

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA ROYA DEL
TEJOCOTE (*Crataegus spp.*) – ENEBRO (*Juniperus spp.*)
EN EL EJE NEOVOLCÁNICO, PUE.**

EDGAR HUMBERTO NIETO LÓPEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis titulada: **Identificación y Epidemiología de la Roya del Tejocote (*Crataegus spp.*) - Enebro (*Juniperus spp.*) en el Eje Neovolcánico, Pue**, realizada por el alumno **EDGAR HUMBERTO NIETO LÓPEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. DIONICIO ALVARADO ROSALES

ASESOR:



DR. DANIEL TEPEZ ORTIZ

ASESOR:



M.C. VICTORIA AYALA ESCOBAR

ASESOR:



DR. RAÚL NIETO ANGEL

Montecillo, Texcoco, Edo. de México, Septiembre de 2014.

IDENTIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE LA ROYA DEL TEJOCOTE (*Crataegus* spp.)-ENEBRO (*Juniperus* spp.) EN EL EJE NEOVOLCÁNICO, PUE.

Edgar Humberto Nieto López, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

En el Eje Neovolcánico de Puebla, tres plantaciones de tejocote (*Crataegus* spp.) y enebros (*Juniperus* spp.) en diferente rango de altitud se seleccionaron como sitios de muestreo en 2012 y 2013. Se estudió la epidemiología de la fase picnial y ecial, además análisis de varianza y estudios de correlación se llevaron a cabo con datos fenológicos del fruto y variables climatológicas en cada plantación. Para la identificación morfológica de la roya se utilizó la clave de Kern y el protocolo de diagnóstico para *Gymnosporangium* spp. (no Europea) y se complementó con la ornamentación de la superficie de las estructuras del peridio y eciosporas con ayuda de microscopía electrónica de barrido en base a la clasificación de Lee y Kakishima. Posteriormente se hizo un análisis molecular y filogenético. Se presentó más de una especie de *Gymnosporangium*, *G. clavipes* cuya fase ecial se encontró en frutos de *Crataegus* spp. y de la cual no se encontró su fase telial, y otra especie cuya fase ecial se encontró en hojas de *Crataegus* spp. y su fase telial en *J. deppeana* Steud y que correspondió a *G. globosum*, sin embargo molecularmente no correspondió a ninguna especie reportada. La incidencia de *G. clavipes* en frutos de tejocote fue de 36.20 %, 10.49 % y 0 % entre plantaciones a diferente asnm en 2012, y de 0 % en todas las plantaciones en 2013. La densidad de lesiones de *G. clavipes* en hojas de tejocote fue de cero en todas las plantaciones en 2012 y 2013. Las epidemias se presentaron con temperatura de 14.5 °C, humedad relativa de 57.51 % y precipitación de 216.2 mm y se ajustaron al modelo monomolecular. La fase picnial se presentó únicamente en frutos del mes de abril a junio, y la fase ecial continuó del mes de junio a septiembre. La incidencia se presentó únicamente en frutos, y estuvo relacionada directamente con la altitud; que a su vez tuvo una relación directa con la humedad relativa y una relación indirecta, con la temperatura y el tamaño de los frutos de tejocote.

Palabras clave: asnm, agallas teliales, densidad, ecias, *Gymnosporangium clavipes* y *Gymnosporangium* sp.

**IDENTIFICATION AND EPIDEMIOLOGY OF TEJOCOTE (*Crataegus* spp.)-
JUNIPER (*Juniperus* spp.) RUST AT THE TRANS MEXICAN NEOVOLCANIC
BELT, PUE**

Edgar Humberto Nieto López, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

Three tejocote (*Crataegus* spp.) plantations and Junipers (*Juniperus* spp.) were selected in 2012 and 2013 at sampling sites at different elevations in the Trans-Mexican Volcanic Belt in Puebla State. Rust was morphologically identified using Kern's key, the diagnostic protocol for *Gymnosporangium* spp. (non European) and was supplemented with the ornamentation of the surface structures peridium and aeciospores using scanning electron microscopy based on Lee and Kakishima's classification. Molecular and phylogenetic analyses were then carried out. The epidemiology of the pycnial and aecial phase of rust was studied. Analysis of variance and correlation studies were also undertaken with phenological data of the fruit and climatic variables in each plantation. It was presented more than one species of *Gymnosporangium*, *G. clavipes* was found and confirmed molecularly in the aecial phase in fruits of *Crataegus* spp. though not in the telial phase. Another species, *G. globosum* was found in the aecial phase in leaves of *Crataegus* spp. and in the telial phase in *J. deppeana* Steud however, molecularly it did not correspond to any kind species reported. The incidence of *G. clavipes* in tejocote fruits was 36.20 %, 10.49 % and 0 % among plantations at different masl in 2012 and 0 % in all plantations in 2013. The density of aecial lesions of *G. clavipes* in tejocote leaves was zero in all plantations in 2012 and 2013. *G. clavipes* epidemics were began with temperature of 14.5 °C, relative humidity of 57.51% and precipitation of 216.2 mm and followed the monomolecular model. The pycnial phase was only present in fruits from april to june and the aecial phase continued from june to september. The incidence occurred only in fruits, and was directly related to the altitude; which in turn had a direct relation to the relative humidity and an indirect relationship with the temperature and size of the fruits of tejocote.

Key words: masl, telial galls, density, aecia, *Gymnosporangium clavipes* and *Gymnosporangium* sp.

DEDICATORIA

A mi madre:

Lila López Méndez,

esa mujer que en los momentos difíciles, simplemente está ahí

A mi padre:

Raúl Nieto Angel

A mi hermano:

Erick Néstor Nieto García

Y a un gran amigo y por cierto es mi tío:

Daniel Nieto Angel

AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro señor por haberme permitido concluir un objetivo más.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento de mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados (CP) por el financiamiento de esta investigación.

Al SINAREFI-SNICS-SAGARPA (Proyecto FRU-TEJ-12), por el financiamiento parcial de este proyecto de investigación.

Al Dr. Dionicio Alvarado Rosales por su amistad, apoyo e invaluable dirección en la planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz por su apoyo, orientación e innumerables muestras de sencillez y amistad.

A la M.C. Victoria Ayala Escobar por sus sugerencias y revisiones a mi trabajo de investigación.

Al Dr. Raúl Nieto Angel por sus valiosos comentarios e interés en la presente investigación.

A la Dra. Hilda Victoria Silvia Rojas por sus acertadas aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación.

Al M.C. Ricardo Vega Muñoz y al Dr. Enrique Guízar Nolazco por su ayuda en la identificación de las muestras de enebro.

A la Ing. María Luisa Rocha Sosa por darle formato a esta tesis.

Agradezco a todos y cada uno de los docentes e investigadores del CP por la aglomeración de conocimientos y de experiencias que compartieron conmigo durante las sesiones de clase dentro y fuera de las aulas.

A los señores productores de tejocote: Aaron Espinoza, Arturo Ortega, Atalo Alonso y Gilberto Tepox por brindarme siempre su apoyo y disposición a la hora de muestrear sus plantaciones.

A mis compañeros y amigos del Postgrado en Fitopatología que hicieron de mi estancia en el Colegio de Postgraduados una agradable experiencia.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
ANTECEDENTES.....	1
JUSTIFICACIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN DE LA ROYA DEL TEJOCOTE (<i>Crataegus spp.</i>) -ENEBRO (<i>Juniperus spp.</i>) EN EL EJE NEOVOLCÁNICO, PUE.	12
RESUMEN.....	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
HIPÓTESIS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
LITERATURA CITADA.....	62
CAPÍTULO II. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ROYA (<i>Gymnosporangium clavipes</i> Cke. &Pk. Y <i>Gymnosporangium sp.</i>) DEL TEJOCOTE (<i>Crataegus spp.</i>) Y SU RELACIÓN CON SU FENOLOGÍA Y CONDICIONES AMBIENTALES, EN EL EJE NEOVOLCÁNICO, PUE.....	67
RESUMEN.....	67
ABSTRACT	68
INTRODUCCIÓN	69
MATERIALES Y MÉTODOS	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73

CONCLUSIONES	91
RECOMENDACIONES	91
LITERATURA CITADA.....	91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de muestreo para la fase fase telial en el bosque de enebros (<i>Juniperus</i> spp.) y ecial en plantaciones de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013	16
Cuadro 2. Tratamientos para el aislamiento a partir de telias de enebro (<i>Juniperus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. en 2012	18
Cuadro 3. Muestras de enebro (<i>Juniperus</i> spp.) y tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) provenientes del Eje Neovolcánico, Pue. utilizadas para la identificación molecular durante 2012-2013	21
Cuadro 4. Relación de iniciadores utilizados para la amplificación del loci ribosomal y las condiciones de PCR.....	23
Cuadro 5. Métodos de obtención de inóculo a partir de germinación de teliosporas de muestras de enebro (<i>Juniperus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013 para identificar el mejor método que será utilizado en las pruebas de asociación.....	25
Cuadro 6. Relación de inoculaciones <i>in vivo</i> a partir de telias de enebro (<i>Juniperus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.....	29
Cuadro 7. Relación de inoculaciones <i>in vitro</i> a partir de telias de muestras enebro (<i>Juniperus</i> spp) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.....	31
Cuadro 8. Medidas de telias y teliosporas en muestras de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.....	34
Cuadro 9. Medidas de ecias en muestras de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013	35
Cuadro 10. Medidas de teliosporas y basidiosporas de las muestras de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) y de eciosporas de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013	39
Cuadro 11. Medidas de las telias y teliosporas de las muestras de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.....	45
Cuadro 12. Medidas de las esporas de las muestras de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) y tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.	45
Cuadro 13. Hospedantes y morfología de la espora de la fase telial de <i>Gymnosporangium</i> spp. (no Europea) que se utilizó como comparativa con las medidas de las muestras de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013	46

Cuadro 14. Hospedantes y morfología de ecias y eciosporas de <i>Gymnosporangium</i> spp. (no Europea) que fue utilizada como comparativa con las medidas de las muestras de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013	47
Cuadro 15. Relación de especies de <i>Gymnosporangium</i> y sus hospedantes encontrados por Lee y Kakishima (1999b) que fue de utilidad para discriminar morfológicamente entre especies de <i>Gymnosporangium</i> provenientes de muestras de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.....	48
Cuadro 16. Relación de especies de <i>Gymnosporangium</i> y sus hospedantes encontrados por Lee y Kakishima (1999a) que fue de utilidad para discriminar morfológicamente entre especies de <i>Gymnosporangium</i> provenientes de muestras de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.....	49
Cuadro 17. Concentración y calidad de ácidos nucleicos de muestras de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) y tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013	52
Cuadro 18. Relación de la homologación de identidad de las muestras de la fase telial de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) y ecial de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. en el año 2012, con los 3 pares de iniciadores en el banco de genes (NCBI)	53
Cuadro 19. Resultados de tratamientos modificados para obtención de inóculo a partir germinación de telias de muestras enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013	59
Cuadro 20. Concentración de inóculo y condiciones de temperatura y humedad relativa durante las inoculaciones <i>in vivo</i> a partir de telias de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013	60
Cuadro 21. Resultados de inoculaciones <i>in vitro</i> a partir de telias de muestras enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.....	61
Cuadro 22. Incidencia de la fase picnial y ecial de <i>Gymnosporangium clavipes</i> en frutos de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) en tres plantaciones con diferente altitud durante 2012 en el Eje Neovolcánico, Pue.	74
Cuadro 23. Análisis mediante el modelo monomolecular utilizado para caracterizar el progreso temporal de fase picnial y ecial de <i>Gymnosporangium clavipes</i> en dos plantaciones de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.....	76
Cuadro 24. Análisis de varianza de incidencia promedio de <i>Gymnosporangium clavipes</i> en frutos entre las distintas plantaciones de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) var. <i>Chapeado</i> y tipo criollo a diferente altitud en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.....	76

Cuadro 25. Análisis de varianza de incidencia de <i>Gymnosporangium clavipes</i> en frutos en el tipo criollo y var. <i>Chapeado</i> durante la evaluación III en las plantaciones de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) a diferente altitud en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012	76
Cuadro 26. Análisis de varianza de la incidencia de <i>Gymnosporangium clavipes</i> en frutos de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo a través de las evaluaciones de tres plantaciones en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012	78
Cuadro 27. Análisis de varianzas de incidencia de <i>Gymnosporangium clavipes</i> en frutos de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo en una misma plantación a través de las evaluaciones en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012	78
Cuadro 28. Análisis de varianza de la temperatura mensual en una misma altitud (P1, 2868 msnm) en el Eje Neovolcánico, Pue. entre el año 2012-2013	79
Cuadro 29. Análisis de correlación entre incidencia de <i>Gymnosporangium clavipes</i> en frutos de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo y las variables climatológicas de temperatura, humedad relativa y precipitación en la plantación P1 (2,868 msnm) en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012	80
Cuadro 30. Análisis de varianzas de humedad relativa mensual en una misma altitud (P1, 2868 msnm) en el Eje Neovolcánico, Pue. entre el año 2012-2013	80
Cuadro 31. Análisis de varianzas de temperatura mensual en una misma altitud (P1, 2868 msnm) en el Eje Neovolcánico, Pue. entre el año 2012-2013	81
Cuadro 32. Análisis de varianzas a través de la evaluaciones de la fenología de frutos en tres altitudes de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.....	85
Cuadro 33. Análisis de varianzas de la fenología de frutos en la evaluación I en tres altitudes de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.....	86
Cuadro 34. Análisis de correlación entre incidencia de <i>Gymnosporangium clavipes</i> en frutos de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) y la fenología de sus frutos en variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo a través de las evaluaciones en una misma plantación en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos de inoculación. A) Frotis de Masa de Teliosporas Germinadas en hoja. B) Masa de Teliosporas Germinadas en hoja. C) Masa de Teliosporas Germinadas en frutos. D) Frotis de Masa de Teliosporas Germinadas en frutos. E) Suspensión de Basidiosporas en frutos. F) Cámara húmeda.....	27
Figura 2. Estructuras de la fase telial proveniente de ramas de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>). A).Agalla globosa. B) Telias sobre la agalla. C) Teliospora bicelular con pedicelo acarotiforme (sin forma de zanahoria). D y E) Teliosporas con 2 poros germinativos por célula. F) Basidiospora. Barras C-D = 20 μm , E-F = 10 μm	36
Figura 3. Estructuras de la fase ecial proveniente de frutos (F) y hojas (H) de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo. A y C). Ecia roestelioide y peridio entre tuberculado y rugoso, proveniente de frutos (F). B y D) Ecia roestelioide y peridio rugoso, provenientes de hojas (H). Barras C-D =10 μm	39
Figura 4. Estructuras de la fase ecial provenientes de frutos (F) y hojas (H) de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo. A) Eciosporas provenientes de frutos (F). B) Eciosporas provenientes de hojas (H), exclusivamente variedad <i>Chapeado</i> C) Comparación de eciosporas provenientes de F y H. D) Comparación de ecias provenientes de F y H. barras A-C = 20 μm	40
Figura 5. MEB de teliosporas de ramas de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>). A y B) Telioporas con ornamentación lisa y pedicelos largos.....	40
Figura 6. MEB de las ecias en frutos (F) de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo. A) Apertura de la ecia en el ápice. B, C, D, E, F) Ornamentación de la pared externa, lateral e interna del peridio. PI, pared interna; PL, pared lateral, PE, pared externa.	41
Figura 7. MEB de las eciosporas de frutos (F) de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> y tipo criollo. A) Eciosporas. B) Ornamentación de eciospora pequeñamente anulado.	42
Figura 8. MEB de las ecias de hojas (H) de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> . A y.B) Apertura de la ecia en el ápice y lacerado lateralmente.C, D, E, F) Ornamentación de la pared externa, lateral e interna del peridio. PI, pared interna; PL, pared lateral, PE, pared externa.	43
Figura 9. MEB de las eciosporas de hojas (H) de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) variedad <i>Chapeado</i> . A) Eciosporas. B) Ornamentación de eciospora pequeñamente coronado...	44
Figura 10. Gel de Agarosa PCR de muestras de fase telial de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) y ecial de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.). A) Iniciadores D1/D2, B) Rust2inv/LR6 y C) Rust2inv/LR6.	51

Figura 11. Árbol filogenético del gen 28S de muestras de la fase telial de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) J2G2 y ecial de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) P2FCh.	55
Figura 12. Árbol filogenético del gen 18S de muestras de la fase telial de enebro (<i>Juniperus deppeana</i>) J2G2 y ecial de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) P1FCh.	56
Figura 13. Signos de la fase picnial y ecial en frutos de tejocote. A) Fase picnial inmadura (coloración naranja). B) Fase picnial madura (coloración naranja oscuro) C) Fase ecial.....	74
Figura 14. Daños de la fase picnial y ecial en frutos de tejocote. A y B) Frutos con deformación.....	74
Figura 15. Incidencia promedio de <i>Gymnosporangium clavipes</i> en frutos de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) en tres plantaciones con diferente altitud el 30/06/12 en el Eje Neovolcánico de Puebla México.....	75
Figura 16. Incidencia, fenología y condiciones de temperatura, humedad relativa y precipitación de la plantación P1 (2,868 msnm) de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) en el año 2012.....	82
Figura 17. Incidencia, fenología y condiciones de temperatura, humedad relativa y precipitación de la plantación P1 (2,470 msnm) de tejocote (<i>Crataegus</i> spp.) en el año 2012.....	82
Figura 18. Diferentes niveles de ceniza volcánica presente en frutos de tejocote debido a la emisión del volcán Popocatepetl. A) Muy alto. B) Alto. C) Medio, grado I. D) Medio, grado II. E) Bajo. F) Escaso.	83
Figura 19. Fenología de la fase reproductiva en tejocote. A) Brotación. B) Desborre C) Flor abierta. D) Amarre (sépalos turgentes y pétalos turgentes). E) Amarre (sépalos turgentes y pétalos senescentes). F) Fructificación I (sépalos turgentes; tamaño pequeño). G) Fructificación II (sépalos turgentes; tamaño medio). H) Fructificación III (sépalos turgentes; tamaño grande).....	84

INTRODUCCIÓN GENERAL

ANTECEDENTES

El tejocote (*Crataegus* spp.) tiene un gran potencial como fuente de pectina (Higareda *et al.*, 1995a; Higareda *et al.*, 1995b), para la producción de fruta fresca, como portainjerto de otros frutales, como forraje, como ornamental, como planta medicinal y para la preparación de licores (Nieto-Ángel y Borys, 1991). En México, dicho frutal se cultiva todavía a nivel de traspatio o semicomercial, generalmente en asociación con diversas especies anuales o perennes (Nieto-Ángel y Borys, 1999). A nivel nacional, se siembran 678.15 ha; y las estadísticas señalan al estado de Puebla como el principal productor de esta fruta, de entre siete entidades en las que está reportado su cultivo, con una producción de 3,675.30 ton en la temporada 2011 (Anónimo, 2012a).

OBJETIVO GENERAL

Identificar la especie o especies involucradas en la roya del tejocote y determinar las condiciones ambientales que favorecen su presencia en el Eje Neovolcánico, Pue.

HIPÓTESIS GENERAL

El agente causal de la roya del tejocote esta determinada por una sólo especie, y su presencia y agresividad esta condicionada por condiciones ambientales como humedad temperatura, humedad relativa y precipitación muy específicas.

JUSTIFICACIÓN

La roya que en el 2012 se presentó en la principal zona de producción de tejocote en el estado de Puebla nunca se había presentado con esa magnitud y por lo tanto causó severos daños económicos según refirieron los mismos productores; debido a la carencia de información sobre esta enfermedad, se decidió estudiar aspectos relevantes como su diagnóstico, identificación de su rango de hospedantes, así como aspectos epidemiológicos que nos permitan identificar cuáles son las condicionantes para que se presente con mayor magnitud, y en base a esto, prevenirla y manejarla adecuadamente conforme este en las posibilidades de los mismos productores.

En el 2012, noticias como la siguiente aparecieron sobre la presencia de la roya del tejocote en el estado de Puebla: “Sube el precio del tejocote por invasión de roya en el 60

% de los cultivos”, “En riesgo 5,000 ha de cultivos de tejocote en Calpan” (La jornada de Oriente, 2012). En el mismo año “El aumento en la incidencia por *Gymnosporangium clavipes* Cke. & Pk. probablemente se vieron favorecidas por mayor humedad, vientos y proximidad de bosques de *Juniperus* spp.” en Michoacán (Anónimo, 2012b).

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Generalidades del tejocote

El género *Crataegus* se ubica taxonómicamente en la familia Rosaceae, Subfamilia Maloideae y Tribu *Crataegeae*. Debido a su amplia variabilidad, se divide en categorías infragenéricas denominadas secciones, las que a su vez se subdividen en series de especies. En total, el género comprende 265 especies clasificadas en 14 secciones y 34 series, distribuidas en América, Asia y Europa. (Phipps *et al.*, 1990). En México, no se ha determinado el número total de especies existentes de *Crataegus*, mediante estudios realizados solamente en el norte de México (a partir de 21° L.N., más el Estado de Hidalgo), Phipps (1997) identificó 13 especies del género, ubicadas en cuatro secciones (*Parvifoliae*, *Mexicanae*, *Crus-galli* y *Coccineae*): *C. uniflora*, *C. mexicana*, *C. gracilior*, *C. rosei* subsp. *parryana*, *C. baroussana* var. *baroussana*, *C. cuprina*, *C. grandifolia* var. *grandifolia* y *C. grandifolia* var. *potosina*, *C. serratissima*, *C. johnstonii*, *C. tracyi* var. *madrensis* y *C. tracyi* var. *coahuilensis*, *C. greggiana* var. *greggiana* y *C. greggiana* var. *pepo*, *C. aurensens* y *C. sulfurea*.

2. Generalidades del enebro

En México el bosque de enebro (*Juniperus* spp.) ocupa el 0.04 % del territorio nacional y se le encuentra en diferentes condiciones ecológicas, desde Baja California y Tamaulipas hasta Chiapas (Rzedowski, 1978). El género *Juniperus* que caracteriza a este tipo de vegetación, tiene aproximadamente 60 especies (Fonseca, 1994) y en México se admiten 12 especies, 6 variedades y 3 formas que son: *J. blancoi* Martínez, *J. californica* Carr, *J. comitana* Martínez, *J. deppeana* Steud, *J. deppeana* var. *pachyplaea* (Torr)

Martínez, *J. deppeana* var. *robusta* Martínez, *J. deppeana* var. *zacatecensis* Martínez, *J. duranguensis* Martínez, *J. eryhocarpa* Cory var. *coahuilensis* Martínez, *J. flaccida* Schl., *J. flaccida* var. *poblana* Martínez, *J. gamboana* Martínez, *J. jaliscana* Martínez, *J. monosperma* (Engelm) Sarg, *J. monosperma* var. *gracilis* Martínez, *J. monticola* Martínez, *J. monticola* f. *compacta* Martínez, *J. monticola* f. *orizabensis* Martínez, *J. patoniana* Martínez, *J. patoniana* f. *oscura* Martínez y *J. stanleyi* Steyemark, de los cuales *J. flaccida* Schl es una de las especies más importantes dentro del bosque de *Juniperus*, la cual se distribuye en Estados Unidos de América y en 19 estados de la República Mexicana, el árbol recibe diversos nombres comunes como son: enebro, cedro, sabino, nebrito, tlaxcal, táscate (Martínez, 1963) y junípero (Cibrián *et al.*, 2007).

3. *Gymnosporangium* spp.

3.1. Generalidades

Muchas royas son parásitos especializados que atacan solo ciertos géneros o especies de plantas hospedantes. Las especies de *Gymnosporangium* son heteróicas, produciendo la fase ecial sobre hojas y frutos de hospedantes pomáceos (Rosaceae) y la fase telial en hojas, tallos y ramas de cedros (*Cupressus* spp.) y enebros (*Juniperus*) (Cupressaceae) (Hiratsuka 1971, Kern 1973, Sinclair y Lyon, 2005). El género ha sido llamado “roya de cedros” o para ser más específico “roya de Cedro-Manzana” para incluir al hospedante alterno. La fase telial se produce sobre varias clases de cedros: cedros rojos (*Juniperus*), cedros blancos (*Chamaecyparis*), cedros incienso (*Calocedrus* también llamado *Heyderia* y *Libocedrus*) y cupresus (*Cupressus*), por lo tanto, el nombre común “roya de cedros” es inapropiado, y aunque la mayoría de las especies son del grupo de hospedantes comúnmente llamados cedros rojos (*Juniperus*) también conocidos como junípero, estos pertenecen a la familia Cupressaceae. Cerca de la mitad de las especies de *Gymnosporangium* tienen la fase ecial sobre hospedantes pomáceos y de esto, tres cuartas partes tienen su fase telial sobre *Juniperus*, con unos pocos sobre *Chamaecyparis*, *Cupressus* y *Colocedrus*. Por lo tanto hay cuatro familias eciales: Rosaceae, Myricaceae, Hydrangiaceae y Cupressaceae (especies autoicas con la fase ecial y telial en esta familia) en su complejo (Kern, 1973).

3.2. Importancia

Las royas (Uredinales) son el grupo más numeroso de hongos fitopatógenos (Savile, 1976) con al menos 7,000 especies descritas en el orden, y un tercio de todos los basidiomicetes descritos (Kirk *et al.*, 2001), son un grupo de patógenos, entre los de mayor importancia económica de muchas plantas nativas y cultivadas, diferente a otra clase de fitopatógenos, los cuales tienden a atacar a fin de ciclo o plantas con pobre crecimiento, por esta razón, los problemas con royas tienden a incrementar con el cultivo intensivo y extensivo de muchos cultivos forestales, hortícolas y agrícolas. Estos hongos son el principal factor limitante de cultivos importantes como trigo, maíz, café y pino (Cummins e Hiratsuka, 1991), y afectan a una gran variedad de angiospermas y gimnospermas, causando daños severos (Scott y Chakravorty 1982; Swann *et al.*, 2001).

3.3. Ciclo de vida

Algunas especies de *Gymnosporangium* completan su ciclo de vida en un año pero muchas requieren dos años. Las fases espermogonial y ecial forman a finales de primavera y verano lesiones de color amarillo a naranja rojizo sobre hojas o puntos cloróticos a café sobre tallos sin lignificar y frutos del hospedante angiospermo. Los espermogonios o picnios en hojas abren sobre el haz y la ecia usualmente se forma en el envés, los espermogonios o picnios son de forma de botella o picnidios, inmersos en el tejido del hospedante, y visibles solamente como puntos color amarillo claro a negros sobre las lesiones. Las ecias son como cuernos blancos o ligeramente coloreados o estructuras cilíndricas (raramente en forma de copa) que producen eciosporas polvorientas de amarillo a café. Las eciosporas son distribuidas por el viento y causan infección en el hospedante telial (perenne) durante el verano y el otoño, a partir de hojas o frutos de su hospedante ecial son distribuidos en otoño (Sinclair y Lyon, 2005).

Las especies de *Gymnosporangium* invernan en su hospedantes gimnospermos, donde producen telias durante la primavera. La telia aparece en forma de cuerno de naranja a café rojizo o como proyecciones en forma de cojín sobre agallas, corteza u hojas, y consisten de teliosporas con pedicelo largos. La telia llega a hincharse y gelatinizarse durante el tiempo húmedo en primavera, y las teliosporas después germinan en su lugar

produciendo, basidios y basidiosporas, éstas son dispersadas por el viento e infectan partes suculentas del hospedante ecial (angiosperma). Muchas especies de *Gymnosporangium* se quedan permanentemente en ramas del junípero o cedro y producen telias anualmente en agallas, hinchazones o escobas de brujas (Sinclair y Lyon, 2005).

3.4. Síntomas y signos

Los miembros del género *Gymnosporangium* causan agallas, protuberancias y escobas de bruja en ramas, y muerte de ramas secundarias en su hospedante perenne. En el hospedante rosáceo se desarrollan manchas de colores y protuberancias localizadas sobre hojas, frutos y brotes, seguidos frecuentemente por deformaciones y muerte de estas partes (Sinclair y Lyon, 2005).

3.5. Distribución mundial

Las especies de *Gymnosporangium* y *Roestelia* son distribuidas principalmente en el Hemisferio Norte, en total se han reportado 57 especies de *Gymnosporangium*, 14 de *Roestelia* y 2 de *Uredo*, las especies de *Gymnosporangium* distribuidas en Norteamérica son: *G. asiaticum* (introducida), *G. bermudianum*, *G. bethelii*, *G. biseptatum*, *G. clavariiforme*, *G. clavipes*, *G. connersii*, *G. corniculans*, *G. cornutum*, *G. cupressi*, *G. davisii*, *G. effusum*, *G. ellisii*, *G. exiguum*, *G. exterum*, *G. floriforme*, *G. fraternum*, *G. fuscum* (introducida), *G. globosum*, *G. gracile*, *G. harknessianum*, *G. hyalinum*, *G. inconspicuum*, *G. japonicum* (introducida), *G. juniperi-virginianae*, *G. kernianum*, *libocedri*, *G. meridissimum*, *G. multiporum*, *G. nelsonii*, *G. nidus-avis*, *G. nootkatense*, *G. speciosum*, *G. tremelloides*, *G. trachysorum*, *G. vauqueliniae*, conocidas solo en su etapa ecial (*Roestelia*) *G. brucensis*, *G. guatemaliana*, conocidas solo en su etapa uredial (*Uredo*); *G. apachea* y *G. cupressicola*. Las especies distribuidas en Europa son: *G. amelanchieris*, *G. clavariiforme*, *G. confusum*, *G. cornutum*, *G. fuscum*, *G. fuisporum*, *G. gaeumanni*, *G. gracile*, *G. minus*, *G. torminali-juniperinum*, *G. tremelloides*, conocidas solo en su etapa ecial (*Roestelia*); *G. malyi*. Las especies distribuidas en Asia son: *G. amelanchieris*, *G. asiaticum*, *G. clavariiforme*, *G. confusum*, *G. corniforme*, *G. cornutum*, *G. cunninghamianum*, *G. formosanum*, *G. fuscum*, *G. hemisphericum*, *G. japonicum*, *G. miyabei*, *G. nipponicum*, *G. padmarensis*, *G. paraphysatum*, *G. dobrozrakovii*, *G. shiraianum*, *G. taianum*, *G. tsingchensis*, *G. turkestanicum*, *G. yamadae*, conocidas solo

en su etapa ecial (*Roestelia*); *G. cunninghamiana*, *G. distorta*, *G. fenzeliana*, *G. levis*, *G. magna*, *G. nanwutiana*, *G. patula*, *G. pourthiaeeae*, *G. wenshanense*. Las especies distribuidas en África son: *G. amelanchieris*, *G. atlanticum*, *G. clavariiforme*, *G. confusum*, *G. fuscum*, *G. gracile*, conocidas solo en su etapa ecial (*Roestelia*); *G. atlasiana* (Kern, 1973).

3.6. Distribución en México

Los miembros del género *Gymnosporangium* que se han identificado son: *G. bethelii* Kern en *J. flaccida* Schl. en Hidalgo y San Luis Potosí; *J. mexicana* en Hidalgo; *Crataegus mexicanus* Moc. & Sesse en el Estado de México; *Crataegus* sp. en San Luis Potosí e Hidalgo; *G. clavipes* Cke. & Pk. en frutos y ramas hipertrofiadas de *Crataegus mexicanus* Moc. & Sesse y *Crataegus* sp. en el Estado de México; *G. gracile* Pat. en *Juniperus* sp. y *Amelanchier denticulata* en el noroeste de México, Chihuahua, Coahuila y Nuevo León; *G. exiguum* Kern en *Juniperus* sp. y *Crataegus* sp. en Hidalgo; *G. globosum* Farl. en *Crataegus* sp. en el Estado de México; *G. kernianum* Bethel en *Juniperus californica* Carr., *Amelanchier* sp. y *Pyrus* sp. en Baja California; *G. nelsonii* Arth en *Cupressus lusitánica* var. *lindleyi*, *Juniperus* sp. y *Amelanchier* sp. en el Estado de México, Michoacán y San Luis Potosí y *G. vauqueliniae* Long & Gooding en *Vauqueliniae karwinsky* Maxim en San Luis Potosí (León-Gallegos y Cummins, 1981). Se tienen registradas infecciones por especies de *Gymnosporangium* no identificadas en Chihuahua, Durango, Hidalgo, Jalisco, Puebla, Tlaxcala y Zacatecas, sin embargo las especies mexicanas no están bien definidas (León-Gallegos y Cummins, 1981).

3.7. Ubicación taxonómica actual en base a morfología

Roestelia es el género anamórfico de *Gymnosporangium*, sin embargo, la ecia en forma roestelioide sin conexión definitiva a un teleomorfo también se trata como *Roestelia*. En total se han reportado 14 especies de *Roestelia*. En la fase ecial de ***Gymnosporangium*** y ***Roestelia***, las características morfológicas como la ornamentación de la superficie de las células peridiales, la forma, tamaño y color de las eciosporas han sido usados como importantes criterios taxonómicos (Kern, 1973).

La **ecia** de especies de *Gymnosporangium* son característicamente “roestelioide” en muchas especies, pero “aecidioide” en unas pocas especies (Kern, 1973). El ecio

roestelioide (*Roestelia*) tiene una estructura en forma de cuerno, frecuentemente de 1 a 3 mm o más de largo, formado por un peridio tubular y de una célula de grueso (Littlefield y Heath, 1979). Kern (1910) dividió la ornamentación de las paredes celulares (externa, lateral e interior) del peridio en cinco tipos basado en la naturaleza de la rugosidad, más tarde, en el libro “La revisión taxonómica de *Gymnosporangium*” (Kern, 1973) describió estos cinco tipos de ornamentación de la superficie de células peridiales: rugosa, rugosa modificada, verrucosa, espinulosa y lisa. Lee y Kakishima (1999ab) observaron las estructuras de la superficie de eciosporas y células del peridio por microscopía electrónica de barrido (MEB) y las clasificaron en 10 y 12 tipos respectivamente. Las eciosporas: grandemente coronada, pequeñamente coronada, minuciosamente coronada, en forma de montaña, equinulada, pequeñamente anulada, grandemente anulada, tuberculada, cabeza de clavo, grandemente verrucosa, pequeñamente verrucosa, verrucosa con gránulos refractivos. Las células del peridio: lisa, densamente equinulada o densamente espinulada, escasamente equinulada, densamente verrucosa, escasamente verrucosa, pequeñamente papilada, proyección coraloide, tuberculada, moderadamente rugosa y rugosa; también reportaron que estos tipos fueron estables dentro de una especie y podrían ser usados como un criterio taxonómico importante y de diagnóstico de la identificación de *Gymnosporangium* y *Roestelia*.

3.8. Ubicación taxonómica actual en base a biología molecular

En un estudio analizando la subunidad grande del rDNA nuclear (NLSU) o secuencias del rDNA 28 S de 52 royas, las tres especies de *Gymnosporangium*: *G. clavariiforme*, *G. cornutum* y *G. fuscum*, ahora considerado como *G. sabinae* formaron un grupo monofilético (Maier *et al.*, 2003). En otro estudio analizando la subunidad grande (NLSU) y la subunidad pequeña (NSU) del rDNA nuclear o secuencias del 28S y 18S (Aime, 2006) de dos especies de *Gymnosporangium*, *G. clavipes* y *G. juniperi-virginianae* formaron un único linaje (grupo monofilético) en los Pucciniales distinto de Pucciniaceae. El género *Gymnosporangium* es inusual, ya que los miembros de este género son las únicas royas que forman su telia en gimnospermas, en miembros de la familia Cupressaceae (Leppik, 1973) y hasta el momento, el género mantiene una posición bastante aislada en estudios filogenéticos y puede representar un linaje separado a nivel familiar de las royas dentro del suborden Urediniales (Aime, 2006).

3.9. Diagnóstico de royas

Las royas tienen tres características únicas que dificultan su diagnóstico: 1) un máximo de cinco estados de esporas morfológicamente diferentes pueden presentarse en un ciclo de vida de una sola especie, 2) muchas especies necesitan dos grupos no relacionados de plantas hospedantes para completar su ciclo de vida (ciclo de vida heteroica), aunque otros puede completar su ciclo de vida en una sola especie de planta hospedante (ciclo de vida autoica) y 3) por lo general las especies tienen rangos de hospedantes estrechos y específicos. Las royas en su hábitat natural son parásitos obligados de plantas, aunque unas pocas especies son actualmente cultivadas en medio artificial (Cummins e Hiratsuka, 1991).

El procedimiento usual de diagnóstico, consiste en determinar primero el estado de la espora y su morfología; después se consulta el índice de hospedantes correctamente identificado, por lo menos hasta género (“host index”) (León-Gallegos y Cummins, 1981).

Las eciosporas y uredosporas son montadas mejor en lactofenol o algún medio similar con secado o no lento con algún clarificante, en general, los poros son más visibles cuando las esporas se montan en lactofenol o en soluciones concentradas de cloro hidratado, calentar el portaobjeto o almacenarlo por algunos días, es de gran ayuda (León-Gallegos y Cummins, 1981). El tamaño, el color y la forma de la ornamentación superficial deben registrarse rápidamente, si se almacenan durante mucho tiempo, algunas características cambian considerablemente, como p.e. el tamaño. Los cortes pueden ser útiles para determinar la posición de la telia en los tejidos del hospedante o para observar las estructuras. Si un manual descriptivo regional está disponible, el índice de hospedantes puede ser utilizado para reducir las posibilidades y luego cada especie probable, puede ser comparada con el espécimen que está siendo identificado. En algunos casos, la identificación se puede confirmar mediante la comparación de especímenes identificados auténticamente o mediante el envío a algún especialista (Cummins e Hiratsuka, 1991).

4. Literatura citada

- Aime, M. C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47:112-122.
- Anónimo. 2012a. Anuario Estadístico de la producción agrícola. INEGI, SAGARPA, SIAP. México.
- Anónimo. 2012b. Ficha técnica: *Gymnosporangium clavipes* Cke. y Pk. (1873) Roya del Membrillo. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. SAGARPA-SENASICA. México, D. F. 8 p.
- Cibrián T., D., Alvarado R. D., y García D. S. E. 2007. Enfermedades forestales en México. Universidad Autónoma Chapingo, CONAFOR: Forest Service United States. 15 Canadian Forest Service. Comisión Forestal de América del Norte. pp: 202-205.
- Cummins, G. B. e Hiratsuka Y. 1991. Illustrated genera of rust fungi, 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Fonseca, R. M., D. Pérez, y J. Rzedowski. 1994. Flora de Guerrero. No 2. Cupressaceae y Toxicodiaceae. Editores Facultad de Ciencias, UNAM. 17 p.
- Higareda, R. A., Salazar, M. J. A. y Ramos, R. G. E. 1995a. Caracterización de la pectina de tejocote. *Revista Chapingo (Serie Horticultura)* 4:155-157.
- Higareda, E. A., Prado O., Salazar, M. J. A., y Ramos, R. G. E. 1995b. El concentrado comercial de la pectina de la pulpa de tejocote. *Revista Chapingo (Serie Horticultura)* 4:47-52.
- Hiratsuka, Y. 1971. Spore surface morphology of pine stem rusts of Canada as observed 5 under a scanning electron microscope. *Can J Bot* 49: 371-294.
- Kern, F. D. 1910. The morphology of the peridial cells in the *Roesteliae*. *Bot. Gaz.* 49: 445-452.

- Kern, F. D. 1973. A revised taxonomic account of *Gymnosporangium*. University Park, Pennsylvania: Penn State Univ Press. Pennsylvania State University Press 134 p.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David J. C., y Stalpers, J. A. 2001. Dictionary of the fungi, 9th edn. CABI, Wallingford, UK.
- La jornada de oriente, 2012. <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article102136>
Consultado el 12 de Marzo de 2014.
- Lee, S. K., y Kakishima, M. 1999a. Aeciospore surface structures of *Gymnosporangium* and *Roestelia* (Uredinales). *Mycoscience* 40:109–120.
- Lee, S. K., y Kakishima, M. 1999b. Surface structures of peridial cells of *Gymnosporangium* and *Roestelia* (Uredinales). *Mycoscience* 40:121–131.
- Leppik, E. E. 1973. Origin and evolution of conifer rusts in the light of continental drift. *Mycopathol Mycol Appl* 49:121–136.
- León-Gallegos H.M. y Cummins, G. B. 1981. Uredinales (Royas) de México, Vols I y II. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Culiacán, Sinaloa, México. 492 p.
- Littlefield, L. J. y Heath, M. C. 1979. Ultrastructure of rust fungi, pp. 20-45. Academic Press, N.Y.
- Martínez, M. 1963. Los *Juniperus* Mexicanos. In Martínez, M. 1963. Las Pináceas mexicanas. Tercera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal. pp. 289-400.
- Maier, W., Begerow D., WeiB M., y Oberwinkler F. 2003. Phylogeny of the rust fungi: an approach using nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Can J Bot* 81:12–23.
- Nieto-Angel, R. y Borys, M. W. 1991. El tejocote (*Crataegus* spp.) en México: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos en México. Ortega, P. R.; G. Palomino H.; F. Castillo G.; V. A. González H. y M. Livera M. (eds.). Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. (SOMEFI). Chapingo, México. pp. 309-324.

- Nieto-Angel, R. y Borys, M. W. 1999. Relaciones fisiológicas y morfológicas de injertos frutales sobre tejocote (*Crataegus* spp.) como portainjerto. Revista Chapingo Serie Horticultura 5(2): 137-150.
- Phipps, J. B., Robertson, K. R., Smith P. G., y Rohrer, J. R.. 1990. A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae). The Canadian Journal of Botany 68: 2209-2269.
- Phipps, J. B. 1997. Monograph of northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae, subfam. Maloideae). Botanical Research Institute of Texas, Inc. USA.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Editorial Limusa. México, Distrito Federal. pp. 311-313.
- Scott, K. J., y Chakravoty, A. K. 1982. The rust fungi. New York: Academic Press Inc.
- Sinclair, W. A., y Lyon, H. H. 2005. Diseases of trees and shrubs. 2nd ed. Ithaca, New York: Cornell Univ Press.
- Savile, D. B. O. 1976. Evolution of the rust fungi (Uredinales) as reflected by their ecological problems. Evol Biol 9:137-207.
- Swann, E. C., Frieders, E. M., y McLaughlin, D. J. 2001. Urediniomycetes. *In* The mycota: systematics and evolution. Vol. VII Part B. Edited by D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin and P.A. Lemke. Springer Verlag, Berlin. pp. 37-56.

CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN DE LA ROYA DEL TEJOCOTE (*Crataegus* spp.) - ENEBRO (*Juniperus* spp.) EN EL EJE NEOVOLCÁNICO, PUE.

Edgar Humberto Nieto López, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

En México se produjeron 3,675 t de tejocote en el año 2012, siendo el estado de Puebla el principal productor. Desafortunadamente en el año 2012 una roya en tejocote causó severos daños. En el Eje Neovolcánico de Puebla, con el fin de identificar la roya, plantaciones de tejocote (*Crataegus* spp.) y enebros (*Juniperus* spp.) de la región circundante, fueron seleccionados como sitios de muestreo. Para la identificación de la roya se utilizó la clave de Kern y el protocolo de diagnóstico para *Gymnosporangium* spp. (no Europea) y se complementó con la ornamentación de la superficie de las estructuras con ayuda de microscopía electrónica de barrido con ayuda de la clasificación de Lee y Kakishima, posteriormente se hizo un análisis molecular y filogenético. El tejocote fue identificado como *Crataegus* spp., con 2 accesiones diferentes, una variedad *Chapeado* y otra tipo criollo, y el enebro fue identificado como *Juniperus deppeana* Steud. Se presentó más de una especie de *Gymnosporangium*, *G. clavipes* la cual se encontró su fase ecial en frutos de *Crataegus* spp. y de la cual no se encontró su fase telial, y otra de la cual se encontró su fase ecial en hojas de *Crataegus* spp. y su fase telial en árboles de *J. deppeana* Steud y que correspondió a *G. globosum*, sin embargo molecularmente no correspondió a ninguna especie, debido a que no se asemeja a ninguna especie en el NCBI con el gen 28S y 18S. En la prueba de asociación *in vitro* e *in vivo* no se obtuvieron resultados positivos en la inoculación de *Crataegus* spp. a partir de basidiosporas de agallas provenientes de *J. deppeana* Steud, sin embargo no se puede descartar la correlación, más bien falta mejorar las metodologías de inoculación.

Palabras clave: ecias, agallas teliales, *Gymnosporangium clavipes*, *Gymnosporangium globosum* y pruebas de asociación.

**ETIOLOGY OF TEJOCOTE (*Crataegus* spp.) - JUNIPER (*Juniperus* spp.) RUST
ON TRANS MEXICAN NEOVOLCANIC BELT, PUE.**

Edgar Humberto Nieto López, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

3,675 t of tejocote were produced in Mexico in 2012, the state of Puebla being the main producer. Unfortunately in 2012 year a fungus rust caused severe damage in tejocote. In the Trans-Mexican Volcanic Belt in Puebla State, with the aim to identify the rust, tejocote (*Crataegus* spp.) plantations and Juniper (*Juniperus* spp.) were selected as sampling sites in the Trans-Mexican Volcanic Belt, Puebla and surrounding areas. Rust was identified using Kern's Key and the diagnostic protocol for *Gymnosporangium* spp. (non European). This was complemented by the ornamentation of the surface structures using scanning electron microscopy and Lee and Kakishima's classification. Molecular and phylogenetic analyses were then carried out. Tejocote was identified as *Crataegus* spp., using 2 different accessions, one *Chapeado* and another criollo type. The Juniper was identified as *Juniperus deppeana* Steud, more than one species of *Gymnosporangium*, *G. clavipes* were present and were confirmed molecularly. These were found in the aecial phase in *Crataegus* spp. fruits and not in the telial phase. The other species, *G. globosum* was found in the aecial phase in *Crataegus* spp. leaves and in the telial phase in *J. deppeana* Steud trees. However, it did not correspond to any species for it did not match any NCBI sample with the genes 18S and 28S. *In vitro* and *in vivo* association tests were not positive in inoculating *Crataegus* spp. from basidiospores from galls in *J. deppeana* Steud, however, the correlation cannot be discarded as the inoculation methodologies need to be improved.

Key words: aecia, telial galls, *Gymnosporangium clavipes*, *Gymnosporangium globosum* and association tests.

INTRODUCCIÓN

En México las siguientes especies de *Gymnosporangium* se tienen reportadas, como parte de las medidas fitosanitarias y directrices para la movilización de árboles frutales de hueso, pepita, y vid dentro de un país miembro de la NAPPO (North American Plant Protection Organization): *Gymnosporangium clavipes* Cke. & Pk. “Roya del membrillo” en manzana (*Malus* spp.) y pera (*Pyrus* spp.), presente sólo en algunas áreas; *Gymnosporangium globosum* Farl. “Roya del tejocote americano” en manzana (*Malus* spp.) y pera (*Pyrus* spp.), presente sólo en algunas áreas; *Gymnosporangium kernianum* Bethel. “Roya de la pera de Kern” en pera (*Pyrus* spp.), presente sólo en algunas áreas y *Gymnosporangium nelsonii* Arth. “Roya de la pera de las montañas rocosas” en pera (*Pyrus* spp.) presente solo en algunas áreas (Jones y Aldwinckle, 1990; Anónimo, 2009). En el oriente del Estado de México, una roya similar *G. exigum* Kern afectó severamente a plantaciones de *Cupressus lusitánica* var. *lindleyi*, causó la muerte de ramas y puntas, y provocó un deterioro general de plantaciones completas, en éstas, el hospedante alterno, *Amelanchier denticulata*, fue abundante. En el Estado de México, en los municipios de Texcoco y Ozumba y en Michoacán *G. globosum* es de importancia económica: causa considerables daños al tejocote (*Crataegus mexicana*) y a los juníperus jóvenes, en varios estados del centro del país se presentan infecciones de ligeras a moderadas (Cibrián *et al.*, 2007). Es importante identificar la especie involucrada en la roya del tejocote (*Crataegus* spp.) - enebro (*Juniperus* spp.) en el Eje Neovolcánico, Pue. para en base a esto conocer su biología y proponer alternativas de manejo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Identificar morfo-molecularmente la roya del tejocote.
- b) Realizar pruebas de asociación en tejocote.
- c) Identificación de los hospedantes alternos.

HIPÓTESIS

- a) *Gymnosporangium globosum* Farl. es el agente causal de la roya del tejocote- enebro.
- b) Los hospedantes alternos son árboles de enebro (*Juniperus* spp.) y ciprés (*Cupressus* spp.)

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en plantaciones de tejocote ubicadas en la región del Izta-Popo comprendida entre Huejotzingo y Chiautzingo (Pue.), así como en zonas marginales de la región comprendida desde Calpulalpan (Tlax) a San Felipe Teotlalcingo (Pue.). En el área de estudio de **Huejotzingo, Chiautzingo y Teotlalcingo** se puede identificar el tipo de clima según la clasificación climática de Köppen modificado por García (1998) y ecosistemas en función de la altitud; por debajo de los 2,900 msnm, el clima predominante corresponde al tipo **templado subhúmedo con lluvias en verano C (w2)**, los suelos corresponden a los regosoles, y andosoles (Anónimo, 2004); entre los 2,500 y 4,000 msnm, se tienen bosques de pinos (*Pinus* sp.), de pinos y encinos (*Quercus* sp.), oyamel (*Abies* sp.) y pastizales amacollados (Anónimo, 2004); arriba de los 4,000 msnm hay un ecosistema de tundra formado por pastizales alpinos de gramíneas amacolladas. El clima de **Calpulalpan** según la clasificación climática de Köppen (McKnight *et al.*, 2000) es **templado con invierno seco Cwb (verano suave)**, los suelos corresponden a los cambisoles, fluvisoles, litosoles, andosoles y regosoles (Anónimo, 2004). La vegetación está compuesta principalmente por bosques de pinos como *Pinus montezumae*, *P. pseudostrobus* y *P. teocote* y oyamel (*Abies* sp.), a menudo asociado con encinos como *Quercus crassipes*, *Q. laurina*, y *Q. rugosa*. A menor asnm, se encuentran vestigios de matorral xerófito, con individuos aislados de sabino (*Juniperus deppeana*) (Anónimo, 2004).

Colecta de material

Para cumplir con los objetivos se seleccionaron en total 15 sitios de muestreo. Para estudiar la **fase ecial** se seleccionaron cuatro sitios de muestreo, representados cada uno por una plantación de tejocote de dos materiales diferentes (Cuadro 1). Para estudiar la **fase telial** previamente se buscaron agallas en cedros (*Cupressus* spp.) del Parque Nacional del Iztaccihuatl y enebros (*Juniperus* spp.) de la región circundante a la plantaciones de tejocote, posteriormente en base a lo encontrado se seleccionaron 11 sitios

de muestreo, representados cada uno por un árbol de enebro (Cuadro 1); el muestreo se llevó a cabo para la fase ecial una vez que se encontraron los primeros síntomas, de abril a noviembre de 2012 y 2013, y para la fase telial una vez que se encontraron las primeras agallas, de julio a noviembre de 2012 y de enero a noviembre de 2013. El material fue colectado en bolsas de papel y de glassin, debidamente etiquetado.

Cuadro 1. Sitios de muestreo para la fase fase telial en el bosque de enebros (*Juniperus* spp.) y ecial en plantaciones de tejocote (*Crataegus* spp.) en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Sitios de muestreo	Hospedante de fase telial (Cupressaceae)	Hospedante de fase ecial (Rosaceae)	Localidad	Coordenadas (Latitud: Longitud)	Altitud (asnm)
1	J1	---	Teotlalcingo	19°14'28.86"N; 98°32'15.3"O	2,543
2	J2-1*	---	Teotlalcingo	19°14'29.16"N; 98°32'16.14"O	2,543
3	J2-2	---	Teotlalcingo	19°14'29.16"N; 98°32'16.14"O	2,543
4	J3-1	---	Calpulalpan	19°33'44.88"N; 98°40'58.74"O	2,837
5	J3-2	---	Calpulalpan	19°33'39.96"N; 98°41'32.94"O	2,811
6	J4	---	Nanacamilpa	19°31'0.12"N; 98°29'54.84"O	2,656
7	J5	---	Ixtacuixtla de Mariano Matamoros	19°26'55.50"N; 98°30'27.18"O	2,643
8	J6	---	Ixtacuixtla de Mariano Matamoros	19°26'53.94"N; 98°30'26.64"O	2,641
9	J7	---	Teotlalcingo	19°14'29.28"N; 98°32'5.34"O	2,532
10	J8	---	Teotlalcingo	19°14'28.92"N; 98°32'5.1"O	2,532
11	J9	---	Teotlalcingo	19°14'28.5"N; 98°32'4.98"O	2,532
12	---	El monte/Fruto (P1F)*z	Atzompa, Chiautzingo	19°11'3.60"N; 98°32'44.22"O	2,868
13	---	Paso de Cura/Fruto (P2F) ^z	Atzompa, Chiautzingo	19°12'4.11"N; 98°30'26.25"O	2,723
14	---	Huejotzingo/Fruto (P3F) ^z	Huejotzingo	19° 8'24.58"N; 98°25'25.28"O	2,470
15	---	Las Ocotera/Hoja (P4H)*	El verde	19°16'18.26"N; 98°32'43.34"O	2,523

* Muestras utilizadas para MEB; ^z Plantaciones utilizadas en el capítulo II.

J: enebro; P: plantación; F: fruto; H: hoja.

Conservación de material

Parte del material tanto de la fase telial como eicial del año 2012 y 2013 fue conservado a -80° C, otra parte a -10° C y otra parte fue deshidratado en estufa a 35 ° C, en laboratorios del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados del Campus Montecillo.

Identificación de hospedantes

Muestras de ramas pequeñas con gálbulos de árboles de enebro (*Juniperus* spp.) donde se encontraron agallas teliales, fueron prensadas e identificadas mediante la clave de Martínez (1963) por el M.C. Ricardo Vega Muñoz responsable del herbario “Hortorio Chapa” del Colegio de Postgraduados y por el Dr. Enrique Guízar Nolasco del área de Silvicultura y Ecología de la División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo. Muestras de ramas pequeñas y flores de tejocote (*Crataegus* spp.) donde fueron localizadas las ecias, fueron prensadas e identificadas mediante la clave de Phipps (1983). La determinación fue realizada por el Dr. Raúl Nieto Angel del área de Fisiología Vegetal del Departamento de Fitotecnia y responsable del Banco de Germoplasma de Tejocote, de la Universidad Autónoma Chapingo.

En busca de otra manera de preservar el inóculo viable a partir de teliosporas, y dado que existen royas que actualmente se están cultivando en medio artificial y sobre todo que Cutter (1959) obtuvo resultado positivo en el aislamiento de *G. juniperi-virginianae* Schw con cultivo de tejidos en medio de Gautheret, y González (1980) obtuvo resultado negativo en el aislamiento de *Gymnosporangium* sp. con cultivos de tejidos en medio de Gautheret, y Murashige y Skoog, es que se optó por hacer pruebas para el aislamiento de la roya en estudio, sin utilizar cultivo de tejidos.

Aislamiento

Se cortaron secciones de 0.5 x 1.5 cm de agallas en invernación que aún no presentaban los cuernos teliospóricos. Las muestras se desinfestaron en diversos tratamientos como lo menciona Cutter (1959) y González (1980) y a diferentes tiempos de inmersión, en hipoclorito de sodio al 6 %, alcohol al 70 % y peróxido de hidrogeno al 3 % (Cuadro 2), y se enjuagaron con agua destilada estéril entre cada uno de los desinfestantes, se secaron y en condiciones asépticas se colocaron 5 piezas por caja Petri

con medio de cultivo infusión de *Juniperus* spp.-dextrosa-agar (JDA). Las cajas se incubaron durante 48 h bajo luz negra y U.V. continua a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Las colonias fungosas con asociación constante fueron transferidas a nuevas cajas con JDA y se purificaron mediante punta de hifa e identificaron con la clave de Barnett y Hunter (2006).

Cuadro 2. Tratamientos para el aislamiento a partir de telias de enebro (*Juniperus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. en el año 2012.

Tratamiento	Desinfectante / Tiempo (min)
1	Hipoclorito de sodio 6 %/3 + Alcohol 70 %/4
2	Hipoclorito de sodio 6 %/3 + Alcohol 70 %/2
3	Hipoclorito de sodio 6 %/3
4	Peróxido de hidrogeno 3 %/2

Identificación morfológica de la roya

La mayoría de las claves de identificación no se basan únicamente en un solo estado de las esporas y frecuentemente se fundamentan en la telia, así, si no se dispone de los estados de las esporas necesarios para hacer una identificación, el problema es difícil (León-Gallegos y Cummins, 1981). Las definiciones genéricas, enfatizan más las características de las teliosporas que las características eciales o uredinales (León-Gallegos y Cummins, 1981). Las muestras de plantas con estados eciales son probablemente los mas difíciles de identificar debido a que las eciosporas tienden a ser muy similares y las descripciones frecuentemente no son detalladas, especimenes con estados urediales tiene una mayor diversidad y en consecuencia son más fáciles de identificar que los estados eciales (León-Gallegos y Cummins, 1981).

Muestras de frutos y hojas de dos materiales diferentes de tejocote fueron depositados en la colección de hongos del herbario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB).

Fase telial

Identificación del género

Para su identificación se utilizó la clave para los géneros de uredinales de México adaptado por Cummins, “Illustrated Genera of Rust Fungi” (1959).

Identificación de la especie

Para su identificación se utilizó la clave de “A revised Taxonomic Account of *Gymnosporangium* (Kern, 1973) y mediante el protocolo de diagnóstico para *Gymnosporangium* spp. (no Europea) (Anónimo, 2006). **1)** Se cuantificó el porcentaje de agallas tipo fusiforme y globosa presentes en *Juniperus* spp. en cada sitio de muestreo. **2)** Se midió el largo de la telia de las agallas de cada tipo por sitio de muestreo con ayuda de un vernier digital Mitutoyo[®]. **3)** Se hicieron montajes temporales con agua, y permanentes con glicerina deshidrata de las teliosporas provenientes de la telia de estos tipos de agallas. **4)** 200 teliosporas fueron medidas; largo, ancho y largo del pedicelo con ayuda del microscopio de luz y el software Motic Images Plus 2.0[®], en base a ésta caracterización fue posible su identificación.

Fase ecial

Para su identificación se utilizó la clave y el protocolo mencionado anteriormente, se utilizaron muestras de frutos y hojas de ambos materiales de *Crataegus* spp. de cada sitio de muestreo. **1)** Se midió la longitud y ancho de las ecias mediante el software Image Tool 3.0[®] con fotografías tomadas con cámara digital Sony cyber-shot DSC-WX80[®]. **2)** Al ecio se le realizaron cortes longitudinales y junto con las eciosporas se hicieron montajes temporales con agua y permanentes con glicerina deshidrata. **3)** 200 células del peridio y 200 eciosporas fueron medidas; largo, ancho y espesor de la pared, para el caso de las células del peridio se caracterizó la ornamentación de la superficie de las células peridiales como lo menciona Kern (1973).

En todas las mediciones se obtuvo siempre la Desviación Estándar (DE) para conocer la dispersión de los datos medidos con respecto al valor promedio, y en caso de que éste valor fuera mayor a 4, se tuvieron que repetir las mediciones.

Microscopía Electrónica de barrido

Una muestra representativa de **teliosporas** provenientes de la telia de las agallas de *Juniperus* spp., y **de ecias y eciosporas**, de muestras provenientes de frutos y hojas de *Crataegus* spp. (J2-1*, P1F* y P4H*; Cuadro 1) fueron observadas con ayuda del microscopio electrónico de barrido (MEB). Las teliosporas, ecias y eciosporas fueron observadas de la pared externa, y en caso específico de las ecias también se observó la pared lateral e interna de las células peridiales; tanto ecias como eciosporas fueron caracterizadas en base a la clasificación de su ornamentación (Lee y Kakishima, 1999ab). Los especímenes previo a su observación fueron fijados con cintas de doble cara en el portaobjetos, y fueron recubiertos con una ligera capa de oro utilizando una evaporadora de plasma para posteriormente ser observados en un Microscopio Electrónico de Barrido Philips XL 30 ESEM® con un intervalo de 2.5 -20 Kv.

Identificación molecular

Se utilizaron en total 23 muestras conservadas a 4 ° C (Pady y Kramer, 1971) y a -20 ° C (Aldwinckle, 1977) de las cuales 18 muestras pertenecían a la **fase telial** y de éstas 11 muestras provenían de agallas en invernación (tejido parenquimatoso del hongo sobre el hospedante) y siete muestras provenían de telias de las agallas b) 5 muestras de la **fase ecial** conformada por ecias y eciosporas de ambos materiales, fueron colectadas por separado para los dos materiales en tubos de microcentrifuga de 2.0 mL (Cuadro 3).

Cuadro 3. Muestras de enebro (*Juniperus* spp.) y tejocote (*Crataegus* spp.) provenientes del Eje Neovolcánico, Pue. utilizadas para la identificación molecular durante 2012-2013.

Muestra	Agalla en invernación tipo Globosa (G)	Muestra	Masa de teliosporas germinadas tipo Globosa (G)	Muestra	Plantación/Tejido/ Material
1	J1G1	12	J2G1		
2	J1G2	13	J2G2	19	El monte / Fruto / Criollo (P1FCr)
3	J2G1	14	J2G3		
4	J2G2	15	J5G1	20	El monte/ Fruto/ <i>Chapeado</i> (P1FCh)
5	J2G3	16	J5G2	21	Paso de Cura/ Fruto/ <i>Chapeado</i> (P2FCh)
6	J4G1	17	J6G1	22	La Ocotera/ Hoja/ <i>Chapeado</i> (P4HCh1)
7	J4G2	18	J6G2	23	La Ocotera/ Hoja/ <i>Chapeado</i> (P4HCh2)
8	J5G1	--	--	--	--
9	J5G2	--	--	--	--
10	J6G1	--	--	--	--
11	J6G2	--	--	--	--

J: *Juniperus*; G: Globosa; P: Plantación; F: Fruto; H: Hoja.

Extracción de DNA

La extracción de ácidos nucleicos se realizó en el laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

El DNA se extrajo a partir de las estructuras colectadas en campo de acuerdo a la metodología modificada del CTAB al 2% descrita por Doyle y Doyle (1990). La

concentración de DNA y las calidades (260/280 y 260/230) se determinaron mediante espectrofotometría con un NANODROP 2000[®] (Thermo SCIENTIFIC, USA), la integridad del DNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

Amplificación y secuenciación del loci ribosomal

Mediante PCR se amplificaron los locus 18S y 28S del rDNA (Aime, 2006). Para la amplificación del 18S rDNA se utilizaron los iniciadores Rust18S-R y NS1 (White *et al.* 1990) que amplifican porciones completas del NSU (nuclear small subunit, por sus siglas en inglés). Para la amplificación del 28S rDNA se utilizaron el par de iniciadores D1/D2 (Van der Auwera *et al.*, 1994) y los iniciadores Rust2inv basado en el complemento reverso de Rust2 (Kropp *et al.*, 1997) y el iniciador LR6 reverse (Vilgalys y Hester, 1990), ambos pares amplificaron porciones de ITS2 (Espacio transcrito interno) y NLSU (nuclear large subunit, por sus siglas en inglés) (Cuadro 4).

EL DNA se amplificó utilizando la siguiente mezcla de reacción: volumen final 25 μ L (13.1 μ L de Agua HPLC, 5 μ L solución buffer 5X colorless Go *Taq* (Promega, USA), 1 μ L dNTPs de 0.2 mM, 2 μ L de cada uno de los iniciadores a 10 μ mol, 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Promega, USA) y 100 nanogramos de DNA de la muestra. Se utilizó un termociclador modelo Thermal Cycler C-1000 Touch (Biorad, USA). Los ciclos de PCR se describen en el Cuadro 4. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, el que se tiñó con Gel Red (Biotium, USA), las bandas se visualizaron en un transiluminador Infinity 1000/26 MX Xpress (Vilber Lourmat, Germany). Los productos amplificados se limpiaron con ExoSap-IT (Affimetrix, USA).

La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el Big Dye Terminator v 3.0 (Applied Biosystems, USA) en un volumen total de 20 μ L: 4.0 μ L (2.5X) de Ready Reaction Premix, 2.0 μ L (5X) de Big Dye Sequencing Buffer, 4.0 μ M de cada iniciador y 2.0 μ L de DNA templado. La secuenciación se realizó en ambas direcciones en un Genetic Analyzer modelo 3130 (Applied Biosystems, USA), las condiciones de secuenciación consistieron de una desnaturalización inicial de 95 °C / 1 min, seguido por 35 ciclos/96 °C/10 s, 50 °C/5 s y 60 °C/4 min.

Cuadro 4. Relación de iniciadores utilizados para la amplificación del loci ribosomal y las condiciones de PCR.

Iniciadores	Nucleótidos	PCR
D1 Forward	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA -3'	Desnaturalización inicial 94°C /3 min; 30 ciclos: Desnaturalización 94° C/30 s Alineamiento a 55° C/30 s
D2 Reverse	5'-TTGGTCCGTGTTTCAAGACG -3'	
Rust2inv	5'-GATGAAGAACACAGTGAAA-3'	Desnaturalización inicial 94°C /3 min; 30 ciclos: Desnaturalización 94° C/30 s Alineamiento a 57° C/1 min
LR6 Reverse	5'-CGCCAGTTCTGCTTACC-3	
Rust18S-F	5'-ACCTTGTTACGACTTTTACTTC-3'	Extensión 72 ° C/1 min; Extensión final a 72 °/10 min
NS1-R	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el software BioEdit[®] para la obtención de secuencias consenso, las que se compararon con la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2014) (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Posteriormente se alinearon mediante la opción BLASTNucleotide (Basic Local Alignment Search) (Zhang *et al.*, 2000).

Para el análisis evolutivo, todas las secuencias de consenso fueron compilados en un solo archivo (formato FASTA) para construir un alineamiento de secuencia de nucleótidos con el modo de perfil de ClustalW 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994). La reconstrucción filogenética fue realizada con 10 y 9 secuencias usando el método estadístico de Maximum Parsimony (MP) incluida en el software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Para determinar los valores de confianza para los clados dentro del árbol resultante, un análisis de arranque se evaluó con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). El conjunto de subdatos fue realizado mediante close-neighbour interchange (CNI) en los

árboles aleatoriamente, con la opción de búsqueda MP (nivel = 1) y el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones), y las brechas de datos faltantes fueron consideradas como una supresión completa. La secuencia de la roya *Puccinia lagenophorae* (Núm. de accession FJ669239) fue designado como fuera de grupo para la realización del árbol filogenético.

Pruebas de asociación

Dos tipos de pruebas se realizaron con el fin de comprobar la relación que existe entre la roya del tejocote (*Crataegus* spp.) y enebro (*Juniperus* spp.); primero se realizó la prueba *in vivo* en plantas de tejocote a partir de la fase telial, pero como no se obtuvieron resultados positivos, después se optó por realizar la prueba *in vitro* en hojas de tejocote.

In vivo

Siete plantas de tejocote fueron inoculadas y 3 fueron testigos en Septiembre de 2012 nombrados como **(1)**, ya que no se obtuvieron resultados positivos, la prueba se repitió con diferencias en la preparación del inóculo y los métodos de inoculación. Varias inoculaciones de 7 plantas de tejocote y 3 como testigos se llevaron a cabo de Marzo a Agosto de 2013, nombrados como **(2)**. El procedimiento de ambas pruebas fue de la siguiente manera:

- a) **Preparación del inóculo a partir de la fase telial:** **(1)** Cuatro telias sin germinar provenientes de agallas fueron colocados en tubos de microcentrifuga con agua estéril para inducir su germinación, y por lo tanto obtener la producción de basidiosporas, dejándolos bajo inmersión a diferentes tratamientos (tiempos de 30 min y 24 h), con dos tratamientos más; el tubo de microcentrifuga abierto /cerrado a 20 °C en condiciones de laboratorio con fotoperiodo 12:12 (Cuadro 5). **(2)** Cuatro telias, para un tratamiento sin germinar y otro tratamiento como germinados en el campo, fueron colocados en tubos de microcentrifuga cerrados con agua estéril para un tratamiento y otros fueron previamente triturados para otro tratamiento como lo menciona González (1980), y tratados igual que el proceso anterior más un tratamiento más con tiempo de inmersión de 48 h y un tratamiento más a 24 °C en incubadora con fotoperiodo 0:24 (Cuadro 5).

Posteriormente se evaluaron los tratamientos con cámara de Neubauer y el tratamiento en el que hubo mayor producción de basidiosporas fue preseleccionado como inóculo (Cuadro 5). Durante las inoculaciones se observó el crecimiento de bacterias, y como las pruebas de asociación fueron negativas, con el tratamiento preseleccionado se experimentó nuevamente adicionando al agua estéril y diversas sustancias a fin de aminorar o retardar el crecimiento de bacterias. Se utilizó inóculo recién colectado bajo la misma metodología para las últimas inoculaciones que se llevaron a cabo en cámara de crecimiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Métodos de obtención de inóculo a partir de germinación de teliosporas de muestras de enebro (*Juniperus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013 para identificar el mejor método a ser utilizado en las pruebas de asociación.

No.	Tratamientos	Telia en inmersión 30 min en eppendorf Abierto/Cerrado	Telia en inmersión 24 h en eppendorf Abierto/Cerrado	Condiciones Ambientales	Fotoperiodo
		Material recién colectado y conservado	Material recién colectado y conservado		
1	Agua Estéril(AE)	Con y sin Trituración	Con y sin Trituración	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24
2	AE+ 2 gotas/l	Con y sin	Con y sin	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24
	Tween 20®(AET)	Trituración	Trituración		
	AET+ 4 gotas Ac.	Con y sin	Con y sin	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24
	Láctico (AETA)	Trituración	Trituración		
3	AET + Estreptomina (AETS)	Con y sin Trituración	Con y sin Trituración	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24
4	AET+Surfactante Inex® (AETSu)	Con y sin Trituración	Con y sin Trituración	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24

b) **Material vegetal: (1)** Se utilizaron doce plantas de tejocote del material *Chapeado* con seis meses de injertadas, en etapa de fructificación con frutos de tamaño mediano

y (2) 30 plantas de tejocote del material *Chapeado* con mes y medio de injertada en etapa de floración, amarre de fruto y fructificación. El material era procedente de un vivero certificado por SENASICA, que al ser inspeccionado minuciosamente no presentaba signos o síntomas de la enfermedad.

- c) **Tratamientos:** (1) En 2012 se establecieron tres tratamientos (4 plantas/tratamiento), el tratamiento 1 (T1) en flores y el tratamiento 2 (T2) en frutos, ambos en una misma planta. El tratamiento 3 (T3) fue el testigo en flores y en frutos (Cuadro 6). (2) En 2013 se establecieron 3 tratamientos (3 plantas/tratamiento). Los tratamientos T1 y T2 estuvieron representados por plantas independientes, de distinto tejido vegetal. El tratamiento T3 fue el testigo (Ts) (Cuadro 6). Ninguno de los tratamientos en ambos años, previamente a ser inoculadas, tuvieron medidas profilácticas.
- d) **Inoculación:** (1) **En invernadero dirigida a frutos** (Figura 1), el T1 fue realizado a partir de aspersion de una suspensión de 30 mL con Tween 20[®] 1×10^3 basidiosporas mL⁻¹ (SB), el T2 fue otra forma de inoculación, colocando directamente la masa de teliosporas germinadas (MTG) en los frutos. (2) **En invernadero** se realizaron 4 repeticiones en diferentes intervalos de tiempo a flores, frutos en amarre y frutos en fructificación, el T1 fue realizada a partir de aspersion de SB 30 mL con Tween 20[®] 1×10^5 basidiosporas mL⁻¹ únicamente en la primera inoculación, en las subsecuentes inoculaciones sólo se verificaba que hubiese basidiosporas por cuestiones de tiempo, el T2 fue colocando directamente MTG al tejido (Cuadro 6). **En cámara de crecimiento** con humidificador, se realizaron 4 repeticiones en diferentes intervalos de tiempo, fue dirigida a flores, racimos de frutos en amarre y fructificación, el T1 fue realizado con SB de concentración desconocida, el T2 fue con la MTG, cabe aclarar que en la última inoculación bajo la misma metodología se utilizó inóculo recién colectado.

- e) **Cámara húmeda:** Todos los tratamientos fueron cubiertos cuidadosamente con bolsas de plástico transparente grandes para que no se moviera el inóculo, y fueron retiradas después de 24 h (1) y después de 24 y 48 h (2) (Cuadro 6).
- f) **Condiciones ambientales:** (1) No fue posible cuantificar la humedad relativa y la temperatura, sin embargo las condiciones de incubación fueron días nublados, (2) las condiciones ambientales prevalentes en **invernadero** fueron temperatura media de 22.6 °C y humedad relativa media del 66.23 %, y en **cámaras controladas** de 21.15° C y 84.5 % respectivamente.
- g) **Evaluación:** (1) y (2). Los tratamientos fueron evaluados cada 2 días una vez retirada la cámara húmeda, se inspeccionaron racimos de fructificación y hojas (debido al posible escurrimiento) a fin de encontrar signos y síntomas; una vez localizado un posible signo, la planta fue marcada, fotografiada y evaluada en su evolución, después de 7 evaluaciones los racimos de fructificación y hojas fueron observados en el estereoscopio a fin de encontrar picnios.

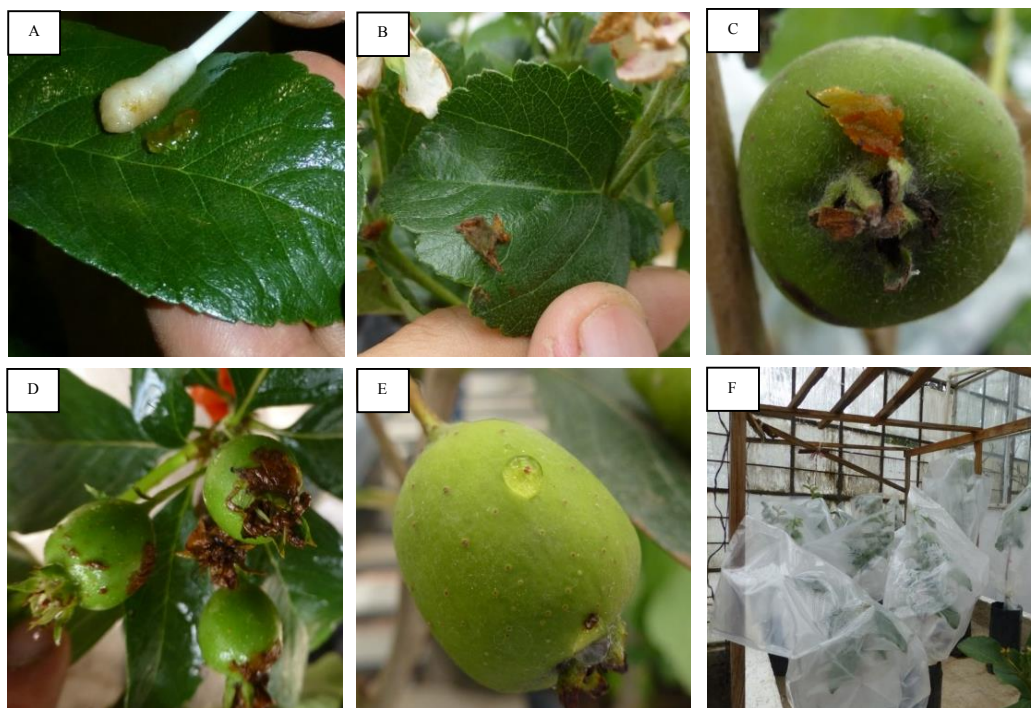


Figura 1. Métodos de inoculación. A) Frotis de Masa de Teliosporas Germinadas en hoja. B) Masa de Teliosporas Germinadas en hoja. C) Masa de Teliosporas Germinadas en frutos. D) Frotis de Masa de Teliosporas Germinadas en frutos. E) Suspensión de Basidiosporas en frutos. F) Cámara húmeda.

In vitro.

Dieciséis cajas petri con hojas de tejocote fueron inoculadas y otras ocho hojas sin inocular fueron testigos bajo la metodología de Rebollar (2009) en noviembre de 2013; este procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) **Preparación del inóculo:** Un número variable de masas de teliosporas germinadas provenientes de 4 telias para un tratamiento y sin germinar para otro tratamiento, conservados de igual manera que los ensayos anteriores, fueron colocados en tubos de microcentrifuga cerrados, dejándolos bajo inmersión 48 h en agua estéril con 2 gotas/L Tween 20[®] más Estreptomicina (AETS), a 20 ° C en condiciones de laboratorio y con fotoperiodo 12:12 (Cuadro 7).

Cuadro 6. Relación de inoculaciones *in vivo* a partir de telias de enebro (*Juniperus spp.*) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Año/ Condiciones	Núm y fecha de Inoculaciones	Plantas / tejido inoculado	Trats	Reps	Inóculo
Invernadero					
2012	I 03/09	Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	II 27/05*	Flores y Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	II 12/06**	Flores y Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	III 25/06*	Flores y Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	IV 03/07**	Flores y Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	V 06/07*	Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	VI 15/07/2013 **	Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Telia germinada
2013	VII 15/07*	Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	I 15/07**	Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	II 01/08*	Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	III 05/08**	Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas
2013	IV 05/08**	Frutos	1 2 3	3	Suspensión de basidiosporas y Masa de teliosporas germinadas

b) Material vegetal: (1) Hojas pequeñas con peciolo y provenientes de brotes jóvenes de plantas de tejocote del mismo vivero, y de la variedad *Chapeado* con un año de injertada, que al ser inspeccionadas no presentaron signos o síntomas de la enfermedad, fueron lavadas, desinfectadas al 1 % de hipoclorito de sodio/2 min y enjuagadas con agua destilada estéril.

- c) Tratamientos:** Se preparó medio al 0.5 % (p/v) de agua-agar para 24 cajas petri de 8 cm de diámetro, se establecieron 3 tratamientos (8 cajas petri/tratamiento), el T1 fue inoculado con SB de concentración desconocida, el T2 fue inoculado colocando la MTG, el T3 fue el testigo (Ts) y se asperjó con agua destilada estéril (Cuadro 7), cada unidad experimental estuvo representada por 2 hojas colocadas de tal manera que quedasen expuestas, una por el haz y la otra por el envés, la tapa de la caja petri funcionó como si fuera la base y sobre la misma se colocó la hoja, posteriormente el peciolo fue cubierto con algodón estéril humedecido a manera que quedará adherido por la misma a la base.
- d) Inoculación:** El T1 SB fue inoculado mediante aspersión con una concentración desconocida con un micro atomizador que asperjo gotas de tamaño pequeño sobre la superficie de la hoja, el T2 fue inoculado colocando la MTG y distribuyéndola sobre toda la superficie de la hoja con ayuda de un palillo estéril, el Ts fue asperjado con un micro atomizador.
- e) Cámara húmeda:** La base que contenía el medio funcionó como tapa y una vez inoculado, se sobrepuso a la base con precaución de no mover las hojas, posteriormente las cajas fueron selladas con parafilm®.
- f) Condiciones ambientales:** El experimento se dividió en 2 tratamientos; de tal forma que 4 repeticiones/tratamiento fueron colocados en una incubadora a 15 °C con fotoperíodo 12:12 y los otros 4 tratamientos a 20 °C con el mismo fotoperíodo (Cuadro 7).
- g) Evaluación: (1) y (2).** Los tratamientos fueron evaluados cada 2 días, la evaluación consistió en la inspección ocular y bajo la observación con el estereoscopio a fin de encontrar picnios, una vez que se observó el crecimiento de algún hongo, se abrió la caja y se realizaron preparaciones permanentes de este tipo de crecimiento y se inspeccionó minuciosamente el resto de la hoja, mientras que las hojas en los que se apreciaban síntomas similares al de la enfermedad, fueron marcados y se continuó con su evaluación hasta finalizar las evaluaciones o hasta encontrar algún tipo de crecimiento fúngico distinto al buscado, después de concluidas las evaluaciones, las unidades experimentales fueron abiertas para mejorar su inspección. Se realizaron cortes para el caso de estructuras

que causaron confusión en el diagnóstico. Después de 2 evaluaciones, al parafilm® de cada caja se le realizaron cuatro incisiones para provocar el intercambio gaseoso.

Cuadro 7. Relación de inoculaciones *in vitro* a partir de telias de muestras enebro (*Juniperus spp.*) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Año	Num y fecha de Inoculaciones	Trats	15 ° C	20 ° C
			Fotoperiodo 12:12	Fotoperiodo 12:12
			Reps	Reps
2013	I 15/11/2013	Suspensión de basidiosporas y Telia germinada	8	8
2013	II 20/06/2013	Suspensión de basidiosporas y Telia germinada	8	8

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de hospedantes

Los árboles de enebro de todos los sitios de muestreo fueron identificados como *Juniperus deppeana* Steud tipo hembra, a simple vista se apreciaban diferentes debido a que al momento de la colecta se encontraban en diferentes etapas fenológicas, en función de los sitios de muestreo donde fueron colectadas, así que hubo la necesidad de colectar varias veces a fin de encontrar gábulos maduros. La presencia de agallas teliales unicamente en árboles tipo hembra se puede deber a que las feminas en plantas dioicas suelen invertir más recursos en la reproducción que los árboles tipo masculino, por tanto el gasto de energía de los árboles tipo hembra en la reproducción tienen diferentes maneras para compensarse e incluyen estructuras reproductivas fotosintéticas, retraso en la reproducción, reabsorción de nutrientes de órganos senescentes, módulo de especialización y alta tasa fotosintética (Obeso, 2002), es por ésto, que los árboles tipo masculino tienden a ser más tolerantes a la sequía y tienen un uso más conservador de agua que las hembras cuando hay escasez del vital líquido o en condiciones de baja temperatura (Chen *et al.*, 2010), sin embargo la susceptibilidad a este tipo de enfermedades con respecto a los árboles tipo macho, no ha sido estudiado.

Los árboles de tejocote de todos los sitios de muestreo fueron identificados como *Crataegus* spp., una accesión de cada sitio de muestreo perteneció a la variedad *Chapeado* y la otra no correspondió específicamente a alguna, por lo cual se le consideró como tipo criollo.

Los árboles de ciprés (*Cupressus* spp.) del Parque Nacional del Iztaccíhuatl no fueron identificados debido a que no se encontró ningún tipo de agalla.

Aislamiento de hongos asociados

Los aislamientos que correspondieron al hipoclorito de sodio 6 %/3 min + Alcohol 70 %/4 min correspondieron a *Eppicoccum* sp. con 26.47 % y a *Lasiodiplodia* sp. con 5.88 %, hipoclorito de sodio 6 %/3 min + Alcohol 70 %/2 min correspondieron a *Lasiodiplodia* sp. con 82.35%; hipoclorito de sodio 6 %/3 min correspondieron a correspondieron a *Eppicoccum* sp. con 54.04 % y 16.21 % a *Alternaria* sp; peróxido de hidrogeno al 3 %/2 min *Eppicoccum* sp. con 81.57 % de y 18.42 % a *Alternaria* sp. El aislamiento inicial causó dificultades para caracterizar las colonias culturalmente debido a la coloración naranja del medio donde fueron colocados los segmentos, así que se transfirieron en función de la velocidad de crecimiento. Por lo tanto, el aislamiento de *Gymnosporangium* fue negativo, coincide con lo reportado por Cummins e Hiratsuka (1991) en que las royas en su hábitat natural son parásitos obligados de plantas, y que pocas especies son actualmente cultivadas en medio artificial, a demás se corroboró que es difícil aislar éste tipo de patógenos sobre todo por el crecimiento de otro tipo de organismos a pesar de utilizar cultivo de tejidos, y por la relación tan específica que existe entre patógeno y hospedante, en relación a esto, Cutter (1959) realizó 13,504 aislamientos de agallas de diversas especies del género *Gymnosporangium*, de los cuales 12,110 se contaminaron con hongos, logrando encallar sólo 358 cultivos y obteniendo finalmente 7 aislamientos puros de *G. juniperi-virginianae* Schw.

Identificación morfológica de la roya.

La **fase telial en enebros** (*J. deppeana*), de los 11 sitios de muestreo, presentaron un promedio de 33.82 agallas globosas/árbol; a pesar de que un inicio hubo confusión

entre tipo globosa y fusiforme, después se confirmó que era globosa, el pedicelo de las teliosporas fue muy variable en tamaño, y por ello no se concluyó con sus mediciones. En cuanto a la **fase ecial, en las plantaciones de tejocote** (*Crataegus* spp.) de la variedad *Chapeado* y tipo criollo, por sus características morfométricas (Cuadro 9) se aprecia que las ecias que se desarrollaron en frutos (F) y hojas (H) son diferentes, independientemente del material en que se presente.

Fase telial

Identificación del género

La **fase telial (ENCB 121367) en enebros** (*J. deppeana*), de los 11 sitios de muestreo tuvieron la telia gelatinosa cuando se encuentra húmeda y las teliosporas pedicelos gelatinosos, septa horizontal, y contituida por dos células; características que corresponden al género *Gymnosporangium*.

Identificación de la especie

Las agallas fueron globosas café castaño, con superficie dividida en porciones rectangulares, de cada una de las cuales emerge la telia en forma de lengüeta o cuerno pequeño de color café canela, generalmente atacando ramas delgadas (Figura 2) y con medidas de 2.62 a 10.53 mm de longitud con un promedio de 5.23 mm. La forma de las teliosporas fue elipsoide, con 1 septo, con 2 poros germinativos por célula, sin papila (Figura 2) y con medidas de 14.5 a 28.4 x 35.1 a 57.6 μm (Cuadro 8). Mediante la clave de Kern, todas las agallas de los sitios de muestreo coincidieron con *G globosum*, con características particulares en su identificación como agalla tipo globosa, subglobosa o reniforme, telia comprimida lateralmente en forma de cuña, con una altura de 6 a 12 mm, teliosporas con pedicelo sin forma carotiforme (forma de zanahoria), sin papila y de 16 a 21 x 37 a 48 μm ; sin que la altura de la telia y mediciones de la teliosporas coincidieran en su totalidad. Mediante el protocolo de diagnóstico para *Gymnosporangium* spp. (no Europea) (Cuadro 13) todas las agallas coinciden con *G. globosum*, con características particulares en su identificación como agalla globosa, telia de 3 a 12 x 1.3 mm de alto y ancho respectivamente, color canela, teliosporas de color dorado a amarillo y 2 poros cerca del septo y tamaño de 17 a 24 x 35 a 40 μm , no ajustándose estrictamente a esta

última característica. En conclusión aunque hay características que no se ajustan en su totalidad en el tamaño, esto puede deberse a diversos factores, como condiciones ambientales, en ambos casos se llega a la especie *G. globosum*.

Las basidiosporas obtenidas por germinación de teliosporas bajo condiciones de laboratorio para las pruebas de asociación (Cuadro 10), mostraron las siguientes características: forma ovoide, superficie lisa y coloración amarilla semejante al color de las teliosporas (Figura 2), y con medidas de 7.0 a 15.10 x 11.7 a 29.0 μm (Cuadro 10), sin embargo, este tipo de esporas no es una característica distintiva para la identificación de especies.

Cuadro 8. Medidas de telias y teliosporas en muestras de enebro (*Juniperus deppeana*) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Árbol	Longitud telia (mm)			Largo teliospora (μm)			Ancho teliospora (μm)		
	Min	Media	Max	Min	Media	Max	Min	Media	Max
J1 R1	2.62	5.44	10.1	39.4	47.26	54.4	14.9	19.38	23.1
J1 R2	3.23	5.39	9.87	36.8	46.78	54.2	14.9	20.05	24.6
J2 R1	3.12	5.42	9.56	36.8	47.04	54.7	17.5	20.33	24.1
J2 R2	3.35	4.9	7.39	37.5	46.4	54	15.9	20.55	24.4
J4 R1	3.35	5.39	10.53	36.6	46.4	55.7	14.5	19.52	23.7
J4 R2	2.97	4.96	7.39	37.1	46.24	56.1	15.9	19.51	25.8
J5 R1	2.89	5.7	9.84	37.1	45.89	53.7	16	19.99	24.1
J5 R2	3.26	4.78	6.72	37.2	45.51	52.6	15.5	19.75	28.4
J6 R1	3.23	5.36	9.53	35.1	45.65	54.3	14.7	19.11	25.4
J6 R2	3.47	5.01	8.27	35.9	47.4	57.6	14.7	19.7	23.6

Cuadro 9. Medidas de ecias en muestras de tejocote (*Crataegus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Plantación/ Tejido de Aeciospora	Largo (μm)			Ancho (μm)			Pared (μm)		
	Min	Media	Max	Min	Media	Max	Min	Media	Max
P1FCh	25.9	33.37	43	20.4	26.55	34.6	2.1	3.12	4.7
P2FCh	26.6	33.33	57.2	18.8	25.63	37.6	2.2	3.22	4.8
P1FCr	25.2	32.03	43.7	18.8	26.84	32.4	1.4	2.92	4.2
P2FCr	24	33	57.2	18.8	25.71	31.2	2	3.27	9.5
P4FCh	25.2	30.31	45.9	21	26.83	34.8	1.4	2.64	4.3
P4HCh	18.6	22.25	34.2	15.9	20.31	24.4	1.2	1.99	3.7

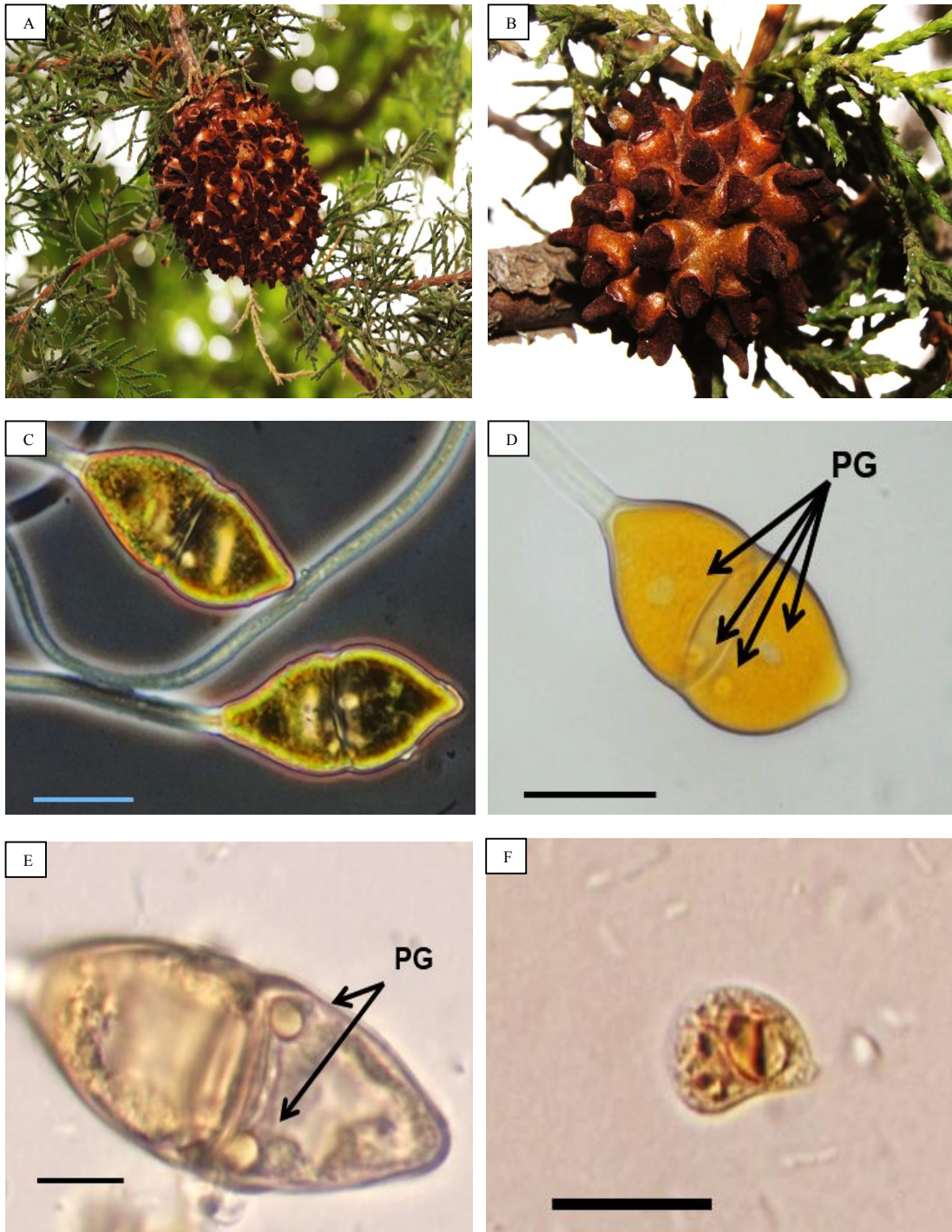


Figura 2. Estructuras de la fase telial proveniente de ramas de enebro (*Juniperus deppeana*). A).Agalla globosa. B) Telias sobre la agalla. C) Teliospora bicelular con pedicelo acarotiforme (sin forma de zanahoria). D y E) Teliosporas con 2 poros germinativos por célula. F) Basidiospora. Barras C-D = 20 μ m, E-F = 10 μ m.

Fase ecial

De las ecias provenientes de frutos (F) variedad *Chapeado* (ENCB 121365) y de los frutos del tipo criollo (ENCB 121364) de todas las plantaciones, el peridio fue tubular, que libera las eciosporas desde el ápice y poco deshiscente o lacerado lateralmente a la madurez, células del peridio tuberculado (Figura 3), las eciosporas globosas o elipsoides, algunas con uno de sus lados rectos adquiriendo una forma elipsoide-angulosa, superficie finamente equinulada, número de poros no distinguibles, color naranja (Figura 3) y medidas de 1.4 a 5.7 x 18.8 a 37.6 x 24.0 a 57.2 μm con una DE máxima de 3.87 (Cuadro 10), tamaño del peridio de 7.59 a 15.25 x 0.54 a 0.79 mm con una DE máxima de 1.79. Mediante la clave de Kern, todas las muestras de ecias provenientes de frutos (F) variedad *Chapeado* y tipo criollo de todas las plantaciones coincidieron con *G. kernianum* Bethel., con características particulares en su identificación como ecia roestelioide, el peridio más o menos tubular algo lacerado y células del peridio tuberculado; aunque también tiene un ligero parentesco con peridio rugoso (Figura 3) de *G. globosum*, sin embargo, **las medidas de las eciosporas presentan 15.0 a 19.0 x 18.0 a 25.0 μm ; pared 1.5 a 2.0 μm .** Mediante el protocolo de diagnóstico para *Gymnosporangium* spp. (no Europea) (Cuadro 14), las ecias provenientes de frutos (F) variedad *Chapeado* y tipo criollo de todas las plantaciones coinciden mayormente con *G. clavipes* Cke. & Pk. con las características particulares en su identificación como ecia tubular desgarrado desde la punta o lacerado de los lados (Figura 3), color de la ecia blanco, color del contenido de la ecia de naranja a blanco, color de eciosporas naranja, poros escondidos y tamaño 28 a 36 μm ; pared 2.5 x 4 μm ; no coincidiendo en su totalidad en éstas últimas características, el tamaño del peridio no coincide y se acerca al de mayor longitud, 1.0 a 4.0 x 0.2 a 0.5 mm (Figura. 3) de *G. globosum*, sin embargo, **es 5 veces mayor el tamaño real en comparación** con lo que menciona la clave. En conclusión, aunque hay características que no se ajustan en su totalidad en su tamaño, como es el caso del tamaño del peridio que en lo absoluto se parece a lo que se reporta en la literatura, esto puede deberse a diversos factores, tales como condiciones ambientales prevalecientes, y a la susceptibilidad del hospedante por la sincronía de los períodos de infección con la fenología del árbol, como lo menciona Jones y Aldwinckle (1990), sin embargo, la especie en cuestión es diferente a la que se presenta en las hojas de tejocote, pero con ésta información no se pudo diferenciar de que

especie se trata; entre *G. kernianum*, *G. globosum* y *G. clavipes*, ya que la ornamentación del peridio es muy importante y no de fácil observación con el microscopio de luz.

De las ecias de hojas (H) de la variedad *Chapeado* (ENCB 121366) de la plantación 4, el peridio fue tubular que libera las eciosporas a través de toda la ecia y muy deshiscente o lacerado lateralmente a la madurez, células del peridio rugoso (Figura 3), las eciosporas globosas o elipsoides, superficie finamente equinulada, número de poros no distinguible, color café (Figura 3) y con medidas de 1.20 a 3.7 x 15.90 a 24.4 x 18.60 a 34.20 μm con una DE máxima de 1.88 (Cuadro 10), tamaño del peridio de 1.44 a 2.67 x 0.13 a 0.33 mm con una DE máxima de 0.36. Mediante la clave de Kern, las muestras de hojas (H) de la variedad *Chapeado* de la plantación 4 coincidieron con *G. confusum* Plowr. con las características particulares en su identificación como ecia roestelioide, el peridio pierde la forma tubular muy lacerado, y células del peridio fuertemente rugoso (Figura 3), espesor 5 a 7 μm y células del peridio de 60 a 90 μm largo, eciosporas 19 a 22 x 19 a 27 μm ; éstas últimas características no se ajustan totalmente a lo real. Mediante el protocolo de diagnóstico para *Gymnosporangium* spp. (no Europea) (Cuadro 14), de muestras de hojas (H) de la variedad *Chapeado* de la plantación 4 coincidieron con *G. globosum* con las características particulares en su identificación como ecia cilíndrico-fusoide puntiagudo en la punta y lacerado de los lados (Figura 3), color de la ecia blancuzco cafezoso, color del contenido de la ecia café, color de eciosporas canela (Figura 4), poros de 7 a 9, pared 1.5 x 2 μm y tamaño 15 a 23 μm , ésta última no coincidió y se acercó más a 20 a 30 μm y de 20 a 28 μm , de *G. clavariiforme* Pers. y *G. juniperi-virginianae* respectivamente, aunque ésta última especie, no se encuentra reportada en tejocote. En conclusión, aunque hay características que no se ajustan en su totalidad en el tamaño, esto puede deberse a diversos factores, como condiciones ambientales, y sin embargo la especie en cuestión es diferente a la que se presenta en los frutos de tejocote, pero con ésta información no se pudo diferenciar de que especie se trata; entre *G. confusum*, *G. globosum* y *G. clavariiforme*.

Cuadro 10. Medidas de teliosporas y basidiosporas de las muestras de enebro (*Juniperus deppeana*) y de eciosporas de tejocote (*Crataegus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Tipo de esporas	Largo (μm)			Ancho (μm)			Pared (μm)		
	Min	Media	Max	Min	Media	Max	Min	Media	Max
Teliosporas	35.1	46.46	57.6	14.5	19.79	28.4	--	--	--
Basidiosporas	11.7	17.09	29	7	9.87	15.1	--	--	--
Eciosporas F	24	32.41	57.2	18.8	26.31	37.6	1.4	3	5.7
Eciosporas H	18.6	22.25	34.2	15.9	20.31	24.4	1.2	2	3.7

F: frutos; H: hoja.

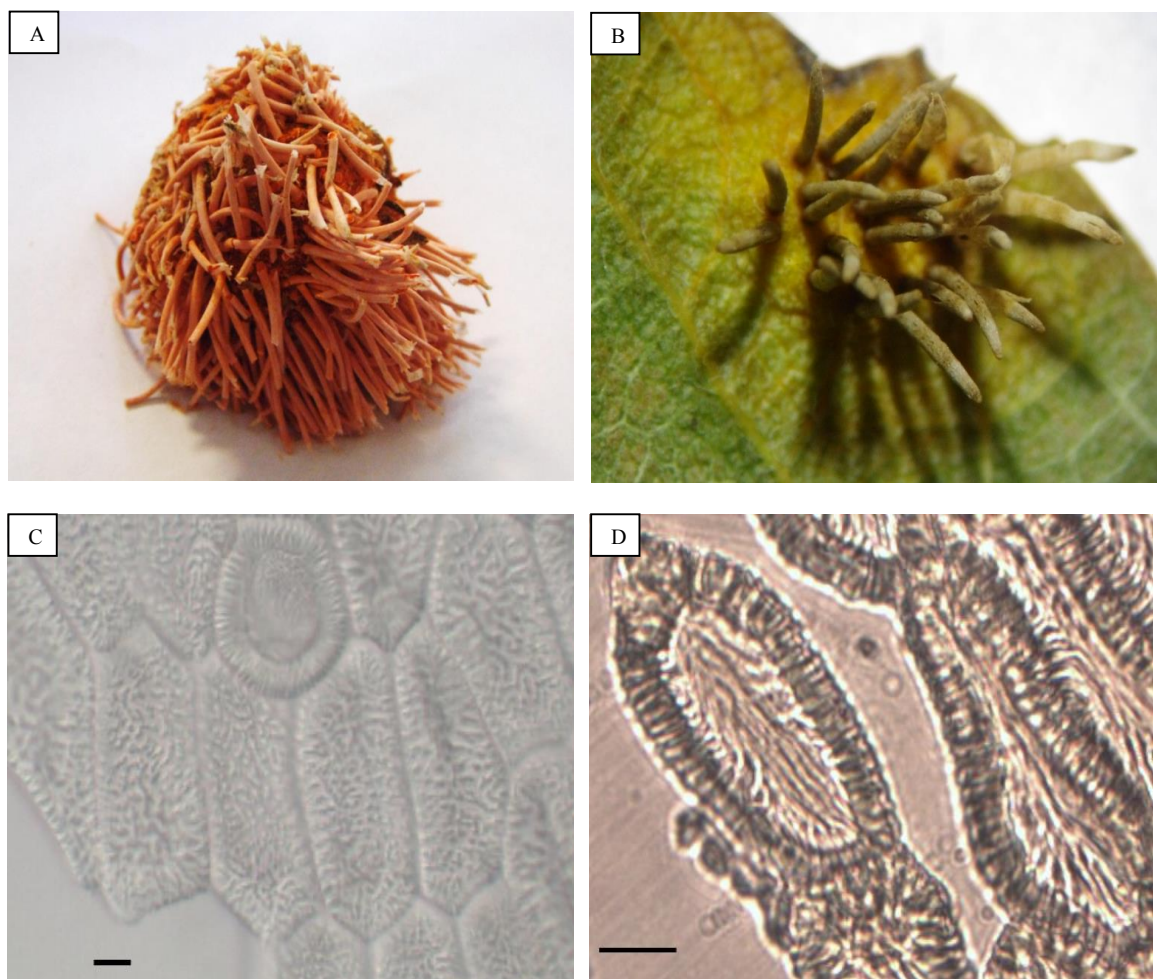


Figura 3. Estructuras de la fase ecial proveniente de frutos (F) y hojas (H) de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado* y tipo criollo. A y C). Ecia roestelioide y peridio entre tuberculado y rugoso, proveniente de frutos (F). B y D) Ecia roestelioide y peridio rugoso, provenientes de hojas (H). Barras C-D =10 μm .

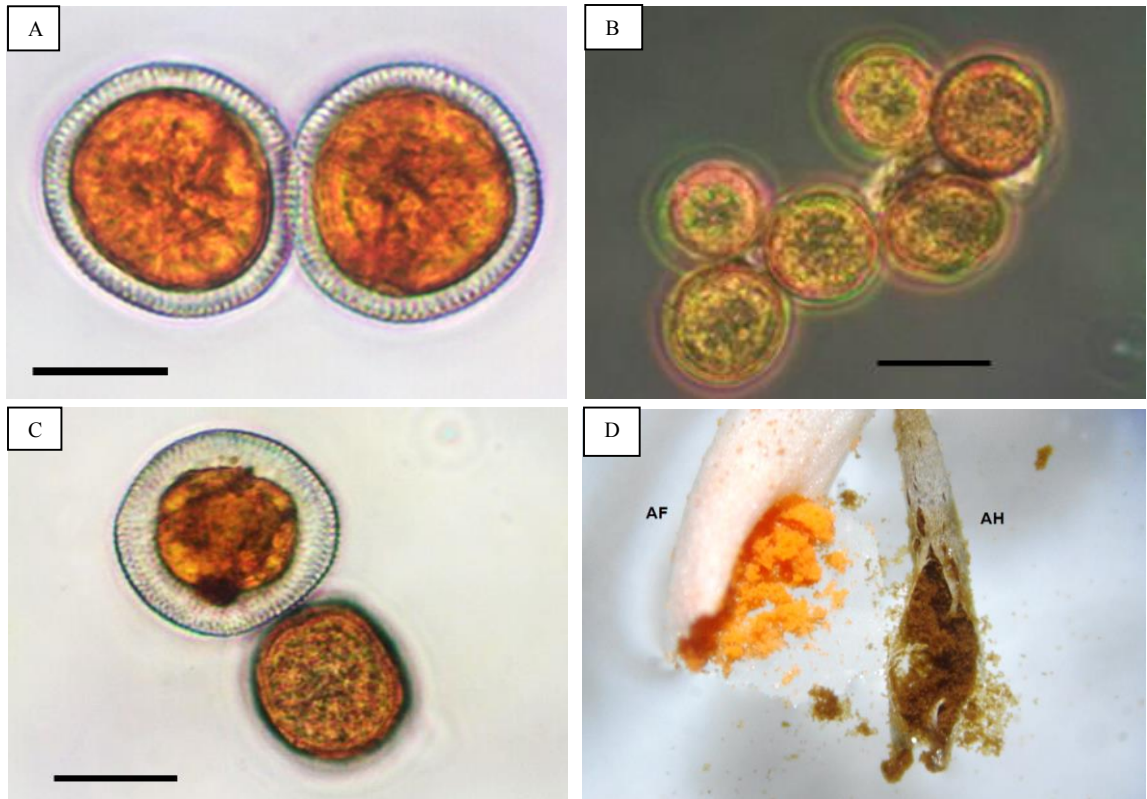


Figura 4. Estructuras de la fase eical provenientes de frutos (F) y hojas (H) de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado* y tipo criollo. A) Eciosporas provenientes de frutos (F). B) Eciosporas provenientes de hojas (H), exclusivamente variedad *Chapeado* C) Comparación de eciosporas provenientes de F y H. D) comparación de ecias provenientes de F y H. barras A-C = 20 µm.

Microscopía Electrónica de Barrido.

La ornamentación de las teliosporas fue lisa, y el pedicelo largo, éstos pedicelos se agregan para formar un fascículo gelatinoso que llevan las teliosporas en los ápices de los pedicelos individuales (Littlefield, 1979), sin embargo estas características en este tipo de esporas no son distintivas para la identificación (Figura 5).

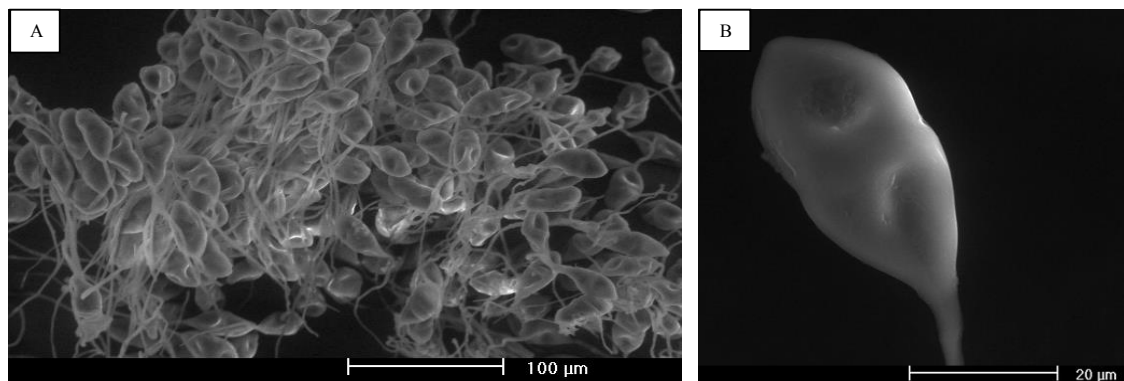


Figura 5. MEB de teliosporas de ramas de enebro (*Juniperus deppeana*). A y B) Telioporas con ornamentación lisa y pedicelos largos.

El peridio de la ecia de frutos (F) tiene la forma más o menos tubular (algo lacerado y con ruptura en la punta), los tipos de ornamentación de las paredes celulares del peridio fueron: de la pared externa y pared lateral lisa, e interior tuberculada (Figura 6) asemejándose a *G. clavipes* como lo menciona Lee y Kakishima (1999b) con su respectivos hospedantes (Cuadro 15 y 16).

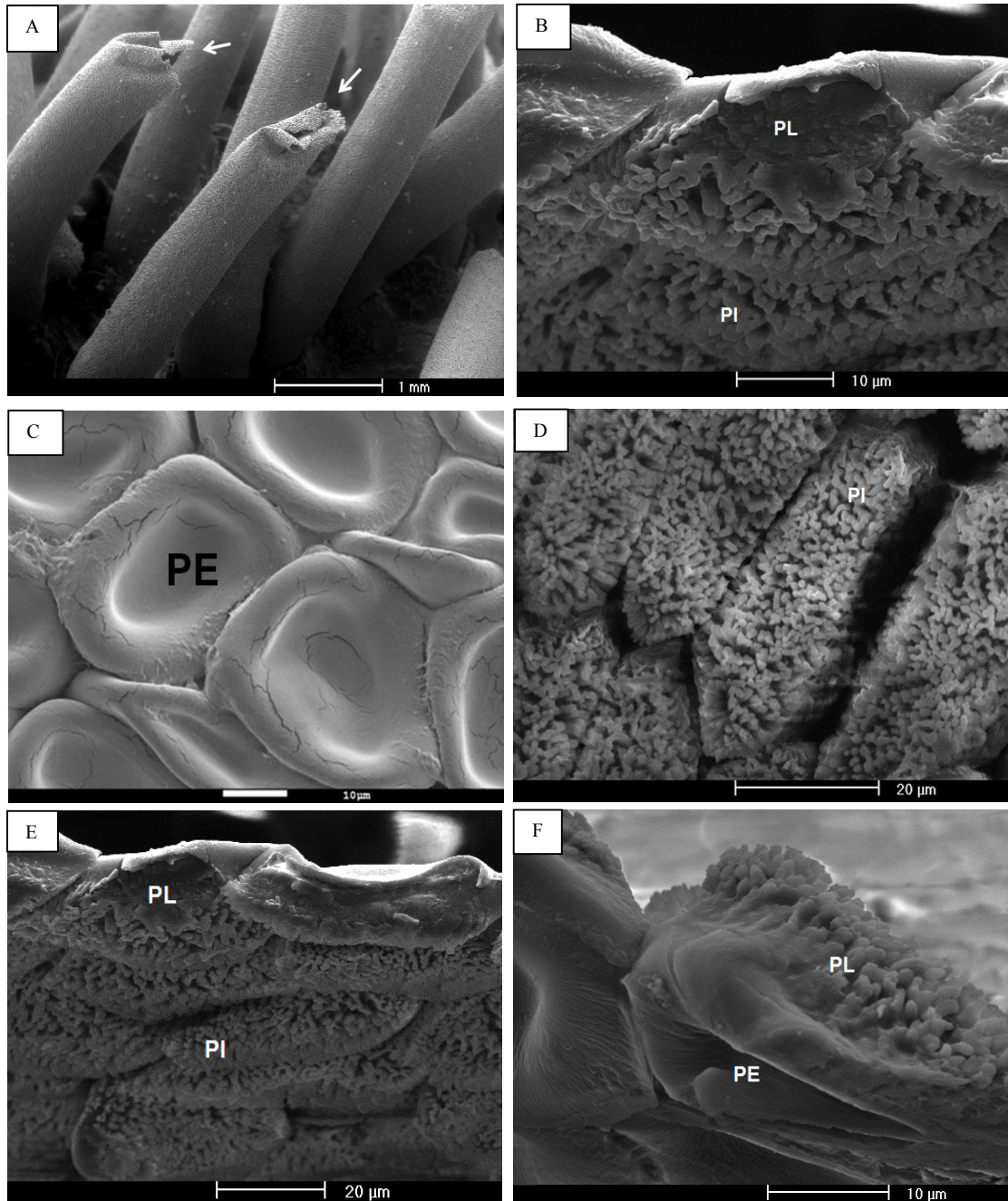


Figura 6. MEB de las ecias en frutos (F) de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado* y tipo criollo. A) Apertura de la ecia en el ápice. B, C, D, E, F) Ornamentación de la pared externa, lateral e interna del peridio. PI, pared interna; PL, pared lateral, PE, pared externa.

Los tipos de ornamentación de las eciosporas fueron: pequeñamente anulado (Figura 7) coincidiendo con *G. clavipes*, *G. inconspicuum* y *G. speciosum* como lo menciona Lee y Kakishima (1999a) con su respectivos hospedantes (Cuadro 16 y 17). En conclusión, se identifica a *G. clavipes* entre los especímenes caracterizados del peridio y complementado con la caracterización de eciosporas mediante MEB en frutos (F) de tejocote.

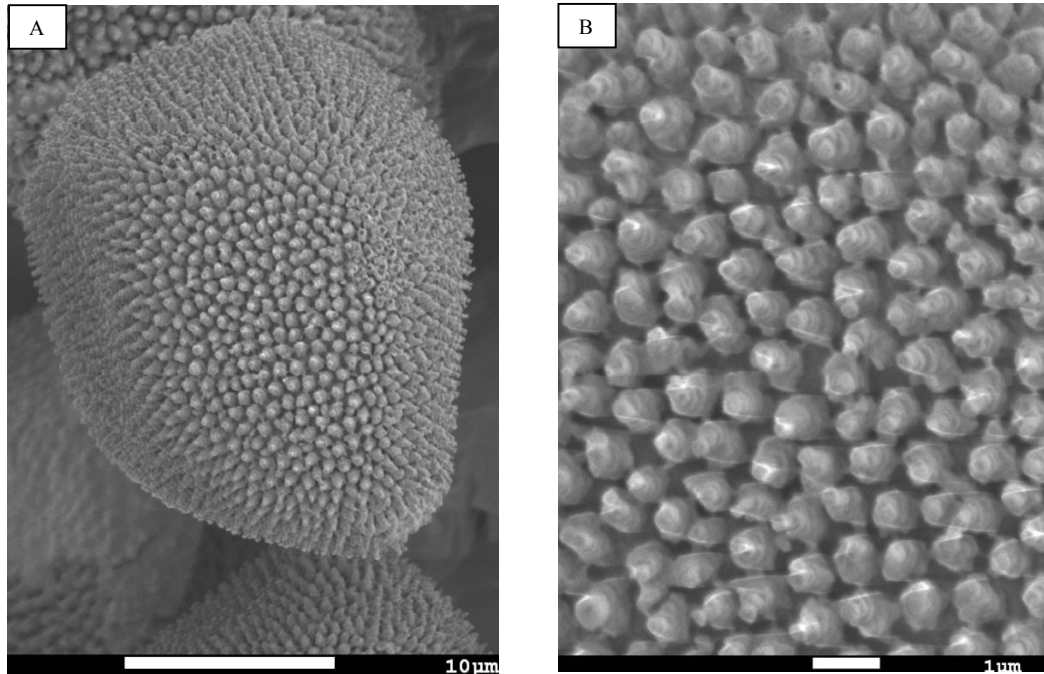


Figura 7. MEB de las eciosporas de frutos (F) de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado* y tipo criollo. A) Eciosporas. B) Ornamentación de la eciospora pequeñamente anulado.

El peridio de la ecia de hoja (H) va perdiendo la forma tubular; lacerándose bastante, los tipos de ornamentación de las paredes celulares del peridio fueron: de la pared externa lisa, pared lateral rugosa y pared interior pequeñamente papilada (Figura 8), semejándose *G. amelanchieris*, *G. betheli*, *G. corniculans*, *G. fuisporum*, *G. globosum*, *G. nelsonii* como lo menciona Lee y Kakishima (1999b) con su respectivos hospedantes (Cuadro 15 y 16) y asemejándose a *G. betheli* y *G. globosum* de acuerdo al rango de hospedantes.

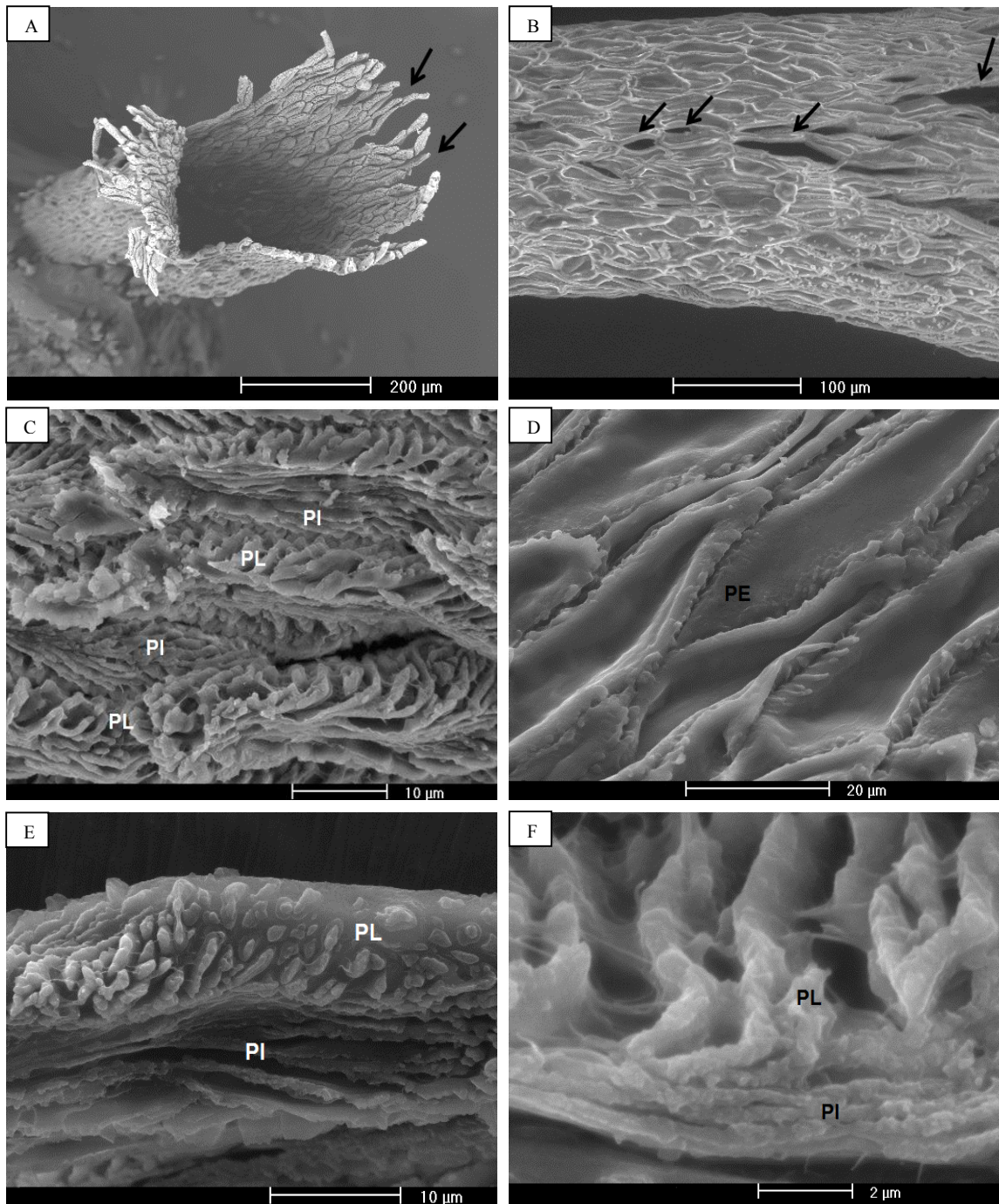


Figura 8. MEB de las ecias de hojas (H) de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado*. A y.B) Apertura de la ecia en el ápice y lacerado lateralmente. C, D, E, F) Ornamentación de la pared externa, lateral e interna del peridio. PI, pared interna; PL, pared lateral; PE, pared externa.

Los tipos de ornamentación de las eciosporas fueron: pequeñamente coronado (Figura 9) coincidiendo de acuerdo con *G. bermudianum*, *G. betheli*, *G. connersi*, *G. cupressi* var *cascadense*, *G. floriforme*, *G. fuscum*, *G. globosum*, *G. guatemalianum*, *G.*

japonicum, *G. juniperi-virginianae*, *G. trachysorum*, *G. turkestanicum* y *G. yamadae* como lo menciona Lee y Kakishima (1999a) con su respectivos hospedantes (Cuadro 15 y 16). Asemejándose a *G. betheli*, *G. connersi*, *G. floriforme* *G. globosum* y *G. trachysorum* al rango de hospedantes. Por tanto, se identifican a las especie entre *G. betheli* y *G. globosum* en hojas (H) de tejocote, a partir de la caracterización del peridio y complementado con la caracterización de las eciosporas, mediante MEB.

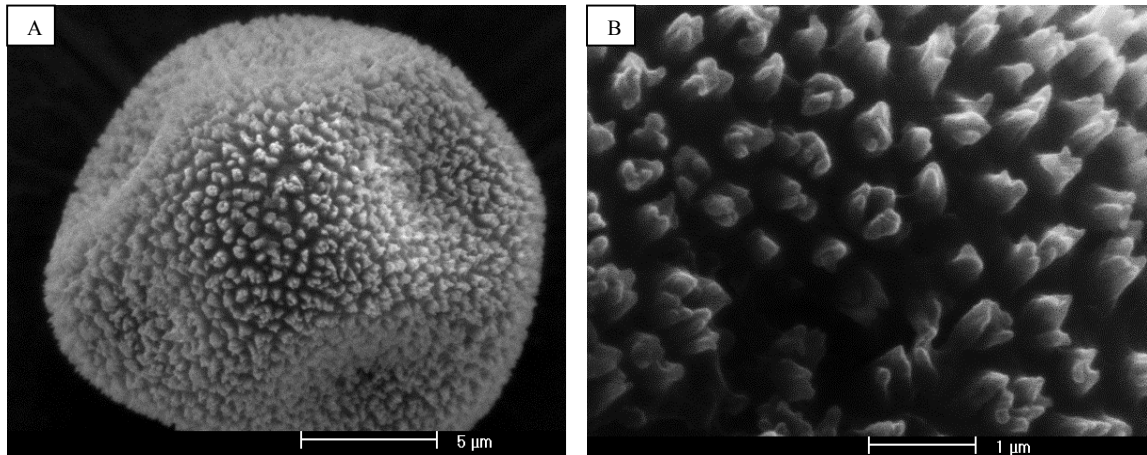


Figura 9. MEB de las eciosporas de hojas (H) de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado*. A) Eciosporas. B) Ornamentación de la eciospora pequeña y coronado.

En conclusión, en base a la identificación morfológica con microscopía de luz complementado con microscopía electrónica de barrido, podemos decir que: la especie que causa las agallas teliales en *J. deppeana* es *G. globosum*, la especie que causa ecias provenientes de frutos (F) de tejocote es *G. clavipes*, y la especie que causa ecias provenientes de hojas (H) de tejocote es *G. globosum*, aunque falta corroborarlas con la identificación molecular. Las principales características observadas de *G. globosum* y *G. clavipes* de la **fase telial** (Cuadro 11) y la **fase ecial** (Cuadro 12) fueron comparados con el rango de hospedantes y las características morfológicas de la **fase telial** (Cuadro 13) y **fase ecial** (Cuadro 14) del protocolo de diagnóstico de *Gymnosporangium* spp. (no Europea) y los hospedantes donde Lee y Kakishima (1999ab) encontraron a estas especies (Cuadro 15 y 16).

Cuadro 11. Medidas de las telias y teliosporas de las muestras de enebro (*Juniperus deppeana*) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Hospedante telial	<i>G. globosum</i>	<i>G. clavipes</i>
<i>Juniperus deppeana</i>	H	--
Telia		
Deformidades /agallas	Agalla globosa o subglobosa	--
Forma de la telia	Cónica en forma de cuña	--
Tamaño telia	2.62-10.53 mm	--
Color	Canela-café	--
Teliosporas		
Forma	Elipsoide sin papila	--
Núm. células	2	--
Tamaño (µm)	14.5-28.4 x 35.1- 57.6	--
Color	Dorado-amarillo	--
Núm. poros /Célula	2 cerca del septo	--

H: Hospedante.

Cuadro 12. Medidas de las ecias y eciosporas de las muestras de tejocote (*Crataegus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Hospedante Ecial	<i>G. globosum</i>	<i>G. clavipes</i>
<i>Crataegus</i> spp. en frutos	--	H
<i>Crataegus</i> spp. en hojas	H	--
Ecía		
Forma	Roestelioide, peridio tubular que pierde la forma debido a que es muy deshiscente o lacerado lateralmente cuando se acerca a la madurez, las eciosporas se liberan a través de toda la ecía, células del peridio rugoso	Roestelioide, peridio tubular que se conserva debido a que es poco deshiscente o lacerado lateralmente cuando se acerca a la madurez, las eciosporas se liberan desde el ápice y poco deshiscente o lacerado lateralmente a la madurez, células del peridio tuberculado
Tamaño (mm)	1.44-2.67 x 0.13-0.33	7.59-15.25 x 0.54-0.79
Color	Blancuzco/cafezoso	Blanco
Color contenido	Café	Naranja a blanco
Eciosporas		
Forma	Globosas o elipsoide, sup. finamente equinulada	Globosas o elipsoides, algunas con uno de sus lados rectos adquiriendo una forma elipsoide-angulosa, sup. finamente equinulada
Tamaño (µm)	15.90-24.4 x 18.60-34.20	18.8-37.6 x 24.0-57.2
Tamaño de Pared celular (µm)	1.20-3.7	1.4-5.7
Color	Canela	Naranja
Núm. poros /Célula	Escondido	Escondido

H: Hospedante.

Cuadro 13. Hospedantes y morfología de las telias y teliosporas de *Gymnosporangium* spp. (no Europea) que se utilizó como comparativa con las medidas de las muestras de enebro (*Juniperus depeana*) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Hospedante telial	<i>G. asiaticum</i>	<i>G. clavipes</i>	<i>G. globosum</i>	<i>G. juniperi-virginianane</i>	<i>.G yamadae</i>
<i>Juniperus</i> spp.	H	H	H	H	H
Telia					
Deformidades /agallas	Sin deformidades	Ligeras deformaciones sobre ramitas o ramas	Agalla globosa, 3-10 mm diam.	Globosa/agalla reniforme, 1-3 cm diam.	Agalla globosa, 3-20 mm diam.
Forma de la telia	Pequeña y gelatinosa	Hemisférico como gelatina	Cónica	Cilíndrico grande	Cónica
Tamaño telia	1-3 mm diam	1-3 mm diam	3-12 mm alto x 1.3 mm ancho	10-20 mm alto	5 mm diam.
Color	Café rojizo a café canela	Naranja-café a canela	Canela-caf	Café	Canela-café
Teliosporas					
Núm. células	2	2	2	2	2
Tamaño(µm)	15-25 x 32-47	20-28 x 35-60	17-24 x 35-40	15-21 x 45-65	15-24 x 32-45
Color	Dorado-amarrillo a canela	Amarillento	Dorado-amarillo	Amarillo - dorado	Dorado - canela
Núm. poros /Célula	2 cerca del septo	1	2 cerca del septo	2 cerca del septo	2 cerca del septo

H: Hospedante.

Cuadro 14. Hospedantes y morfología de ecias y eciosporas de *Gymnosporangium* spp. (no Europea) que fue utilizada como comparativa con las medidas de las muestras de tejocote (*Crataegus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Hospedante Ecial	<i>G. asiaticum</i>	<i>G. clavipes</i>	<i>G. globosum</i>	<i>G. juniperi-virginianane</i>	<i>G. yamadae</i>
<i>Malus</i> spp.	--	H	H	H	H
<i>Pyrus</i> spp.	H	H	H	--	--
<i>Amelanchier</i> spp.	--	H	H	--	--
<i>Aronia</i> spp.	--	H	--	--	--
<i>Chaenomeles</i> spp.	H	H	--	--	--
<i>Cotoneaster</i> spp.	--	H	--	--	--
<i>Crataegus</i> spp.	H	H	H	--	--
<i>Cydonia</i> spp.	H	H	--	--	--
<i>Mespilus</i> spp.	--	H	--	--	--
<i>Photinia</i> spp.	H	H	--	--	--
<i>Sorbus</i> spp.	--	H	H	--	--
Ecias					
Forma	Tubular ,desgarrado en la punta	Tubular , desgarrado desde la punta o lacerado de los lados	Cilindrico fusoide, puntiagudo en la punta y lacerado de los lados	Finamente lacerado en la base, fuertemente curvado y apariencia de espeso	Forma tubular/ cuerno; finamente lacerado
Tamaño (mm)	3-6 x 0.25	2-3 x 0.4-0.5	1-4 x 0.2-0.5	1-2.0 largo	3-8 x 0.3-0.5
Color	Blanco	Blanco	Blancuzco/cafezoso	Blancuzco	Cafezoso
Color contenido	Cafe	Naranja a blanco	Café	Café rojizo	--
Eciosporas					
Tamaño (µm)	17-15	28-36	15-23	20-28	17-28
Tamaño de Pared celular(µm)	1.5-2.5	2.5-4	1.5-2	1.5-2.5	2.5-3.5
Color	Amarillo	Naranja(Contenido)	Canela	Canela	Dorado-Amarillo
Núm. de poros	6-8.0	Escondido	7-9.0	8-10.0	Escondido

H: Hospedante.

Cuadro 15. Relación de especies de *Gymnosporangium* y sus hospedantes encontrados por Lee y Kakishima (1999b) que fue de utilidad para discriminar morfológicamente entre especies de *Gymnosporangium* provenientes de muestras de tejocote (*Crataegus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Especies	Peridio de ecias en tejocote (<i>Crataegus</i> spp.)	
	Frutos (F)	Hojas (H)
<i>G. clavipes</i>	<i>Amelanchier alnifolia</i> , <i>A. bartramiana</i> , <i>Amelanchier</i> sp., <i>Crataegus punctata</i> , <i>C. lavalleyi</i> , <i>C. oxycantha</i> var <i>pauli</i> , <i>Crataegus</i> sp., <i>Cydonia vulgaris</i> y <i>Malus</i> sp.	---
<i>G. amelanchieris</i>	---	<i>Amelanchier asiática</i> , <i>A ovalis</i> , <i>A. vulgaris</i> y <i>Aronia rotundifolia</i>
<i>G. betheli</i>	---	<i>Crataegus douglasii</i> y <i>Crataegus</i> spp.
<i>G. corniculans</i>	---	<i>Amelanchier alnifoli</i> , <i>A. canadensis</i> , <i>A. laevis</i> y <i>Amelanchier</i> sp.
<i>G. fuisporum</i>	---	<i>Cotoneaster integerima</i>
<i>G. globosum</i>	---	<i>Crataegus beata</i> , <i>C. caesia</i> , <i>C. chrysocarpa</i> , <i>C. fuscata</i> , <i>C. pedicellatus</i> , <i>C. pinnatifida</i> , <i>C. pinnatifida</i> var <i>major</i> y <i>Crataegus</i> spp., <i>Malus domestica</i> , <i>Malus sylvestris</i> , <i>Malus</i> sp., <i>Pyrus americana</i> y <i>Sorbus tianschanica</i>
<i>G. nelsonii</i>	---	<i>Amelanchier alnifolia</i> , <i>A. florida</i> , <i>A. laevis</i> y <i>Amelanchier</i> sp.

Cuadro 16. Relación de especies de *Gymnosporangium* y sus hospedantes encontrados por Lee y Kakishima (1999a) que fue de utilidad para discriminar morfológicamente entre especies de *Gymnosporangium* provenientes de muestras de tejocote (*Crataegus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Especies	Eciosporas en tejocote (<i>Crataegus</i> spp.)	
	Frutos (F)	Hojas (H)
<i>G. clavipes</i>	<i>Crataegus lavalleyi</i> , <i>C. oxycantha</i> var <i>pauli</i> , <i>C. punctata</i> y <i>Crataegus</i> spp.	
<i>G. inconspicuuum</i>	<i>Amelanchier alnifolia</i> , <i>A. bakeri</i> , <i>A. florida</i> y <i>Amelanchier</i> sp.	
<i>G. speciosum</i>	<i>Fendlera supicola</i> , <i>Philadelphus micropylus</i> , <i>P. occidentalis</i> y <i>P. rogosus</i>	
<i>G. bermudianum</i>		<i>Juniperus virginiana</i> y <i>Juniperus</i>
<i>G. betheli</i>		<i>Crataegus douglasii</i> , <i>C. ribularis</i> y <i>C. succulenta</i> y <i>Crataegus</i> spp.
<i>G. connersi</i>		<i>Crataegus chysocarpa</i> , <i>C. douglasii</i> y <i>C. succulenta</i>
<i>G. cupressi</i> var		<i>Amelanchier pallida</i>
<i>G. floriforme</i>		<i>Crataegus spathulata</i> , <i>C. raleighensis</i> y <i>Crataegus</i> spp.
<i>G. fuscum</i>		<i>Pyrus communis</i>
<i>G. globosum</i>		<i>Crataegus beata</i> , <i>C. caesia</i> , <i>Crataegus chysocarpa</i> , <i>C. fuscosa</i> , <i>C. pedicellatus</i> , <i>C</i>
<i>G. guatemalianum</i>		<i>Amelanchier nervosa</i> y <i>Amelanchier</i> sp.
<i>G. japonicum</i>		<i>Pothinia parvifolia</i> , <i>Pothinia laevis</i> var <i>villosa</i> , <i>P. villosa</i> y <i>Pothinia</i> sp
<i>G. juniperi-virginianae</i>		<i>Malus cornoaria</i> , <i>Malus pumila</i> y <i>Malus</i> sp.
<i>G. trachysorum</i>		<i>C. marshalii</i> y <i>Crataegus</i> spp.
<i>G. turkestanicum</i>		<i>Sorbus thianschanica</i>
<i>G. yamadae</i>		<i>Malus asiatica</i> , <i>Malus halliana</i> , <i>Malus pumila</i> , <i>Malus sieboldii</i> y <i>Malus spectabilis</i>

Identificación molecular.

Muestras de la fase telial extraídas directamente de la telia y de agallas en invernación y de **la fase ecial** provenientes de frutos y hojas de tejocote amplificaron en la PCR a sus respectivos iniciadores (Figura 10). De las muestras extraídas directamente de la telia, se obtuvo buena calidad, pero sólo fueron utilizadas para secuenciación las que su relación de absorbancia fue 260/280 y 260/230 se acercó al valor de 2.00 (J2G1*, J2G2*, J2G3*; Cuadro 17), en éste caso se seleccionó la muestra J2G2 y se utilizó para los 3 pares de iniciadores. De las muestras extraídas de frutos, la muestra que obtuvo calidad para la secuenciación (P2FCh*; Cuadro 17) en éste caso fue la muestra P2FCh y fue utilizada para los 3 pares de iniciadores. Las muestras extraídas de agallas en invernación tuvieron mala calidad (Cuadro 17) para la secuenciación, quedando totalmente excluidas, la mala calidad obtenida muy probablemente se debió a los compuestos que contienen las ramas de *J. deppeana*, el problema a menudo encontrado durante la extracción de ADN es separar, el ADN de los contaminantes que existen naturalmente en la célula de la planta, tales como polisacáridos y compuestos fenólicos (Pandey, Adams y Flournoy, 1996; Porebski *et al.*, 1997), a demás estos compuestos en sus formas oxidadas se enlazan covalentemente a los ácidos nucleicos durante la extracción y los inutilizan para la mayoría de las aplicaciones en investigación (Katterman y Shattuck, 1983; Peterson *et al.*, 1997). Las muestras provenientes de hojas, ninguna obtuvo la calidad necesaria para ser secuenciada (P4HCh1**, P4HCh2**; Cuadro 17), así que hubo la necesidad de repetir varias veces la extracción, aun así no se logró obtener ácidos nucleicos de calidad a pesar de que resultaba importante para fines de comparación.

La homologación de identidad de las muestras de la fase telial de enebro (*Juniperus deppeana*) en el NCBI fue con *G. juniperi-virginianae*, *G. sabiniae*, *G. yamadae*, y *G. clavariiforme* y de las muestras de la fase ecial de tejocote (*Crataegus* spp.) fue con *G. clavipes* y *Uromycladium tepperianum* (Cuadro 18).

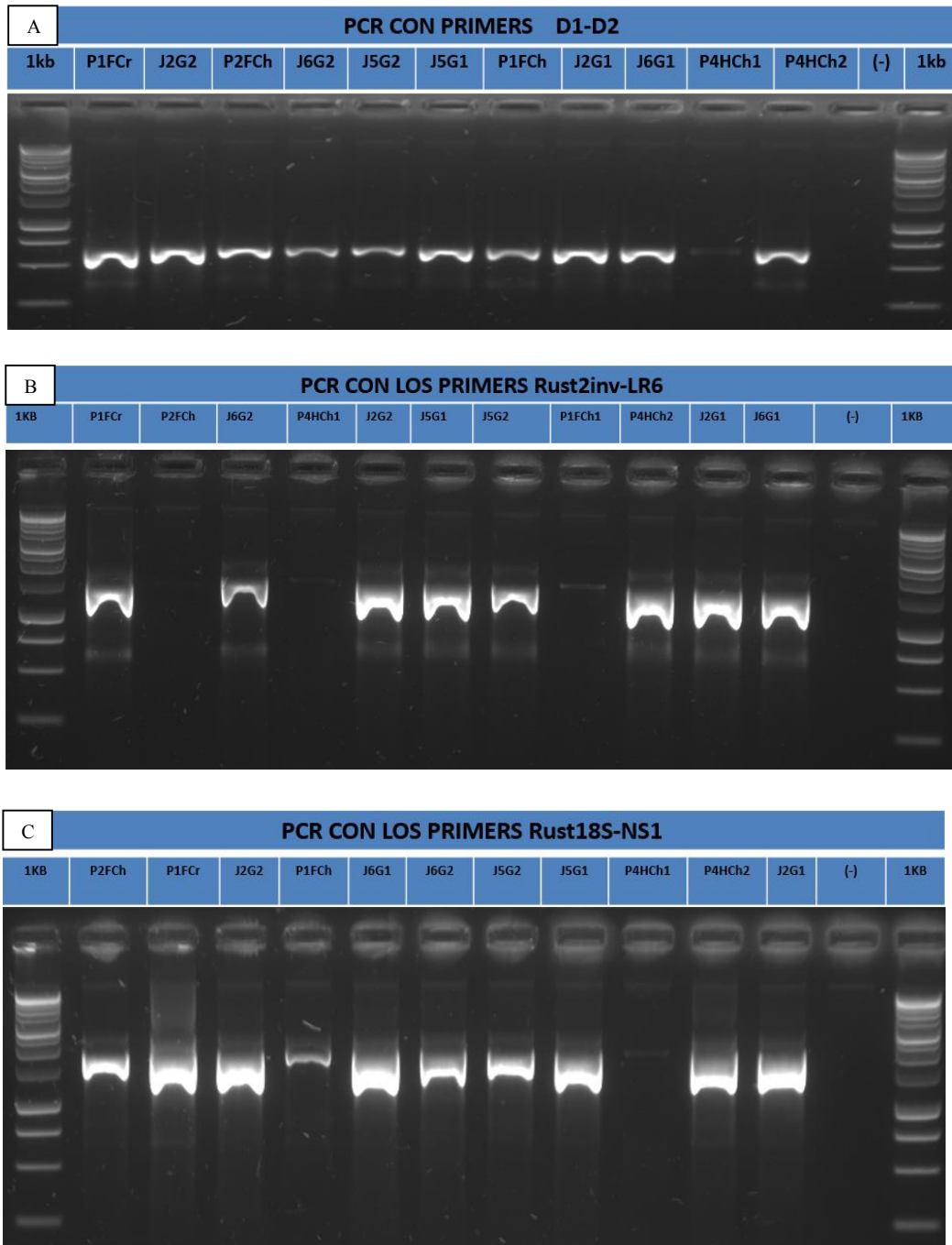


Figura 10. Gel de agarosa del PCR de muestras de fase telial de enebro (*Juniperus deppeana*) y ecial de tejocote (*Crataegus* spp.). A) Iniciadores D1/D2, B) Rust2inv/LR6 y C) Rust2inv/LR6.

Cuadro 17. Concentración y calidad de ácidos nucleicos de muestras de enebro (*Juniperus deppeana*) y tejocote (*Crataegus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Agalla en invernación Tipo Globosa (G)	(ng/μl)	Calidad		Telia germinada Tipo Globosa(G)	(ng/μl)	Calidad		Plantación/Tejid o/Variiedad	(ng/μl)	Calidad	
		260/ 280	260/ 230			260/ 280	260/ 230			260/2 80	260/2 30
J1G1	199	0.8	0.18	J2G1*	588.5	2.13	1.92	P1FCr	2051.6	2.06	1.82
J1G2	318.5	0.82	0.27	J2G2*	1464.3	2.18	2.07	P1FCh	751.3	1.84	1.39
J2G1	540.5	0.93	0.16	J2G3*	828.6	2.05	1.96	P2FCh*	1367.4	2.03	2.09
J2G2	529.2	0.92	0.16	J5G1	779.8	2.1	1.71	P4HCh1**	262.1	1.98	0.91
J2G3	318.5	0.82	0.27	J5G2	880.1	2.01	1.51	P4HCh2**	124.7	2.11	1.39
J4G1	265.8	0.69	0.13	J6G1	540.3	2.05	1.67	--	--	--	--
J4G2	164.6	1.12	0.19	J6G2	1163.8	2.06	1.66	--	--	--	--
J5G1	300.6	0.63	0.27	--	--	--	--	--	--	--	--
J5G2	225.6	0.83	0.2	--	--	--	--	--	--	--	--
J6G1	1503.8	0.53	0.29	--	--	--	--	--	--	--	--
J6G2	198.3	0.69	0.17	--	--	--	--	--	--	--	--

* Muestras que cumplen con la calidad para secuenciar.

** Muestras que no cumplen con la calidad para secuenciar, y que por tanto fueron extraídas varias veces.

Muestras que carecen de asterisco (*) son aquéllas que no cumplieron la calidad necesaria para secuenciar, y por lo tanto, fueron excluidas para dicho proceso.

Cuadro 18. Relación de la homologación de identidad de las muestras de la fase telial de enebro (*Juniperus deppeana*) y eical de tejocote (*Crataegus* spp.) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. en el año 2012, con los 3 pares de iniciadores en el banco de genes (NCBI).

Muestra	Iniciadores	Especie	Máximo puntaje	Puntaje total	Pares de bases	% Consulta cubierta	% Identidad	Accesión
J2G2-1	D1/D2	<i>Gymnosporangium juniperi-virginianae</i>	1134	1134	1086	99	99	DQ354547
		<i>Gymnosporangium sabiniae</i>	1131	1131	643	99	99	JN969962
		<i>Gymnosporangium sabiniae</i>	1131	1131	643	99	99	JN969964
		<i>Gymnosporangium sabiniae</i>	1125	1125	643	99	99	JN969966
		<i>Gymnosporangium sabiniae</i>	1125	1125	643	99	99	JN969963
		<i>Gymnosporangium yamadae</i>	1123	1123	1445	99	98	GU058012
J2G2-2	J2G1-F	<i>Gymnosporangium juniperi-virginianae</i>	1077	1077	1146	100	99	DQ667158
		<i>Gymnosporangium juniperi-virginianae</i>	1077	1077	1415	100	99	AY123289
		<i>Gymnosporangium juniperi-virginianae</i>	1053	1053	1086	100	99	DQ354547
		<i>Gymnosporangium juniperi-virginianae</i>	1050	1050	1349	100	99	AY629316
J2G2-3	LR6	<i>Gymnosporangium yamadae</i>	1044	1044	1445	100	99	GU058012
		<i>Gymnosporangium sabiniae</i>	1037	1037	1289	98	99	HM114221
		<i>Gymnosporangium clavariiforme</i>	1037	1037	1428	100	98	HM114220
P2FCh	D1/D2	<i>Gymnosporangium clavipes</i>	1168	1168	1368	99	99	DQ354545
		<i>Gymnosporangium clavipes</i>	1044	1044	865	90	99	HQ317528
P1FCh-1	18S-R	<i>Uromycladium tepperianum</i>	1077	1077	1672	100	99	DQ323923
		<i>Gymnosporangium clavipes</i>	1077	1077	1670	100	99	DQ354546
P1FCh-2	18S-F	<i>Gymnosporangium clavipes</i>	1024	1024	1072	100	98	AY123309
		<i>Gymnosporangium clavipes</i>	1013	1013	1670	100	98	DQ354546
		<i>Gymnosporangium clavipes</i>	1007	1007	1048	100	98	U41566

Las muestras para el gen 28S (iniciadores D1/D2), de la **fase ecial de fruto** (F) P2FCh se acercó filogenéticamente a *G. clavipes* quedando muy cerca (Figura 10); **el resultado morfológico** concuerda con ésta especie, mientras que la muestra de la **fase telial** J2G2 se encuentra muy alejada de *G. nelsonii* (Figura 11); sin embargo en **el resultado morfológico** se obtiene a *G. globosum*, esto puede deberse a que en general hay pocas especies del género *Gymnosporangium* descritas molecularmente en el NCBI para el gen 28S y no existe ninguna secuencia de *G. globosum*, por lo tanto resultaría la primera secuencia para este gen.

Las muestras para el gen 18S (iniciadores Rust2inv/LR6), de la **fase ecial de fruto** (F) P1FCh, filogenéticamente se encuentra muy alejado de *G. clavipes* (Figura 11), mientras que, en **el resultado morfológico** concuerda con ésta especie, en el caso de la muestra de la **fase telial** J2G2 se encuentra muy alejado de *G. juniperi-virginianae* (Figura 12), sin embargo, en **el resultado morfológico** se obtiene a *G. globosum*, esto puede deberse a que en general hay muy pocas especies del género *Gymnosporangium* descritas molecularmente en el NCBI para el gen 18S; *G. clavipes*, *G. juniperi-virginianae*, *G. libocedri* se encuentran arbitradas y *G. globosum* y *G. sabiniae* no se encuentran arbitradas hasta el momento, es por esto, que se pierde la confiabilidad del árbol filogenético con el gen 18S, sin embargo, resultaría una secuencia más para este gen.

La secuencia con primers D1/D2, perteneciente a la **fase telial** proveniente de enebro (*J. deppeana*) (J2G2) con núm. de vaucher **ENCB** 121367 fue subida al NCBI como *Gymnosporangium* sp. con número de accesión KM382068.

La secuencia con primers D1/D2, perteneciente a la fase ecial proveniente de fruto de tejocote (*Crataegus* spp.) (P2FCh) núm. de vaucher **ENCB** 121365 fue subida al NCBI como *Gymnosporangium clavipes* con número de accesión KM382067.

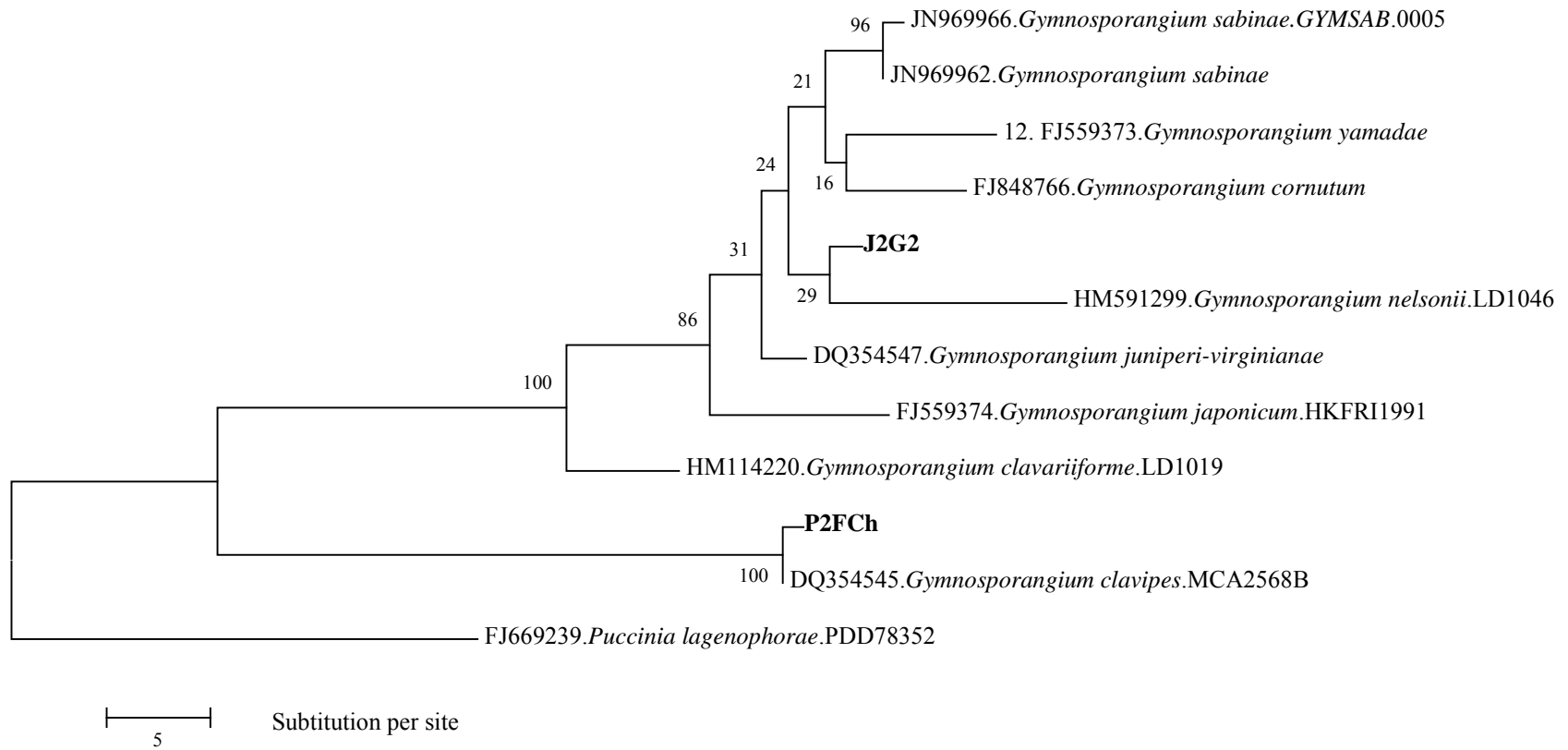


Figura 11. Árbol filogenético del gen 28S (iniciadores D1/D2) de las muestras de la fase telial de enebro (*Juniperus deppeana*) J2G2 y ecial de tejocote (*Crataegus* spp.) P2FCh.

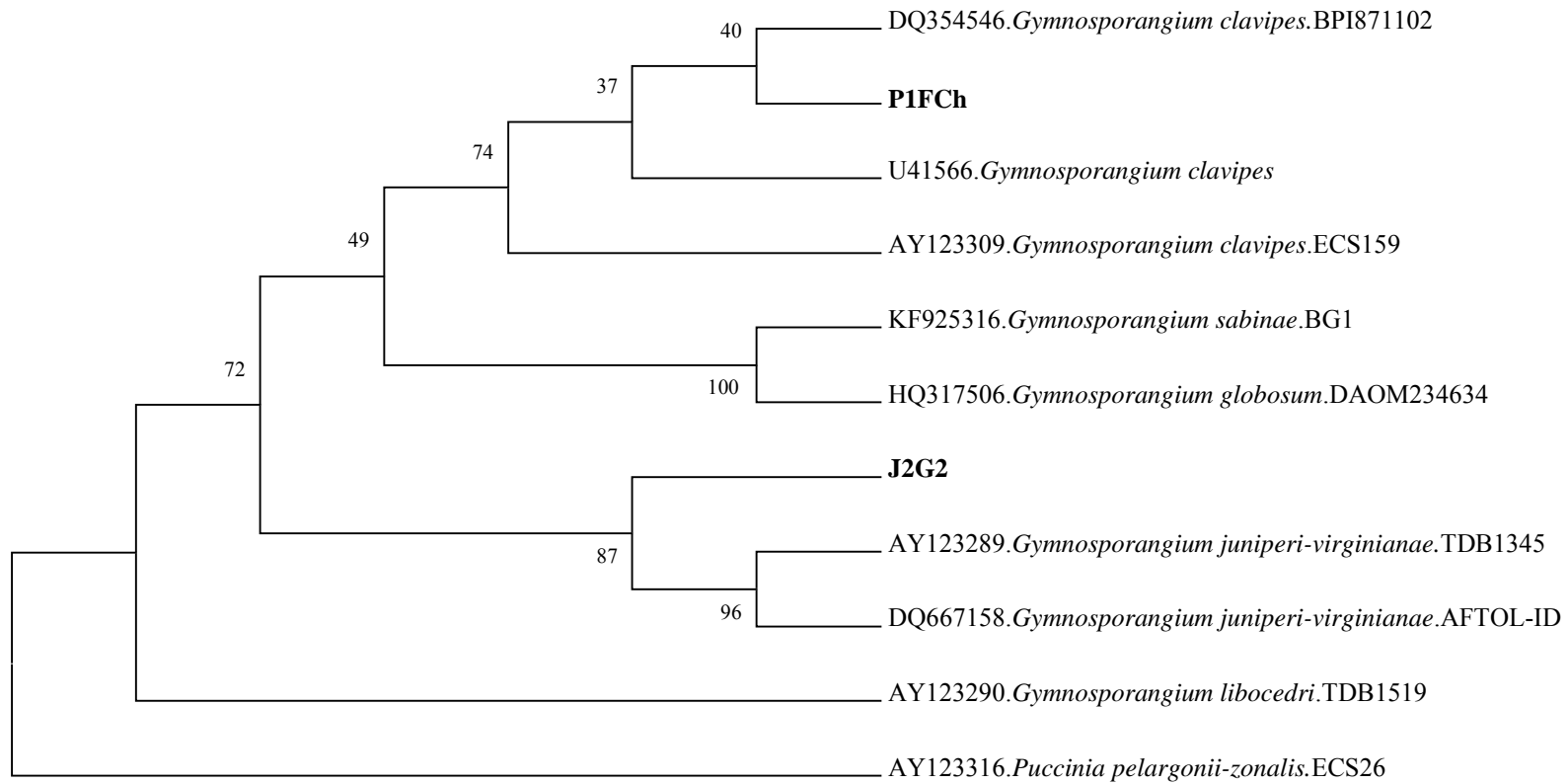


Figura 12. Árbol filogenético del gen 18S (iniciadores Rust2inv/LR6) de las muestras de la fase telial de enebro (*Juniperus deppeana*) J2G2 y ecial de tejocote (*Crataegus* spp.) P1FCh.

Pruebas de asociación

In vivo

Fuentes de inóculo

En el año 2012 la prueba de asociación con el contacto directo de la MTG dio positiva en inoculaciones y no en testigo, esto sucedió en hojas a los 11 días de inoculación, similar a como lo menciona Aldwinckle (1975) quién reporta que los síntomas comenzaron a aparecer en las hojas de manzano aproximadamente 10 días después de la inoculación en cultivares para *G. juniperi-virginianae* con la aspersión de basidiosporas (SB). En éste estudio apartir de la aspersión de SB, dio negativa en inoculaciones y testigo.

En el año 2013 la prueba de asociación resultó negativa, tanto para el contacto directo de la MTG y la aspersión SB, y aunque en algunas inoculaciones y en el testigo dieron positivas. En ambos años estas inoculaciones coincidieron con el mes de septiembre, por lo que se infiere que las plantas como provienen del mismo vivero, probablemente antes de someterse a inoculaciones, ya traían la fuente de inóculo, y por lo tanto para **el año 2012 y 2013, la prueba de asociación resulto negativa** (Cuadro 20).

Para el año 2013 la fuente de inóculo que se utilizó fue a partir de la MTG en tubo de microcentrifuga cerrado en tratamientos a partir de 24 h, independientemente de las condiciones en que se encuentre (Cuadro 19), ya que fue en donde se obtuvo el mayor número de basidiosporas.

En las dos primeras inoculaciones no se obtuvieron síntomas positivos, y se observó que conforme transcurre el tiempo en agua, hay aparición de bacterias lo que podría estar afectando la patogenicidad, por ello es que se realizaron otras pruebas para evaluar la producción de basidiosporas y el crecimiento de bacterias, obteniéndose como el mejor tratamiento, el agua estéril con 2 gotas/L Tween 20[®] más estreptomycin (AETS) en donde se obtuvo una producción similar de basidiosporas y nulo crecimiento de bacterias, por lo cual, fue utilizado como fuente de inóculo **a partir de la tercera hasta la última inoculación. De la tercera a la séptima inoculación no se obtuvieron resultados positivos.**

Debido a que lo viejo del inóculo podría estar afectando la patogenicidad ya que la cantidad en producción de basidiosporas había disminuido a grado tal, que **en la séptima inoculación** no hubo producción de basidiosporas, en las últimas cuatro pruebas se utilizó inóculo recién colectado de campo. De igual modo en las siguientes inoculaciones **no hubo producción de basidiosporas a pesar de que fue material recién colectado en el campo, ya que el material también se encontraba envejecido en los árboles**, sin embargo se continuó con las inoculaciones ya que se observó que algunas teliosporas germinaban con micelio (Cuadro 19).

La décima y onceava inoculaciones dieron positivas a los tratamientos y el testigo, en hojas de nueve hasta 17 días.

Cuadro 19. Resultados de tratamientos modificados para obtención de inóculo a partir germinación de telias de muestras enebro (*Juniperus deppeana*) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

No.	Trats	Telia en inmersión 30 min en eppendorf Abierto/Cerrado	Telia en inmersión 24 h en eppendorf Abierto/Cerrado	Condiciones Ambientales	Fotoperíodo	No. Basidiosporas		Crecimiento bacteriano		
						Material recién colectado	Material conservado	8h	16h	42 h
1	Agua Estéril(AE)	Con y sin	Con y sin	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24	90000	182.5	Nulo	Nulo	Regular
		Trituración	Trituración			82333.66	112.1			
2	AE+ 2 gotas/l Tween 20®(AET)	Con y sin	Con y sin	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24	12000	13.5	Nulo	Nulo	Regular
		Trituración	Trituración							
3	AET+ 4 gotas Ac. Láctico(AETA)	Con y sin	Con y sin	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24	32000	10.2	Nulo	Nulo	Nulo
		Trituración	Trituración							
4	AET + Estreptomina (AETS)	Con y sin	Con y sin	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24	257000	0	Nulo	Nulo	Nulo
		Trituración	Trituración							
4	AET+Surfactante Inex® (AETSu)	Con y sin	Con y sin	Incubadora a 20 y 24 °C	12:12 y 0:24	55000	0	Nulo	Nulo	Poco
		Trituración	Trituración							

Cuadro 20. Concentración de inóculo y condiciones de temperatura y humedad relativa durante las inoculaciones *in vivo* a partir de telias de eebro (*Juniperus deppeana*) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Año	No. y fecha de Inoculaciones	Plantas/tejido inoculado	Reps	Inóculo	Basidiosporas/mL	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)
Invernadero							
2012	Inoculación 1 03/09	Frutos	4	SB y MTG	---		
2013	Inoculación 1 27/05*	Flores y Frutos	3	SB y MTG	85,000	24.8	51.6
2013	Inoculación 2 12/06**	Flores y Frutos	3	SB y MTG	63,666.66	21.3	62.9
2013	Inoculación 3 25/06*	Flores y Frutos	3	SB y MTG	7,000	22.5	64.1
2013	Inoculación 4 03/07**	Flores y Frutos	3	SB y MTG	14,000	26.8	62.1
2013	Inoculación 5 06/07*	Frutos	3	SB y MTG SB y MTG	257,000	20.5	73.4
2013	Inoculación 6 15/07/2013**	Frutos	3	SB y MTG	---	21.1	74.8
2013	Inoculación 7 15/07*	Frutos	3	SB y MTG	---	21.1	74.8
Cámara controlada							
2013	Inoculación 1 15/07**	Frutos	3	SB y MTG	---	22.1	85.3
2013	Inoculación 2 01/08*	Frutos	3	SB y MTG	---	20.5	84
2013	Inoculación. 3 05/08**	Frutos	3	SB y MTG	---	21.1	87
2013	Inoculación 4 05/08**	Frutos	3	SB y MTG		21	81.7

In vitro

Las inoculaciones con SB, con la MTG y los Ts no presentaron síntomas ni signos; sin embargo algunas repeticiones de ambos tratamientos presentaron posibles síntomas que después de ser inspeccionados mediante cortes histológicos fueron identificados como *Eppicoccum* sp., también hubo repeticiones que presentaron contaminaciones por hongos, pertenecientes a los géneros *Alternaria* y *Eppicoccum*, hubieron otras repeticiones que después de 20 días no presentaron ni síntomas ni contaminaciones (Cuadro 21).

Cuadro 21. Resultados de inoculaciones *in vitro* a partir de telias de muestras enebro (*Juniperus deppeana*) colectadas en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012-2013.

Año	Num y fecha de Inoculaciones	Trats	15 ° C Fotoperiodo 12:12 Reps	20 ° C Fotoperiodo 12:12 Reps	Aparición de síntomas y signos
2013	I 15/11/2013	SB y MTG	8	8	Sin presencia
2013	II 20/06/2013	SB y MTG	8	8	Sin presencia

CONCLUSIONES

En el Eje Neovolcánico del estado de Puebla se presentó más de una especie de *Gymnosporangium*:

G. clavipes Cke. & Pk cuya su fase telial no se encontró y cuya fase ecial se encontró en frutos de tejocote (*Crataegus* spp.) de la variedad *Chapeado* y tipo criollo.

Gymnosporangium sp. que morfológicamente coincidió con *G. globosum* Parl. "roya del tejocote americano", sin embargo, no se logró confirmar con el diagnóstico molecular. Su fase telial se encontró en árboles de enebro (*Juniperus deppeana* Steud) y su fase ecial en hojas de tejocote (*Crataegus* spp.) de la variedad *Chapeado*.

En la prueba de asociación *in vitro* e *in vivo* no se obtuvieron resultados positivos en la inoculación de plantas de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado* a partir de basidiosporas de agallas proveniente de *J deppeana* Steud; corroborando que en los

parásitos obligados los factores bióticos y abióticos deben ser muy específicos para que se presente la enfermedad.

RECOMENDACIONES

Se recomienda que para comprobar la relación que existe entre la roya del tejocote (*Crataegus* spp.) y la del enebro (*Juniperus deppeana*) se deben realizar las pruebas de asociación; con lo que respecta al inóculo, éste debe provenir de agallas recién colectadas y comprobar la germinación de las basidiosporas en agua-agar en lo que respecta al hospedante, las plantas de tejocote deben ser obtenidas a partir de semillas y que se encuentren bajo condiciones controladas para pruebas *in vivo* o en brotes obtenidos a partir de cultivo de tejidos para para pruebas *in vitro*.

LITERATURA CITADA

- Aime, M. C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47:112-122.
- Aldwinckle, H. S. 1975. Pathogenic races of *Gymnosporangium juniper-virginianae* on apple. *Phytopathology* 65:958-961.
- Aldwinckle, H. S., Lamb, R. C. y Gustafson, H. L. 1977. Nature and inheritance of resistance to *Gymnosporangium juniper-virginianae* in apple cultivars. *Phytopathology* 67: 259-266.
- Anónimo. 2004. SEMARNAT. 2004. Parque nacional Izta-Popo-Zoquiapan. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- Anónimo. 2006. *Gymnosporangium* spp.(no Europea). European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

- Anónimo. 2009. RSPM No. 35. Directrices para la movilización de frutales de hueso, pepita y vid dentro de un país miembro de la NAPPO.
- Barnett, L. H., y Hunter, B. B. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Chen, L., Zhang, S., Zhao, H., Korpelainen, y H., Li, C. 2010. Sex-related adaptative responses to interaction of drought and salinity in *Populus vunnanensis*. *Plant, Cell & Environment* 33: 1767-1778.
- Cibrián T., D., Alvarado R. D., y García D. S. E. 2007. Enfermedades forestales en México. Universidad Autónoma Chapingo, CONAFOR: Forest Service United States. 15 Canadian Forest Service. Comisión Forestal de América del Norte. pp: 202-205.
- Cutter, V. M. Jr. 1959. Studies on the isolation and growth of plant rusts in host tissue cultures and upon synthetic media. I. *Gymnosporangium*. *Mycologia* 51: 248-295.
- Cummins, G. B. 1959. Illustrated genera of rust fungi. Burgess Publ. Co., Mineapolis, 131 pp.
- Cummins, G. B. e Hiratsuka Y. 1991. Illustrated genera of rust fungi, 2nd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- García, E. 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). "Climas" Clasificación de Koppen, modificado por García, Escala 1:1000000. México.
- González, G. N. 1980. Relación Taxonómica entre la roya de Enebro (*Juniperus* spp.) y la roya del tejocote (*Crataegus* sp) y la roya del tejocote (*Crataegus* sp.). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 61 p.
- Jones, A. L y Aldwinckle, H. S. 1990. Compendium of apple and pear diseases. APS Press, St. Paul, MN.

- Katterman, F. R. H. y Shattuck, V. I. 1983. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. *Prep Biochem* 13: 347-359.
- Kern, F. D. 1973. A revised taxonomic account of *Gymnosporangium*. University Park, Pennsylvania: Penn State Univ Press. . Pennsylvania State University Press 134 p.
- Kropp, B. R., Hansen, D. R., Wolf, P.G., Flint, K.M., y Thomson, S.V. 1997. A study on the phylogeny of the dyer's woad rust fungus and other species of *Puccinia* from Crucifers. *Phytopathology* 87:565-571.
- Lee, S. K., y Kakishima M. 1999a. Aeciospore surface structures of *Gymnosporangium* and *Roestelia* (Uredinales). *Mycoscience* 40:109-120.
- Lee S. K., y Kakishima M. 1999b. Surface structures of peridial cells of *Gymnosporangium* and *Roestelia* (Uredinales). *Mycoscience* 40:121-131.
- León-Gallegos H. M. y Cummins, G. B. 1981. Uredinales (Royas) de México, Vols I y II. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Culiacán, Sinaloa, México. 492 p.
- Littlefield, L. J. y Heath, M. C. 1979. Ultrastructure of rust fungi, pp. 20-45. Academic Press, N.Y.
- Martínez, M. 1963. Los *Juniperus* Mexicanos. In Martínez, M. 1963. Las Pináceas mexicanas. Tercera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal. pp. 289-400.
- McKnight, T. L., y Hess, D. 2000. Climate Zones and Types. *Physical Geography: A Landscape Appreciation*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. 200 p.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2014. Gen Bank. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consultado el 01 de Marzo de 2014.
- Obeso, J. R. 2002. The costs of reproduction in plants. *New Phytologist* 155:321-348.
- Pady, S. M., y Kramer, C. L. 1971. Basidiospore discharge in *Gymnosporangium*. *Phytopathology* 61:951-953.

- Pandey, R. N., Adams, R. P. y Flournoy, L. E. 1996. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol Biol Rep* 14: 17-22.
- Peterson, D. G., Boehm, K. S. y Stack, S. M. 1997. Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), a plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Mol Biol Rep* 15(2): 148-153.
- Porebski, S., Bailey, L. G. y Baum, B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15(1): 8-15.
- Phipps, J. B. 1983. Biogeographic, taxonomic and cladistic relationships between east asiatic and north american *Crataegus*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70: 667-700.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., y Gibson, T. J. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-80.
- Rebollar, A. A., H. S. Silva R., L. X. Zelaya M., M. Ellis A. 2009. First Report of *Peronospora sparsa* Causing Downy Mildew (Dryberry) of *Rubus fruticosus* in Mexico. *Plant Disease* 93 (6) 674.
- Van der Auwera, G., Chapelle S., De Watcher, R. 1994. Structure of the large ribosomal subunit RNA of *Phytophthora megasperma*, and phylogeny of the oomycetes. *FEBS Letters* 338 (1994) 133-136

- Vilgalys, R., & Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172, 4238-4246.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315-322.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7:203-214.

CAPÍTULO II. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ROYA (*Gymnosporangium clavipes* Cke. &Pk. Y *Gymnosporangium* sp.) DEL TEJOCOTE (*Crataegus* spp.) Y SU RELACIÓN CON SU FENOLOGÍA Y CONDICIONES AMBIENTALES, EN EL EJE NEOVOLCÁNICO, PUE.

Edgar Humberto Nieto López, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

Se estudió la epidemiología de la fase picnial y ecial en tres plantaciones de tejocote de dos materiales a diferente altitud sobre el nivel del mar en el eje neovolcánico en el año 2012 y 2013. En cada plantación se cuantificó la incidencia en frutos y la densidad de lesiones eciales en hojas. Se determinaron las fases fenológicas del fruto del tejocote y se colocaron dataloggers en cada uno de los sitios de evaluación. Se realizaron análisis de varianza y estudios de correlación con datos fenológicos del fruto y variables climatológicas. La incidencia de *G. clavipes* en frutos de tejocote fue de 36.20 %, 10.49 % y 0 % entre plantaciones en 2012, y de cero por ciento en todas las plantaciones en 2013. La densidad de lesiones de *G. clavipes* en hojas de tejocote fue de cero en todas las plantaciones en 2012 y 2013. Las epidemias se presentaron con temperatura de 14.5 °C, humedad relativa de 57.51 % y precipitación de 216.2 mm y se ajustaron al modelo monomolecular. La venta fenológica de la fase picnial se presentó únicamente en frutos de abril a junio, y de la fase ecial continuó de junio a septiembre. La plantación con mayor altitud presentó mayor incidencia y tuvo al menos una temperatura media diferente, en los meses de abril y junio, y al menos una humedad relativa diferente en los meses de abril y junio, entre los años 2012 y 2013. La incidencia se presentó únicamente en frutos, y estuvo relacionada directamente con la altitud; que a su vez tiene una relación directa con la humedad relativa, y una relación indirecta con la temperatura y la fenología de los frutos de tejocote. La presencia de *Gymnosporangium* sp. se presentó únicamente en hojas en diferente época en que se observó *G. clavipes*, pero no fue posible estudiarla más a detalle.

Palabras clave: asnm, densidad, incidencia, ecias, picnios y variables climatológicas.

EPIDEMIOLOGY OF TEJOCOTE (*Crataegus* spp.) RUST (*Gymnosporangium clavipes* Cke. & Pk. AND *Gymnosporangium* sp.) AND ITS CORRELATION WITH IT PHENOLOGY AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON TRANS MEXICAN NEOVOLCANIC BELT, PUE.

Edgar Humberto Nieto López, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

The epidemiology of rust was studied in the pycnial and aecial phase in two materials from three tejocote plantations in the Trans-Mexican Volcanic belt in 2012 and 2013. In each plantation, incidence in fruit and aecial density lesions on leaves were quantified. The phenological phases of the tejocote fruit were determined and a datalogger was installed in each evaluation site. Analysis of variance and correlation studies were carried out with phenological data of fruit and climatic variables. Incidence of *G. clavipes* in tejocote fruit was from 36.20 %, 10.49 % and zero percent among plantations at different masl elevations and zero percent in all plantations in 2013. The density of aecial lesions in *G. clavipes* in tejocote leaves was zero in all plantations in 2012 and 2013. The epidemics began and continued to infect at 14.5 °C, 57.51 % relative humidity and 216.2 mm of rainfall and followed the monomolecular model. The pycnial phase of *G. clavipes* was only present in fruit from april to june, the last infection being in June, and the aecial phase continued from june to september. There were significant differences between the two years in the plantation with a greater incidence of *G. clavipes*, regarding the months the infection took place, the temperature in april and june and the relative humidity from april to june. Incidence of *G. clavipes* was directly related to altitude, which in turn is directly related to relative humidity and indirectly related to temperature and the size of the tejocote fruits. *Gymnosporangium* sp. occurred on leaves only in a different period to *G. clavipes*, but was not studied epidemiologically.

Key words: masl, density, incidence, aecia, pycia and climatic variables.

INTRODUCCIÓN

La roya (*Gymnosporangium juniperi-virginianae*) es la principal enfermedad del manzano (*Malus pumila*) en E.U.A., varios estudios se han llevado a cabo a través de los años, donde las condiciones ambientales necesarias para la infección también han sido objeto de estudio con énfasis en el tipo de liberación y sobrevivencia de las basidiosporas, que a su vez están relacionados con el tiempo de humedad en el follaje del manzano, humedad relativa, temperatura, radiación y nubosidad.

También han sido estudiados la susceptibilidad y tolerancia de algunos cultivares de ésta especie (*Malus pumila*) a *Gymnosporangium juniperi-virginianae* y la etapa fenológica del hospedante en que se presenta la enfermedad (Aldwinckle *et al.*, 1980; Pearson *et al.*, 1980).

En el año 2012 se presentó la roya en la principal zona de producción de tejocote en el estado de Puebla, nunca se había presentado con esa magnitud y por tanto causó severos daños económicos según refirieron los mismos productores; en la literatura no se tiene mucha información sobre esta enfermedad, por lo tanto, en la presente investigación se decidió estudiar aspectos epidemiológicos que nos permitan identificar las condicionantes para que se presente, y en base a esto, prevenirla o determinar la época exacta para su manejo, y reducir así las pérdidas económicas.

Por la gravedad del problema noticias como la siguiente aparecieron sobre la presencia de la roya del tejocote en la zona de estudio del estado de Puebla: “Sube el precio del tejocote por invasión de roya en el 60 % de los cultivos”, “en riesgo 5,000 ha de cultivos de tejocote en Calpan” (La Jornada de Oriente, 2012). En el mismo año “el aumento en la incidencia por *Gymnosporangium clavipes* Cke. & Pk. probablemente se vieron favorecidas por mayor humedad, vientos y proximidad de bosques de *Juniperus* spp.” en Michoacán (Anónimo, 2012b).

Con base a lo anterior en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Determinar el efecto de la altitud y condiciones climáticas sobre la incidencia y densidad de la enfermedad.
- b) Determinar las ventanas fenológicas que permiten la infección en el tejocote.

Con base a lo anterior en la presente investigación se planteó la siguientes hipótesis:

La incidencia en frutos y la densidad de lesiones eciales están relacionadas proporcional y directamente con una mayor altitud sobre el nivel del mar debido a que cambian condiciones ambientales que desconocemos y que influyen en que la enfermedad se presente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en árboles en tres plantaciones distribuidas en un rango de altitud de 2,400 a 2,800 msnm en Chiautzingo y Huejotzingo (P1F^z, P2F^z y P3F^z; Cuadro 1).

Epidemiología de la roya del tejocote

Se determinaron cualitativamente los signos y síntomas de la fase picnial y ecial en los frutos. El desarrollo de la enfermedad se estudió en las etapas fenológicas floración, amarre de fruto y fructificación que correspondieron al mes de abril a octubre del 2012 y del 2013. Los árboles de la plantación 1 (P1) (2,868 msnm), plantación 2 (P2) (2,723 msnm) y plantación 3 (P3) (2,470 msnm) tienen una edad de 30 años aproximadamente, encontrándose establecidos en las terrazas de los terrenos a una distancia de 5 m entre árboles. Se eligieron 10 árboles / plantación de la variedad *Chapeado* y tipo criollo, de cada árbol se seleccionó una rama del estrato bajo del punto cardinal E; que tenía no al menos 20 frutos y 20 hojas que fueron marcados. La evaluación se llevó a cabo de manera sistemática buscando la fase picnial y ecial de *Gymnosporangium clavipes* en frutos y hojas en intervalos de 30 días.

Se decidió estudiar sólo los parámetros de incidencia y densidad de lesiones eciales porque la toma de datos representó dificultades en los frutos para evaluar severidad ya que éstos llegan a deformarse y la baja incidencia obtenida no permitió validar la escala. La incidencia de frutos enfermos se estimó mediante la ecuación $I_i = \left(\frac{\sum ni}{N_i} \right) 100$; donde I_i = incidencia (%) de frutos con roya en el momento i ; n_i = número de frutos con picnios

o ecios en el momento i ; N_i = población total de frutos experimentales. La densidad de lesiones eciales por hojas se estimó mediante la ecuación $D_i = (\sum n_i)/N_i$, donde D_i = densidad (Núm.) de hojas con roya en el momento i ; n_i = número de lesiones por picnios o ecios en el momento i ; N_i = población total de hojas.

Los datos porcentuales de incidencia se transformaron a valores numéricos por el método Townsend y Heuberger (1943) y a cada valor se le sumó 0.5 y se dividió entre $100 + 2$ para evitar la pérdida de datos al obtener el logaritmo de cero.

Los datos promedio de las epidemias se transformaron con el logaritmo natural (intensidad), logaritmo natural $[1/(1-\text{intensidad})]$, logaritmo natural $[\text{intensidad}/(1-\text{intensidad})]$, y $-\text{logaritmo natural} [-\text{logaritmo natural}(\text{intensidad})]$ para estimar el ajuste de esta variable a través del tiempo a los modelos exponencial, monomolecular, logístico y Gompertz, respectivamente (Campbell y Madden, 1990). El modelo matemático con mejor ajuste se seleccionó con base al mayor coeficiente de determinación (R^2). Todos los cálculos se hicieron mediante el programa estadístico InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba - Facultad de Ciencias Agropecuarias, ARG).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los datos de incidencia en frutos y densidad en hojas entre las plantaciones, para verificar si la altitud tiene influencia sobre la incidencia y densidad de la enfermedad. Así mismo, se hizo un ANOVA de los datos de incidencia en frutos y densidad en hojas entre la variedad *Chapeado* y tipo criollo en una misma plantación y evaluación, esto para verificar si existe algún material de tejocote que sea más tolerante.

Relación del gradiente altitudinal (asnm) en las plantaciones con las condiciones ambientales

Las condiciones ambientales en cada una de las plantaciones del área de estudio se midieron con dataloggers Watchdog 1650 (Spectrum Technologies[®], USA), los cuales fueron colocados en un rango de ± 50 m de distancia en cada una de las plantaciones y se registró temperatura ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (%) y precipitación (mm) en intervalos de 30 min.

Análisis de varianza

Utilizando el programa estadístico InfoStat se realizó un ANOVA de la temperatura, humedad relativa y precipitación mensual Para una misma plantación en años diferentes (2012 y 2013) y de las tres plantaciones evaluando los mismos parámetros en un mismo año.

Factor de correlación

Los datos de incidencia en frutos y densidad de lesiones eciales en hojas de cada año fueron correlacionados de manera individual mediante la estimación del factor de Pearson (R) con la temperatura media mensual, humedad relativa media mensual y la precipitación mensual.

Relación del gradiente altitudinal (asnm) en las plantaciones con la fenología del tejocote

Se categorizaron las fases fenológicas de la flor y fruto del tejocote en una escala. En cada plantación se eligieron los mismos 10 árboles de tejocote (*Crataegus* spp.) de la variedad *Chapeado* y tipo criollo dónde se evaluó la incidencia en frutos y densidad de lesiones eciales en hojas. La evaluación consistió en seleccionar 10 frutos al azar/árbol para definir en qué etapa fenológica se encontraba de acuerdo a la escala fenológica previamente establecida para determinar si existió alguna etapa de desarrollo en que el hospedante tiene mayor incidencia de la enfermedad; en la fase de fructificación III debido a que los frutos era muy grandes, decidió evaluarse cuantitativamente, así que se midió la longitud ecuatorial y polar con la ayuda de un vernier digital (Truper, MEX) y se obtuvo la relación de tamaño del fruto mediante la ecuación $Ri = \frac{DEi}{DLi}$ donde Ri= relación de tamaño de frutos en el momento i; DE = Diámetro ecuatorial de frutos en el momento i; DL = Diámetro ecuatorial de frutos en el momento i, ya que en esta etapa eltamaño de los mismos fue muy variable. La evaluación se llevó a cabo en intervalos de 30 días.

Análisis de varianza

Utilizando el programa estadístico InfoStat para una misma plantación en año diferente se realizó un ANOVA de los datos fenológicos y de las 3 plantaciones en un mismo año también.

Factor de correlación

Los datos de incidencia en frutos y densidad de lesiones eciales en hojas de cada año fueron correlacionados mediante la estimación del factor de Pearson (R) con los datos fenológicos.

Otras variables

Durante las evaluaciones se observó en las plantaciones de tejocote la presencia de diferentes niveles de ceniza del volcán Popocatepetl, por lo tanto, se buscaron registros actualizados de emisiones de ceniza volcánica, con la intención de relacionar este factor con la incidencia y densidad de la enfermedad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Epidemiología de la roya del tejocote

En base a los signos de la fase picnial y ecial de *G. clavipes* en frutos (Figuras 13 y 14), la incidencia promedio de *G. clavipes* en frutos de la variedad *Chapeado* en la plantación P1 el 30/06/2012 fue de 36.20 % y del tipo criollo fue de 28.85 % (Cuadro 22, Figura 15). La incidencia promedio de *G. clavipes* en frutos de la variedad *Chapeado* en la plantación P2 el 30/06/2012 fue de 10.49 % y del tipo criollo fue de 7.90 % (Cuadro 22, Figura 15). La incidencia promedio de *G. clavipes* en frutos de la variedad *Chapeado* y tipo criollo en la plantación P3 en el año 2012 fue de cero porciento (Cuadro 22, Figura 15) y de igual manera en las plantaciones P1, P2 y P3 en el año 2013.



Figura 13. Signos de las fases picnial y eical en frutos de tejocote. A) Fase picnial inmadura (coloración naranja). B) Fase picnial madura (coloración naranja oscuro) C) Fase eical.



Figura 14. Daños de las fases picnial y eical en frutos de tejocote. A y B) Frutos con deformación.

Cuadro 22. Incidencia de las fases picnial y eical de *Gymnosporangium clavipes* en frutos de tejocote (*Crataegus* spp.) en tres plantaciones con diferente altitud durante 2012 en el Eje Neovolcánico, Pue.

Árbol	Plantación 1 (2,868 msnm)		Plantación 2 (2,723 msnm)		Plantación 3 (2,470 msnm)	
	var. <i>Chapeado</i> (%)	tipo criollo (%)	var. <i>Chapeado</i> (%)	tipo criollo (%)	var. <i>Chapeado</i> (%)	tipo criollo (%)
1	38.89	41.67	7.41	0.0	0.0	0.0
2	64.29	14.29	14.29	0.0	0.0	0.0
3	23.08	8.33	0.0	16.0	0.0	0.0
4	10.0	30.0	14.81	19.44	0.0	0.0
5	26.32	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	57.69	30.0	2.7	25.93	0.0	0.0
7	17.39	33.33	4.55	0.0	0.0	0.0
8	23.08	40.91	15.38	10.0	0.0	0.0
9	40.0	0.0	18.52	7.69	0.0	0.0
10	37.5	50.0	27.27	0.0	0.0	0.0

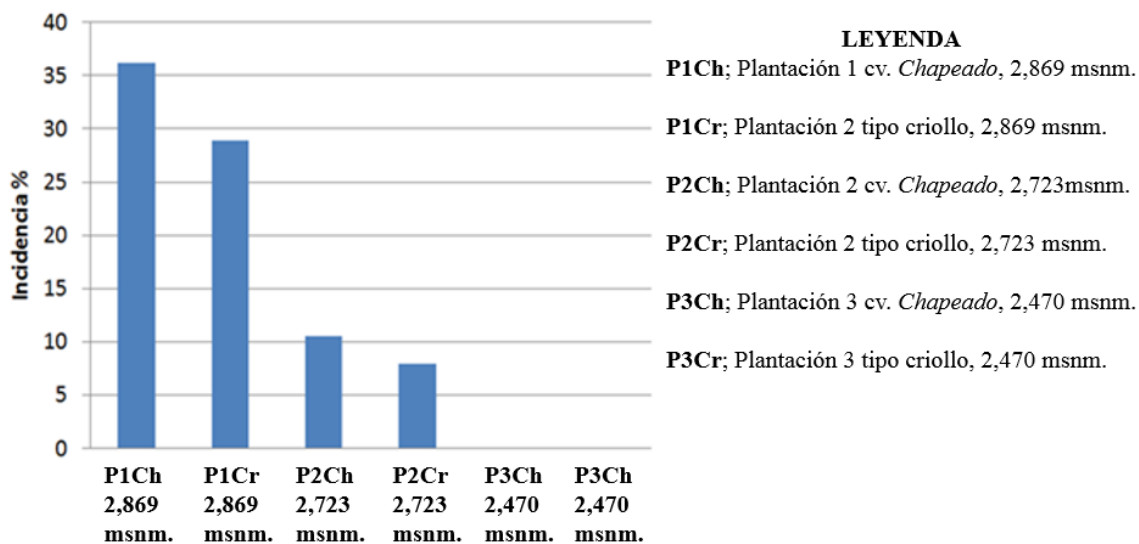


Figura 15. Incidencia promedio de *Gymnosporangium clavipes* en frutos de tejocote (*Crataegus* spp.) en tres plantaciones con diferente altitud el 30/06/12 en el Eje Neovolcánico, Pue.

La epidemia en los frutos de la plantación P1 en el año 2012 de la variedad *Chapeado* y tipo criollo se ajustaron al modelo monomolecular ($R^2=0.77$, $R^2=0.99$), de igual forma en la plantación P2 en los mismos materiales de tejocote ($R^2=0.01$, $R^2=0.99$) (Cuadro 23); por lo tanto, ambas epidemias se comportaron como una enfermedad monocíclica y esto coincide con Sinclair y Lyon (2005) en que las especies de *Gymnosporangium* completan su ciclo de vida en un año pero la mayoría requieren de dos. En el año 2012 no se presentó la enfermedad en frutos en la plantación P3 en ninguno de los materiales de tejocote.

En el año 2012 y 2013, no hubo lesiones eciales en hojas de *G. clavipes* en las plantaciones P1, P2 y P3 en ambos materiales de tejocote.

Cuadro 23. Análisis mediante el modelo monomolecular utilizado para caracterizar el progreso temporal de las fases picnial y eicial de *Gymnosporangium clavipes* en dos plantaciones de tejocote (*Crataegus* spp.) en el Eje neovolcánico, Pue. durante 2012.

Plantación	Tipo de tejocote	R ²	Ecuación Ln [1/(1-y)]
P1	<i>Chapeado</i>	0.7715	= 0.0087t - 6.2974
	criollo	0.9996	= 0.0074t - 5.7957
P2	<i>Chapeado</i>	0.0189	= 0.0001t - 5.7353
	criollo	0.9987	= 0.003t - 6.1265

Se encontraron diferencias significativas en la incidencia de la enfermedad en frutos dependiendo de la altitud en que se encuentran las plantaciones (Cuadro 24). No hubo diferencias significativas de la incidencia de la enfermedad en frutos entre variedad *Chapeado* y tipo criollo en una misma plantación (Cuadro 25), lo que nos indica que la presencia de la enfermedad del tejocote esta condicionada a la altitud.

Cuadro 24. Análisis de varianza de incidencia promedio de *Gymnosporangium clavipes* en frutos entre las distintas plantaciones de tejocote (*Crataegus* spp.) var. *Chapeado* y tipo criollo a diferente altitud en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.

ANOVA de datos promedio de incidencia de tipo criollo y var. <i>Chapeado</i>	Plantación P1 (2,868 msnm), P2 (2,723 msnm) y P3 (2,470 msnm) del año 2012
F	21.4726
Valor crítico para F	3.3541

Cuadro 25. Análisis de varianza de incidencia de *Gymnosporangium clavipes* en frutos en el tipo criollo y var. *Chapeado* durante la evaluación III en las plantaciones de tejocote (*Crataegus* spp.) a diferente altitud en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.

ANOVA de Incidencia durante la evaluación III	Plantación P1 tipo criollo y var. <i>Chapeado</i>	Plantación P2 tipo criollo y var. <i>Chapeado</i>
F	0.6419	4.4138
Valor crítico para F	0.7452	4.4138

Es importante señalar que en una plantación joven de tejocote de la variedad *Chapeado* que no se encontraba bajo estudio se observaron picnios y ecios en hojas de *Gymnosporangium* sp. de agosto a octubre del año 2012 y no se desarrollaron en el año 2013, pero su densidad de lesiones eciales no fue cuantificada.

Se concluyo que, la fase picnial de *G. clavipes* se presentó únicamente en frutos en los meses de abril a junio, y la fase ecial continuó de junio a septiembre, coincidiendo con lo que reporta Sinclair y Lyon (2005), en que las fases espermogonial / picnial y ecial forman lesiones de amarillo a naranja rojizo sobre hojas, tallos sin lignificar y frutos del hospedante angiospermo a finales de primavera y verano, por lo tanto, se confirma que la última infección de la fase picnial se presentó en el mes de junio, sin embargo, la fase picnial y ecial de *Gymnosporangium* sp. se presentaron únicamente en hojas en los meses de agosto a octubre del año 2012, y no coincide con los autores anteriormente mencionados (2005) en que se forman a finales de primavera y verano. En las plantaciones P1, P2, y P3 en el año 2013 no hubo epidemias de *G. clavipes* en hojas en la variedad *Chapeado* y tipo criollo y en la plantación externa del estudio en 2013 no se presentaron epidemias de *Gymnosporangium* sp. en hojas en la variedad *Chapeado* y tipo criollo.

Relacion del gradiente de altitud en las plantaciones con las condiciones ambientales

Cuando la enfermedad de los frutos en las plantaciones en el año 2012 se presentó a partir de una temperatura media de 14.5 °C, humedad relativa media de 57.51 % y precipitación de 216.2 mm, coincidiendo con el intervalo de temperatura óptimo de 10 a 24 °C para la infección de *G. juniperi-virginiananae* en hojas de manzana con un período de humedad de la hoja de 2 a 5 h y de 4 a 6 h para una infección grave reportado por Aldwinckle *et al.*(1980), y con temperatura óptima de 13 a 16 °C reportado por Palmiter (1952), pero no coincidiendo con la temperatura de alrededor de 18 °C reportado por Giddings (1918). Sin embargo, la temperatura media de 15.5 °C, humedad relativa de 47.46 % y precipitación de 736.6 mm donde no se presentaron epidemias en las plantaciones en el año 2013, de igual manera coinciden con el intervalo de temperatura óptimo que mencionan Aldwinckle *et al.* (1980) y Palmiter (1952).

Análisis de varianza

Se presentó diferencia significativa en la incidencia de la enfermedad en ambos materiales en diferentes altitudes durante las evaluaciones realizadas (Cuadro 26) lo que indica que la incidencia puede estar influenciada por la variación en las condiciones ambientales.

Cuadro 26. Análisis de varianza de la incidencia de *Gymnosporangium clavipes* en frutos de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado* y tipo criollo a través de las evaluaciones de tres plantaciones en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.

ANOVA en Incidencia en frutos evaluacion I	Plantación P1, P2 y P3		ANOVA Incidencia en frutos evaluacion II	Plantación P1, P2 y P3		ANOVA Incidencia en frutos evaluacion III	Plantación P1, P2 y P3	
	<i>Chapeado</i>	criollo		<i>Chapeado</i>	criollo		<i>Chapeado</i>	criollo
F	10.965	142.799		113.094	938.877		150.288	482.613
Valor crítico para F	335.413	335.413		335.413	340.282		335.413	340.282

En una misma altitud y en una misma evaluación entre ambos materiales no se presentó diferencias en incidencia de *G. clavipes* (Cuadro 27), lo que nos indica que la temperatura, humedad relativa y precipitación tienen influencia en la incidencia de la enfermedad.

Cuadro 27. Análisis de varianza de incidencia de *Gymnosporangium clavipes* en frutos de tejocote (*Crataegus* spp.) entre variedad *Chapeado* y tipo criollo en una misma plantación a través de las evaluaciones en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.

ANOVA Incidencia evaluacion I	Plantación P1	Plantación P2	ANOVA Incidencia evaluacion II	Plantación P1	Plantación P2	ANOVA Incidencia evaluacion III	Plantación P1	Plantación P2
	<i>Chapeado</i> y criollo	<i>Chapeado</i> y criollo		<i>Chapeado</i> y criollo	<i>Chapeado</i> y criollo		<i>Chapeado</i> y criollo	<i>Chapeado</i> y criollo
F	100.190	0.07003		0.0743	0.0151		0.6045	0.6789
Valor crítico para F	441.387	441.387		441.387	441.387		441.387	441.387

Temperatura

Análisis de varianza

Se presentaron diferencias significativas en la temperatura de algunos meses entre los años 2012 y 2013 en la plantación P1(2,868 msnm), que fue la que presentó mayor incidencia de *G. clavipes* en ambos materiales, por lo cuál la temperatura tuvo un efecto en la incidencia de la enfermedad (Cuadro 28), con una temperatura media más baja en el año 2012 en los meses de enero, febrero, abril, junio y julio con 10.0, 10.9, 13.8, 14.3 y 13.3 °C, respectivamente, de los cuales, los meses que correspondieron al período de infección fueron abril y junio (Figura 16), coincidiendo con Aldwinckle *et al.* (1980) y Palmiter (1952) en el intervalo de temperatura óptimo para la enfermedad y no así con Giddings (1918) que reporta temperatura alrededor de 18 °C, con respecto a la plantación P3 (2,470 msnm) que también se ajusta a las condiciones de los autores antes mencionadas (Figura 17).

Cuadro 28. Análisis de varianza de la temperatura mensual en una misma altitud (P1, 2,868 msnm) en el Eje Neovolcánico, Pue. entre el año 2012-2013.

ANOVA de Temperatura mensual	Plantación P1 Año 2012-2013						
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
F	151.061	415.015	103.169	598.441	256.244	103.924	357.359
Valor crítico para F	400.1198	401.954	405.174	400.687	400.119	400.687	400.119

Factor de correlación

En el año 2012 de la P1 (2,868 msnm) que fue la que presentó mayor incidencia de *G. clavipes* en ambos materiales, la incidencia de *G. clavipes* y la temperatura durante las tres evaluaciones tuvieron una correlación inversa (Cuadro 29), sin embargo debido al bajo valor en el factor de determinación, es que decimos que se ajusta muy poco a la realidad, y en el tipo criollo de la P1 definitivamente no existió correlación.

Cuadro 29. Análisis de correlación entre incidencia de *Gymnosporangium clavipes* en frutos de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado* y tipo criollo y las variables climatológicas de temperatura, humedad relativa y precipitación en la plantación P1 (2,868 msnm) en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.

Evaluaciones en incidencia 2012	Plantación P1 Temperatura		Plantación P1 Humedad Relativa		Plantación P1 Precipitación	
	<i>Chapeado</i>	Criollo	<i>Chapeado</i>	Criollo	<i>Chapeado</i>	Criollo
	Factor de Correlación(R)	-0.34	0.02	-0.82	-0.97	-0.86
Coefficiente de determinación (R ²)	0.11	0.00079	0.68	0.95	0.74	0.97

Humedad relativa

Análisis de varianza

Se presentaron diferencias significativas en la humedad relativa de algunos meses entre los años 2012 y 2013 en la plantación P1(2,868 msnm) que fue la que presentó mayor incidencia de *G. clavipes* en ambos materiales, por lo cuál la humedad relativa tuvo un efecto en la incidencia de la enfermedad (Cuadro 30) con una humedad relativa media más alta en el año 2012 en los meses de enero, febrero, marzo, abril, junio y julio con 59.0, 67.3, 49.7, 46.8, 72.8 y 80.3 %, respectivamente, de los cuales los meses de infección fueron abril y junio (Figura 16), coincidiendo con Aldwinckle *et al.* (1980) en el periodo de humedad óptimo para la enfermedad, con respecto a la plantación P3 (2,470 msnm) que también se ajusta a las condiciones de los autores antes mencionadas (Figura 17).

Cuadro 30. Análisis de varianza de humedad relativa mensual en una misma altitud (P1, 2,868 msnm) en el Eje Neovolcánico, Pue. entre el año 2012-2013.

ANOVA	Plantación P1 Año 2012-2013						
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
F	287.895	121.042	12.484	793.847	228.404	138.847	555.546
Valor crítico para F	400.119	401.954	405.174	401.297	400.119	400.687	400.119

Factor de correlación

En el año 2012 en la variedad *Chapeado* de la P1 (2,868 msnm) que fue la que presentó mayor incidencia de *G. clavipes* en ambos materiales, la incidencia de *G. clavipes* y la humedad relativa durante las tres evaluaciones tuvieron una correlación inversa (Cuadro 30), lo que nos indica que conforme incrementa la humedad relativa hay una menor incidencia de la enfermedad.

Precipitación

Análisis de varianza

Se presentaron diferencias significativas en la precipitación de algunos meses entre los años 2012 y 2013 en la plantación P1 (2,868 msnm) que fue la que presentó mayor incidencia de *G. clavipes* en ambos materiales, por lo cual, la precipitación tuvo un efecto en la incidencia de la enfermedad (Cuadro 31) con una precipitación mayor en el año 2012 en el mes de febrero con 19.6 mm (Figura 16), con respecto a la plantación P3 (2,470 msnm) que también coincide con lo que reporta Aldwinckle *et al.* (1980) en el periodo de humedad óptimo para la enfermedad (Figura 17).

Cuadro 31. Análisis de varianza de temperatura mensual en una misma altitud (P1, 2,868 msnm) en el Eje Neovolcánico, Pue.entre el año 2012-2013.

ANOVA de Precipitación mensual	Plantación P1 Año 2012-2013						
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
F	109.192	481.709	0.02848	0.9329	18.929	0.9839	0.0027
Valor crítico para F	400.119.138	401.9546	403.430	400.687	400.119	400.687	400.119

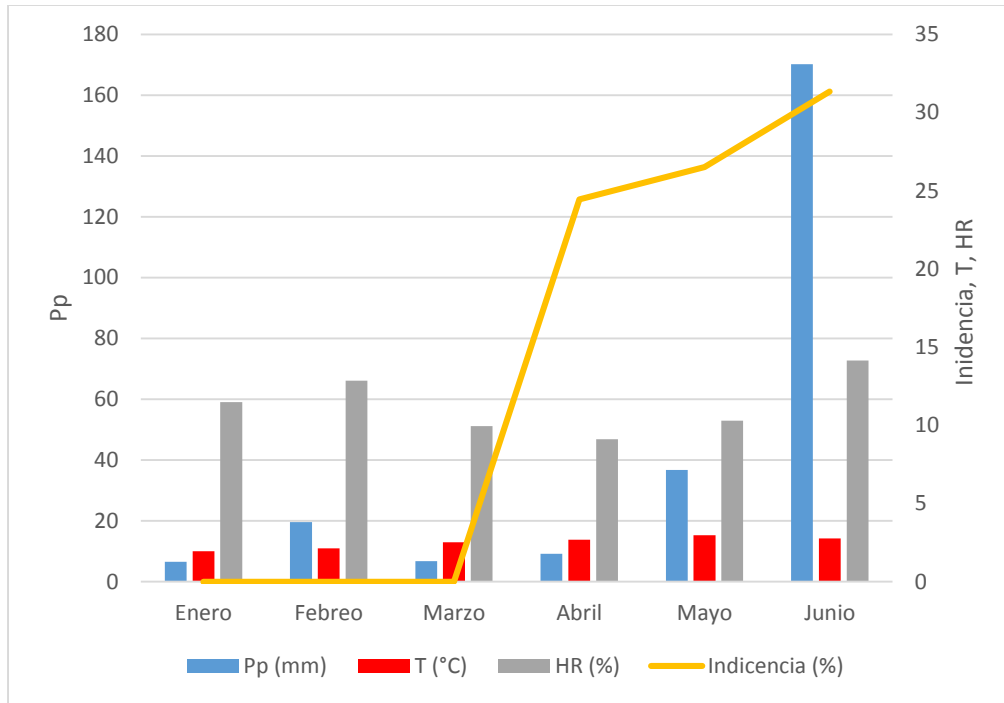


Figura 16. Incidencia, y condiciones de temperatura, humedad relativa y precipitación registradas en la plantación P1 (2,868 msnm) de tejocote (*Crataegus* spp.) en el Eje Neovolcánico, Pue.en el año 2012.

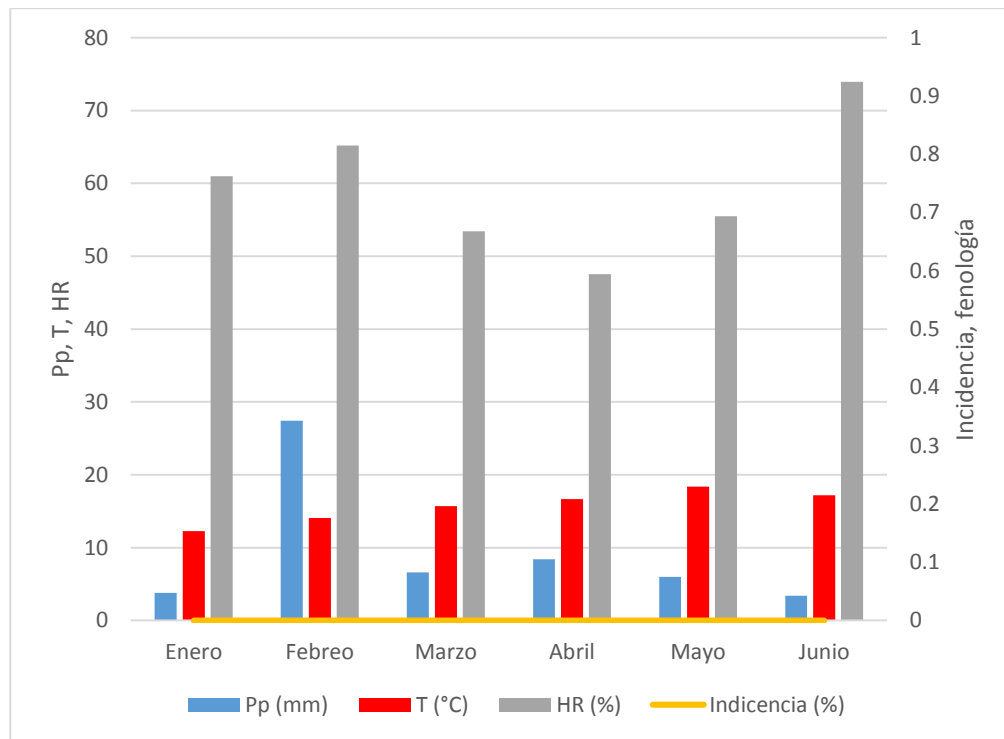


Figura 17. Incidencia, y condiciones de temperatura, humedad relativa y precipitación registradas en la plantación P3 (2,470 msnm) de tejocote (*Crataegus* spp.) en el Eje Neovolcánico, Pue. en el año 2012.

Factor de correlación

En el año 2012 en la variedad *Chapeado* de la P1 (2,868 msnm) que fue la que presentó mayor incidencia de *G. clavipes* en ambos materiales, la incidencia de *G. clavipes* y precipitación durante las tres evaluaciones tuvieron una correlación inversa (Cuadro 29), lo que indica que conforme incrementa la precipitación hay una menor incidencia de la enfermedad.

Durante el avance temporal de la epidemia de la roya en su respectiva plantación, la presencia de ceniza volcánica presentó diferentes niveles (Figura 18), sin embargo, no se evaluó por falta de tiempo, así mismo no se pudo obtener de ninguna base de datos actualizados la emisión de ceniza volcánica y por ende no se correlacionó con ninguna variable bajo estudio.

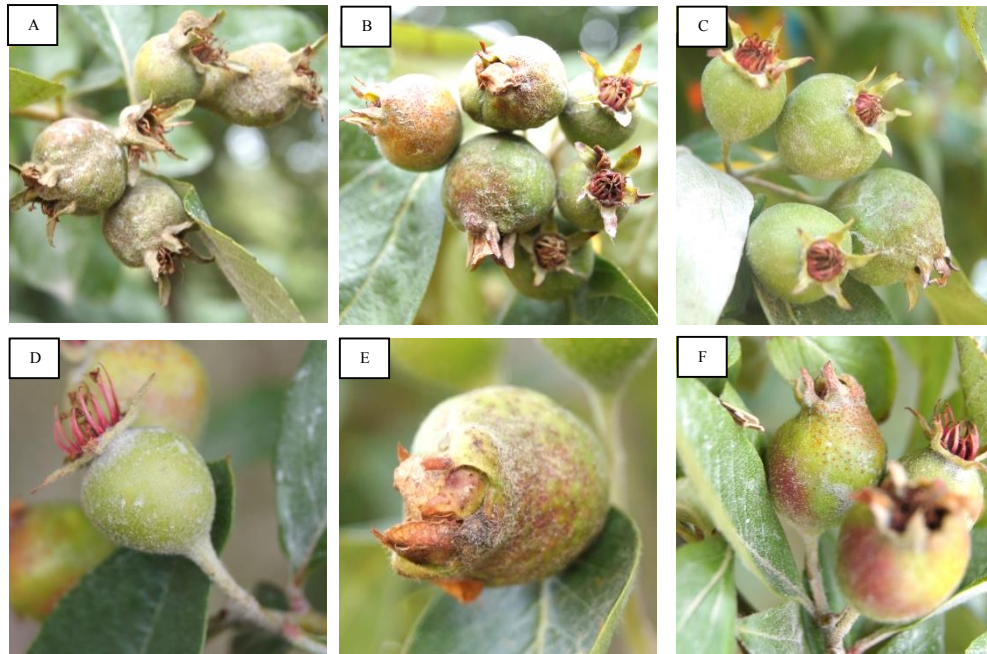


Figura 18. Diferentes niveles de ceniza volcánica presente en frutos de tejocote debido a la emisión del volcán Popocatepetl. A) Muy alto. B) Alto. C) Medio, grado I. D) Medio, grado II. E) Bajo. F) Escaso.

Influencia del gradiente altitudinal (asnm) con la fenología del tejocote

Las fases fenológicas de la flor y fruto del tejocote se categorizaron de la manera siguiente: brotación (1), desborre (2), flor abierta (3), amarre con sépalos turgentes y pétalos turgentes (4), amarre con sépalos turgentes y pétalos senescentes (5), fructificación I con sépalos turgentes; tamaño del fruto pequeño (6), fructificación II con sépalos turgentes; tamaño del fruto medio (7), fructificación III con sépalos turgentes; tamaño del fruto grande (8) (Figura 19).

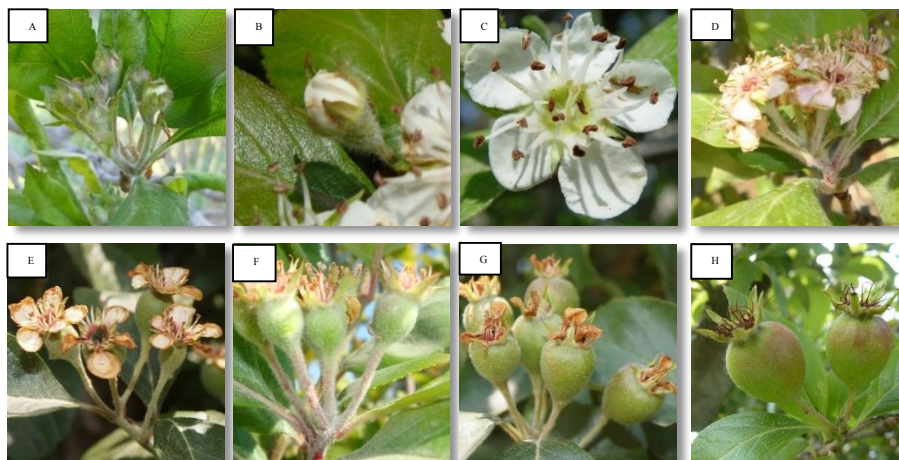


Figura 19. Fenología de la fase reproductiva en tejocote. A) Brotación. B) Desborre C) Flor abierta. D) Amarre (sépalos turgentes y pétalos turgentes). E) Amarre (sépalos turgentes y pétalos senescentes). F) Fructificación I (sépalos turgentes; tamaño pequeño). G) Fructificación II (sépalos turgentes; tamaño medio). H) Fructificación III (sépalos turgentes; tamaño grande).

Análisis de varianza

Se presentaron diferencias significativas en la fenología entre la variedad *Chapeado* y tipo criollo de manera inconsistente durante los años 2012 y 2013 en una misma altitud (P1, 2,868 msnm; P2, 2,723 msnm; P3, 2,470 msnm) y evaluación (Cuadro 32), por lo cual demuestra que la fenología tuvo un efecto en la incidencia de la enfermedad (Figura 20 y 21), la inconsistencia en esta variable evaluada podría deberse a que el tamaño del fruto es solo una variable más de las muchas con respecto a la fenología del árbol, y esto podría explicarse ya que el fruto del árbol tipo criollo (diversos tipos) por lo general alcanza la madurez antes que la variedad comercial, con un tamaño de fruto menor.

Cuadro 32. Análisis de varianza a través de la evaluaciones de la fenología de frutos en tres altitudes de tejocote (*Crataegus* spp.) variedad *Chapeado* y tipo criollo en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.

ANOVA Evaluación I <i>Chapeado</i> - criollo	Plantación 1			Plantación 2			Plantación 3		
F	0.0074	0.0074	453.428	44.254	14.790	102.222	0.19436477	481542857	6.89×10^{-11}
Valor crítico para F	441.387	441.387	441.387	441.387	441.387	441.387	441.387	441.387	441.387

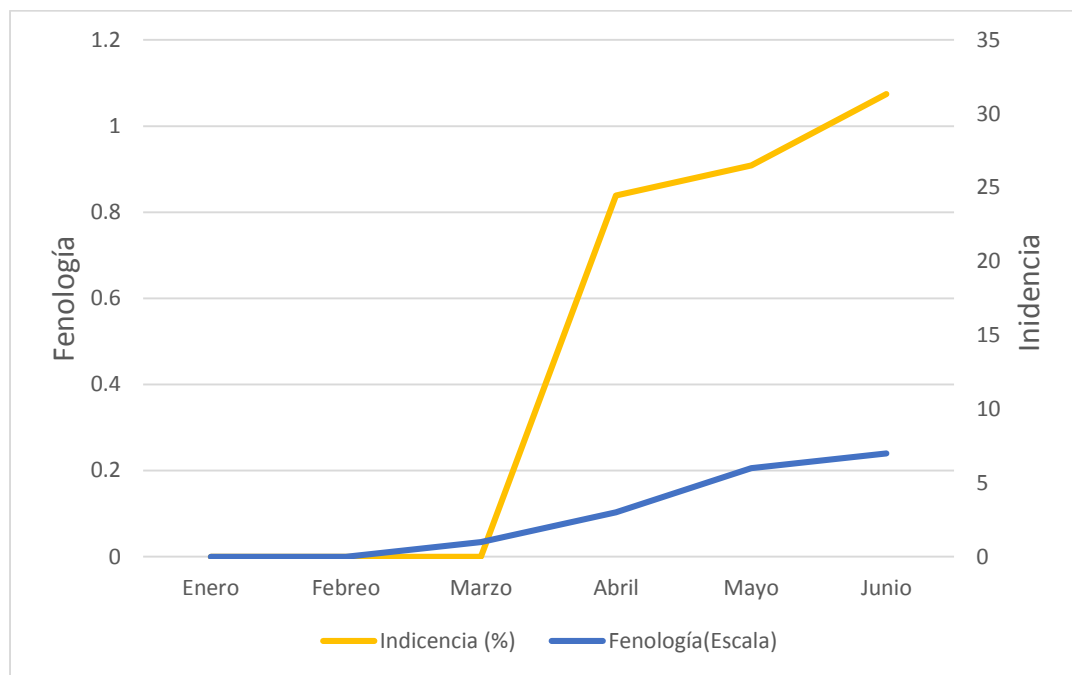


Figura 20. Incidencia y fenología registradas en la plantación P1 (2,868 msnm) de tejocote (*Crataegus* spp.) en el Eje Neovolcánico, Pue.en el año 2012.

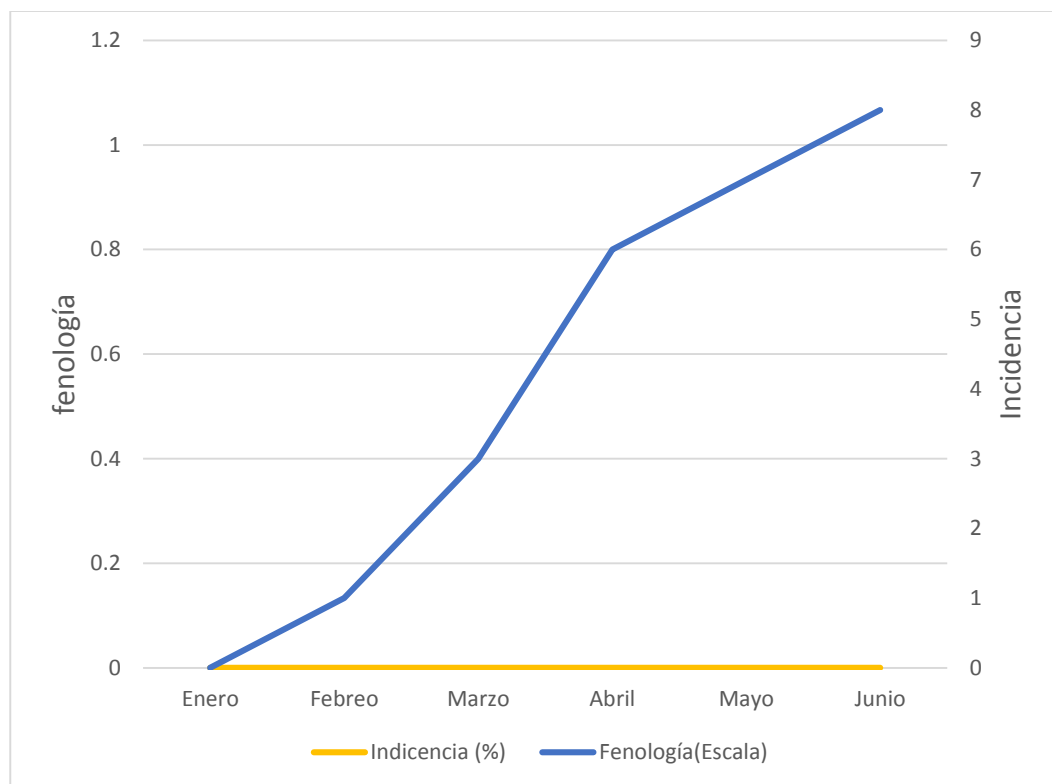


Figura 21. Incidencia y fenología registradas en la plantación P3 (2,470 msnm) de tejocote (*Crataegus spp.*) en el Eje Neovolcánico, Pue.en el año 2012.

Se presentaron diferencias en la fenología en una mismo material y evaluación en un mismo año en diferentes altitudes (P1, 2,868 msnm; P2, 2,723 msnm; P3, 2,470 msnm) (Cuadro 33) lo que demuestra que los árboles de tejocote de una misma variedad en diferentes plantaciones se encuentran en diferente etapa fenológica.

Cuadro 33. Análisis de varianzas de la fenología de frutos en la evaluación I en tres altitudes de tejocote (*Crataegus spp.*) variedad *Chapeado* y tipo criollo en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.

ANOVA Evaluacion I	Plantación P1, P2 y P3		ANOVA Evaluacion II	Plantación P1, P2 y P3		ANOVA Evaluacion III	Plantación P1, P2 y P3	
	<i>Chapeado</i>	criollo		<i>Chapeado</i>	criollo		<i>Chapeado</i>	criollo
F	355.918	32.124		975.950	888.826		366.716	150.146
Valor crítico para F	335.413	3.541		335.413	335.413		335.413	335.413

Factor de correlación

En el año 2012 en la variedad *Chapeado* de la P1 (2,868 msnm) y P2 (2,723 msnm), la incidencia de *G. clavipes* y la fenología durante las tres evaluaciones tuvieron una correlación inversa (Cuadro 34), y de la misma manera, pero del material tipo criollo tuvieron una correlación inversa perfecta (Cuadro 34), lo que demuestra que conforme aumenta el tamaño del fruto en la variedad *Chapeado* hay una menor incidencia de la enfermedad.

Cuadro 34. Análisis de correlación entre incidencia de *Gymnosporangium clavipes* en frutos de tejocote (*Crataegus* spp.) y la fenología de sus frutos en variedad *Chapeado* y tipo criollo a través de las evaluaciones en una misma plantación en el Eje Neovolcánico, Pue. durante 2012.

Evaluaciones en Incidencia 2012	Plantación P1		Plantación P2	
	<i>Chapeado</i>	Criollo	<i>Chapeado</i>	Criollo
Factor de Correlación (R)	-0.99	-0.19	-0.61	-0.92
Coefficiente de determinación (R ²)	0.99	0.038	0.37	0.85

En resumen, en la influencia del gradiente altitudinal con las condiciones ambientales y con la fenología del tejocote, se demuestra que a pesar que la humedad relativa y precipitación aumentan, la incidencia de *G. clavipes* tiene una relación inversa con la fenología del fruto (Figuras 22 y 23), lo que resultaría contradictorio, pero coincide con Biggs *et al.*, (2009) en que el rango de susceptibilidad de variedades de manzano a *G. juniperi-virginiananae* en Nueva York y Virginia se puede deber a la coincidencia de períodos de infección con la fenología del árbol. La ventana fenológica de infección de *G. clavipes* es bastante estrecha con la máxima sensibilidad que se produce entre el brote de color rosáceo y la caída de pétalos en el desarrollo de los brotes (Jones y Aldwinckle 1990), además que las condiciones de infección de *G. juniperi-virginiananae* en las hojas con precaución pueden ser extrapolados a la infección de los frutos, aunque tanto frutos como hojas rápidamente pierden susceptibilidad a medida que maduran, y el período de máxima sensibilidad ocurre tempranamente con el color rosáceo en la floración (Aldwinckle *et al.*, 1980). También las basidiosporas se dispersan sincronizándose

aproximadamente con el inicio de brotación del hospedante rosáceo, mientras los espermogonios o picnios y ecios se desarrollan en las partes suculentas de los mismos hospedantes (Sinclair y Lyon, 2005).

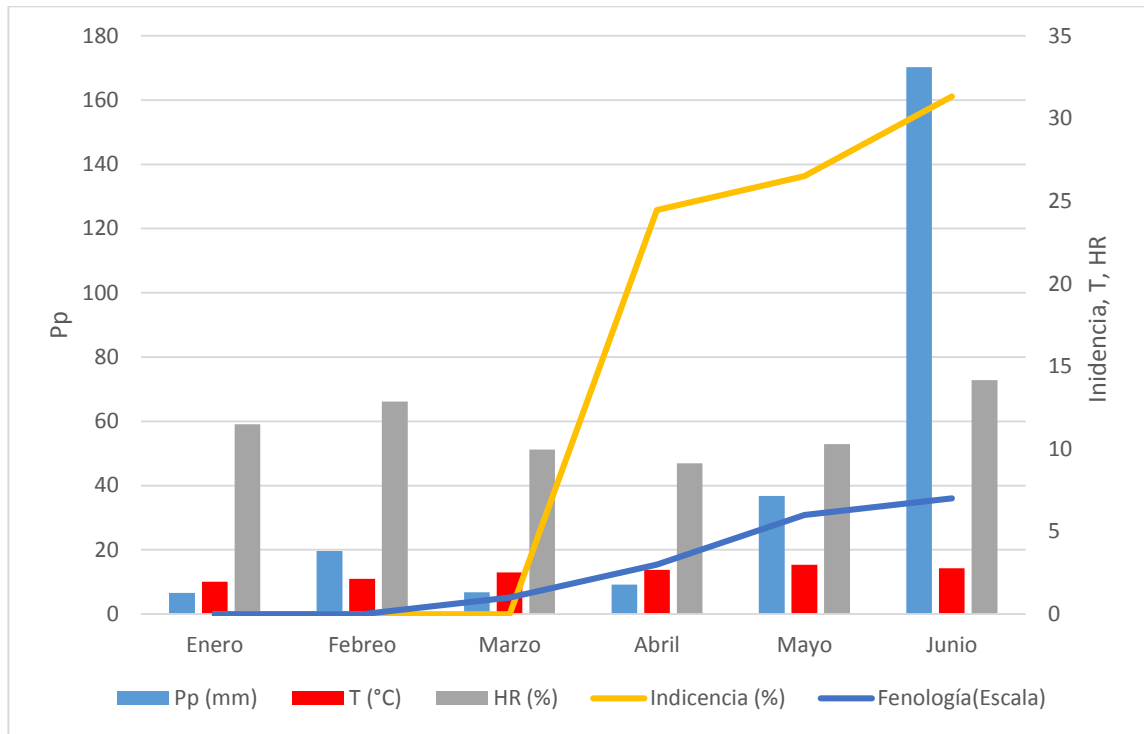


Figura 22. Incidencia, fenología y condiciones de temperatura, humedad relativa y precipitación registradas en la plantación P1 (2,868 msnm) de tejojote (*Crataegus spp.*) en el Eje Neovolcánico, Pue.en el año 2012.

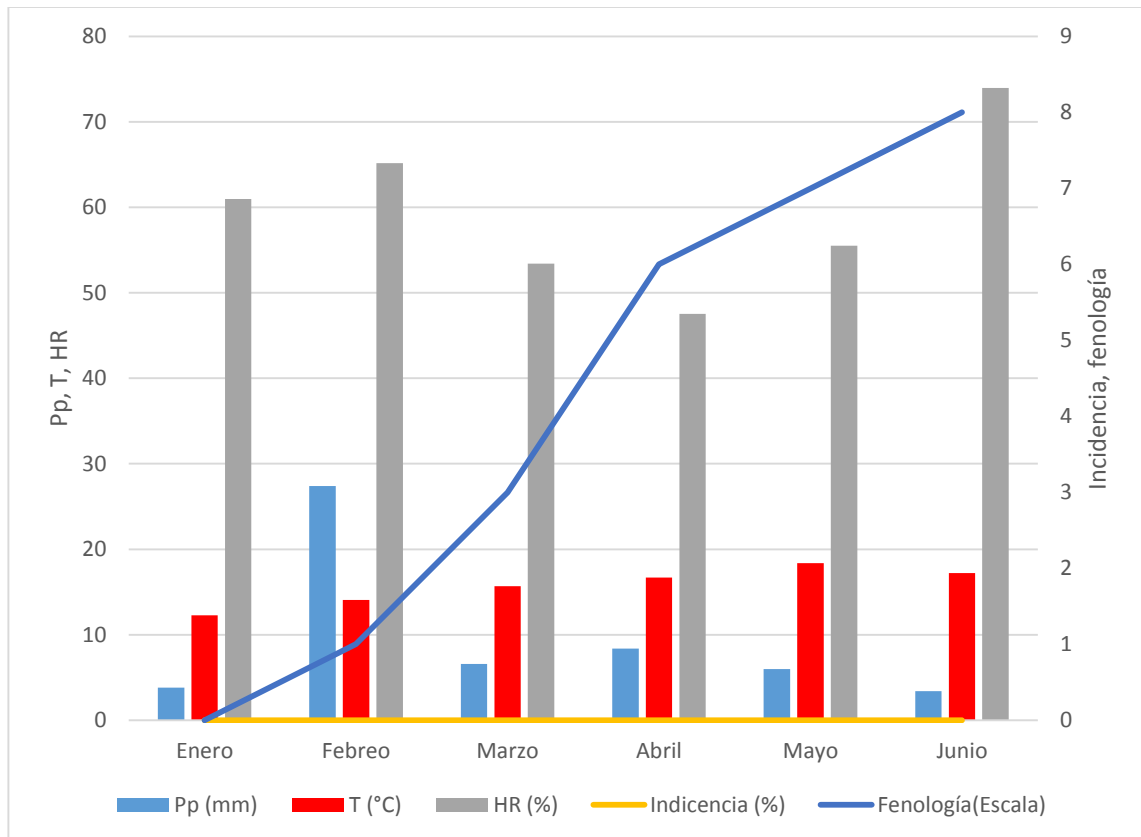


Figura 23. Incidencia, fenología y condiciones de temperatura, humedad relativa y precipitación registradas en la plantación P3 (2,470 msnm) de tejocote (*Crataegus spp.*) en el Eje Neovolcánico, Pue. en el año 2012.

Las condiciones climáticas y el estado fenológico del tejocote son factores que demuestran su relación directa con la infección de *G. clavipes* ya que las basidiosporas son capaces de viajar grandes distancias, permanecer viables (Hamilton, 1937, MacLachlan, 1935, Parmelee, 1965) y pueden sobrevivir hasta que las condiciones sean favorables para la infección (Pearson *et al.*, 1980), pero mueren en 2 a 5 h de luz solar directa (Reed y Crabill, 1915). Sin embargo, también hay que considerar las condiciones climáticas necesarias para que las teliosporas germinen produciendo basidiosporas en el hospedante telial, ya que las basidiosporas de la liberación primaria permanecen viables y viajan largas distancias desde su liberación bajo condiciones de alta humedad relativa, temperaturas moderadas y nubosidad permitiendo su sobrevivencia durante varios días (McLachlan, 1935).

Otras variables

El efecto de la ceniza emitida por el volcán Popocatepetl ha sido muy poco documentada, sin embargo de diciembre de 1994 a marzo de 1995 se analizó y se encontró que esta compuesto por una fracción cristalina de cuarzo y feldespato, piroxeno y hornblenda, líticos y vidrio (menos del 1 %), que tienen como principal elemento al sílice (SiO_2), aunque este elemento no figura entre los elementos esenciales para la plantas, su papel en conferir resistencia a las plantas a factores abióticos como el estrés y factores bióticos ha recibido una atención creciente (Yoshida *et al.*, 1962; Epstein, 1994; Liang, 1999; Liang *et al.*, 2003). La formación de aposiciones en la pared celular (papilas), son restricciones a la penetración de hongos en las células epidérmicas de las plantas y consisten principalmente de calosa, material fluorescente UV, y silicio (Aist, 1976; Heath, 1981; Kovats *et al.*, 1991; Stein y Klomparens, 1993), también se observó yeso, pirita en pequeña cantidad, que a su vez están compuestos por sulfatos ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y sulfuros (FeS_2), el elemento azufre es uno de los más viejos fungicidas conocido (Tweedy, 1981). La distribución de la ceniza en ese período fue fundamentalmente en dirección al este, aunque las variaciones en la dirección del viento propiciaron la caída de ceniza tanto al norte como al sur del volcán, las medidas periódicas de espesor permitieron estimar un volumen de ceniza de diciembre de 1994 a marzo 1995 de 0.001 km^2 (Martin del Pozzo, 1995), sin embargo, como no existió ningún método para cuantificar la ceniza y debido a que sus componentes tienen efectos potenciales para influir en la incidencia de la enfermedad, confirma el resultado que a pesar que la humedad relativa y precipitación aumenten, la incidencia de *G. clavipes* es menor, pudiendo la ceniza ser una variable que tiene al igual que la fenología, una relación en la incidencia de *G. clavipes* en el año 2012 y 2013, por tanto, su efecto debe ser estudiado más a detalle para demostrar si en realidad tiene relación con la enfermedad.

CONCLUSIONES

Bajo la premisa de que las basidiosporas se producen en su hospedante telial en los meses que corresponden al período susceptible del tejocote, tenemos las siguientes conclusiones:

No existe diferencia en la incidencia de *Gymnosporangium clavipes* entre la variedad *Chapeado* y tipo criollo en una misma elevación, pero si de un mismo material a diferentes altitudes, concluyendo que la altitud influye en la presencia de *G. clavipes*.

A medida que aumenta la altitud se incrementa la humedad relativa y disminuye la temperatura, estas condiciones ambientales coinciden en los lugares donde el ciclo del tejocote es mas largo, lo que favorece a la incidencia de *G. clavipes*.

La susceptibilidad de la variedades *Chapeado* y tipo criollo en los frutos es igual.

La ventana fenológica para que inicie la infección en frutos de tejocote con la fase picnial de *G. clavipes* es durante los meses de abril a junio.

RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores, se recomienda buscar el hospedante telial de *Gymnosporangium clavipes* Cke. & Pk., ya que ayudaría a tomar decisiones para el posterior manejo de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

Anónimo. 2012b. Ficha técnica: *Gymnosporangium clavipes* Cke. y Pk. (1873) Roya del Membrillo. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. SAGARPA-SENASICA. México, D. F. 8 p.

- Aldwinckle, H. S., Pearson, R. C., y Seem, R. C. 1980. Infection periods of *Gymnosporangium juniperi-virginianae* on apple. *Phytopathology* 70:1070-1073.
- Aist, J. R. 1976. Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14:145-63.
- Biggs, A. R., Rosenberger, D. A., Yoder, K. S., Kiyomoto, R. K., Cooley, D. R., y Sutton, T. B. 2009. Relative Susceptibility of selected apple cultivars to cedar apple rust and quince rust. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2009-1014-01-RS.
- Campbell, C. L., y Madden, L. V. 1990. *Introduction to Plant Disease Epidemiology*. John Wiley y Sons, New York, NY. USA.
- Epstein, E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 11-7.
- Giddings, N. J. 1918. Infection and immunity in apple rust. *W. Va. Agríc. Exp. Stn. Bull.* 170. 71 pp.
- Hamilton, J. M. 1937. Recent investigations on the control of cedar-apple rust in the Hudson Valley. *N. Y. Agríc. Exp. Stn. Bull.* 678.34 pp.
- Heath, M. C. 1981. The suppression of the development of silicon-containing deposits in french bean leaves by exudates of the bean rust fungus and extracts from bean-rust infected tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 18:149-55.
- Jones, A. L y Aldwinckle, H. S. 1990. *Compendium of apple and pear diseases*. APS Press, St. Paul, MN.
- Kovats, K., Binder, A., y Hohl, H. R. 1991. Cytology of systemic induced resistance of tomato to *Phytophthora infestans*. *Planta* 183:491-96.
- La jornada de oriente, 2012. <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article102136>
Consultado el 12 de Marzo de 2014.
- Liang, Y. C., 1999. Effects of silicon on enzyme activity, and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. *Plant and Soil* 209: 217-24.

- Liang, Y. C., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W. H., y Ding, R. X. 2003. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology* 160:1157-1164.
- Martin del Pozzo, A. L., Espinasa, R. P., Armienta, M. A., Aguayo, A., Reyes, M., Sánchez, G., Cruz, O., Cenicerós, N., Lugo, J., González, V., Butrón, M. A., y Villareal, M. Instituto de Geofísica, UNAM, C.U.; 04510, México, D.F.
- MacLachlan, J. D. 1935. The dispersal of viable basidiospores of the *Gymnosporangium* rusts. *J. Arnold Arboretum* 16: 411-422.
- Palmiter, D. H. 1952. Rust diseases of apples and their control in the Hudson Valley. N. Y. State Agríc. Exp. Stn. Bull. 756. 26 pp.
- Parmelee, J. A. 1965. The genus *Gymnosporangium* in Eastern Canada. *Can. J. Bot.* 43:239-267.
- Pearson, R. C., Seem, R. C., y Meyer, F. W. 1980. Environmental factors influencing the discharge of basidiospores of *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. *Phytopathology* 70:262-266.
- Reed, H. S., y Crabill, C. H. 1915. The cedar rust disease of apples caused by *Gymnosporangium juniperi-virginianae* Schw.Va. *Agric. Exp. Stn. Bull.* 9:1-106.
- Sinclair, W. A., y Lyon, H. H. 2005. *Diseases of trees and shrubs*. 2nd ed. Ithaca, New York: Cornell Univ Press.
- Stein, B. D., Klomparens, y K. L. R. 1993. Histochemistry and ultrastructure of the induced resistance response of cucumber plants to *Colletotrichum lagenarium*. *J. Phytopathol.* 137:177-88.
- Townsend, G. R. y Heuberger, J. W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Rep.* 27: 340-343.
- Tweedy, B. G. 1981. Inorganic sulfur as a fungicide. *Residue Rev.* 78:43-68.

Yoshida, S., Ohnishi, Y., y Kitagishi, K. 1962. Histochemistry of silicon in rice plant. III. The presence of cutical-silica double layer in epidermal tissues. Soil Science and Plant Nutrition 8: 1-5.