



Artículo Científico

Inoculación de *Uromyces viciae-fabae* en condiciones controladas

Jorge Pérez-Cárcamo^{1*}; José Sergio Sandoval-Islas¹; María Florencia Rodríguez-García²; Serafín Cruz-Izquierdo¹; Cristian Nava-Díaz¹; Olga Gómez-Rodríguez¹. ¹Colegio de Postgraduados, Carretera Federal México-Texcoco Km. 36.5 Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. CP 56264. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México, Carretera Los Reyes-Texcoco, km 13.5, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, México. CP 56250.

*Autor de Correspondencia:
Jorge Pérez-Cárcamo
jorgeperezcarcamo@gmail.com

Sección:
Edición periódica

Recibido:
14 Mayo, 2025
Aceptado:
21 Julio, 2025
Publicado:
01 Agosto, 2025

Cita:
Pérez-Cárcamo J, Sandoval-Islas JS, Rodríguez-García MF, Cruz-Izquierdo S, Nava-Díaz C, et al. 2025. Inoculación de *Uromyces viciae-fabae* en condiciones controladas. Revista Mexicana de Fitopatología 43(3): 80. <https://doi.org/10.18781/R.ME.X.FIT.2505-4>

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. El objetivo fue evaluar temperaturas de incubación y post-incubación, concentraciones de inóculo y efecto del ácido maleico para obtener un método eficiente y reproducible para inocular *U. viciae-fabae* en genotipos de haba.

Materiales y métodos. Los factores evaluados fueron: concentración de inóculo, temperatura de incubación y post-incubación, concentración de ácido maleico y la validación del método de inoculación. Las variables evaluadas fueron: tipo de infección, número de pústulas, porcentaje de severidad, tamaño de pústulas y período de latencia. Se realizó análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Resultados. Las temperaturas de incubación de 7 y 18 °C no mostraron diferencias significativas. La concentración de urediniosporas de 3×10^6 mostró diferencias significativas en el número de pústulas y severidad. Para el ambiente no controlado de 24 °C en promedio no se observaron síntomas. *U. viciae-fabae* fue capaz de desarrollarse en temperaturas controladas de 18, 22 °C y en temperaturas no controladas donde el promedio de temperatura fue 20 °C.

Conclusiones. Una inoculación eficiente se pudo obtener con una concentración de 3×10^6 urediniosporas por mL⁻¹ a una temperatura de incubación y post-incubación de 18 °C.

Palabras clave: *Vicia faba*, Condiciones óptimas, Esporulación, Tipo de infección

INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de la enfermedad es necesario identificar factores y condiciones óptimas, como la temperatura óptima para la inoculación, método de inoculación, concentración de inóculo, humedad relativa, viabilidad de las esporas o propágulos, condiciones de luz, entre otros. Estos factores son importantes en hongos biótrofos



(Lorrain *et al.*, 2019), con la finalidad de realizar cualquier estudio sobre la interacción planta-patógeno (Porras *et al.*, 2023; Dixit *et al.*, 2023; Lahlali *et al.*, 2024).

Caso particular del fitopatógeno *Uromyces viciae-fabae* causante de la roya del haba, es de gran importancia a nivel mundial. Se caracteriza por formar urediniosporas durante el cultivo y teliosporas en invierno o en la senescencia de la planta. En México no se ha reportado estructuras sexuales del patógeno.

Para la inoculación y replicación de la enfermedad se han adaptado protocolos reportados de otros patosistemas como roya del trigo (*Puccinia graminis*), avena (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*) y cebada (*Puccinia hordei*) (Ijaz *et al.*, 2021). Desafortunadamente, se desconocen las condiciones óptimas de desarrollo de *U. viciae-fabae* principalmente: temperaturas de incubación y post-incubación, concentración de inóculo, métodos de inoculación, diluyentes y dispersantes; información de gran utilidad para cualquier estudio de interacción haba-*U. viciae-fabae*.

Para reproducir la roya del haba diversos investigadores reportan diferentes condiciones. Joseph y Hering (1997) mencionan que las urediniosporas de *U. viciae-fabae* germinan en un rango entre 5 y 26 °C. Por su parte, Ijaz *et al.* (2021) indican que la temperatura de desarrollo de la enfermedad es de 22 ± 2 °C. Emeran *et al.* (2005) mostraron que se pueden inocular plantas de haba con una concentración de 0.5 mg de urediniosporas.

El ácido maleico se emplea para inhibir el crecimiento vegetal en diversos cultivos. En los programas de cereales lo emplean para regular el crecimiento de las plántulas utilizadas para el incremento de inóculo y desarrollo de monopústulas; en trigo se usan 0.8 g L⁻¹ de ácido maleico (Rodríguez-García *et al.*, 2010). Esto permite tener muchos aislamientos de roya en cámaras pequeñas y no tener contaminación cruzada.

El objetivo de este trabajo fue evaluar temperaturas de incubación y post-incubación, concentraciones de inóculo, efecto del ácido maleico para obtener un método eficiente y reproducible para inocular en genotipos de haba con *U. viciae-fabae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Se utilizó la línea 5 ICAMEX de haba, la cual es una F₆ que se caracteriza por pertenecer a la subespecie mayor, de crecimiento indeterminado desarrollada en el Programa de Mejoramiento Genético de Haba del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). El aislado del hongo fue el genotipo CP21 colectado en 2021 en el Campo Experimental Montecillo del Colegio de Postgraduados ubicado a 19° 27' 38" LN y 98° 54' 11" LO a una altitud de 2250 msnm. La purificación se realizó en 2023, y se obtuvo mediante tres generaciones de cultivos monopústulas en la línea 5 ICAMEX, se conservó en tubos de ensaye de 5 mL a -20 °C. Para reactivar las urediniosporas se aplicó un choque térmico, se inocularon en plantas de haba y se colectaron urediniosporas con las cuales se inocularon los experimentos. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio Nacional de Royas y Otras Enfermedades de Cereales (LANAREC) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX), ubicado a 19° 29' 88" LN y 98° 54' 22" LO y una altitud de 2260 msnm en 2023. La cepa CP21 se ha evaluado en campo en estudios previos y se comportó con mayor virulencia en comparación a otras cepas.

Temperaturas de incubación. Sembraron 40 semillas en vasos de unicel con capacidad de 295 mL en invernadero a 18 ± 2 °C. Las plantas de haba fueron regadas con agua potable durante todo el experimento. Las plántulas se fertilizaron a partir del estadio 10 (son visibles el primer par de hojas) con el fertilizante Haifa® Poly-Feed a una concentración de 10 g L⁻¹. Un total de 20 plántulas de haba en estado de desarrollo 13 (tres hojas abiertas), se inocularon mediante aspersión (López-Rodríguez, 2014). La concentración de inóculo fue de 1×10^6 urediniosporas mL⁻¹ diluidas en 5 mL de aceite mineral Sotrol® 170 determinada por conteos con una cámara de Neubauer. La inoculación se hizo con un aspersor adaptado a una bomba de vacío de la marca FELISA® modelo 1500 a una presión de 98066.5 Pa. Una vez inoculadas, 10 de las plántulas se transfirieron a una cámara bioclimática con temperatura de 7 ± 2 °C y las otras 10 plantas a una cámara bioclimática con temperatura de 18 ± 2 °C. Todas las plántulas estuvieron bajo luz continua y 100 % de humedad relativa durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, todas las plántulas se trasladaron a un invernadero con temperatura de 18 ± 2 °C.

Concentración de urediniosporas. En este experimento se utilizó el mismo material biológico del hospedante y patógeno, descritos previamente; así como el riego y fertilización. 20 plántulas de haba se inocularon mediante aspersión de 10 días después de la germinación con dos suspensiones de esporas diluidas en aceite mineral Sotrol 170®. La mitad de las plántulas se inoculó con una suspensión de 1×10^6 urediniosporas mL⁻¹ y la otra mitad con una suspensión de 3×10^6 urediniosporas mL⁻¹. La técnica para inoculación se realizó como se describió anteriormente en el experimento temperaturas de incubación. Una vez inoculadas, todas las plántulas fueron colocadas dentro de una cámara bioclimática con temperatura de 18 ± 2 °C, luz continua y 100 % de humedad relativa durante 24 h, la cual fue determinada previamente en el experimento de temperaturas de incubación. Posteriormente, las plántulas se trasladaron a un invernadero con temperatura de 18 ± 2 °C.

Temperatura post-incubación. En este ensayo los componentes biológicos tanto del hospedante como del hongo y el manejo fueron los mismos a los descritos con anterioridad. Se inocularon mediante aspersión, 40 plántulas de haba de 10 días después de la germinación con una suspensión de 3×10^6 urediniosporas mL⁻¹ diluidas en 5 mL aceite mineral Sotrol 170®.

Una vez inoculadas, las plántulas se transfirieron a una cámara bioclimática con temperatura de 18 ± 2 °C, luz continua y 100 % de humedad relativa durante 24 h. Concluido el periodo de incubación de 24 h, las plántulas se dividieron en cuatro grupos de 10 plántulas. Dos grupos se colocaron en dos invernaderos con temperatura controlada; un grupo a 18 ± 2 °C y el otro grupo a 22 ± 2 °C. Los dos grupos restantes estuvieron en dos invernaderos con temperaturas no controladas; uno estuvo a una temperatura promedio de 20 °C, una mínima de 10 °C y máxima de 35 °C, el otro grupo estuvo a una temperatura promedio de 24 °C, con mínima de 10 °C y máxima de 42 °C.

Concentración de ácido maleico. Sesenta semillas de haba de la línea 5 ICAMEX, se sembraron en vasos de unicel con capacidad de 295 mL bajo condiciones de invernadero. El sustrato utilizado fue turba marca Promix®. Un día después de la germinación estadio 06 (emergencia, el brote traspasa la superficie del suelo) (López-Rodríguez, 2014), se les

aplicó 50 mL de ácido maleico marca Sigma-Aldrich® M0375 diluido en agua destilada, a 20 plántulas a una concentración de 0.3 g L⁻¹. A otras 20 se les aplicó la misma cantidad de solución, a una concentración de 0.9 g L⁻¹. Las 20 plántulas restantes sirvieron como testigo, las cuales sólo fueron asperjadas con agua destilada. En total se tuvieron tres tratamientos incluyendo el testigo. Los siguientes riegos hasta la evaluación fueron con agua potable. Las plántulas fueron inoculadas, y sometidas a una temperatura de incubación y post-incubación de 18 °C, temperatura determinada en el experimento anterior.

Variables evaluadas. Transcurridos 15 días desde la inoculación, en cada experimento se realizó la evaluación de tipo de infección (TI) usando la escala de Stakman *et al.* (1962) adaptada a haba por Sillero *et al.* (2000), número de pústulas, porcentaje de severidad (Fragoso-Benhumea *et al.* 2022) y tamaño de pústulas en tres hojas de la parte central de la planta. El período de latencia (PL), se monitoreó desde los 10 días después de la inoculación y; evaluó el PL₁, PL₅₀ y PL₁₀₀, refiriéndose a cuando errumpió la primera pústula, el 50 % de pústulas errumpentes y el 100 % de pústulas errumpentes, respectivamente. El PL₅₀ se estimó mediante la fórmula propuesta por Niks *et al.* (2014).

$$LP_{50} = a + (b/c) * d$$

a = Tiempo desde la inoculación hasta el último conteo antes de que el 50 % de las pústulas maduraran.

b = Tiempo entre conteos antes y después de que el 50 % de las pústulas maduraran.

c = Incremento en el número de pústulas durante el periodo b.

d = Conteo al 50 % menos el número de pústulas al comienzo del periodo b.

Sólo para el experimento de concentración de ácido maleico, adicionalmente se midió la altura de planta a los siete y 28 días después de la aplicación. Cada factor se evaluó de forma independiente bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones, donde una plántula fue la unidad experimental. Todos los experimentos se repitieron dos veces. Se realizó un análisis de varianza y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el programa estadístico SAS 9.4.

Inoculación de *Uromyces viciae-fabae* en invernadero. Para determinar un método óptimo estable, confiable y replicable se tomaron las mejores condiciones previamente determinadas y se comprobó al evaluar el nivel de resistencia a *U. viciae-fabae* en 13 genotipos de haba procedentes de los programas de Mejoramiento Genético de ICAMEX y Colegio de Postgraduados. El método fue realizado de la siguiente forma: Las semillas de cada genotipo se sembraron en vasos de unicel con capacidad de 295 mL. El sustrato utilizado fue turba marca Promix®. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones. Se utilizó una planta como unidad experimental. El experimento se repitió dos veces sin aplicar ácido maleico.

A los ocho días después de la siembra se inocularon con urediniosporas frescas del aislado CP21 de *U. viciae-fabae* a una concentración de 3×10^6 urediniosporas mL⁻¹. Se utilizó 5 mL aceite mineral (Sotrol® 170) como vehículo diluyente. La inoculación se hizo con un aspersor adaptado a una bomba de vacío de la marca FELISA® modelo 1500. Las plántulas inoculadas se transfirieron a una cámara bioclimática con temperatura de $18 \pm$

2 °C, luz continua y 100 % de humedad relativa durante 24 h. Después de las 24 h, las plántulas se trasladaron a un invernadero con temperatura de 18 ± 2 °C.

A los 20 días después de la inoculación se evaluó las variables: tipo de infección (TI) utilizando la escala propuesta por Stakman *et al.* (1962) adaptada a haba por Sillero *et al.* (2000), (Cuadro 1) número de pústulas, porcentaje de severidad (Fragoso-Benhumea *et al.*, 2022), tamaño de pústulas en tres hojas de la parte central de la planta. El tamaño de pústulas se midió con un vernier de la marca RexQualis. El período de latencia (PL) se monitoreó desde los 10 días después de la inoculación, considerando PL₁, PL₅₀ y PL₁₀₀. El PL₅₀ se estimó mediante la fórmula descrita por Niks *et al.* (2014). Se realizó un análisis de varianza y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el programa estadístico SAS 9.4, con el procedimiento PROC SORT para generar una sola salida del análisis de varianza y comparación de medias de los dos experimentos.

Cuadro 1. Escala de tipo de infección propuesta por Stakman *et al.* (1962) adaptada a haba por Sillero *et al.* (2000).

Tipo de infección	Síntomas
0	Sin síntomas
;	Motas necróticas
1	Pústulas diminutas
2	Pústulas con halos necróticos
3	Pústulas con halo clorótico
4	Pústulas sin clorosis y/o necrosis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Temperaturas de incubación. La comparación del efecto de dos temperaturas de incubación permitió conocer el comportamiento en la infección en términos de tipo de infección (TI), número y tamaño de pústulas, porcentaje de severidad y período de latencia (PL) (Zadoks y Schein, 1979).

Los resultados mostraron que ninguna de estas variables (TI, número y tamaño de pústulas, porcentaje de severidad y PL) fue afectada significativamente por las dos temperaturas de incubación (Figura 1A). En este sentido Joseph y Hering (1997) mencionan que las urediniosporas de *U. viciae-fabae* germinan en un rango entre 5 y 26 °C, siendo 20 °C la temperatura óptima de germinación. Esto coincidió con los resultados obtenidos, pues el aislado evaluado desarrolló la enfermedad a temperaturas de 7 y 18 °C. Por su parte Sillero y Rubiales (2002) también lograron el desarrollo de la enfermedad inoculando plantas e incubando a 20 °C en completa oscuridad y 100 % de humedad relativa durante 24 h. En el genotipo de haba VF-176 presentó un tipo de infección 4 según la escala de Stakman *et al.* (1962) adaptada a haba por Sillero *et al.* (2000). Además, detectaron variación en el nivel de resistencia entre genotipos debido a que en el genotipo V-300 se observó un tipo de infección 2. También encontraron que el PL₁₀₀ (período de latencia), cuando todas las pústulas esporularon, fue a los 10 días después de la inoculación, siendo notablemente que los periodos de latencia son más cortos que los obtenidos en el presente estudio; esto pudiera deberse a una interacción genética entre los genotipos tanto del patógeno como del hospedante que son distintos con los nuestros. El

número de pústulas obtenidas a los 7 °C fueron 3.6 mientras que a los 18 °C se obtuvieron 3.8.

En virtud de que en ambas temperaturas de incubación se desarrolla *U. viciae-fabae*, es factible utilizar una temperatura de 18 °C puesto que para lograr temperaturas de 7 °C se requiere de sistemas frigoríficos que elevan los costos.

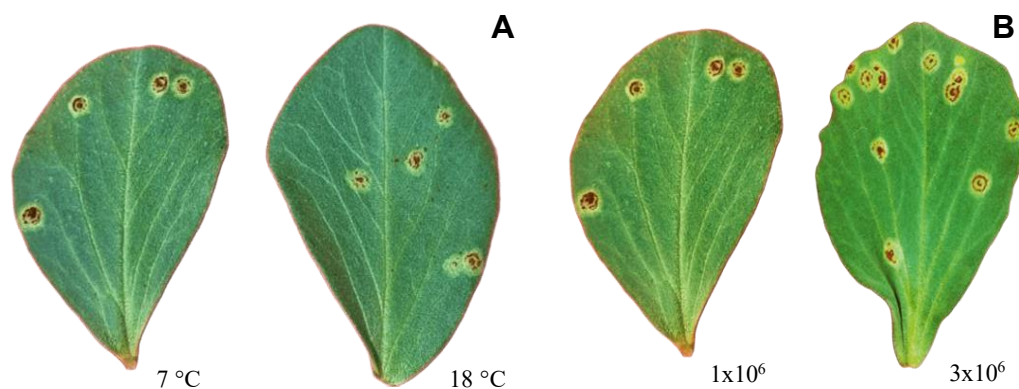


Figura 1. Hojas de haba de la línea 5 ICAMEX con esporulación de *Uromyces viciae-fabae* aislado CP21 a los 28 días después de la inoculación. A) Hojas inoculadas a una concentración de 1×10^6 y expuestas a dos temperaturas de post-inoculación, B) Hojas inoculadas con dos concentraciones de inóculo y expuestas a 18 °C en post-incubación.

Concentración de urediniosporas. La concentración de urediniosporas de 3×10^6 mostró diferencias significativas ($p < 0.0001$) en las variables de número de pústulas y severidad, con respecto a la concentración 1×10^6 , pero sin afectar los períodos de latencia, el PL₁ fue de 12 días (d), PL₅₀ 13 d y PL₁₀₀ 13.6 d. Tampoco afectó tipo de infección y tamaño de la infección (Figura 1B). Emeran *et al.* (2005) mencionaron que plantas de haba de los genotipos Amcor y Baraca inoculadas con una concentración de 0.5 mg de esporas por planta mostraron un TI 4 en ambos genotipos, con severidad de 25 y 30 %, respectivamente. Ijaz *et al.* (2021) indicaron que la concentración de inóculo no afecta el tipo de infección, pero si puede influir en el número de pústulas y por ende en el porcentaje de severidad. Resultado similar se obtuvo en esta investigación y se ilustra en la Figura 1B.

Temperatura post-incubación. En el Cuadro 2 y Figura 2 se muestra el efecto de la temperatura de la post-incubación. Para el ambiente no controlado de 24 °C en promedio no se observaron síntomas; esto pudo deberse a que, en determinadas horas del día, la temperatura máxima alcanzó los 42 °C afectando el desarrollo del patógeno. *U. viciae-fabae* fue capaz de desarrollarse en temperaturas controladas de 18, 22 °C y en temperaturas no controladas donde el promedio de temperatura fue 20 °C con mínima de 10 °C y máxima de 35 °C. Es notable que, a temperatura de 18 °C los PLs 1, 50 y 100, se prolongan respecto a las otras dos temperaturas evaluadas, las cuales entre ellas tuvieron un comportamiento similar. Se observó un PL de 14 a 16 d desde la inoculación hasta la esporulación en temperaturas controladas de 18 y 22 °C, así como en temperatura no controlada de 20 °C promedio.

Cuadro 2. Medias de siete variables del monociclo de la infección y valores de p obtenidos de plántulas de haba de la línea 5 ICAMEX inoculadas con 3×10^6 urediniosporas frescas mL^{-1} de *Uromyces viciae-fabae* y colocadas bajo cuatro temperaturas de post-incubación de dos experimentos.

Variables	Temperaturas de post-incubación				DMS	Pr > F
	18 ± 2 °C	Min = 10 °C Prom= 20 °C Max = 35 °C	22 ± 2 °C	Min = 10 °C Prom = 24 °C Max = 42 °C		
Resultados de la repetición uno del experimento						
Tipo de infección ^z	3	3	3	SE		
Número pústulas ^y	9.4	7.5	7.4	SE	1.94	0.1509
Severidad (%)	11.5a	6.9b	6.1b	SE	2.38	0.0011
Tamaño de pústulas ^x	1.1	1.1	1.0	SE	0.04	0.1340
PL1 ^w	11.7a	11.2b	11.b	SE	0.42	0.0116
PL50 ^w	12.9a	12.2b	12.1b	SE	0.36	0.0008
PL100 ^w	15.7a	14.3b	14.3b	SE	0.57	< 0.0001
Resultados de la repetición dos del experimento						
Tipo de infección ^z	3	3	3	SE		
Número pústulas ^y	9.03	7.3	7.1	SE	2.0	0.2479
Severidad (%)	11.5a	6.7 b	5.8b	SE	2.7	0.0003
Tamaño de pústulas ^x	1.16a	1.15a	1.10b	SE	0.03	0.0109
PL1 ^w	12.0a	11.1b	11.0b	SE	0.16	< 0.0001
PL50 ^w	13.0a	12.0b	12.0b	SE	0.42	< 0.0001
PL100 ^w	16.0a	14b	14b	SE	0.60	< 0.0001

SE: sin esporulación. Las condiciones de incubación fueron temperatura $18 \pm 2^\circ\text{C}$, luz continua y 100 % de humedad relativa durante 12 h. ^z Escala cualitativa de Stakman *et al.* (1962) adaptada a haba por Sillero *et al.* (2000), ^y Promedio de tres hojas de la parte central de la planta, ^x Diámetro en milímetros, ^w Período de latencia; PL1, PL50 y PL100. Valores con la misma letra dentro de filas son significativamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

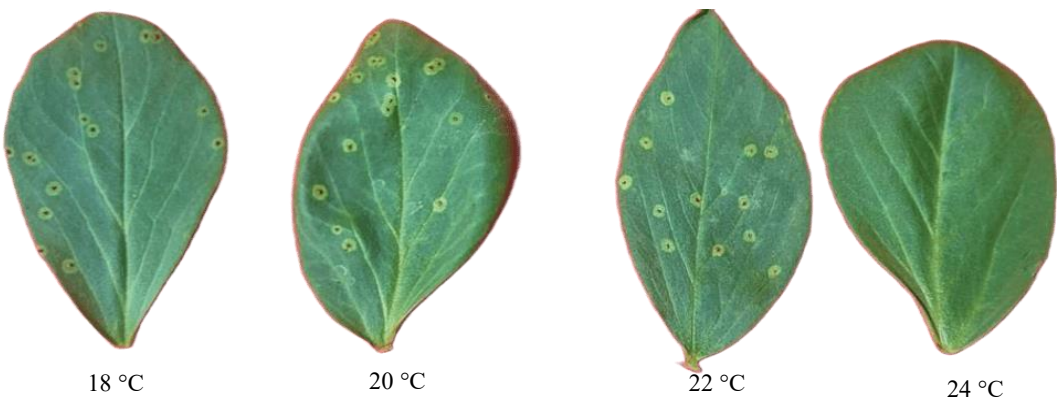


Figura 2. Hojas de haba de la línea 5 ICAMEX mostrando inicio de esporulación a los 13 días después de ser inoculadas con 3×10^6 urediniosporas mL^{-1} del aislado CP21 de *Uromyces viciae-fabae* y mantenidas bajo invernadero bajo cuatro temperaturas de post-incubación.

La temperatura post-incubación juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. En haba se ha reportado que las temperaturas de desarrollo de *U. viciae fabae* son 22 ± 2 °C (Ijaz *et al.*, 2021) y 20 °C (Ijaz *et al.*, 2020) denotando que los períodos de latencia variaron de acuerdo con el aislado del patógeno y el hospedante utilizado. Por otro lado, Ijaz *et al.* (2020) inocularon dos aislados denominados 4 y 8, procedentes de Australia sobre el cultivar susceptible Fiord y sobre el cultivar resistente Ac1655, en el primero ambos aislamientos mostraron un TI 3+ mientras que el segundo, que posee el gen mayor *Uvf-3* de resistencia incompleta tuvo un TI 12C según la escala de Ijaz *et al.* (2018) que va de 0 a 4, lo que significa una menor compatibilidad entre genotipos del patógeno y hospedante, dando evidencia del efecto del gen mayor para resistencia incompleta. Los datos de este estudio muestran que, en temperaturas de 18 °C, el número de pústulas y la severidad son altos, pero cuando la temperatura se incrementa el número de pústulas y severidad tienden a reducirse hasta cero (Figura 2). Este comportamiento indica que la severidad es influenciada por la temperatura, ya que la severidad sólo puede calcularse con base en el número de pústulas. Las temperaturas de 20 y 22 °C tienen un comportamiento similar, pero con diferencias con las obtenidas a 18 °C en la mayoría de las variables.

Concentración de ácido maleico. Las dos concentraciones de ácido maleico afectaron el crecimiento de las plántulas de haba. La concentración de 0.3 g L⁻¹ afectó la altura promedio a los 7 y 28 días, con respecto al testigo en 3 y 40 cm, respectivamente. El efecto fue mayor en la concentración de 0.9 g L⁻¹ pues el crecimiento obtenido a los 7 y 28 días fue 7 y 48 cm menor, respectivamente comparadas con el testigo (Figura 3 y Cuadro 3).



Figura 3. Diferencias en crecimiento de plantas de haba de la línea 5 ICAMEX tratadas con dos concentraciones de ácido maleico.

Cuadro 3. Efecto de la aplicación de ácido maleico sobre la altura de plantas de haba de la línea 5 ICAMEX y seis variables del monociclo de la infección de *Uromyces viciae-fabae* en dos experimentos.

Variables	Concentración de ácido maleico			DMS	Pr > F
	Testigo	0.3 g L ⁻¹	0.9 g L ⁻¹		
Resultados de la repetición uno del experimento					
Altura de planta 1 ^z	15.6a	12.7b	9.6c	2.1	< 0.0001
Altura de planta 2 ^z	58.9a	18.7b	11.3c	4.2	< 0.0001
Tipo de infección ^y	3	3	3		
Número pústulas ^x	8.0a	7.6b	4.0c	2.3	0.0136
Tamaño de pústulas ^w	1.3	1.3	1.1	0.19	0.3806
PL1 ^v	11.0b	11.0b	14.8a	1.01	< 0.0001
PL50 ^v	12.0b	11.8b	16.8a	0.7	< 0.0001
PL100 ^v	13.0b	12.6b	17.a	0.7	< 0.0001
Resultados de la repetición dos del experimento					
Altura de planta 1 ^z	16.85a	13.35b	8.5c	2.06	< 0.0001
Altura de planta 2 ^z	58.95a	16.9b	10.3c	2.05	< 0.0001
Tipo de infección ^y	3	3	3		
Número pústulas ^x	11.9a	8.1b	4.3c	2.80	< 0.0001
Tamaño de pústulas ^w	1.56a	1.41a	0.9b	0.15	< 0.0001
PL1 ^v	11 b	11.2b	15.16a	0.88	< 0.0001
PL50 ^v	11.9b	12.3b	16.8a	0.86	< 0.0001
PL100 ^v	12.8b	12.88b	17.66a	1.28	< 0.0001

^z Lectura en centímetros a los 7 y 28 días, después de la aplicación de ácido maleico, ^y Escala cualitativa de Stakman, *et al.* (1962) adaptada a haba por Sillero *et al.* (2000), ^x promedio de las tres hojas de la parte central de la planta, ^w diámetro en milímetros, ^v Período de latencia, PL1, PL50 y PL100. Valores con la misma letra dentro de filas son significativamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos muestran que a mayor concentración de ácido maleico la altura de la plántula será menor. Un efecto observado fue que el ácido maleico además de afectar la altura de la planta también afectó el desarrollo de la enfermedad puesto que sólo el 50 % de las plántulas tratadas con una concentración de 0.9 g L⁻¹ presentaron esporulación; además, permitió un número y tamaño de pústulas menor comparado con el testigo y con las plantas tratadas con una concentración de 0.3 g L⁻¹. La concentración de 0.9 g L⁻¹ de ácido maleico afectó los períodos de latencia 1, 50 y 100 al prolongar hasta 4 días la esporulación de las pústulas comparadas con el testigo y con la concentración de 0.3 g L⁻¹. Esta observación puede ser útil en caso de que se requiera una esporulación tardía.

Aunque hay pocos estudios de cómo actúa el ácido maleico en los tejidos y células de la planta una posible explicación de los resultados anteriores es debido a que el ácido maleico actúa como inhibidor de la auxina (Zhu *et al.*, 2021). Zhu *et al.* (2021) aplicaron ácido maleico a *Spirodela polyrrhiza* y encontraron que afecta negativamente la expresión de 14 genes relacionados con la auxina, la cual es encargada de promover el crecimiento vegetativo de las plantas.

El ácido maleico se ha estudiado para el control de hongos. Fei *et al.* (2023) lo evaluaron como agente de control *in vitro* y en hojas desprendidas de *Brassica napus*, encontraron una reducción en la severidad de *Sclerotinia sclerotiorum*. Debido a que la secreción de ácido oxálico (asociado con la colonización de los hongos), se reduce por efecto del ácido maleico. Causando una baja expresión de genes relacionados con la virulencia del hongo (*SS-Bil* y *SS-GgtI*).

Esto también pudieran estar sucediendo en la concentración 0.9 g L^{-1} de ácido maleico aplicado en plantas de haba, pero se requiere de estudios que permitan comprender los modos de acción del ácido maleico.

El ácido maleico se ha empleado como regulador de crecimiento vegetal y como herbicida. En diversas especies se ha utilizado como inhibidor de crecimiento como en papa (*Solanum tuberosum*), en otras se ha probado que suprime el crecimiento en caléndula (*Calendula officinalis*), trigo (*Triticum aestivum*), cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*), árboles forestales, frutales y ornamentales, así como inhibir la germinación de plantas holoparásitas y malezas (Karki *et al.*, 2021; Venezian *et al.*, 2017).

Con base en los resultados obtenidos, la aplicación de una concentración de 0.3 g L^{-1} , puede ser recomendada para tener una plántula de aproximadamente 20 cm, facilitando el incremento de inóculo y la obtención de cultivos monopústulares, pues una altura de estas dimensiones o menor permite tener un manejo adecuado de la planta, una mayor cantidad de inóculo en espacios reducidos y evitar contaminación cruzada de los aislamientos de roya. Esto permite tener inóculo puro para diversos estudios, como la evaluación de la resistencia genética, diversidad del patógeno, en agresividad o virulencia, evaluación de la efectividad biológica de fungicidas, proceso de patogénesis.

En trigo, cebada y avena se emplea el ácido maleico para incrementar el inóculo de las diferentes royas que enferman a estos cultivos. Para el caso de roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) del trigo, en México, se aplica una dosis de 0.8 g L^{-1} de ácido maleico para regular su crecimiento (Rodríguez-García *et al.*, 2010). El ácido maleico suprime el crecimiento de las plántulas y la hoja primaria se desarrolla al máximo (Samborski *et al.*, 1960), por lo que la producción de esporas es muy abundante (Knott, 1989) lo que coincide con lo observado en la dosis 0.3 g L^{-1} donde las plantas fueron de menor tamaño que las obtenidas en el testigo, sin afectar el tamaño de pústula. Sin embargo, la aplicación de ácido maleico no es recomendable en experimentos para evaluación de la resistencia.

Las evidencias encontradas fortalecen el propósito en programas de mejoramiento genético para resistencia a royas, permite tener eficiencia y eficacia en los resultados por la uniformidad genética de los monopústulares (McIntosh *et al.*, 1995).

Inoculación de *Uromyces viciae-fabae* en invernadero. La intención fue conocer el nivel de resistencia a *U. viciae-fabae* bajo condiciones controladas validando el método de inoculación que consiste en una concentración de inóculo de 3×10^6 urediniosporas por mL^{-1} en aceite Soltrol®, una temperatura de incubación de 18°C , humedad relativa de 100 % durante 24 h y una temperatura post-incubación de 18°C (Cuadro 4), estas condiciones permitieron evaluar eficientemente los principales componentes del monociclo como período de latencia, número y tamaño de pústulas y porcentaje de severidad. También permitió estimar el tipo de infección que nos indica el grado de compatibilidad entre el hospedante y patógeno, máximo signo del tipo de resistencia que se está manifestando (Ijaz *et al.*, 2021).

Los resultados sugieren que el método es estable y reproducible, siendo una herramienta útil para hacer evaluaciones en plántulas para conocer las diferentes interacciones que se dan en este patosistema, así como detectar fuentes de resistencia, diversidad del patógeno y su hospedante, la variabilidad patogénica, la determinación de diferenciales para la identificación de razas fisiológicas entre otros estudios, ya que la

expresión fenotípica de la interacción del hospedante y el patógeno será altamente confiable.

Cuadro 4. Medias de siete variables del monociclo de la infección obtenidas en plántulas de 13 genotipos de haba inoculadas con urediniosporas de *Uromyces viciae-fabae* para conocer su nivel resistencia.

Genotipos ^z		Variables evaluadas						
		TI ^y	PL1 ^x	PL50 ^x	PL100 ^x	No. de pústulas ^w	Severidad ^w %	Tamaño de pústula (mm) ^w
Huahuaxtla 1	T	2	12a	16.0a	18.0a	5.8ed	3.5f	0.8d
Guarrama	T	2.9	11b	14.1b	16.4b	5.8ed	8.2ef	1.1abc
Apizaco 4	T	3	11b	13.8bc	15.9c	4.8e	7.9def	1.2ab
Apizaco 3	T	3	11b	13.7bc	16.3bc	6.8ced	11.5bcd	1.3 a
Apizaco 1	T	3	11b	13.8bc	15.9c	6.3ced	10.1cde	1.1abc
Apizaco 5	T	2.4	11b	14.0bc	16.3bc	7.5ced	12.0bcd	1.2ab
Apizaco 2	T	2.6	11b	13.9bc	16.1bc	6.7ced	9.4cde	1.0
Negra CP	M	3	11b	13.8bc	16.3bc	6.9ced	10.4bcde	1.2ab
Texcoco 1	M	2.9	11b	13.9bc	16.9bc	9.3bc	13.1bc	1.0bc
Nativitas 1	T	3	11b	14.0bc	16.0bc	8.4bcd	15.1b	1.2 a
Zacatelco 1	T	3	11b	13.8bc	16.4b	20.4 a	29.8 a	1.0bc
Oaxaca 1	O	2.5	11b	14.0bc	16.3bc	11.5b	11.5bcde	1.0cd
5 ICAMEX	M	3	11b	13.5c	16.0bc	8.2bcd	10.3cde	1.2 a
			0.8	0.5	0.43	3.35	4.71	0.17
Pr > F			<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

^zObtenidos de ICAMEX Y CP, ^yEscala cualitativa de Stakman, *et al.* (1962) adaptada a haba por Sillero *et al.* (2000), ^xPeríodo de latencia, PL1, PL50 y PL100, ^w Promedio de las tres hojas de la parte central de la planta, T: Tlaxcala, M: México, O: Oaxaca. Valores con la misma letra dentro de filas son significativamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

En los patosistemas más estudiados que involucran una roya, como son diversos cereales y leguminosas, se han caracterizado principalmente dos tipos de resistencia, la resistencia de hipersensibilidad dada por pocos genes que indica poca o nula compatibilidad entre el patógeno y el hospedante, los tipos de infección bajos es considerado como un fenotipo resistente, dependiendo de la escala utilizada, en haba se tiene un comportamiento similar (Ijaz *et al.*, 2018; Rubiales y Khazaei, 2022; Adhikari *et al.*, 2025). Los tipos de infección altos indican mayor compatibilidad entre hospedante y patógeno que se considera un fenotipo susceptible. Esta variable es la más importante cuando se trata de la evaluación de la resistencia, pues nos indica que tipo de material que se tiene en el programa de mejoramiento y el camino a seguir en el proceso (Ijaz *et al.*, 2021). El otro tipo de resistencia es la horizontal o poligénica aunque es menos estudiada que la antes mencionada, ha sido reportada por diversos autores (Sillero *et al.*, 2000; Rubiales y Khazaei, 2022).

En este estudio las condiciones de inoculación, incubación y post-incubación, previamente descritas (Cuadro 3 y Figura 4), permitieron realizar eficientemente la evaluación de la resistencia de los 13 genotipos utilizados, pues los TI fueron claros y consistentes, indicando que el germoplasma evaluado tiende más hacia susceptibilidad, pues los valores de TI 3 indican mayor compatibilidad entre patógeno y hospedante.

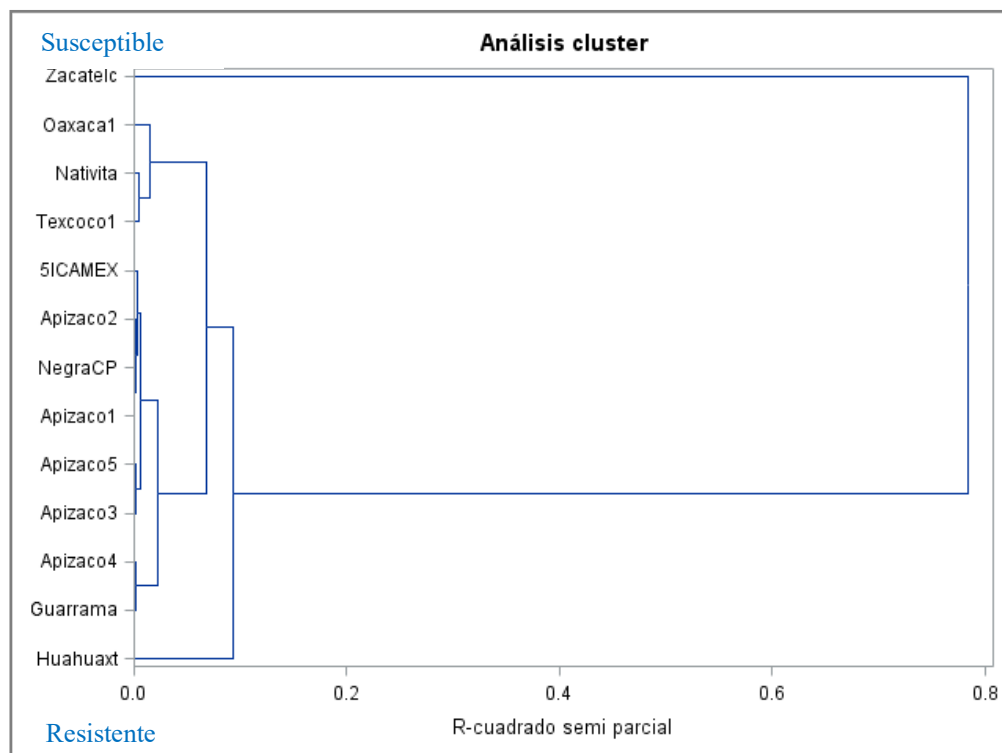


Figura 4. Dendrograma de la resistencia y susceptibilidad de 13 genotipos de haba a *U. viciae-fabae* en condiciones controlas realizado del análisis multivariado de todas las variables evaluadas.

Debido a que no se contaba con un método claro para evaluar la resistencia a *U. viciae-fabae* en México, se utilizó la línea 5 ICAMEX, la cual se ha reportado como susceptible, pero ahora con datos contundentes y el análisis multivariado. Se puede recomendar utilizar el genotipo Zacatelco 1, ya que es mayormente susceptible que 5 ICAMEX. Huahuaxtla 1, según el análisis multivariado es el de mayor nivel de resistencia. Estudios más detallados y con suficientes repeticiones serán necesarios para caracterizar con mayor precisión estos genotipos y darles el uso adecuado en los programas de mejoramiento, así como estudios de herencia de la resistencia.

CONCLUSIONES

El método de inoculación para reproducir eficientemente a *U. viciae-fabae* bajo condiciones controladas, consiste en asperjar una concentración de esporas de 3×10^6 urediniosporas mL^{-1} de aceite Soltrol. La incubación debe hacerse a 18°C y humedad relativa del 100 %. La temperatura de post-incubación debe ser de 18°C . La evaluación de la resistencia de los genotipos de haba a roya permitió validar el método de inoculación, siendo confiable, estable y reproducible. Una concentración de ácido maleico de 0.3 g L^{-1} permite tener plántulas pequeñas para generación de cultivos monopustulares. El Método de inoculación se puede utilizar para estudios del patógeno como del hospedante y la resistencia genética a *U. viciae-fabae*.

Limitaciones

No aplica

Conflicto de interés

Todos los autores declaran no tener conflicto de interés en relación con esta investigación.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Colegio de Postgraduados y el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).

Agradecimientos

Al Colegio de Postgraduados, Laboratorio Nacional de Royas y Otras Enfermedades de Cereales (LANAREC) del Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP), en el Campo Experimental del Valle de México, Instituto de Investigación y Capacitación Agrícola, Acuícola y Forestal del Estado de México, por el apoyo brindado durante mi doctorado en ciencias.

REFERENCIAS

- Adhikari KN, Catt SC and Stoddard FL. 2025. Faba Bean Breeding in Australia: Past, Present and future. *Legume Science*. 7: 1-13. <https://doi.org/10.1002/leg3.70026>.
- Dixit S, Sivalingam PN, Baskaran RKM. Senthil-Kumar M and Ghosh PK. 2024. Plant responses to concurrent abiotic and biotic stress: unravelling physiological and morphological mechanisms. *Plant Physiology Reports*. 29: 6-17. <https://doi.org/10.1007/s40502-023-00766-0>
- Emeran AA, Sillero JC, Niks RE and Rubiales D. 2005. Infection structures of host-specialized isolates of *Uromyces viciae-fabae* and of other species of *Uromyces* infecting leguminous crops. *Plant Disease* 89:17-22. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0017>
- Fei YC, Cheng Q, Zhang H, Han C, Wang X, *et al.* 2023. Maleic acid and malonic acid reduced the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* by inhibiting mycelial growth, sclerotia formation and virulence factors. *Stress Biology* 3:45. <https://doi.org/10.1007/s44154-023-00122-0>
- Fragoso-Benhumera JM, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildózola Á, Franco-Mora O, Gutiérrez-Ibáñez AT, *et al.* 2022. Escala diagramática para evaluar la severidad de roya en haba (*Vicia faba*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 40(3):474-482. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2206-2>
- Ijaz U, Adhikari K, Kimber R, Trethowan R, Bariana H and Bansal U. 2021. Pathogenic specialization in *Uromyces viciae-fabae* in Australia and rust resistance in faba bean. *Plant Disease* 105: 636-642. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1325-RE>
- Ijaz U, Adhikari K, Stoddard FL and Trethowan RM. 2018. Rust resistance in faba bean (*Vicia faba* L.): Status and strategies for improvement. *Australasian Plant Pathology* 47:71-81. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0528-6>
- Ijaz U, Ayliffe M, Adhikari K. Bariana H and Bansal U. 2020. Australian *Uromyces viciae-fabae*: host and nonhost interaction among cultivated grain legumes. *Plant Pathology* <https://doi.org/10.1111/ppa.13222>
- Joseph ME and Hering TF. 1997. Effects of environment on spore germination and infection by broad bean rust (*Uromyces viciae-fabae*). *The Journal of Agricultural Science* 128:73-78. <https://doi.org/10.1017/S0021859696003930>
- Karki P, Atreya PN and Shrestha S. 2021. Effect of maleic hydrazide and gibberellic acid on growth and yield of African marigold (*Tagetes erecta* L.) cv. Calcuttia Orange. *Fundamental and Applied Agriculture* 6:272-278. <https://doi.org/10.5455/faa.103177>
- Knott DR. 1989. The Wheat Rusts-Breeding for Resistance. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 201 pp. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-83641-1>

- López-Rodríguez M. 2014. El Cultivo de Haba una Tradición en el Estado de México. Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuicola y Forestal del Estado de México. Metepec, México. 89 p.
- Lorrain C, Gonçalves dos Santos KC, Germain H, Hecker A and Duplessis S. 2019. Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist* 222: 1190-1206. <https://doi.org/10.1111/nph.15641>
- McIntosh RA, Wellings CR and Park RF. 1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRO Publishing. Canberra, Australia. 200 pp. https://bgri.cornell.edu/wp-content/uploads/2021/01/wheat_rust_atlas_full.pdf
- Niks RE, Parlevliet JE, Lindhout P and Bai Y. 2014. Breeding Crops with Resistance to Diseases and Pests. Wageningen Academic Publishers. Wageningen, The Netherlands. 200 pp. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-882-7>.
- Porras MF, Navas CA, Agudelo-Cantero GA, Santiago-Martínez MG, Loeschcke V, *et al.* 2023. Extreme heat alters the performance of hosts and pathogen. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 11: 2023. DOI:10.3389/fevo.2023.1186452
- Rachid L, Mohammed T, Salah-Eddine L, Grace G, Rachid E, *et al.* 2024. Effects of climate change on plant pathogens and host-pathogen interactions. *Crop and Environment*. 3:159-170. <https://doi.org/10.1016/j.crope.2024.05.003>.
- Rodríguez-García MF, Huerta-Espino E, Villaseñor-Mir HE, Sandoval-Islas JS y Singh RP. 2010. Análisis de virulencia de la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) del trigo (*Triticum aestivum* L.) en los Valles Altos de México. *Agrociencia* 44:491-502. <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/814/814>
- Rubiales D and Khazaei H. 2022. Advances in disease and pest resistance in faba bean. *Theoretical and Applied Genetics*. 135(11):3735-3756. doi: 10.1007/s00122-021-04022-7
- Samborski DJ, Person C and Forsyth FR. 1960. Differential effects of maleic hydrazide on the growth of leaf and stem rusts of wheat. *Canadian Journal of Botany* 38:1-7. <https://doi.org/10.1139/b60-001>
- Sillero JC, Moreno M and Rubiales D. 2000. Characterization of new sources of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in a germplasm collection of *Vicia faba*. *Plant Pathology* 49:389-395. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00459.x>
- Sillero JC and Rubiales D. 2002. Histological characterization of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in faba bean. *Phytopathology* 92:294-299. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.3.294>
- Stakman, E.C., Stewart, D.M., Loegering, W.Q. 1962. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. United States Department of Agriculture. Res. Serv. ARS E617:1-53.
- Statistical Analysis System (SAS). 2018. Release 9.4 for Windows. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, United States of America.
- Venezian A, Dor E, Achdari G, Plakhine D, Smirnov E and Hershenhorn J. 2017. The influence of the plant growth regulator maleic hydrazide on Egyptian broomrape early developmental stages and its control efficacy in tomato under greenhouse and field conditions. *Frontiers in Plant Science* 8:691. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00691>
- Zadoks JC and Schein RD. 1979. Epidemiology and plant Disease Management. Oxford University Press. Oxford, United Kingdom. 427 pp.
- Zhu Y, Li X, Gao X, Sun J, Ji X, *et al.* 2021. Molecular mechanism underlying the effect of maleic hydrazide treatment on starch accumulation in *S. polyrrhiza* 7498 fronds. *Biotechnol Biofuels*. 14:99. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01932-y>