja en el genotipo "Atred"; y (g) pústula en ápice de hoja del genotipo "Elinia 48". p= pústula de roya.

**Figure 1.** Organogenesis wheat "Atred", "Elinia 48" and "Mirlo 26" and response and *in vitro* plants acclimated to rust. (a) regenerated plants via direct organogenesis genotype "Atred"; (b) inoculated seedlings genotype "Atred"; (c and d) freckling of white on the leaves; (e) rust pustules on genotype "Mirlo 26"; (f) leaf death in genotype "Atred"; and (g) pustule at apex of leaf genotype "Elinia 48". p= rust pustule.

The BA is widely used for multiplication *in vitro* cereal because it stimulates the formation and shoot length and the number of sheets (Patiño, 2010); cereals such as rice and barley stimulates proliferation of sprouts (Patiño *et*



3 brotes de 3.5 cm y para "Mirlo 26" (R) 5 brotes de 4.5 cm. El porcentaje promedio de brotación fue de 45% en los tres genotipos (Cuadro 4). La mayor cantidad de brotes y plántulas regeneradas con la organogénesis directa resultó la mejor ruta morfogénica en los tres genotipos.

*al.*, 2007). The response of the three genotypes of wheat to the cytokinin was different; 11.1  $\mu$ M of BA with the number of buds, leaf length and number of leaves increased considerably. The addition of AIA affected the number of outbreaks, since the combination with BA produced

**Cuadro 4. Organogénesis en trigo "Atred" (S), "Mirlo 26" (R) y "Elinia 48" (R).**

**Table 4. Organogenesis wheat "Atred" (S), "Mirlo 26" (R) and "Elinia 48" (R).**

BA + AIA ( $\mu$ M)	"Atred" (S)			"Mirlo 26" (R)			"Elinia 48" (R)		
	B (Núm.)	LB (cm)	H (Núm.)	B (Núm.)	LB (cm)	H (Núm.)	B (Núm.)	LB (cm)	H (Núm.)
	Organogénesis directa								
11.1 + 0	2	6	3	3	6	5	4	6	5
11.1 + 1	3	8	7	5	8	7	4	7	7
15.5 + 1	3	4	5	2	6	4	3	7	5
Significancia	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	Organogénesis indirecta								
11.1 + 0	2	1	2	1	1	1	3	2	1
11.1 + 1	2	4	2	3	4	3	3	3	3
15.5 + 1	2	2	2	1	2	1	1	2	1
Significancia	*	*	NS	*	*	NS	*	*	NS

B= brotes; LB= longitud de brotes; H= hojas; \* =  $p \leq 0.05$ ; NS= no significativo.

### Enraizamiento *in vitro*

El enraizamiento *in vitro* se logró en los mismos tratamientos usados para inducir la regeneración de plántulas vía organogénesis directa e indirecta en los tres genotipos. Sin embargo, el número y longitud de raíces para cada tratamiento utilizado así como para cada genotipo fue diferente ( $p \leq 0.05$ ). 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; el enraizamiento fue de 60%.

### Aclimatación de plántulas

La tasa de supervivencia en la aclimatación de plantas de los tres genotipos de trigo fue 90% en condiciones de invernadero. Aunque no hubo diferencias significativas entre la altura de planta y el porcentaje de supervivencia ( $p \leq 0.05$ ), el alto porcentaje de plantas aclimatadas indica que el procedimiento de aclimatación empleado (Mujeeb, 2000) resultó óptimo. La mezcla de peat moss + agrolita, en proporción 1:1 fue eficiente; su alto contenido de materia orgánica favorece la adaptación de las plantas; además, brinda buena retención de agua y excelente aireación, propiedades que beneficiaron la supervivencia a los 10 días del trasplante (Pospisilova *et al.*, 1999).

a greater response variables organogenesis. The effect cytokinins and auxins in of morphogenesis *in vitro* is different between species and varieties, it has been suggested that endogenous levels in the plant also influence morphogenic responses *in vitro* (Britto *et al.*, 2003).

### Regeneration of plants via indirect organogenesis

At this stage, the callus derived from seeds of three wheat genotypes were established in medium culture MS (1962) with different concentrations of BA and AIA. After 60 days of culture was obtained regeneration of plantlets with differences between genotypes ( $p \leq 0.05$ ). The maximum response number and length of sprouts was achieved with 11.1  $\mu$ M of BA and 1.0  $\mu$ M of AIA in the three genotypes. To "Elinia 48" (R) 4 outbreaks 3 cm in length were obtained; for "Atred" (S) 3 outbreaks of 3.5 cm and for "Mirlo 26" (R) 5 outbreaks of 4.5 cm. The average germination percentage was 45% in the three genotypes (Table 4). Most outbreaks and regenerated plantlets with direct organogenesis was the best route morphogenic in the three genotypes.

### Rooting *in vitro*

The *in vitro* rooting was achieved in the same treatments used to induce regeneration of plantlets via direct and indirect organogenesis in the three genotypes. However, the

### Inoculación de la roya en plántulas *in vitro*

Las diferencias detectadas fueron significativas en la dosis de inoculación de roya sobre las plántulas, pero no en las concentraciones de sacarosa adicionadas al medio de cultivo sobre el crecimiento de las esporas ( $p \leq 0.05$ ). En genotipos de trigo susceptibles las esporas inician la germinación a los 30 min después del contacto con la hoja y una gota de rocío. El periodo entre la germinación de las esporas, penetración, establecimiento de la colonia y momento de esporulación en el campo puede abarcar de 8 a 10 días bajo temperaturas constantes de 20 a 24 °C (Singh y Dubin 1997). Por ello, en este estudio se hicieron evaluaciones en tiempos diferentes para observar el comportamiento del patógeno en los tres genotipos de trigo *in vitro*.

En las plántulas *in vitro* de los tres genotipos de trigo cultivadas con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, se observó la presencia de pústulas en las hojas cuando se inocularon con 0.03 mg L<sup>-1</sup> de esporas de roya. Los primeros síntomas de la roya de la hoja son la aparición de pequeñas pecas o diminutas manchas de color blanco entre los 7-10 días (McIntosh *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2004) después de la infección. En los genotipos inoculados *in vitro*, los signos aparecieron 20 días después de su inoculación, por lo tanto la enfermedad tuvo un desarrollo más lento comparado con las plantas de campo o invernadero (Figura 1). El máximo porcentaje de pústulas en los tres genotipos, en la dosis de 0.01 mg mL<sup>-1</sup>, de esporas fue de 10%, mientras con la dosis de 0.03 mg mL<sup>-1</sup> fue de 70% para "Atred", 40% para "Mirlo 26" y 30% en "Elinia 48". En la dosis de 0.05 mg mL<sup>-1</sup> el porcentaje de pústulas fue de 25% en los tres genotipos.

La formación de pústulas en condiciones de invernadero es favorecida por temperaturas de 20 a 24 °C; se retrasa si es inferior a 16 °C. Estos aspectos coinciden con la respuesta obtenida en la inoculación *in vitro* donde la temperatura de 26 ± 2 °C fue constante las 24 h del día; humedad relativa de 30% y fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad. Estas condiciones facilitaron la aparición de la roya (Figura 1).

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

number and length of roots used for each treatment and for each genotype was different ( $p \leq 0.05$ ). The highest values of number and length of roots were obtained in the treatment consisting of 11.1 μM of BA and 1.0 μM of AIA in the three genotypes; the rooting was 60%.

### Seedling acclimation

The survival rate in the acclimatization of plants of the three genotypes of wheat was 90% under greenhouse conditions. Although there were no significant differences between plant height and percentage of survival ( $p \leq 0.05$ ), the highest percentage of naturalized plants indicates that the employee acclimation process (Mujeeb, 2000) was optimal. The mixture of peat moss + perlite in proportion 1:1 was efficient; its high content of organic matter favors the adaptation of plants; also provides good water retention and excellent aeration, properties benefited survival at 10 days after transplantation (Pospisilova *et al.*, 1999).

### Inoculation of rust in plantlets *in vitro*

The significant differences were detected in the inoculation dose of rust on the seedlings, but not in spiked sucrose concentrations to the culture medium on the growth of spores ( $p \leq 0.05$ ). In susceptible wheat genotypes spores start germination at 30 min after contact with the sheet and a dewdrop. The period between spore germination, penetration, establishment of the colony and sporulation time in the field can range from 8 to 10 days under constant temperatures of 20 to 24 °C (Singh and Dubin 1997). Therefore, in this study evaluations at different times they were made to observe the behavior of the pathogen in the three genotypes *in vitro* wheat.

The *in vitro* seedlings of the three genotypes of wheat cultured with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, pustules on the leaves was observed when inoculated with 0.03 mg L<sup>-1</sup> of rust spores. The first symptoms of leaf rust are the appearance of freckles small or tiny white spots between 7-10 days (McIntosh *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2004) after infection. Genotypes inoculated *in vitro*, signs appeared 20 days after inoculation, disease therefore had a slower growth compared to the field or greenhouse plants (Figure 1). The maximum rate of pustules on the three genotypes in the dose of 0.01 mg mL<sup>-1</sup>, spore was 10%, while a dose of 0.03 mg mL<sup>-1</sup> was 70% for "Atred", 40% for "Mirlo 26" and 30% in "Elinia 48". In the dose of 0.05 mg mL<sup>-1</sup> pustules percentage was 25% in the three genotypes.

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 hacer la selección *in vitro* sin necesidad de la regeneración de plantas en invernadero o campo.

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

A los cinco días de la aparición de las pústulas las plantas comenzaron a mostrar síntomas que iniciaron con la necrosis de las hojas. Esta respuesta se debió a que *Puccinia triticina* estresó las plantas *in vitro*, suponiendo que aquellas que sobrevivieron y no presentaron pústulas son resistentes, respuesta que coincide con lo obtenido en los materiales evaluados *in vivo*. La información obtenida podría aplicarse al mejoramiento genético de genotipos con tolerancia a esta enfermedad.

Algunas de las ventajas de la inoculación de roya *in vitro*, comparada con la efectuada en campo, son que se pueden aplicar en cualquier época del año, permite mantener un control de las condiciones ambientales de experimentación, se requiere de espacio relativamente pequeño, es factible evaluar muchos genotipos a la vez y se pueden llevar a cabo múltiples evaluaciones de forma paralela (Gunn y Day, 1986).

### **Inoculación de la roya en plantas aclimatadas**

Plantas aclimatadas de los tres genotipos de trigo “Atred” (S), “Mirlo 26” (R) y “Elinia 48” (R) se mantuvieron en invernadero a  $26 \pm 2$  °C e inoculadas con la roya de la hoja. 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, generando una respuesta ostensible de resistencia (Huerta y Singh, 2000). A los siete días de la inoculación, tuvo lugar la germinación y esporulación del hongo; mostrando las mismas características de reproducción del patógeno que con el material evaluado *in vivo*.

The formation of pustules under greenhouse conditions is favored by temperatures of 20 to 24 °C; is delayed if less than 16 °C. These aspects coincide with the response obtained *in vitro* inoculation where the temperature of  $26 \pm 2$  °C was constant 24 hours a day; relative humidity 30% and photoperiod 16/8 h light/dark. These conditions facilitated the occurrence of rust (Figure 1).

In the literature there are no reports of inoculation procedures of leaf rust of wheat under *in vitro* conditions. The methodology developed here is the first study that was done about it, which may be useful in the characterization of the genotypes evaluated so they can be selected and used in breeding programs and the consequent obtaining varieties resistant to this pathogen. Therefore, evaluation of leaf rust under *in vitro* conditions generates significant for genetic improvement alternatives being *Puccinia triticina* E. selective agent, making it feasible to make the *in vitro* selection without regeneration of plants in greenhouses or countryside.

Under the premise that the behavior of plants *in vitro* wheat to the pathogen is similar to stem explants were extracted where plants, the selection process would be greatly facilitated in resistance to leaf rust. This *in vitro* selection was carried out using different concentrations of the selective agent *Puccinia triticina* E. This matches with Cubero (2003) who mentions that this method can be simple and efficient since the agent sensitive cells die, allowing growth tolerant and perhaps with a higher level of differentiation genotypes would have been possible to regenerate tolerant plants.

Within five days of the appearance of the pustules plants began to show symptoms that started with necrosis of leaves. This response was due to *Puccinia triticina* stressed out *in vitro* plants, assuming that those who survived and showed no pustules are tough, response that matches what obtained in the materials evaluated *in vivo*. The information obtained could be applied to the breeding of genotypes with tolerance to this disease.

Some of the advantages of inoculating *in vitro* rust, compared to that made in the field, are that can be applied in any season, can maintain control of the environmental conditions of experimentation, it requires relatively small space, it is feasible evaluate many genotypes simultaneously and can perform multiple evaluations in parallel (Gunn and Day, 1986).

A los 12 días después de la inoculación se observó una variación inesperada en la respuesta comparada con las plántulas *in vivo* y con las regeneradas vía organogénesis indirecta. En los genotipos considerados resistentes, "Elinia 48" y "Mirlo 26", se observó que 10% de las plantas perdió la resistencia mostrando características de susceptibilidad. En el genotipo "Atred", susceptible, 21% de las plantas mostraron algún grado de resistencia a la roya de la hoja; este genotipo se usa como un progenitor de primavera en los cruzamientos de nuevas líneas de resistencia a *Puccinia triticina* en el mejoramiento convencional.

El porcentaje de genotipos cristalinos resistentes a roya de la hoja en un grupo de hábito invernal solo representan alrededor de 4% (Cubero, 2003). La respuesta obtenida en el genotipo "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 los fitomejoradores ya que puede ser una variante cuyas características esenciales conviene conservar.

La resistencia observada en "Mirlo 26" fue conferida por un gen recesivo en respuesta a la raza BBG/BPC; mientras que la resistencia en "Elinia 48" (R) fue por un gen dominante y otro recesivo, en materiales obtenidos bajo condiciones de invernadero. Se requieren más estudios que corroboren la presencia o ausencia de estos genes, característicos de las líneas evaluadas *in vivo* en materiales obtenidos en condiciones *in vitro*. Las plantas obtenidas *in vitro* pueden presentar diferencias fenotípicas, morfológicas o bioquímicas en comparación con las plantas madre. Larkin y Scowcroft (1981) distinguieron a la variación epigenética transitoria y las variaciones genéticas "verdaderas", como las causas probables; ambas conocidas como variaciones somaclonales.

Es probable que los resultados obtenidos en los tres genotipos sean atribuidos a variaciones epigenéticas. Sin embargo, se necesitan mayores estudios moleculares que confirmen o descarten las respuestas. Las variaciones somaclonales en algunas ocasiones pueden ser una limitante, pero en otras, como lo obtenido en este estudio, pueden ser benéficas. Es una herramienta eficiente cuando se obtienen plantas que muestran ventajas adaptativas y puede aplicarse en el mejoramiento genético (Bairu *et al.*, 2011).

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

### Inoculation of rust in acclimatized plants

The acclimatized plants of the three genotypes of wheat "Atred" (S), "Mirlo 26" (R) and "Elinia 48" (R) kept in a greenhouse at  $26 \pm 2$  °C and inoculated with leaf rust. After four days after inoculation the disease symptoms began to be visible; they started with small chlorotic spots on inoculated leaves, generating an ostensible resistance response (Huerta and Singh, 2000). At seven days after inoculation, it took place germination and sporulation of the fungus; showing the same reproduction characteristics pathogen with the material evaluated *in vivo*.

At 12 days after inoculation unexpected variation in the response compared to seedlings *in vivo* and via indirect organogenesis it regenerated observed. Genotypes considered resistant, "Elinia 48" and "Mirlo 26", it was observed that 10% of plants showing resistance lost susceptibility characteristics. In genotype "Atred" susceptible, 21% of the plants showed some degree of resistance to leaf rust; this genotype is used as a spring parent in crosses of new lines of resistance to *Puccinia triticina* in conventional breeding.

The percentage of crystalline genotypes resistant to leaf rust in a group of winter habit only represent about 4% (Cubero, 2003). The response in genotype "Atred" (S) is an option to generate and increase resistance lines relevant to leaf rust in winter bread wheats features. This response is a new contribution to plant breeders because it can be a variant whose essential characteristics should be retained.

The resistance observed in "Mirlo 26" was conferred by a recessive gene in response to the BBG/BPC race; while the resistance in "Elinia 48" (R) was by a dominant gene and one recessive, in materials obtained under greenhouse conditions. Further studies to corroborate the presence or absence of these genes characteristic of the lines evaluated *in vivo* in materials obtained *in vitro* in conditions are required. The plants obtained *in vitro* may have phenotypic, morphological and biochemical differences compared to the parent plants. Larkin and Scowcroft (1981) distinguished transient epigenetic variation and the "true" genetic variations, the probable causes; both known as somaclonal variations.

Probably the results obtained in the three genotypes are attributed to epigenetic variations. However, further molecular studies to confirm or refute the answers are

cambio epigenético (Sánchez 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 muestra respuestas similares sería una respuesta somaclonal heredable; variabilidad genética útil para el mejoramiento de plantas con características agronómicas superiores.

Los resultados obtenidos en la presente investigación constituyen el primer reporte donde se aplican las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para evaluar la susceptibilidad y resistencia de genotipos de trigo a la roya de la hoja. Puede constituir una valiosa herramienta factible de incorporarse en programas de mejoramiento genético de trigo y otros cereales.

## Conclusiones

A partir de segmentos basales de tallo se regeneraron plantas vía organogénesis directa e indirecta en los genotipos de trigo "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 morfogénica para la propagación fue la organogénesis directa con 45% de brotación en los tres genotipos. La aclimatación de plántulas fue viable en invernadero con 90% de supervivencia en sustrato de peat-moss y agrolita (1:1) en los tres genotipos. La evaluación de roya de la hoja mediante plantas aclimatadas tuvo porcentajes de infección de 21% en el genotipo "Atred" (S), 10% en "Mirlo 26" (R) y 10% en "Elinia 48" (R). En plántulas *in vitro* los porcentajes fueron de 70% para "Atred", 40% para "Mirlo 26" y 30% para "Elinia 48" con la dosis de 0.03 mg mL<sup>-1</sup>. de esporas. Estas respuestas fueron diferentes a las evaluaciones efectuadas en campo, lo que indica una posible variación somaclonal o epigenética que debe ser corroborada en la progenie de cada genotipo mediante inoculación del patógeno y con pruebas genéticas.

## Literatura citada

- 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.
- Bairu, M. W.; Aremu, A. O. and Van Staden, J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*. 63:147-173.

needed. The somaclonal variations can sometimes be a limiting factor, but in others, as obtained in this study, can be beneficial. It is an efficient tool when plants showing adaptive advantages and can be applied in breeding (Bairu *et al.*, 2011) are obtained.

The response of susceptibility and resistance genotypes "Atred" (S), "Elinia 48" (R) and "Mirlo 26" (R) would be unstable and would revert with high frequency if an epigenetic change (Sánchez and Jiménez, 2009), so the evaluation of the progeny of these materials is required by inoculating the pathogen *Puccinia triticina* E. *in vivo*. Conversely, if the progeny show similar responses would somaclonal response heritable; genetic variability useful for plant breeding with superior agronomic characteristics.

The results obtained in this research are the first report where the techniques of plant tissue culture *in vitro* are applied to evaluate the susceptibility and resistance of wheat genotypes to leaf rust. It can be a valuable tool feasible incorporated into breeding programs of wheat and other cereals.

## Conclusions

From basal segments from stem plants are regenerated via direct and indirect organogenesis in wheat genotypes "Atred" (S), "Mirlo 26" (R) and "Elinia 48" (R) grown in culture medium MS (1962) supplemented with BA (11.1  $\mu$ M) and AIA (1.0  $\mu$ M). The best route for the spread morphogenic was the direct organogenesis with 45% of sprouting in the three genotypes. Acclimatization was viable seedling greenhouse with 90% survival in peat-moss and perlite substrate (1:1) in the three genotypes. The evaluation of leaf rust by acclimated plants had infection rates of 21% in genotype "Atred" (S), 10% in "Mirlo 26" (R) and 10% in "Elinia 48" (R). In *in vitro* plantlets percentages were 70% for "Atred", 40% for "Mirlo 26" and 30% for "Elinia 48" with a dose of 0.03 mg mL<sup>-1</sup>. de spores. These responses were different evaluations carried out in the field, indicating a possible epigenetic or somaclonal variation to be confirmed in the progeny of each genotype by inoculation of the pathogen and genetic testing.

*End of the English version*



- 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.
- Cubero, J. I. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. 2ª. (Ed.). Mundi-Prensa. España. 562 p.
- Das, M. and 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.
- Folguera, M.; Rodríguez, S.; Morales, L.; Dávila, J. E.; Ramos, L. 2009. *Trichoderma* spp., hongo rival para el combate de patógenos. Cuba. 100 p.
- George, E. F. and P. C. Debergh. 2008. Micropropagation: uses and methods. In: Edwin F. George *et al.* (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture 3<sup>th</sup>* (Ed.). The Background. Springer. 29-62 pp.
- Gunn, R. E. and Day, R. R. 1986. *In vitro* culture in plant breeding. In: Withers, L. A. and Alderson, P. G. (Eds.). *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Butterworths, UK. 313-327 pp.
- Herrera, F. S. A.; Singh, R. P.; Huerta, J. and Djurle, A. 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. 1:361-363.
- Huang, T. and 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.
- Huerta, E. J. y Singh, R. B. 2000. Las royas del trigo. In: el trigo de temporal en México. Villaseñor, M. H. E. y Espitia, R. E. (Eds.). SAGARPA, INIFAP. CIP-CENTRO y CEVAMEX, México. 231-251 pp.
- Huerta, E. J. y Skovmand, B. 2000. Origen, botánica y taxonomía del trigo. In: el trigo de temporal en México. Villaseñor, M. H. E. y Espitia, R. E. (Eds.). SAGARPA, INIFAP. CIR-CENTRO y CEVAMEX, México. 25-38 pp.
- Larkin, P. and 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.; Wellings, C. R. and Park, R. F. 1995. Wheat rusts: An atlas of resistance genes. CSIRO Australia. 200 p.
- Mujeeb, K. A. 2000. An analysis of the use of haploidy in wheat improvement. In: Kohli, M. M. and Francis, M. (Eds.). *Application of biotechnologies to wheat breeding*. Uruguay. 33-48 pp.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-493.
- Patiño, C. R.; Sánchez, H. L. y 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 Agron*. 59:80-90.
- Pérez, A.; Saucedo, O.; Iglesias, J.; Wencomo, H.; Reyes, F.; Oquendo, G. y Millan, I. 2010. Caracterización y potencialidades del grano de sorgo (*Sorghum bicolor* L.). *Pastos y Forrajes*. 33:1-17.
- Pospisilova, J.; Ticha, S. I.; Kadlec, D.; Haisel, P. and Pizakova, S. 1999. Acclimatization of micropropagated cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-493.
- Rodríguez, G. M. F.; Huerta, E. J. y Villaseñor, M. H. E. 2008. Nomenclatura de razas fisiológicas de *Puccinia striiformis* f. sp. *trititica* en México. *Agrociencia*. 9:11-21.
- Roelfs, A. P.; Singh, E. P. y Saari, E. 1992. Las royas del trigo: conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. México. CIMMYT. 81 p.
- Sánchez, C. N. y Jiménez, V. 2009. Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agron. Mesoam*. 20:135-151.
- Statistical Analysis System (SAS) Institute. 2003. User's Guide. (Release 9.1). Cary, NC, USA. SAS Inst. Quality, and elemental removal. *J. Environ. Qual*. 19:749-756.
- Shaom, H. B.; Chu, L. Y.; Shao, M. A.; Jaleel, C. A. and Mí, H. M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C.R. Biologies*. 331:433-441.
- Singh, R. P.; Huerta, E. and Roelfs, A. P. 2004. The wheat rusts. In: bread wheat improvement and production. Series No. 30 B.C. Curtis, S. Rajaram y H. Gómez M. (Eds.). FAO. Italy. 227-249 pp.
- Singh, R. P. and Dubin, H. J. 1997. Sustainable control of wheat diseases Mexico. In: Primer Simposio Internacional de trigo Memorias. Sonora, México. 93-102.
- Zhang, H. and Knott, D. R. 1990. Inheritance of leaf rust resistance in durum wheat. *Crop Sci*. 30:1218-1222.