

PRUEBAS DE INOCULACION ARTIFICIAL EN EL  
SISTEMA DIANTHUS CARYOPHYLLUS / UROMYCES  
CARYOPHYLLINUS (SCH) WINT.

M. Molinas de Ferrer  
Departamento de Biología



PRUEBAS DE INOCULACION ARTIFICIAL EN EL SISTEMA DIANTHUS  
CARYOPHYLLUS/ UROMYCES CARYOPHYLLINUS (SCHR.) WINT.

M. Molinas de Ferrer  
Departamento de Biología

La inoculación artificial con unos métodos adecuados permite distinguir con seguridad los genotipos sensibles de los resistentes.

En estas pruebas se estudió el empleo de tres métodos de inoculación artificial y su aplicación respectiva sobre plantas intactas cultivadas en invernadero, esquejes en solución nutritiva y hojas mantenidas en cámara húmeda que parecieron los más idóneos para su aplicación en el clavel. Se realizó un sondeo de variedades y clasificación según su sensibilidad y se estudiaron los distintos tipos de reacción en los tejidos del huesped.

#### Material y técnicas empleadas

Todas las pruebas de inoculación artificial se efectuaron con cuatro variedades mediterráneas, obtenidas por J. Aguilá, especialmente adaptadas a las condiciones ecológicas de la comarca de "El Maresme", dos consideradas sensibles "Kiruna" y "Bikini" y dos resistentes, "Aurora" y "Mireia". En el sondeo se utilizaron veinte variedades en su mayor parte nuevos híbridos de clavel. Las plantas se cultivaron en el invernadero de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona, sobre un substrato de turba y arena y recibieron un abono regular cuya relación  $N/P_2O_5/K_2O$  era de 1/1/2.

La inoculación de plantas intactas se realizó entre los veinte y treinta días del trasplante, utilizándose 3 bloques de ocho plantas para cada variedad. Los tres primeros días después de la inoculación se mantenían tapadas con bolsas de polietileno.

Los esquejes procedían de plantas seguramente exentas de enfermedad, cultivadas en los Campos Experimentales de la Facultad de Ciencias. Antes de su inoculación se realizaba un lavado con agua durante 15 min. seguido de esterilización superficial con alcohol de 70% y a con

tinuación cada esqueje era colocado en un matraz con 50 cc de solución Pfeffer diluida. Una vez inoculados se cubrían con bolsas de polietileno para lograr una cámara saturada de humedad. Se utilizaron tres bloques de ocho esquejes para cada variedad.

Las hojas aisladas, previamente desinfectadas como en el caso anterior, se colocaban en cámara húmeda y después de la inoculación se dejaban bajo luz difusa y a temperatura de 18°C a 20°C. Se realizaron tres repeticiones con veinticuatro hojas para cada variedad.

El registro de los resultados se hacía en todos los casos a los 15 y 20 días de la inoculación. Se procuró inocular cuidadosamente ambas caras de las hojas sin producir heridas.

Las esporas formaban un lote homogéneo obtenido a partir de plantas naturalmente infectadas en diversos puntos de la comarca de "El Maresme" (Molinas, 1976) El conteo de las esporas se realizó con la cámara de Thoma ajustando después las diluciones deseadas. Antes de cada inoculación se comprueba la capacidad germinativa

El primer método de inoculación consistió en aplicar una suspensión de esporas en aceite de parafina conteniendo aproximadamente  $10^7$  esporas por mililitro con ayuda de un pincel de pelo blando. A continuación se pulverizaban las hojas con agua.

El segundo método consistió en la pulverización sobre las hojas previamente humedecidas de una mezcla de esporas con talco en proporción de 50 mg de uredosporas por gramo de talco.

Con el tercer método se procedía directamente a la atomización de una suspensión de esporas en agua conteniendo aproximadamente  $10^7$  esporas por ml y gastándose una cantidad aproximada proporcional a 0,125 ml por hoja.

Se ha realizado el control efectuando el conteo directo de las lesiones en las plantas, considerando como lesión el área clorótica característica que se desarrolla, en la cuál pueden aparecer más tarde una o más pústulas.

## Resultados de la inoculación artificial

Las esporas de *Uromyces caryophyllinus* (Sch.) Wint. germinan para producir un promicelio, sin periodo de latencia, tanto en agua como en una suspensión en aceite de parafina. Esta propiedad fué utilizada para comprobar la facultad germinativa de los distintos lotes de uredosporas.

Los resultados obtenidos con la inoculación de plantas intactas y de hojas aisladas mantenidas en cámara húmeda han sido satisfactorios. El número de pústulas desarrollado en ambos casos es elevado, ver tablas n° 2 y 3. Las hojas aisladas resisten bien el periodo de incubación e incluso emiten algunas raíces adventicias. Los esquejes mantenidos en solución nutritiva presentaron pro

-blemas de marchitez e infecciones a cargo de hongos sa prófitos (*Fusarium* sp., *F. roseum*, *Alternaria* sp., *Botrytis* sp.) que en muchos casos impidieron la terminación del experimento.

De los tres métodos ensayados el que en todos los casos ha proporcionado mejores resultados es la inoculación de esporas en una emulsión en aceite de parafina y pulverización posterior de agua (tabla 1 y 3). Nosotros explicamos el efecto favorable del aceite de parafina por dos motivos: por una parte por favorecer la condensación de pequeñas gotas de agua sobre la superficie de las hojas, necesarias para la germinación de las esporas y, por otra parte, una posible extracción de inhibidores de la germinación, de carácter liposoluble.

La pulverización de una mezcla de esporas con talco, método frecuentemente recomendado en la bibliografía para la inoculación de otras royas (Dunkle, Maheshwari y Allen, 1969., Zimmer et al. 1958., Sunderman, Ausemus 1963., Cammak, 1958) di-ó, en nuestro caso, resultados poco favorables. Las esporas en la mayoría de los casos no llegaban a germinar y el número de pústulas que alcanzaban desarrollo era muy escaso. Probablemente este método sólo resulte adecuado para la inoculación de grandes superficies en condiciones de campo, cuando se inocula, por ejemplo, una superficie de trigo o avena.

Tampoco se obtuvieron resultados brillantes con la atomización de esporas en agua. El número de pústulas es superior al de la inoculación con talco pero inferior al obtenido con aceite de parafina. Los resultados en este caso fueron muy irregulares.

La utilización de una emulsión de esporas en aceite de parafina y agua parece ser el método más adecuado para la inoculación artificial del clavel con el agente causante de la roya, *Uromyces caryophyllinus*, y es por tanto el método de elección. Disponer de un buen método de inoculación artificial cuyos resultados sean reproducibles es un factor importante en el estudio de los mecanismos de resistencia y de los factores hereditarios que la transmiten.

Estudio de los distintos tipos de reacción en los tejidos del huésped.

El estudio de la reacción frente a *U. caryophyllinus* de las variedades seleccionadas para nuestro trabajo se inició con un "screening" o sondeo preliminar que se llevó a cabo en plantas en las que se dejó curso a la infección natural, colocando en el momento de la plantación dos plantas de clavel de raza americana "Sim" muy infectado por cada diez plantas del sondeo. A los 45 días de iniciar el experimento se iniciaron los recuentos, en número de tres y espaciados unos quince días.

TABLA 1

Número de fustulas por hoja en plantas enteras  
Valores medios de 24 plantas por variedad

	"Kiruna"	"Mireia"	"Aurora"	"Bikini"
método 1	3,52	1,02	-0-	3,28
método 2	0,69	0,22	-0-	0,06
método 3	1,97	0,51	-0-	0,61

TABLA 2

Número de fustulas por esqueje, valores medios hoja .

	"Kiruna"		"Mireia"		"Aurora"		"Bikini"	
	e	p/h	e	p/h	e	p/h	e	p/h
método 1	6	1,03	8	0,5	5	-0-	7	0,8
método 2	3	0,01	7	-0-	6	-0-	4	0,03
método 3	7	0,20	5	0,09	9	-0-	4	1,02

e - n° de esquejes en los que se pudo realizar el  
contaje al final de la experiencia

p/h n° de pústulas por hoja

TABLA 3

Número de pustulas y lesiones locales en hojas aisladas, valores medios de 72 hojas por variedad.

	"Kiruna"		"Mireia"		"Aurora"		"Bikini"	
	pp	ll	pp	ll	pp	ll	pp	ll
método 1	4,1	-	0,92	#	-0-	###	2,95	#
método 2	0,3	-	-0-	-	-0-	-	-0-	-
método 3	2,5	-	0,32	-	-0-	##	0,51	-

pp n<sup>o</sup> de pustulas por hoja

ll n<sup>o</sup> de lesiones locales

- ausentes

# menos de 5 por hoja

## de 5 a 10 por hoja

### más de 10 por hoja

Se repitió el experimento mediante inoculación de una emulsión de esporas en aceite de parafina según el método anteriormente descrito, sobre plantas enteras. Se utilizaron dieciséis plantas para cada variedad. Los recuentos se hicieron a los quince días y un mes de la inoculación.

Las plantas se distribuyeron en cinco grupos según la gravedad de las lesiones medida en forma de número de pústulas visibles en las hojas del sexto y séptimo verticilos contando cuatro brotes de cada planta.

-	grupo 0	.....	ningún síntoma
#	grupo 1	....	entre 0 y 0,5 pústulas/hoja
##	grupo 2	.....	entre 0,5 y 1,1 púst./hoja
###	grupo 3	.....	entre 1,1 y 2 púst./hoja
####	grupo 4	.....	más de 2 pústulas por hoja

Posteriormente las variedades fueron clasificadas en cinco grupos según su sensibilidad (- inmunes, # resistentes, ## medianamente sensibles, ### sensibles y #### muy sensibles). Los resultados se recogen en la tabla 4, condiciones de campo, y 5 inoculación artificial en invernadero.

Se estudiaron con precisión las reacciones a la inoculación de esquejes, plantas de invernadero y hojas aisladas, en los tipos inmunes, resistentes y sensibles y, siguiendo las normas aconsejadas por Stakman y Harr, 1957 (cit. Wood, 1967), hemos agrupado las distintas reacciones en seis tipos de infección:

<u>tipo de infección</u>	<u>Reacción del huésped</u>
0 Inmune	No se desarrollan pústulas. Pueden aparecer lesiones necróticas puntiformes de color blanco difícilmente visibles a ojo desnudo.
1 Muy resistente	Pústulas muy pequeñas rodeadas de área necrótica.
2 Resistentes	Pústulas pequeñas o medianas, generalmente una por lesión, rodeada de un halo clorótico o necrótico relativamente ancho.
3 Susceptibles	Pústulas de tamaño mediano generalmente separadas, sin tejidos necróticos pero en las que aparecen halos cloróticos con relativa frecuencia.

TABLA 4

	recuentos			calificación	raza	color
	1	2	3			
ALICE	3	3	4	####	M/A	amlo.
AURORA ROJO	0	0	0	-	M	rojo
AURORA ROSA	0	0	0	-	M	rosa
BIKINI	2	3	3	###	M	amlo.
CABALLERO	2	2	2	##	M	rojo
CANDID	1	2	2	##	M	blanco
EVA	1	1	1	#	M	amlo.
INES	1	1	2	#	M	rosa
KIRUNA	3	3	4	###	M	blanco
MIREIA	1	1	1	#	M	rosa
LUX	1	1	2	##	M	amlo.
PIRINEU	2	2	2	##	M	blanco
ROBERTINO	1	1	1	#	M	rojo
SATURNO	1	1	1	#	M	rojo
SESTRIERE	2	3	3	###	M	blanco
SITJES	1	2	2	##	M	rojo
TOKIO	2	2	3	##	M	amlo.
WHITE SIM	4	4	4	####	A	balnco
WILLIAM SIM	4	4	4	####	A	balnco
CARMEN	1	1	2	#	M	rojo

Resultados del screening preliminar de la resistencia fr  
frente a Uromyces caryophyllinus de veinte variedades de  
clavel inoculados en condiciones de campo, valores medios  
de treinta plantas p.0,05/

-- grupo 0

# grupo 1 ; ### grupo 3

## grupo 2 ; #### grupo 4

A americano

M mediterraneo

TABLA 5

	recuentos		calificación
	1	2	
ALICE	4	4	####
AURORA ROJO	0	0	-
AURORA ROSA	0	0	-
BIKINI	3	3	###
CABALLERO	2	2	##
CANDIDE	2	2	##
CARMEN	1	2	#
EVA	2	2	#
INES	2	2	#
KIRUNA	4	4	####
MIREIA	1	2	#
LUX	2	2	##
PIRINEU	2	3	##
ROBERTINO	2	2	#
SATURNO	2	2	#
SESTRIERE	4	4	####
SITJES	2	3	##
TOKIO	3	3	##
WHITE SIM	4	4	####
WILLIAM SIM	4	4	####

Resultados obtenidos en la inoculación artificial con emulsión de esporas en aceite de parafina de plantas mantenidas en invernadero. Valores medios de dieciseis plantas.  $p=0,05$ . (calificación ver tabla 4).

- 4 Muy susceptibles Pústulas grandes a menudo confluentes. Las lesiones carecen de halo clorótico y nunca aparecen necrosis.
- 5 Heterogeneo Plantas con pústulas de tipología varia que a veces incluyen a todos los anteriores, en una misma planta

En la tabla 9 se ofrece el resultado de clasificar de acuerdo con esta escala las distintas variedades estudiadas y su relación con el número de pústulas por hoja, valor medio global ponderado en condiciones de campo y el grado de sensibilidad asignado.

Se examinaron también cuidadosamente los resultados de la inoculación artificial de hojas escindidas, mantenidas en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Se pudo observar la aparición en las variedades inmunes de unas lesiones puntiformes en las que aparece un halo que no sintetiza almidón y que se convierte en una lesión necrótica, que no es visible en condiciones de campo si no es con ayuda de instrumentos ópticos. La aparición del halo suele ser entre las cuarenta y ocho y las sesenta y dos horas después de la inoculación en las variedades inmunes, mientras en las sensibles tarda de cuatro a ocho días en hacerse claramente visible.

Los resultados de los distintos tipos de inoculación son concordantes, teniendo en cuenta que el número de lesiones siempre es mayor en las plantas de invernadero o en cámaras húmedas.

Aparecen distintos grados de reacción y, en contra de la suposición de Landsade, 1961, nosotros hemos encontrado dos variedades "Aurora rojo" y "Aurora rosa" inmunes, por lo menos en la actualidad a las variedades del patógeno existentes en la comarca de El Maresme.

En líneas generales la resistencia parece relacionada inversamente con el vigor y la existencia de pigmentos antocianos. Las plantas más sensibles son, en general las más vigorosas, de crecimiento rápido, hoja color verde amarillento y flores claras.

Las observaciones realizadas sobre plantas en condiciones controladas manifestaron el efecto de la temperatura y la nutrición nitrogenada sobre el desarrollo de las pústulas:

1) En las variedades sensibles la temperatura modifica la expresión de las pústulas. Así en la cv. "Bikini" durante los meses fríos aparecen pústulas del tipo tres, mientras en verano en la misma variedad las lesiones son del tipo dos. En la cv. "Kiruna" podemos observar durante el verano la formación de halo necrótico alrededor de las lesiones.

TABLA 6

Tipo de infección	VARIETADES	Grupo	Sensibilidad
0	Aurora rojo	0	-
	Aurora rosa	0	-
1	Robertino	1	#
2	Carmen	1	#
	Eva	1	#
	Lux	2	##
	Mireia	1	#
3	Caballero	2	##
	Pirineu	2	##
	Saturno	1	#
	Sestriere	3	###
	Tokio	2	##
4	Alice	4	####
	Kiruna	3	###
	William Sim	4	####
	White Sim	4	####
5	Bikini	3	###
	Candid	2	##
	Sitges	2	##

Distribución de las variedades según los tipos de infección y su relación al número de pústulas por hoja y sensibilidad global asignada.

0, inmune; 1, muy resistente; 2, resistente; 3, susceptible; 4, muy susceptible; 5, heterogeneo.

clasificación atendiendo al número y tipología de las lesiones.

2) Cuando se fuerzan las dosis del abonado nitrogenado se manifiesta un aumento de la sensibilidad, que se traduce no en un aumento del número de pústulas sino en un cambio en el tipo de infección.

La comparación de sistemas con distinto grado de compatibilidad, así como el efecto de la temperatura y del contenido en nitrógeno, nos lleva a pensar en un mecanismo de hipersensibilidad como responsable de la inmunidad de las plantas del grupo "Aurora".

La reacción de hipersensibilidad se caracteriza por la muerte rápida de los tejidos con aparición de la necrosis correspondiente, mucho antes de que empiecen a aparecer los síntomas en los sistemas compatibles. Las primeras células que son invadidas por los haustorios procedentes de la hifa radicada en la vesícula subestomática, mueren inmediatamente, por lo que el parásito queda rodeado de células muertas a partir de las cuales es incapaz de nutrirse. El material de reserva de la espora se agota durante el periodo de germinación (Schipper y Mirocha, 1969) por lo que al faltar el suministro el hongo muere.

## Sumario

En estas pruebas se estudió el empleo de la inoculación artificial y su aplicación respectiva sobre plantas intactas cultivadas en invernadero, esquejes y hojas aisladas. De entre los métodos ensayados, la inoculación con una emulsión de esporas en aceite de parafina parece el más adecuado en todos los casos y es el método de elección, y el empleado en todos los demás experimentos.

Se procedió a clasificar un conjunto de variedades mediterráneas adaptadas a las condiciones ecológicas de la comarca de El Maresme y se incluyeron dos variedades americanas tipo Sim. El resultado de estas pruebas fue evidenciar la existencia de sistemas con distintos grados de compatibilidad que van desde la inmunidad (cv. "Aurora rosa" y "Aurora rojo") hasta distintos grados de susceptibilidad.

El estudio de los mecanismos de reacción en sistemas de distinto grado de compatibilidad ha permitido demostrar que la inmunidad y la resistencia son debidas a un fenómeno de hipersensibilidad.

## Bibliografía

- AGUILA J.- 1971 "Comportamiento fisiológico de variedades de clavel seleccionadas en la zona de El Maresme" tesis doctoral. Universidad de Bracelona
- CUTTLE, V.M.-1960 "Studies on the isolation and growth of plant rust in host tissue cultures and upon synthetic media" *Mycologia*, 51:248-249 y *Mycologia* 52: 726.
- DUNKLE, L.D. MAHESHWARI, R; ALLEN, P.J.- 1969 "Infection structures from rust uredisopores: Effects on RNA and protein synthesis inhibitors" *Science* 1963: 481-482
- LANSADE, M.- 1961 "Sur les principales maladies de l'oeillet" *Extrait du compte rendu des journées florales Nice-Antibes 9-10 Juin 1961*
- MOLINAS, M; FONTARNAU, R.-1976 "Estudio al microscopio electrónico de barrido SEM de las esporas de Uromyces caryophyllinus (Sch). Wint. *Anales de la Sección Ciencias del Colegio Universitario de Gerona*, vi
- SCHIPPER, A.L.; MIROCHA, C.J.-1969 "The mechanism of starch depletion and accumulation in Bean leaves at rust infection sites" *Phytopathology* 59:143-146
- SCHIPPER, A.L.; MIROCHA, C.J.-1969 "The mechanism of starch depletion in leaves of Phaseolus vulgaris infected with Uromyces phaseoli" *Phytopathology* 59: 1722-1727
- SUNDERMAN, D.W.; AUSEMUS, E.R.; 1963.-"Inheritance of seedling reaction to stem rust in four hexaploid wheats" *Univ. of Minn. Agric, Exp. Stotech. Bull*, 240, 40pp
- WOOD, R.K.S.-1967 "Physiological plant pathology" *Blackwell Scientific Pub., Oxford*, 570pp
- ZIMMER et al.- 1968 "The nature of inheritance of seedling rust resistance of Nebraska H-S safflower" *Phytopathology* 58: 1451-1455