

PROCESO DE INFECCIÓN DE LA ROYA DE LA HOJA DEL TRIGO (*Puccinia triticina* Erikson) EN GENOTIPOS CON RESISTENCIA PARCIAL

INFECTION PROCESS TO WHEAT LEAF RUST (*Puccinia triticina* Erikson) IN GENOTIPES WITH PARTIAL RESISTANCE

Erika García-Lara¹, S. Gerardo Leyva-Mir², Elizabeth Cárdenas-Soriano¹, Julio Huerta-Espino³,
J. Sergio Sandoval-Islas¹ y Eduardo Villaseñor-Mir²

¹Fitopatología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México (erikagl@colpos.mx). ²Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. (lsantos@correo.chapingo.mx). ³Campo Experimental Valle de México-INIFAP, Apartado Postal 10, 56230. Chapingo, Estado de México.

RESUMEN

Con el propósito de entender los mecanismos de resistencia parcial que confieren los genes *Lr 34*, *Lr46* y uno aún no designado (Gen 1) a la resistencia prehaustorial que presentan algunos genotipos de trigo con resistencia parcial a roya de la hoja causada por *Puccinia triticina*, se estudió el proceso de infección en genotipos de trigo que contienen genes con resistencia parcial: Jupateco 73R+*Lr34*, Avocet+*Lr34*, Lalbahadur+*Lr46* y Lalbahadur+Gen 1, y en genotipos que no contienen el gen: Jupateco 73S-*Lr34*, Avocet-*Lr34* y Lalbahadur. El objetivo fue conocer los mecanismos de resistencia que actúan en el proceso de infección. Se utilizaron las técnicas de tinción con fucsina ácida y microscopía de fluorescencia. En el porcentaje de germinación de las urediosporas de la roya de trigo no hubo diferencias significativas en la comparación múltiple de medias ($p > 0.05$; DMS). Sin embargo, se encontró que Lalbahadur+*Lr46* y Lalbahadur+*Lr34* presentaron mayor porcentaje de reducción ($p \leq 0.05$) en porcentaje de germinación. En cuanto a la formación de apresorios, penetración y formación de vesícula subestomática, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los genotipos Lalbahadur+*Lr46* y Lalbahadur+*Lr34*. En los tejidos de hoja de trigo infectados con roya, por la técnica de inclusión en parafina se observaron daños celulares: colapso, desintegración celular y necrosis. En los genotipos con el gen *Lr34* se encontró colapso, desintegración celular y finalmente necrosis en toda la hoja excepto en el haz vascular del genotipo Lalb+*Lr34* y en gran parte de la hoja en los genotipos AOC+*Lr34* y Jup73R+*Lr34*. El genotipo con el Gen1 presentó poca necrosis a 86 h de muestreo, por lo que se expresó pronto la resistencia parcial, y en el genotipo con el gen *Lr46* se inició la infección con colapso seguida de la desintegración de cloroplastos a las 30 h, y posteriormente la necrosis en toda la hoja excepto en el haz vascular, por lo que manifestó temprano su resistencia. Además, se encontraron papilas en Jupateco 73R 40 h después de la inoculación. De los resultados obtenidos se deduce que *Lr34*, *Lr46* y el Gen1 confieren resistencia prehaustorial, o sea frente al haustorio

ABSTRACT

With the purpose to understand partial resistance mechanisms, which the genes *Lr34*, *Lr46*, and one gene (Gene 1) not yet named confer to prehaustorial resistance, presented by some wheat genotypes with partial resistance to leaf rust caused by *Puccinia triticina*, the infection process in wheat genotypes containing genes with partial resistance was studied: Jupateco 73R+*Lr34*, Avocet+*Lr34*, Lalbahadur+*Lr46*, and Lalbahadur+Gene 1, and in genotypes that do not contain the gene: Jupateco 73S-*Lr34*, Avocet-*Lr34*, and Lalbahadur. The objective was to recognize the resistance mechanisms which act in the infection process. Staining techniques with fuchsine acid and fluorescence microscopy were employed. In the percentage of urediospore germination of wheat rust, there were no significant differences in multiple comparison of means ($p > 0.05$; DMS). It was found, however, that Lalbahadur+*Lr46* and Lalbahadur+*Lr34* showed higher percentage of reduction ($p \leq 0.05$) in the germination percentage. With respect to the formation of apresoria, penetration, and substomatal bladder formation, significant differences ($p \leq 0.05$) between the genotypes Lalbahadur+*Lr46* and Lalbahadur+*Lr34* were noticed. In the tissues of rust-infected wheat leaf, cell damages were observed by the technique of inclusion in paraffin: collapse, cell disintegration, and necrosis. In the genotypes with gene *Lr34*, collapse, cell disintegration and finally necrosis were found all over the leaf with exception of the vascular bundle of genotype Lalb+*Lr34* and to a great extent of the leaf in genotypes AOC+*Lr34* and Jup73R+*Lr34*. The genotype with Gene 1 presented little necrosis at 86 h of sampling, that is why partial resistance was expressed soon, and in the genotype with gene *Lr46*, the infection began with collapse, followed by chloroplast disintegration at 30 h, and subsequently necrosis on the entire leaf except the vascular bundle, therefore its resistance became evident soon. Besides, papillae were detected in Jupateco 73R 40 h after inoculation. From the results obtained it is deduced that *Lr34*, *Lr46*, and Gene1 confer prehaustorial resistance, or in other words, before the haustorium of the fungus, which is very similar to the resistance of the non-host, that is of the durable type.

del hongo, que se asemeja mucho a la resistencia de no hospedante, la cual es de tipo durable.

Palabras clave: Alteraciones celulares, cereales, fitopatógenos, resistencia vegetal, signos.

INTRODUCCIÓN

El trigo es uno de los cultivos más importantes en México, y su producción representa 15% y 28% de la producción nacional e internacional de cereales (FAO, 1995). Esta planta es muy afectada por la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), la roya del tallo (*Puccinia graminis tritici*) y la roya de la hoja (*Puccinia triticina* E.), la enfermedad del trigo (*Triticum aestivum* L.) más distribuida y destructiva en México y el mundo (Dubin y Rajaram, 1996). En el mundo, la roya de la hoja reduce hasta 10% el rendimiento (Johnson, 1981). El método más efectivo para proteger el cultivo de las enfermedades es usar variedades con resistencia genética, la cual puede ser específica o no específica. Como la resistencia específica sólo confiere protección por poco tiempo a las plantas se han buscado otras alternativas, como generar variedades con resistencia parcial. La resistencia parcial resulta de una reducción del desarrollo de la epidemia ante un tipo de infección sobre una variedad susceptible (Parlevliet, 1975). Hay genes que confieren resistencia parcial, como el *Lr34* localizado en el cromosoma 7DS que se expresa en plántula, aunque su efecto más significativo es en la planta adulta, y el *Lr46*, en el cromosoma 1B de Pavon 76 (Singh *et al.*, 1998). Para incorporar dicha resistencia a las variedades en proceso de mejoramiento genético se necesita información del cultivo en invernadero y campo, formas de herencia y del manejo en el mejoramiento de variedades (Singh *et al.*, 2001).

Dada la importancia de la roya de la hoja en México, el objetivo de la presente investigación fue conocer el proceso infectivo del hongo en el tejido y entender los mecanismos de resistencia parcial conferida por los genes *Lr34*, *Lr46* y un gen designado provisionalmente como Gen 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en invernaderos y laboratorios del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, y del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), en El Batán, Estado de México. Los genotipos de trigo en este estudio tienen los genes *Lr34*, *Lr46* y Gen 1 que les confieren resistencia parcial (Cuadro 1).

Cada genotipo se sembró en cinco macetas con una mezcla de tierra, peat moss, y arena de río (pasteurizada). Todos los genotipos (Cuadro 1) se inocularon con esporas de *P. triticina* raza MCJ/SP.

Key words: Cell alterations, cereals, phyto-pathogens, vegetal resistance, signs.

INTRODUCTION

Wheat is one of the most important cultivars in Mexico, and its production represents 15 and 28% of the cereal production national and worldwide (FAO, 1995). This plant is severely affected by yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), stem rust (*Puccinia graminis tritici*), and leaf rust (*Puccinia triticina* E.), the most wide-spread and destructive disease of wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mexico and worldwide (Dubin and Rajaram, 1996). All over the world, wheat leaf rust reduces crop yield up to 10% (Johnson, 1981). The most effective method to protect the crop against diseases is to use varieties with genetic resistance, which can be specific or nonspecific. As specific resistance confers only short-time protection, other alternatives have been searched for, like generating varieties with partial resistance. Partial resistance results from a reduction of the epidemic development facing a type of infection on a susceptible variety (Parlevliet, 1975). There are genes conferring partial resistance, like *Lr34* localized on the 7DS chromosome manifest in seedling, though its most significant effect is on the adult plant, and *Lr46*, on the chromosome 1B of Pavon 76 (Singh *et al.*, 1998). In order to incorporate this resistance to the varieties in process of genetic improvement, information about the crop in greenhouse and field, forms of inheritance, and management in breeding of varieties is needed (Singh *et al.*, 2001).

Given the importance of wheat leaf rust in México, the objective of the present research was to identify the infection process of the fungus in the tissue and understand partial resistance mechanisms conferred by genes *Lr34*, *Lr46*, and one gene provisionally denominated Gene1.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out in greenhouses and laboratories of the Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico, and of the Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), at El Batán, State of Mexico. The wheat genotypes in this study have the genes *Lr34*, *Lr46*, and Gene1 conferring partial resistance (Table1).

Each genotype was sown in five pots with a mixture of soil, peat moss, and (pasteurized) river sand. All genotypes (Table1) were inoculated with *P. triticina* spores, MCJ/SP race. Inoculation was made with a suspension of 500 000 urediospores per mL of mineral oil (Soltrol 170 MR) using an atomizer connected to an air compressor. The inoculated plants were kept in a moist chamber 16 h, fitting the

La inoculación se realizó con una suspensión de 500 000 urediosporas por mL de aceite mineral (Soltról 170 MR), usando un atomizador conectado a un compresor de aire. Las plantas inoculadas se mantuvieron 16 h en la cámara húmeda ajustando el humidificador a 100% de humedad relativa en las primeras 4 h, después se proporcionaron 15 min de neblina cada hora durante 24 h, condiciones óptimas para inducir la germinación de las urediosporas y la formación de estructuras de infección. Las macetas se llevaron al invernadero con 18 a 25 °C y riego cada tercer día hasta el final del ensayo. Cada genotipo se colocó en bloques, cada bloque con cinco macetas.

Para el muestreo se tomó la hoja bandera, a partir de 12, 24, 30, 36, 40, 72, 86, 110 h, hasta 6 d después de la inoculación. Se seccionó la hoja en tres partes iguales y se colocó en tubos de ensayo con el fijador FAA (formaldehído 100 mL, ácido acético glacial 50 mL, alcohol etílico absoluto 500 mL, agua destilada 350 mL); luego se transfirieron a solución de Carnoy (ácido acético glacial 100 mL y alcohol etílico absoluto 600 mL) debido a que aclara más los tejidos y facilita la observación histológica. Se fraccionaron más las secciones de la hoja bandera de los diferentes muestreos en trozos de 1 cm² para aplicar las técnicas de tejidos clarificados (Curtis, 1986). Para procesar las muestras de microscopía de fluorescencia, las fracciones de 1 cm² de las hojas clarificadas en solución de Carnoy se siguió el procedimiento de Rohringer *et al.* (1977) usando Uvitex en lugar de Calcofluor como sustancia fluorescente. Las observaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia American Optical (Polyvar modelo 11 P6W), equipado con una lámpara de mercurio (HBO 200W/2), un filtro de excitación de 395 a 400 nm, un separador cromático FT5³ Campo Experimental Valle de México-INIFAP, Apartado Postal 10, 56230. Chapingo, Estado de México. 60 y un filtro supresor de 470 nm.

Para la técnica de inclusión en parafina las muestras seccionadas de la hoja bandera permanecieron 24 h en la solución Carnoy's, luego se deshidrataron en alcohol etílico e incluyeron en paraplast (Sigma Chemical Co). Se cortaron con el micrótopo rotatorio (American Optical Modelo 820); y de cada muestra se obtuvieron cortes de 10 y 12 μm de grosor, que se colocaron en un baño de flotación con agua a 60±1 °C. Los cortes se extendieron y se adhirieron a los portaobjetos, se desparafinaron y se tiñeron con la técnica diferencial safranina-verde rápido (Curtis, 1986). Para observar las preparaciones se usó un microscopio compuesto modelo 9600.

Se estudiaron 80 muestras (con su repetición) para cada técnica utilizada. Las variables se sometieron a una comparación múltiple de medias usando la prueba DMS (p≤0.05). Las fuentes de variación fueron hora de muestreo, genotipo, germinación, penetración, formación de vesícula, célula madre haustorial y formación de haustorios. Los daños celulares se determinaron en las muestras incluidas en parafina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en las observaciones realizadas en las preparaciones teñidas con fucsina ácida y para microscopía de fluorescencia, se describe el ciclo infectivo de *Puccinia triticina*: la urediospora germina

Cuadro 1. Genotipos de trigo usados en el estudio de patogénesis de la roya de la hoja.

Table 1. Wheat genotypes used in the study of leaf rust pathogenesis

Genotipos	Gen
Jupateco 73S	Jup. 73 S -Lr34
Jupateco 73R	Jup. 73 R +Lr34
Avocet-S	AOC. -Lr34
Avocet Lr34	AOC. +Lr34
Lalbahadur/Parula (7D)	Lalb-Lr46
Lalbahadur 1B/ Pavon	Lalb +Lr46
Lalbahadur/ Mono 9/4	Lalb. +Gen 1
Lalbahadur	Lalb

(-) = sin los genes Lr34 y Lr46.

(+) = con los genes Lr34, Lr46 y el Gen 1.

humidifier at 100% relative humidity during the first 4 hours; subsequently, mist was provided 15 min every hour during 24 h, optimal conditions to induce urediospore germination and formation of infection structures. The pots were taken to the greenhouse with 18 to 25 °C and irrigation every three days until the end of the assessment. The genotypes were placed in blocks with five pots each.

The flag leaf was picked for sampling, starting from 12, 24, 30, 36, 40, 72, 86, and 110 h to six days after inoculation. The leaf was cut into three equal parts and placed in test tubes with FAA fixative (100 mL formaldehyde, 50 mL glacial acetic acid, 500 mL absolute ethyl alcohol, 350 mL distilled water), subsequently, they were transferred to Carnoy solution (100 mL glacial acetic acid and 600 mL absolute ethyl alcohol) because it clears the tissues and facilitates histological observation. The flag leaf sections of the different samplings were fractionated in more pieces of 1 cm² to apply the techniques of cleared tissues (Curtis, 1986). In order to process the samples of fluorescence microscopy, in the 1cm² fractions of leaves cleared in Carnoy solution the procedure of Rohringer *et al.* (1977) was followed using Uvitex instead of Calcofluor as fluorescent substance. The observations were made under an American Optical fluorescence microscope (Polyvar model 11 P6W) equipped with a mercury lamp (HBO 200W/2), a 395 to 400 nm excitation filter, an FT560 chromatic separator, and a 470 nm suppressor filter.

For the technique of paraffin inclusion, the selected samples of the flag leaf remained in Carnoy's solution during 24 h; subsequently, they were dehydrated in ethyl alcohol and included in paraplast (Sigma (chemical Co). Using the rotary microtome (American Optical Model 820), from each sample sections of 10 and 12 μm thickness were obtained, which were placed in flotation water bath at of 60±1 °C. The cuts were extended and adhered to the microscope slides, the paraffin was removed and they were stained employing the safranin-quick green differential technique (Curtis, 1986). To observe the preparations a light microscope model 9600 was used.

Eighty samples (with their respective repetition) for each utilized technique were studied. The variables were subjected to multiple comparison of means using the DMS test (p≤0.05). The sources of variation were sampling hour, genotype, germination, penetration,

formando un tubo germinativo que se dirige hacia los estomas; no todos los tubos alcanzan los estomas. Cuando el tubo germinativo alcanzó el estoma se indujo la formación del apresorio por medio del cual se adhiere al estoma; del apresorio sale la hifa de penetración, que al llegar a la cavidad subestomática origina la vesícula subestomática que tiene forma de pera (Figura 1). De ella sale la hifa infectiva que al contacto con la célula del mesófilo forma la célula madre haustorial y dentro de las células el haustorio. Estos últimos no fueron observados, pero las colonias del hongo sí se observaron en el material preparado para el microscopio de fluorescencia (Figura 2), lo que indica que el hongo siguió creciendo y colonizando los tejidos.

Heath (1981) sugirió que los mecanismos expresados antes de que se forme el primer haustorio son los de mayor impacto. Después de que un hongo invade los tejidos de una hoja incompatible se manifiestan algunos efectos adversos en el crecimiento o la apariencia de la vesícula subestomática y de la hifa infectiva. Aun cuando esto es más común en no hospedantes, también se reportan en cultivares resistentes (Leath y Rowell, 1966). En todos los genotipos evaluados con *P. triticina* no se observó la formación de haustorios; sin embargo, sí hubo formación de colonias, lo cual según Bushnell (1972) probablemente se debe a que la formación del haustorio ocurre inmediatamente después de la penetración, pero este momento se observa siempre oscuro, por los diferentes compuestos que se liberan con el rompimiento de la pared celular. Rubiales y Niks (1995) indicaron que en el proceso de infección de la roya de la hoja la resistencia parcial conferida por el gen *Lr34* se basó en una reducción de la tasa de formación de haustorios en las etapas tempranas de infección asociada con poca o total ausencia de necrosis

bladder formation, haustorial mother cell, and haustoria formation. Cell damages were determined in the samples included in paraffin.

RESULTS AND DISCUSSION

Based on the observations made on preparations stained with fuchsin acid for fluorescence microscopy, the infective cycle of *Puccinia triticina* was described: The urediospore germinates forming a germinative tube, which is directed towards the stomata, not all the tubes reach them. When the germinative tube gets to the stoma, the formation of the apresorium is induced, through which it adheres to the stoma; from the apresorium penetration hypha comes out, which arriving at the sub-stomal cavity originates the pear-shaped sub-stomal bladder (Figure 1). From this, the infective hypha penetrates and contacts the mesophyll cell, forms the haustorial mother cell and within the cells, the haustorium. The latter were not observed, but the fungus colonies were certainly seen in the material prepared for the fluorescence microscope (Figure 2), which indicates that the fungus continues growing and colonizing the tissues.

Heath (1981) suggested that the mechanisms, presented before the formation of the first haustorium are those of the strongest impact. After the fungus invades the tissues of an incompatible leaf, some adverse effects on growth or the appearance of sub-stomal bladder and infection hypha become evident. Although this is more common in non-hosts, it is also reported for resistant cultivars (Leath and Rowell, 1966). In all the genotypes with *P. triticina* evaluated, haustoria formation was not observed; there was, however, formation of colonies, which according to Bushnell (1972) is probably due to the fact that forming of



Figura 1. Desarrollo de las estructuras de infección de *Puccinia triticina* en hojas de *Triticum aestivum*. A) uredospora germinada, B) aglomeración de esporas y apresorios de *P. triticina* sobre el estoma, C) vesícula subestomática en forma de pera (40X) vistas al microscopio con la tinción de fucsina ácida.

Figure 1. Development of infection structure of *Puccinia triticina* on *Triticum aestivum* leaves. A) germinated urediospore; B) crowded spores and *P. triticina* apresoria on the stoma; C) pear-shaped (40X) sub-stomatal bladder, view under microscope with fuchsin acid staining.

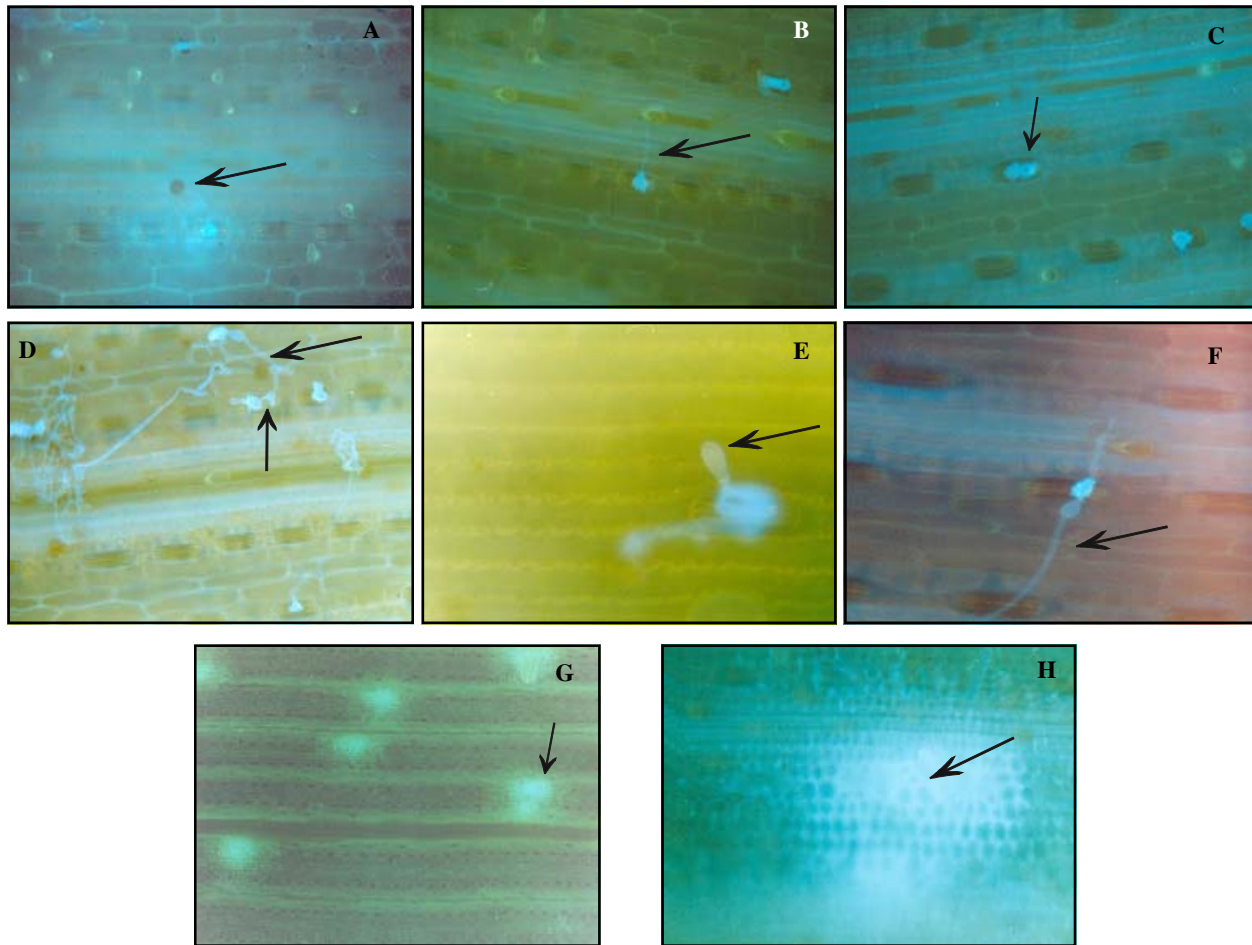


Figura 2. Desarrollo de las estructuras de infección de *Puccinia triticina* en hojas de *Triticum aestivum*. A) urediospora germinada; B) apresorios de *P. triticina*; C) aglomeración de apresorios de *P. triticina* sobre el estoma; D) vesícula subestomática y hifas de infección de *P. triticina*; E) vesícula subestomática en forma de pera; F) hifa de infección de *P. triticina*; G) colonias de *P. triticina* vistas al microscopio de fluorescencia (10X); H) colonia de *P. triticina*, vistas en microscopio de fluorescencia (40X).
 Figure 2. Development of *Puccinia triticina* infection structures on *Triticum aestivum* leaves. A) germinated urediospore; B) apresoria of *P. triticina*; C) accumulation of *P. triticina* apresoria on stoma; D) sub-stomatal bladder and hyphae of *P. triticina* infection; E) pear-shaped sub-stomatal bladder; F) hyphae of *P. triticina* infection; G) colonies of *P. triticina* seen under fluorescence microscope (10X); H) *P. triticina* colony seen under fluorescence microscope (40X).

de células vegetales, lo cual podría explicar por qué no se observaron haustorios en los genotipos que tenían este gen.

Germinación

El porcentaje de germinación de urediosporas en la superficie de la hoja varió considerablemente de acuerdo con el genotipo; de 9.7 en Lalbahadur con el gen *Lr34* hasta 40.65 en Jup73S sin el *Lr34* (Cuadro 2). Lalb + Gen 1 tuvo el menor porcentaje de germinación de los genotipos resistentes, comparados con los susceptibles. Si los genotipos se definieran por el porcentaje de germinación Jupateco 73S sería el más susceptible, seguido de AOC-*Lr34* y Lalbahadur (+ *Lr34* y +*Lr46*)

haustorium occurs immediately after penetration; but this moment is not visible because of the different compounds, that are released with the breaking of the cell wall. Rubiales and Niks (1995) indicated that in the infection process of leaf rust, partial resistance conferred by the gene *Lr34* was based on a diminution of haustoria formation rate at the early stage of infection, associated to little or total absence of vegetal cell necrosis, which could explain why haustoria were not observed in the genotypes having this gene.

Germination

The percentage of urediospore germination on leaf surface varied considerably according to the genotype,

como el menos susceptible. En los genotipos resistentes con *Lr34*, el porcentaje de germinación se redujo más en Lalb+*Lr34*, luego en AOC+*Lr34* y Jup73R+*Lr34*; aquí se ve el efecto de la base genética ya que corresponde a cuando el gen *Lr34* está ausente o presente.

Los resultados indican que los genotipos con resistencia parcial afectan el porcentaje de germinación de la urediospora, lo cual ayudaría a explicar la reducción en el número de uredias o pústulas observados en genotipos que poseen *Lr34* o *Lr46*. No hay evidencia de que los genes con resistencia parcial tengan efectos antes de la formación de los haustorios. En este caso el Gen 1 parece no tener efecto en el porcentaje de germinación de las urediosporas (Cuadro 2).

El genotipo susceptible Jupateco 73 S tuvo más esporas germinadas (Cuadro 2). Los resultados mostraron una reducción en la germinación de urediosporas; esto es común en plantas no hospedantes, ya que en varias interacciones reducen el porcentaje de germinación de las esporas. Por ejemplo, las urediosporas de la roya del frijol (*Uromyces appendiculatus*) tienen bajo porcentaje de germinación sobre hojas de col y tomate; sin embargo, aún sobre plantas no hospedantes, hay pocos reportes de bajos porcentajes de germinación, y el tubo germinativo es el que falla para localizar el sitio de reconocimiento (Heath, 1981).

Poyntz y Hyde (1987) reportaron diferencias entre variedades de trigo resistentes y susceptibles a la roya

from 9.7 in Lalbahadur with gene *Lr34* to 40.65 in Jup73S without *Lr34* (Table2). Lalb+Gene1 had the lowest germination percentage of the resistant genotypes compared to the susceptible ones. If the genotypes were defined by germination percentage Jupateco 73S would be the most susceptible, followed by AOC -*Lr34* and Lalbahadur (+*Lr34* and +*Lr46*) as the least susceptible ones. In the resistant genotypes with *Lr34*, the germination percentage was most reduced in Lalb+*Lr34*, then in AOC+*Lr34* and Jup73S+*Lr34*; here the effect of the genetic background can be seen, since it corresponds to gene *Lr34* being absent or present.

The results indicate that the genotypes with partial resistance influence urediospore germination percentage, which would help to explain the reduction in the number of uredia or pustules, observed in genotypes having *Lr34* or *Lr46*. There is no evidence that the genes with partial resistance may have effects before haustoria formation. In this case, Gene1 seems to have no effect on the percentage of urediospore germination (Table2).

The susceptible Jupateco 73S genotype had more germinated spores (Table2). The results showed reduction in urediospore germination; this is common in non-host plants, since in several interactions they reduce the percentage of spore germination. For example, urediospores of bean rust (*Uromyces appendiculatus*) have low germination percentage on cabbage and tomato leaves; however, even on non-host plants, there are few reports of low germination

Cuadro 2. Separación de medias de germinación, formación de apresorios, penetración y formación de vesícula subestomática de *P. triticina* por variedad. Análisis conjunto, y valor de DMS.

Table 2. Separation of germination means, apresorium formation, penetration, and sub-stomatal bladder formation of *P. triticina* by variety. Joint analysis and DMS value.

Genotipos y genes	Germinación		Apresorio		Penetración		Vesícula subestomática	
	Media	Reducción (%)	Media	Reducción (%)	Media	Reducción (%)	Media	Reducción (%)
Jup 73 S-Lr34	40.65 a		148.3 de		221.6 cd		73.3 ab	
Jup 73 R+Lr34	31.4 abc	22.75	133.3 e	10.1	190.9 d	13.85	58.05 ab	20.8
AOC -Lr34	38.65 ab		317.4 b		399.9 ab		82.5 a	
AOC +Lr34	24.4 abc	38.86	354.6 ab	-11.7	414.65 ab	-3.7	57.2 ab	30.6
Lalb-Gene 1	23.85 abc		453.75 a		543.5 a		90.05 a	
Lalb+Gene 1	23.9 abc	-0.2	261.35 bcd	42.4	301.25b cd	44.5	39.9 b	55.7
Lalb-Lr46	23.85 abc		453.75 a		543.5 a		90.05 a	
Lalb+Lr46	14.05 bc	41.09	191 cde	57.9	252.2 cd	53.6	66.2 ab	26.5
Lalb-Lr34	23.85 abc		453.75 a		543.5 a		90.05 a	
Lalb+Lr34	9.7 c	59.32	281.65 bc	37.9	340.2 bc	37.4	58.55 ab	36.3
Valores DMS,P=0.05	9.18	44.35	53.54	12.3				
p=0.01	12.01	58.29	70.37	16.2				

Datos con letra diferente en una columna son estadísticamente diferentes (p=0.05) ♦ Data with different letter in one column are statistically different (p= 0.05).

A efectos de la comparación, los datos de Lalbahadur en el Cuadro se repitieron para formar pares con y sin el gene en el fondo genético de Lalbahadur ♦ For comparison the data of Lalbahadur in the Table were repeated to form pairs with and without the gene in the genetic fund of Lalbahadur.

de la hoja en germinación y longitud de tubo germinativo; el menor porcentaje en ambos tipos correspondió a las variedades susceptibles, y en el proceso de infección la mayor colonización la presentaron las susceptibles.

Apresorios

Hubo diferencias ($p \leq 0.05$) entre las variedades Jup73S-*Lr34* (148.30) y Jup73R+*Lr34* (133.30) en formación de apresorios (Cuadro 2). La formación de apresorios siguió la misma tendencia de germinación, pero la excepción fue el par de Avocet, donde AOC+*Lr34* tuvo mayor porcentaje de formación de apresorios (una explicación podría ser plantas fuera de tipo o mezclas). En esta etapa Lalbahadur tuvo el mayor porcentaje de formación de apresorios, seguido de Avocet y Jupateco 73S. En los genotipos con *Lr34* el porcentaje de formación de apresorios se redujo más en Jup73R+*Lr34*, y luego Lalb+*Lr34* y AOC+*Lr34*. En los genotipos resistentes, en el gen *Lr46*, el porcentaje de formación de apresorios se redujo más que en Lalb+Gen 1. y Lalb+*Lr34*. De nuevo una reducción en el porcentaje de la formación de apresorios indica un mecanismo general o de defensa, similar a los mecanismos de resistencia del hospedante incompatible, el cual se usa sólo en especie de planta y especie de patógeno. Por tanto, una especie de planta es no hospedante de una especie de patógeno si ningún individuo es susceptible a cualquier genotipo del patógeno; así, la resistencia parcial es una débil versión cuantitativa de la resistencia no hospedante. Según Chang y Line (1983) no hay diferencias significativas en formación de apresorios entre genotipos susceptibles y con resistencia parcial en trigo. Las diferencias en porcentaje de formación de apresorios entre el ápice y la parte central de la hoja están relacionadas con pequeñas diferencias en condiciones ambientales (Broers y Jacobs, 1989).

Penetración de la hifa

El porcentaje de penetración fue muy similar al observado en el porcentaje de formación de apresorios, incluyendo la relación entre AOC+*Lr34* y AOC-*Lr34*; el porcentaje de penetración fue menor en Jup73R+*Lr34* y mayor en AOC+*Lr34*. Al comparar Lalbahadur, el porcentaje de penetración se redujo más en Lalb+*Lr46*, seguida de Lalb+Gen 1 y Lalb+*Lr34*. En esta etapa de patogénesis se observa una reducción en el porcentaje de penetración en los genotipos con genes que condicionan resistencia parcial (Cuadro 2).

Martínez *et al.* (2001) reportaron que en los componentes macroscópicos de la resistencia se muestra

percentajes, and it is the germination tube that fails in localizing the recognition site (Heath, 1981).

Poyntz and Hyde (1987) reported differences among wheat varieties, resistant and susceptible to leaf rust in germination and germinative tube length; the lowest percentage in both types corresponded to the susceptible varieties, and in the infection process the largest colonization was presented by the susceptible varieties.

Apresoria

There were differences ($p \leq 0.05$) among the varieties Jup73S-*Lr34* (148.30) and Jup73R+*Lr34* (133.30) in apresorium formation (Table 2). Apresorium formation followed the same tendency of germination, but the exception was the pair of Avocet, where AOC+*Lr34* had higher percentage of apresorium formation (one explanation could be plants out of type or mixtures). At this stage Lalbahadur had the highest percentage of apresorium formation, followed by Avocet and Jupateco 73S. In the genotypes with *Lr34*, the percentage of apresorium formation was reduced more in Jup73R+*Lr34*, followed by Lalb+*Lr34* and AOC+*Lr34*. In resistant genotypes, in gene *Lr46* percentage of apresorium formation was more reduced than in Lalb+Gen1 and Lalb+*Lr34*. Again, a reduction in the percentage of apresorium formation indicates a general mechanism or of defense, similar to the resistance mechanisms of the incompatible host, which is only utilized in plant species and pathogen species. Therefore, a plant species is no host of a pathogen species, if none of the individuals is susceptible to any genotype of the pathogen; that is why partial resistance is a weak version of non-host resistance. Chang and Line (1983) reported that there are no significant differences in apresorium formation among susceptible genotypes and with partial resistance in wheat. The differences in percentage of apresorium formation between the apex and the central part of the leaf are related to small differences in environmental conditions (Broers and Jacobs, 1989).

Hypha penetration

The percentage of penetration was very similar to the one observed in the percentage of apresorium formation, including the relation between AOC+*Lr34* and AOC-*Lr34*; penetration percentage was lower in Jup73R+*Lr34*, and higher in AOC+*Lr34*. At comparing Lalbahadur, penetration percentage was reduced more in Lalb+*Lr46*, followed by Lalb+Gen1 and Lalb+*Lr34*. At this stage of pathogenesis, a reduction in penetration percentage is observed in the genotypes with genes conditioning partial resistance (Table2).

una infección alta en planta adulta y plántula. El período de latencia en plántulas es significativamente más largo en Lalbahadur *Lr34* que en Lalbahadur, lo cual explica que en este estudio hubo un mayor número de hifas que penetraron en el genotipo Lalbahadur. El efecto del gen *Lr46* es parecido al del gen *Lr34* en plantas adultas. Con períodos prolongados de latencia y alto porcentaje de lesiones del hongo no asociadas con necrosis celular, se reduce el tamaño de la colonia y hay baja severidad de la enfermedad en el genotipo Lalbahadur.

Vesícula subestomática

La formación de la vesícula subestomática indica que la penetración ha sido satisfactoria, y por tanto el proceso de infección se encuentra en una etapa avanzada. Nuevamente se observa la tendencia a reducir el porcentaje de formación de la vesícula subestomática en los genotipos con genes que confieren resistencia parcial; la misma tendencia se encontró en todos los genotipos con resistencia parcial. El menor porcentaje de formación de vesículas subestomáticas se observó en Lalb+ Gen 1, seguida por Avocet+ *Lr34*, Jupateco 73 R +*Lr34*, Lalb+*Lr34* y Lalb+*Lr46*. Sin embargo la mayor reducción ocurrió en Lalb+ Gen 1, seguida por Lalb+*Lr34* y Lalb+*Lr46* (Cuadro 2). El gen *Lr34* alarga el período de latencia, reduce la frecuencia de infección y el tamaño de la uredia, (Drijepondt y Pretorius, 1989; Singh y Huerta-Espino, 2003). En los genotipos Lalb+Gen 1 y Avocet+*Lr34* aparecieron los síntomas a las 72 h del muestreo después de la inoculación, por lo que podrían tener un periodo de latencia más largo.

Alteraciones celulares

En las muestras en parafina se observaron las alteraciones celulares que el hongo indujo en los genotipos (Cuadro 3), con los genes que confieren resistencia parcial. En los genotipos con el gen *Lr34* hubo colapso, desintegración celular y finalmente necrosis en toda la hoja excepto en el haz vascular del genotipo Lalb+*Lr34*, y en gran parte de la hoja en los genotipos AOC+*Lr34* y Jup 73R+*Lr34* (Figura 3). En el genotipo con el gen *Lr46* se inició la infección con colapso seguida de la desintegración de cloroplastos a las 30 h, y luego la necrosis en toda la hoja excepto en el haz vascular, por lo que manifestó tempranamente su resistencia. Respecto al genotipo con el gen 1, sólo presentó poca necrosis a las 86 horas de muestreo, por lo que manifestó pronto la resistencia parcial (Figura 3).

Los genotipos susceptibles presentaron las mismas alteraciones ya reportadas, aunque la diferencia está

Martínez *et al.* (2001) reported that in macroscopic resistance components high infection in adult plant and seedling is shown. The latency period in seedlings is considerably longer in Lalbahadur *Lr34* than in Lalbahadur, which explains, that in this study, there have been a larger number of hyphae penetrating genotype Lalbahadur. The effect of gene *Lr46* is similar to that of gene *Lr34* in adult plants. With prolonged latency periods and high percentage of fungus lesions, not associated to cell necrosis, the colony size decreases and there is low severity of the disease in genotype Lalbahadur.

Sub-stomatal bladder

The formation of the substomatal bladder indicates that the penetration has been satisfactory and therefore the infection process is at an advanced stage. Again, the tendency of reducing the percentage of substomatal bladder formation is observed in those genotypes with genes conferring partial resistance; the same tendency was found in all the genotypes with partial resistance. The lowest percentage of sub-stomatal bladder formation was observed in Lalb+Gene1, followed by

Cuadro 3. Alteraciones celulares en hojas de trigo producidas por la roya de la hoja (*P. triticina*) en diferentes horas de muestreo.

Table 3. Cell alterations in wheat leaves produced by leaf rust (*P. triticina*) at different hours of sampling.

Genotipo	Daño	Hora de muestreo
Lalba+ <i>Lr34</i>	Colapso y poca necrosis Necrosis total excepto en el haz vascular 110	12
Lalba+ <i>Lr46</i>	Poco colapso y desintegración de cloroplastos Necrosis total excepto en el haz vascular	30 36
Lalba+ Gen 1	Poca necrosis	86
Lalbahadur	Colapso celular Desintegración de las células del mesófilo	12 72
Jup 73S- <i>Lr34</i>	Necrosis por zonas Necrosis en gran parte de la hoja	36 72
Jup 73R+ <i>Lr34</i>	Desintegración celular Necrosis en gran parte de la hoja	24 36
AOC- <i>Lr34</i>	Colapso en gran parte de las células del mesófilo	12
AOC- <i>Lr34</i>	Hoja sana Colapso y necrosis en las células del mesófilo	40 72

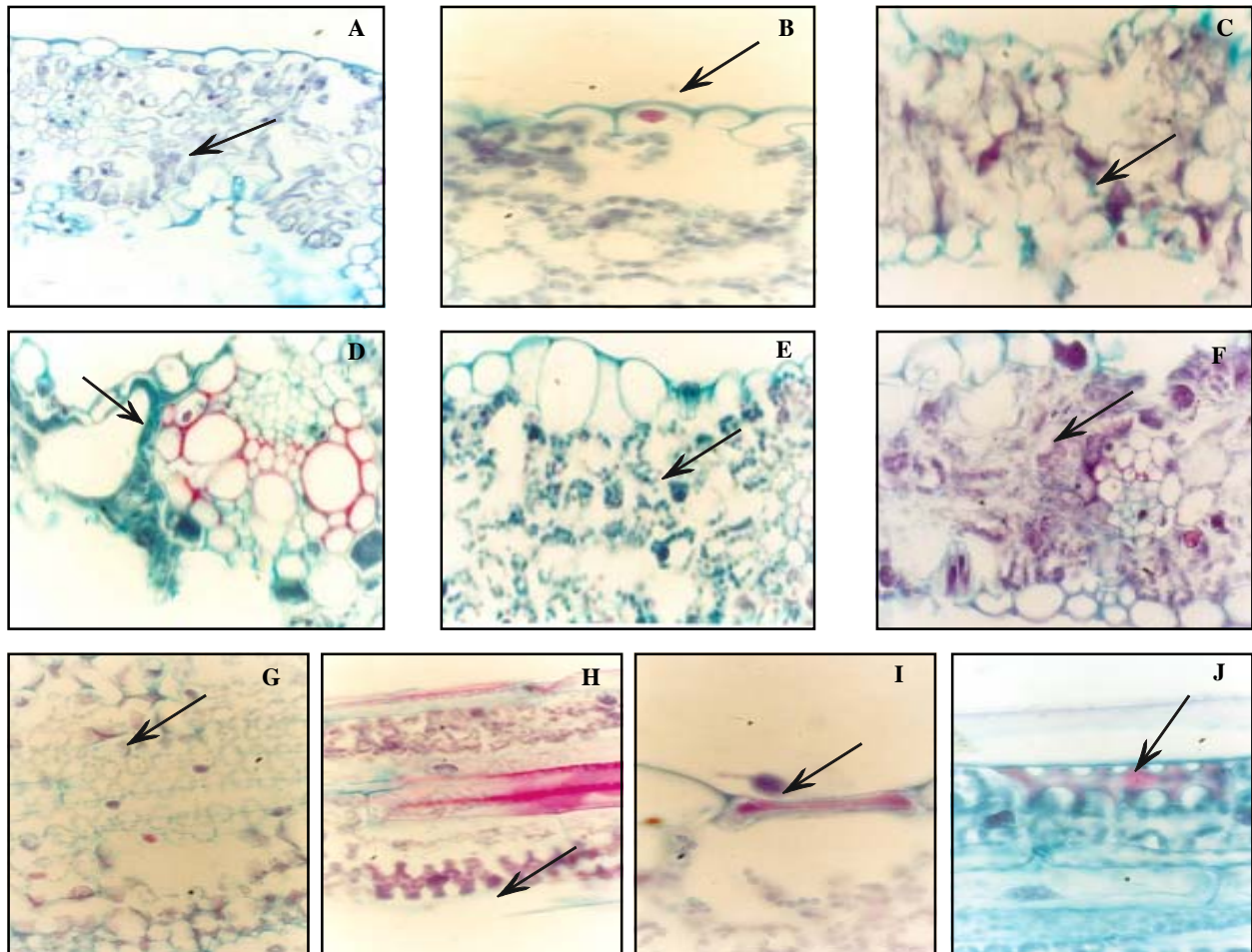


Figura 3. Alteraciones celulares de *Puccinia triticina* en hojas de *Triticum aestivum* observadas en las muestras en parafina. A) Lalbahadur (susceptible) corte transversal de la hoja se observan las células del mesófilo colapsadas a las 12 h (10x); B) en Lalb+Gen1 las células del mesófilo sanas (86 h) 40; C) Lalb+Lr46 presentó colapso celular y necrosis (40x); D) Lalb+Lr34 las células del mesófilo completamente necrosadas excepto el haz vascular (40x); E) AOC+Lr34 corte transversal de la hoja del trigo sana (40x); F) En AOC-Lr34 las células del mesófilo necrosada excepto el haz vascular (40x); G) corte paradermal de Jup73R+Lr34 inicio de la necrosis (40x); H) necrosis en Jup73R+Lr34 en gran parte de las células del mesófilo las 36 h; I) Presencia de papilas (10x) en Jup73R+Lr34 a las 40 h; J) corte transversal de Jup 73S-Lr34, inicio de la necrosis (40x).

Figure 3. Cell alterations of *Puccinia triticina* on *Triticum aestivum* leaves, observed in samples in paraffin. A) Lalbahadur (susceptible) cross section of the leaf, collapsed mesophyll cells, observed at 12 h (10x); B) the healthy mesophyll cells in Lalb+Gene1 (86h) 40x; C) Lalb+Lr46 presented cell collapse and necrosis (40x); D) Lalb+Lr34, completely necrotized mesophyll cells except vascular bundle (40x); E) AOC+Lr34, cross section of healthy wheat leaf (40x); F) necrotized mesophyll cells on AOC-Lr34 except vascular bundle (40x); G) paradermal cut of Jup73R+Lr34, beginning of necrosis (40x); H) necrosis in Jup73R+Lr34 great part of mesophyll cells for 36 h 10x, I) presence of papillae (10x) in Jup73R+Lr34 at 40 h; J) cross section of Jup73S-Lr34, beginning of necrosis (40x).

en los tiempos de infección: en Lalbahadur hubo colapso en las primeras horas de muestreo (12) y luego desintegración de las células del mesófilo. En Jup73S-Lr34 se observó necrosis sólo en zonas localizadas a 36 h, seguida de una necrosis en gran parte de la hoja a 72 h. En AOC-Lr34 a 12 h hubo colapso en gran parte de la hoja (Cuadro 3).

Los resultados de la presente investigación concuerdan con los de Álvarez (1995) quien encontró que las alteraciones celulares inducidas por *P. triticina* en las

Avocet+Lr34, Jupateco 73R+Lr34, Lalb+Lr34, and Lalb+Lr46. The greatest reduction, however, occurred in Lalb+Gene1, followed by Avocet+Lr34, and Lalb+Lr46 (Table2). Gene Lr34 prolongs the latency period, reduces infection frequency, and uredia size (Drijepont and Pretorius, 1989; Singh and Huerta-Espino, 2003). In the genotypes Lalb+Gene1 and Avocet+Lr34, the symptoms appeared until 72 h of sampling after inoculation; therefore, they might have a longer latency period.

variedades con el gen *Lr34* y en las susceptibles se debieron a colapso celular. Estas alteraciones sólo fueron evidentes en estado avanzado de la infección, y la explicación es que *P. triticina* es un parásito obligado que ha desarrollado un parasitismo evolucionado, por el cual mantiene viva a la célula el mayor tiempo posible.

CONCLUSIONES

El proceso de infección de la roya de la hoja en los genotipos que contienen genes con resistencia parcial, como Jupateco 73R+*Lr34*, Avocet+*Lr34*, Lalbahadur+*Lr46* y Lalbahadur+Gene1, muestra disminución en cuanto a germinación, formación de apresorios, penetración y formación de vesícula subestomática. Estos genes actúan desde antes de la formación del haustorio en etapas tempranas de la infección del hongo. Por tanto, se deduce que *Lr34*, *Lr46* y el Gene1 confieren resistencia prehaustorial, que se asemeja mucho a la resistencia de no hospedante, la cual es de tipo durable. En el presente estudio no se observó la formación de células madres haustoriales y haustorios y, probablemente, se debe tomar muestras con mayor frecuencia para observarlos. Las alteraciones celulares en las plantas infectadas fueron necrosis, colapso y desintegración celular de la mayoría de los genotipos, aunque estos síntomas fueron más evidentes en los genotipos susceptibles.

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.
- Broers, L. H., and Th. Jacobs. 1989. Histological, genetical and epidemiological studies on partial resistance in wheat to wheat leaf rust. Ph. D. Thesis. Wageningen University. 201 p.
- Bushnell, W. R. 1972. Physiology of fungal haustorio. Ann. Rev. Phytopathol. 10:151-176.
- Chang, K. F., and R. F. Line. 1983. Urediospore germination and growth of *Puccinia recondita* f sp *tritici* in leaves of resistant and susceptible wheat cultivars. Phytopathology. 73: 816.
- Curtis, P. J. 1986. Microtecnia Vegetal. Ed. Trillas, México. 106 p.
- Drijepondt, S. C., and Z. A. Pretorius. 1989. Greenhouse evaluation of adult-plant resistance conferred by the gene *Lr34* to leaf rust of wheat. Plant Dis. 73: 669-671.
- Dubin, H. J., and S. Rajaram. 1996. Breeding disease-resistant wheat for tropical highland and lowlands. Annu. Rev. Phytopathol. 34: 503-526.
- FAO. (Food and Agricultural Organization) 1995. Anuario de producción. Vol 49 Núm. 2/3/4.
- Heath, M. C. 1981. Resistance of plant to rust infection. Phytopathology. 71: 971-974.
- Johnson, R. 1981. Durable disease resistance. In: Strategies for Control of Cereal Diseases. Jenkyn. J. F., and R. T. Plumb (eds). Blackwell, Oxford. pp: 55-64.

Cell alterations

In the samples in paraffin, cell alterations were observed induced by the fungus to the genotypes (Table 3) with genes conferring partial resistance. In the genotypes with gene *Lr34* there was, collapse, cell disintegration, and finally necrosis all over the leaf, except the vascular bundle of genotype Lalb+*Lr34*, and to a great extent of the leaf in genotypes AOC+*Lr34* and Jup73R+*Lr34* (Figure 3). In the genotype with gene *Lr46*, infection began with collapse followed by chloroplast disintegration until 30 h, and then necrosis of the entire leaf with exception of the vascular bundle, for which it showed its resistance early. Regarding the genotype with Gene1, this only presented slight necrosis at 86 h from sampling, therefore, partial resistance soon became evident. (Figure 3).

The susceptible genotypes presented the same alterations as those already reported, although the difference consists in the times of infection: in Lalbahadur, there was collapse in the first hours of sampling (12), and then, disintegration of the mesophyll cells. In Jup73S-*Lr34* necrosis was found only in zones located at 36 h, followed by necrosis to a great extent of the leaf at 72 h. In AOC-*Lr34* at 12 h, there was collapse on great part of the leaf (Table 3).

The results of our research agree with those of Álvarez (1995), who found that the cell alterations, induced by *P. triticina* in the varieties with gene *Lr34* and in the susceptible ones, were due to cellular collapse. These alterations were only evident in advanced state of infection, and the explanation is that *P. triticina* is a customary parasite, which has developed an advanced parasitism, therefore it keeps the cell alive as long as ever possible.

CONCLUSIONS

The infection process of leaf rust in the genotypes that contain genes with partial resistance, such as Jupateco 73R+*Lr34*, Avocet+*Lr34*, Lalbahadur+*Lr46*, and Lalbahadur+Gene1 shows diminution with respect to germination, apresorium formation, penetration, and sub-stomal bladder formation. These genes act since previous to haustorium formation at early stages of fungus infection. Therefore, it is deduced that *Lr34*, *Lr46*, and Gene1 confer pre-haustorial resistance, which resembles very much non-host resistance, which is durable. In this study, the formation of haustorial mother cells and haustoria were not observed, probably, because samples must be taken more often, so that they can be seen. The cell alterations in the infected plants were necrosis, collapse, and cell disintegration of most of the genotypes, although these symptoms were more evident in the susceptible genotypes.

- Leath, K. T., and J. B. Rowell. 1966. Histological study of the resistance of *Zea mays* to *Puccinia graminis*. *Phytopathology*. 56: 1305-1309.
- Martinez, F., R. E. Singh, and D. Rubiales. 2001. Characterization of Lr46, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas* 135: 111-114.
- Parlevliet, J. E. 1975. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. I. effect of cultivar and development stage on latent period. *Euphytica* 24:21-27
- Poyntz, B., and P. M. Hyde. 1987. The expression of partial resistance of wheat to *Puccinia recondita*. *Phytopathology*. 120: 136.142.
- Rohringer, R., W. K. Kim., D. J. Samborski, and N. K. Howes. 1977. Calcofluor: An optical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology*. 82: 71-78
- Rubiales, D., and R. E. Niks. 1995. Characterization of Lr34, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust. *Plant Dis*. 79: 1208 – 1212.
- Singh, R. P., J. Huerta-Espino, y M. William. 2001. Resistencia durable a la roya de la hoja y roya amarilla: genética y mejoramiento en el CIMMYT. *In: Seminario Internacional: Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento del trigo*. INIA CIMMYT. INIA La Estanzuela, Uruguay. pp: 103-108.
- Singh, R. P., A. Mujeeb-kazi, and J. Huerta-Espino. 1998. *Lr46*: A gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Crop Sci*. 37: 390-395.
- Singh, R. P., and J. Huerta-Espino. 2003. Effect of leaf rust resistance gene *Lr34* on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. *Euphytica* 129: 371-376.