



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Puccinia sherardiana EN *Sphaeralcea angustifolia* EN EL NORTE DEL
ESTADO DE MÉXICO, MÉX.: AVANCES DE SU CICLO BIOLÓGICO.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA

PRESENTA:

IVÁN LEAL LEÓN

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL

ASESORES:

DR. JESÚS RICARDO SÁNCHEZ PALE

DR. ANDRÉS QUEZADA SALINAS

DRA. MAGNOLIA MORENO VELÁZQUEZ

CAMPUS UNIVERSITARIO “EL CERRILLO”, EL CERRILLO PIEDRAS
BLANCAS, TOLUCA, MÉXICO.

FEBRERO 2023



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	¡Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA	¡Error! Marcador no definido.
ÍNDICE	ii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivo específico	2
III. HIPÓTESIS	3
IV. JUSTIFICACIÓN	4
V. REVISIÓN DE LITERATURA	5
5.1 Importancia de las malváceas en México.....	5
5.2 <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	5
5.2.1 Etimología.....	5
5.2.2 Clasificación botánica.....	5
5.2.3 Descripción botánica	6
5.2.4 Distribución y hábitat	6
5.2.5 Usos	6
5.3 Pucciniales	8
5.3.1 Etimología.....	8

5.3.2 Información general de los Pucciniales	8
5.3.3 Morfología y estados esporicos.....	9
5.3.4 Origen de las royas	11
5.3.5 Evolución de las royas.....	12
5.3.6 La evolución de las royas según Leppik.....	13
5.3.7 Ciclo de vida de las royas.....	14
5.3.8 Ciclo de <i>Puccinia graminis</i>	16
5.3.9 El proceso de infección biotrófica.....	18
5.3.10 Daños ocasionados en plantas cultivadas	20
5.3.11 Control de royas	23
5.3.12 Royas como control biológico.....	24
5.4 Importancia de las royas en México	24
5.5 <i>Puccinia sherardiana</i>	25
5.5.1 Clasificación botánica.....	25
5.5.2 Morfometría y ciclo de vida.....	26
5.5.3 Distribución.....	27
5.6 Municipio de Axapusco.....	27
5.6.1 Localización.....	27
5.6.2 Clima	29
5.6.3 Flora	29
5.6.4 Producción Agrícola	30
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Recolección de material	31
6.2 Caracterización morfológica	32
6.3 Extracción de ADN, PCR y secuenciación	33

6.4 Pruebas de patogenicidad.....	34
6.5 Análisis filogenético.....	35
VII. RESULTADOS	36
7.1 Descripción de síntomas y signos.....	36
7.2 Descripción morfológica.....	37
7.3 Pruebas de patogenicidad.....	40
7.4 Filogenia.....	40
VIII. DISCUSIÓN	44
IX. CONCLUSIONES	47
X. LITERATURA CITADA.....	48
XI. ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nombres de soros y esporas de las Royas, con los respectivos numerales para las generaciones y fases nucleares.....	14
Cuadro 2. Ciclos de vida y generaciones de Royas.....	15
Cuadro 3. Royas (Pucciniales) importantes como patógenos de plantas cultivadas (Hospederos principales).....	21
Cuadro 4. Royas que atacan cultivos de importancia en México.....	25
Cuadro 5. Secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos de este estudio. Las secuencias se obtuvieron de NCBI o se generaron como parte de este estudio. La especie hospedante y la ubicación también se proporcionan cuando están disponibles.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Sphaeralcea angustifolia</i> (Cav.) G. Don.....	7
Figura 2. Representación esquemática de la fase (0) espermogonial y aecial (I).....	10
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Puccinia graminis</i> (Pucciniales).....	17
Figura 4. Representación esquemática de las estructuras de infección de un hongo de la roya de los cereales.....	19
Figura 5. Mapa de localización del municipio de Axapusco en el Estado de México, México.....	28
Figura 6. Municipios colindantes del municipio de Axapusco, Estado de México.....	28
Figura 7. Denominaciones climáticas para el municipio de Axapusco, Estado de México.....	30
Figura 8. Fotografía satelital de la región de recolección de plantas de <i>S. angustifolia</i> con desarrollo de soros típicos de una infección por roya.....	31
Figura 9. Montaje y observación de esporas de <i>Puccinia sherardiana</i> , llevado a cabo en el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).....	32
Figura 10. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss), propiedad del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).....	33
Figura 11. Formación de manchas circulares color verde claro en hojas (a y b).....	36
Figura 12. Desarrollo de ecios y eciosporas de color amarillo.....	36
Figura 13. Desarrollo de telios en hoja (a) y tallo (b).....	37
Figura 14. Telios delimitados por una halo clorótico.....	37
Figura 15. Corte longitudinal de un espermogonio.....	38
Figura 16. Ecios.....	38

Figura 17. Eciosporas.....	39
Figura 18. Teliosporas.....	39
Figura 19. Árbol filogenético basado en secuencias de subunidad grande para <i>Puccinia sherardiana</i> obtenidas de la planta <i>Sphaeralcea angustifolia</i> , en la región de Santa María, Axapusco, Estado de México, México, y secuencias obtenidas de GenBank.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ejemplar de <i>Sphaeralcea angustifolia</i> , en el municipio de Axapusco, Estado de México.....	59
Anexo 2. Síntomas por el efecto de desarrollo de soros típicos de una infección causada por <i>Puccinia sherardiana</i> en <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	60
Anexo 3. Observación visual de una decoloración verde claro, en forma de manchas circulares, sobre el haz de las hojas de <i>Sphaeralcea angustifolia</i> , que corresponde, aparentemente, a la fase espermogonial de <i>Puccinia sherardiana</i>	61
Anexo 4. Observación visual de ecios y telios de <i>Puccinia sherardiana</i> , en el envés de la hoja de <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	62
Anexo 5. Observación de pústulas causadas por <i>Puccinia sherardiana</i> , en el envés de <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	63
Anexo 6. Emisión de telios de <i>Puccinia sherardiana</i> en <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	64
Anexo 7. Observación de ecios de <i>Puccinia sherardiana</i> en <i>Sphaeralcea angustifolia</i> bajo el microscopio estereoscópico.....	65
Anexo 8. Corte longitudinal de una pústula de <i>Puccinia sherardiana</i> en <i>Sphaeralcea angustifolia</i> bajo el microscopio estereoscópico.....	65
Anexo 9. Formación de ecios de <i>Puccinia sherardiana</i> en <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	66
Anexo 10. Rotura de ecios y liberación de eciosporas de <i>Puccinia sherardiana</i> en <i>Sphaeralcea angustifolia</i>	66
Anexo 11. Aeciosporas de <i>Puccinia sherardiana</i> vistas desde el microscopio de luz.....	67

Anexo 12. Teliosporas de <i>Puccinia sherardiana</i> vistas desde el microscopio de luz.....	67
Anexo 13. Medición de un ecio de <i>Puccinia sherardiana</i> con el apoyo del software del Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss).....	68
Anexo 14. Medición de una eciospora de <i>Puccinia sherardiana</i> con el apoyo del software del Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss).....	68
Anexo 15. Medición de una teliospora de <i>Puccinia sherardiana</i> con el apoyo del software del Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss).....	69
Anexo 16. Teliosporas de <i>Puccinia sherardiana</i> vistas con el apoyo del software del Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss).....	69

RESUMEN

Descripción del ciclo de vida demicíclico de *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia* en México.

Durante 2017 y 2018, se recolectaron plantas con lesiones café oscuras conteniendo telios hipófilos rodeados por halos cloróticos en hojas y tallos de *Sphaeralcea angustifolia* localizadas en Axapusco, Estado de México. Con base en las características morfológicas de picnios, ecios y telios observados en microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido, se identificó al hongo *Puccinia sherardiana*. No se presentó el estado uredinial durante el periodo de observación. La verificación de la identidad se realizó mediante un análisis filogenético con una secuencia del gen 28S del ADN ribosómico. Adicionalmente, se realizaron pruebas de patogenicidad en hojas de *S. angustifolia* mediante la inoculación de teliosporas. Las plantas inoculadas desarrollaron síntomas 15 días después de la inoculación, iniciando con la presencia de ecios errumpentes en la epidermis del hospedante y posteriormente se formaron telios, completando los Postulados de Koch. *Puccinia sherardiana* se describió previamente como una roya con ciclo de vida microcíclico sobre especies de los géneros *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* y *Sphaeralcea*, pertenecientes a la familia Malvaceae, sin embargo, este estudio demostró que este hongo fitopatógeno presenta un ciclo de vida demicíclico.

PALABRAS CLAVE: Roya, morfología, patogenicidad, análisis filogenético.

ABSTRACT

Description of the demicyclic life-cycle of *Puccinia sherardiana* on *Sphaeralcea angustifolia* in Mexico.

During 2017 and 2018, plants with dark brown lesions containing hypophilic telia surrounded by chlorotic halos were collected on leaves and stems of *Sphaeralcea angustifolia* located in Axapusco, Estado de México. Based on the morphological characteristics of pycnia, aecia and telia observed in light microscopy and scanning electron microscopy, the fungus *Puccinia sherardiana* was identified. No uredinal status was present during the observation period. Verification of identity was performed by phylogenetic analysis with a ribosomal DNA 28S gene sequence. Additionally, pathogenicity tests were performed on leaves of *S. angustifolia* by inoculation of teliospores. The inoculated plants developed symptoms 15 days after inoculation, beginning with the presence of eruptive aecia in the epidermis of the host and later telia were formed, completing Koch's Postulates. *Puccinia sherardiana* was previously described as a rust with a microcyclic life cycle on species of the genera *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* and *Sphaeralcea*, belonging to the Malvaceae family, however, this study showed that this phytopathogenic fungus has a demicyclic life cycle.

KEY WORDS: Rust, morphology, pathogenicity, phylogenetic analysis.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Sphaeralcea* perteneciente a la familia Malvaceae, está representado por alrededor de 40 especies que se encuentran principalmente en la parte occidental de Norteamérica, y más de 50% se distribuyen en México. Algunas especies son usadas en la medicina tradicional. En México, la especie más representativa es *Sphaeralcea angustifolia* Cav. G. Don., una planta comúnmente conocida como vara de San José, hierba del negro o tlixihuitl en la lengua Náhuatl (Rzedowski y Rzedowski, 2001), la cual se encuentra ampliamente distribuida en México (Villaseñor y Espinosa, 1998; McVaugh, 2001), además, Vibrans (2009) menciona su empleo como forraje, pesticida y ornamental en xerojardinería. Los Pucciniales (Basidiomycota) son un orden de hongos parásitos obligados de plantas vasculares, con ciclos de vida complejos y causantes de enfermedades conocidas como royas (Romero-Cova, 1988; Toome-Heller, 2016; Aime *et al.*, 2018). En la actualidad, se estima que existen de 7500 a 8500 especies descritas de Pucciniales siendo el género *Puccinia* el más destructivo económicamente (Toome-Heller, 2016) y el que comprende el mayor número de especies reportadas con aproximadamente 4000 (Kirk *et al.*, 2008). La mayoría de los Pucciniales requieren de dos hospedantes específicos, pero no relacionados para completar su ciclo de vida. Este tipo de ciclo se puede diferenciar en dos fases (ecial y telial), cada una de las cuales se produce en su hospedante asociado. La etapa ecial representa la parte del ciclo de vida en la que los monocariones haploides (es decir, las espermacias) se unen mediante fertilización (plasmogamia) para formar el dicarion. Entonces se forman aeciosporas dicarióticas que se dispersan al hospedante donde se desarrollara la fase telial. En éste hospedante, la propagación asexual se produce a través de la producción de urediniosporas. En última instancia, generalmente en respuesta a las condiciones ambientales, el dicarion cesará la esporulación asexual y formará teliosporas. Es durante esta etapa que tiene lugar la cariogamia, seguida de la meiosis. Finalmente, las basidiosporas haploides se producen a partir de la germinación de la teliospora, que llevan el nuevo monocarion de regreso al hospedante ecial (Aime *et al.*, 2018).

Diferentes especies de plantas de los géneros *Sphaeralcea*, *Sidalceae*, *Althaea*, *Malvastrum*, *Alcea* (Malvaceae), son afectadas por *Puccinia sherardiana* Körn (Horst, 2013; Demers *et al.*, 2015), la cual se caracteriza por producir síntomas y signos tanto en el tallo como en las hojas, estos consisten en la presencia de telios de color café oscuro, rodeados por halos cloróticos. Cabe resaltar que este tipo de roya es reportada como microcíclica (Arthur, 1962; Briere y Franc, 1998; Dugan y Nazaire, 2011), sin embargo, puede estar mal clasificada, por lo que es conveniente revisar detalladamente una descripción de su morfología y verificar su patogenicidad.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el ciclo de vida del hongo *Puccinia sherardiana*, en plantas de *Sphaeralcea angustifolia*.

2.2 Objetivo específico

a) Realizar una descripción morfológica detallada de *Puccinia sherardiana*.

b) Verificar su patogenicidad del hongo.

III. HIPÓTESIS

Puccinia sherardiana es clasificada como una roya microcíclica al carecer de la fase ecial y uredinial, por lo que en el presente estudio será posible determinar alguna de estas fases, y por consiguiente, poder ser clasificada como una roya demicíclica y no microcíclica.

IV. JUSTIFICACIÓN

Puccinia sherardiana se ha reportado en los EE. UU. (Arizona, California, Colorado, Nevada, Oregón, Washington, Idaho, Nebraska, Nuevo México, Texas, Utah, Wyoming, Montana y North Dakota) infectando diferentes especies de los géneros *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* y *Sphaeralcea*, dentro de la familia Malvaceae. En el caso de México, se menciona que *P. sherardiana* se encuentra como especie nativa, sin embargo, no se disponen de datos del sitio de colecta ni del hospedante; por otro lado, se han identificado en esta roya dos especímenes (de origen desconocido) de *Sphaeralcea* sp., en intercepciones realizadas en El Paso, Texas, en mercancía que entraba por la frontera de México. Sin embargo, a la fecha no existen evidencias científicas que indiquen la presencia de *P. sherardiana* en México, por lo que este trabajo podría representar el primer reporte confirmado de este hongo fitopatógeno en México, y una de las primeras descripciones de su ciclo de vida en las condiciones del centro de nuestro país.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Importancia de las malváceas en México

La familia Malvaceae es un grupo de plantas perteneciente al orden Malvales, la cual tiene importancia agrícola, ornamental, medicinal y como maleza. En el caso de las malváceas de importancia agrícola y ornamental de México, se encuentran enlistados: el algodónero (*Gossypium hirsutum* L.), la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), el cacao (*Theobroma cacao* L.), la ceiba (*Ceiba pentandra* L.), el hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), el falso hibisco (*Malvaviscus penduliflorus* DC.), el palo de agua (*Pachira aquatica* Aubl.) y la malva real (*Alcea rosea* L.). Como malvas de importancia medicinal sobresalen: *Tilia platyphyllos* Scop. y *Tilia cordata* Mill. Como maleza de cultivos destaca la *Malva parviflora* L., *Anoda cristata* L. y *Malvastrum coromandelianum* L." Además hay un grupo de plantas malváceas que se encuentran catalogadas como maleza de importancia medicinal, entre ellos resaltan la *Malva sylvestris* L., *Sida abutilifolia* Mill, *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G.Don, entre otros (Martínez, 2019).

5.2 *Sphaeralcea angustifolia*

5.2.1 Etimología

Sphaeralcea deriva de las palabras griegas *sphaera* (esfera) y *alkea* (malva), que significa "malva globosa" en alusión a la forma del fruto (La Duke, s.f.); Mientras que la palabra *angustifolia* es un epíteto latino que significa "de hojas angostas" (Griffith, 2019), por lo que en otras palabras, *Sphaeralcea angustifolia* significa, "malva globosa de hojas angostas".

5.2.2 Clasificación botánica

De acuerdo al National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2020a), se establece la siguiente clasificación taxonómica para *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G.Don:

Superreino: Eukaryota

Reino: Viridiplantae

División: Streptophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Género: *Sphaeralcea*

Especie: *Sphaeralcea angustifolia*

5.2.3 Descripción botánica

Planta herbácea perenne (Pérez *et al.*, s.f.), de 0.5 a 1.5 m de altura con tallos diminutivamente pubescentes. Hojas alternas, angostamente lanceoladas, de hasta 12 cm de longitud, 4 a 6 más largas que anchas, más o menos agudas, crenadas, ligeramente discoloras, con dientes redondeados en los márgenes. Inflorescencia en forma de panícula angosta racemiforme, con hojas reducidas hacia su parte superior; Los pedicelos que sostienen las flores son usualmente más cortos que el cáliz. Tres bractéolas lineares (más cortas que el cáliz) se encuentran en la base de cada flor formando el llamado cálculo. El cáliz de 5 sépalos unidos en la base, de hasta 8 mm de largo, cubierto de pelillos ramificados; la corola de 5 pétalos de 8 a 12 mm de largo (a veces más largos), morados o azul-rosados, a veces blancos; estambres unidos en la base formando una columna de color púrpura y cubierta de pelillos; estilos 10 a 16. Los frutos secos, llamados esquizocarpos, más o menos globosos con el ápice hendido, cubiertos de pelillos ramificados, casi envueltos en el cáliz, están compuestos por 10 a 16 piezas (mericarpios) que en la madurez se abren hacia la parte superior. Semillas 1 a 3 en cada mericarpio, generalmente sin pelillos (Fryxell, 1992; McVaugh, 2001; Rzedowski y Rzedowski, 2001; Vibrans, 2009).

5.2.4 Distribución y hábitat

Es una especie nativa del Suroeste de Estados Unidos y del centro y norte de México, donde se encuentra en espacios abiertos de clima templado a semiárido (Vibrans, 2009). De acuerdo con Fryxell (1993), se encuentra desde los 900 m.s.n.m. hasta los 2500 m.s.n.m., encontrándose principalmente a orillas de caminos; en áreas de disturbio, o campos de cultivo abandonados incluyendo áreas urbanas, frecuentemente como mala hierba y floreciendo todo el año (Fryxell, 1992).

5.2.5 Usos

Es utilizada por su efecto antiinflamatorio en enfermedades como tonsilitis, bronquitis, conjuntivitis, reumatismo, contusiones y hemorroides (Díaz, 1976; Andrade-Cetto, 2009), también se utiliza como cicatrizante, en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales como diarrea y disentería (García-Rodríguez *et al.*, 2012; Calzada *et al.*, 2017) y la osteoartritis (Romero-Cerecero *et al.*, 2013). Vibrans

(2009) menciona su empleo como forraje, pesticida y ornamental en xerojardinería, además se establece en jardines para polinizadores, ya que atrae a insectos nectarívoros (UTA, 2017).

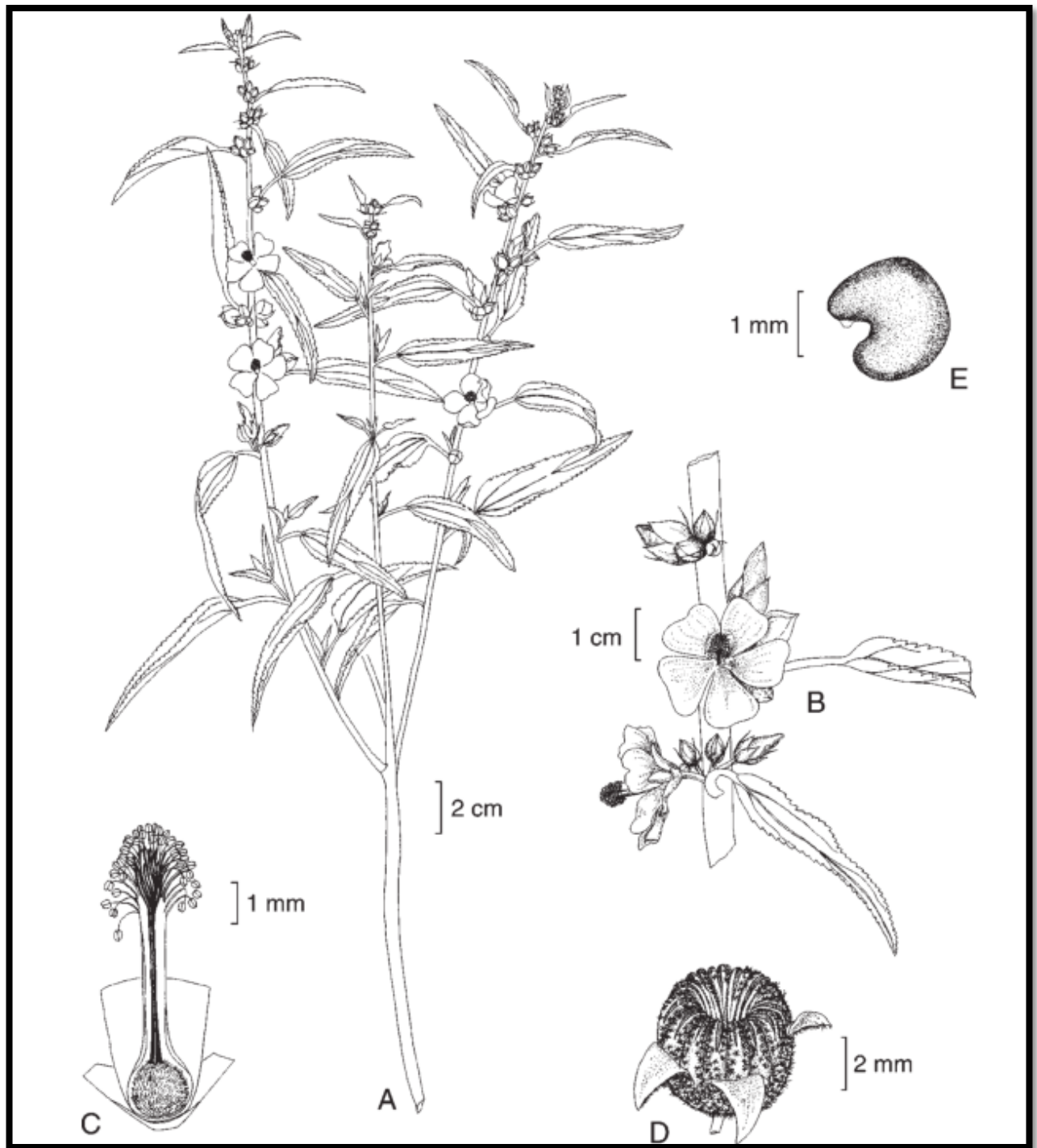


Figura 1 *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. A. rama con flores; B. flores; C. androceo y gineceo; D. fruto; E. semilla. Ilustrado por Humberto Sánchez Córdova (Fryxell, 1993).

5.3 Pucciniales

5.3.1 Etimología

En tiempos antiguos, los romanos denominaban a las royas y a los carbonos “*uredo*” (lat. urere = quemar), refiriéndose a masas de esporas de color marrón rojizo a negro y polvorientas que se parecen a tejido quemado. Después, este nombre se aplicaba solamente a las royas. El nombre *Puccinia* está basado en el nombre del médico y profesor italiano T. Puccini (Piepenbring, 2015).

5.3.2 Información general de los Pucciniales

Los hongos de la roya (Pucciniales), son un orden de hongos perteneciente a la división Basidiomycota, los cuales son conocidos por provocar enfermedades muy destructivas en las plantas, que incluso han ocasionado hambre y arruinado la economía de grandes áreas y países enteros. Los Pucciniales se caracterizan por producir esporas sexuales, denominadas basidiosporas, sobre una estructura tubular o en forma de clava denominada basidio (promicelio). El basidio tiene septos que lo dividen en cuatro células, cada una de las cuales produce una basidiospora (Agrios 2005).

Muchas especies de royas provocan el desarrollo de agallas que aparecen como deformaciones de hojas, ramas o inflorescencias, pústulas, partes hinchadas de diferentes órganos o escobas de bruja. Otras royas causan un colapso local de tejido (cancro), pero los síntomas más comunes son manchas en hojas y un crecimiento reducido de la planta. Las esporas de las royas se producen en soros ubicados en las manchas y en las agallas. Los soros que se ven en el campo con mayor frecuencia son uredios con uredosporas, telios con teliosporas y ecios con eciosporas. Su coloración varía según la especie de roya y el tipo de esporas producidas, el soro es de color anaranjado, amarillo, blanco, marrón o negro. En el caso de las especies de los géneros *Puccinia* y *Uromyces*, generalmente los ecidios y uredios son de color anaranjado y los telios marrones a negros. Además las royas forman espermogonios con espermacios, que son pequeñas estructuras efímeras y difíciles de observar a simple vista. Una cubierta blanca sobre un telio a veces corresponde a basidios con basidiosporas resultando de la germinación de las teliosporas (Piepenbring, 2015).

Algunas de las esporas parasitan sólo a un hospedante, mientras que las demás infectan y parasitan a un hospedante alterno distinto. En algunas royas macrocíclicas, pueden faltar los espermacios, las uredosporas o ambos. Algunas royas macrocíclicas, como es el caso de la roya del espárrago completan sus ciclos de vida en un solo hospedante y se le denomina autoicas. Otras, como la roya

del tallo de los cereales, requieren de dos hospedantes distintos alternos para completar todo su ciclo de vida y se les denomina heteroicas (Agrios 2005).

5.3.3 Morfología y estados esporicos

Los Pucciniales presentan una variedad de estados esporicos, donde cada uno es morfológica y funcionalmente diferente dentro del ciclo de vida de las especies de royas (Hawksworth *et al.*, 2001; Cummins y Hiratsuka, 2003). Algunas pueden tener hasta cinco estados esporicos que se designan como: espermogonio (0), aecio (I), uredo (II), telio (III) y basidio (IV) (Hahn, 2000). A continuación, se describe cada uno de los estados esporicos:

Espermogonio (0)

También conocidos como picnidios, son las estructuras que tienen a los espermacios u órganos masculinos y a las hifas receptoras, que actúan como tricógina (prolongación hifal para recibir al espermacio; (Figura 2). Por lo general los espermogonios tienen forma de botella y se forma unos pocos días después de la germinación de la basidiospora. En el centro del mismo hay una cavidad delimitada por numerosas células que emiten al interior de la cavidad células esporógenas empaquetadas, alargadas y con un único núcleo, llamadas espermacióforos, cada uno de ellos origina de forma basípeta numerosos espermacios unicelulares; a la vez que se producen se forma el ostiolo apical; varias hifas delgadas se forman del margen superior y convergen en un punto central, curvándose hacia arriba (perífisis), y provocan la rotura del ostiolo, dejando libres los espermacios que salen junto con una gota de néctar. Las hifas receptoras se producen desde la parte superior de la pared del espermogonio, entre las perífisis o bajo ellas, y salen por el ostiolo hasta alcanzar la gota de néctar que contiene los espermacios. Las hifas receptoras y espermacios de un mismo espermogonio no son compatibles, por lo que es necesario que un espermogonio de distinta polaridad entre en contacto con una hifa receptora, ya sea por medio de la lluvia o viento, o en ocasiones ayudado por un insecto que se alimenta del néctar. Al contactar, se fusionan y el núcleo del espermacio pasa a la hifa receptora, formando una célula dicariótica (Menéndez, 2014).

Aecio (1)

Denominados también como ecidios, es la siguiente fase en el ciclo de las royas (Figura 2), por lo general se desarrollan en el envés de las hojas. Su nombre, que deriva del griego *aika* (herida), indica claramente que produce una herida o rotura de la planta (Menéndez 2014). En especies de *Puccinia*,

las aeciosporas o ecidiosporas jóvenes están protegidas dentro del tejido de la planta por una capa de células del hongo, que corresponde a un peridio y luego se abre. Las ecidiosporas se forman en cadenas y están separadas una de la otra por pequeñas células separadoras que se rompen cuando las ecidiosporas se liberan. Las ecidiosporas generalmente son finamente verrugosas (Piepenbring, 2015).

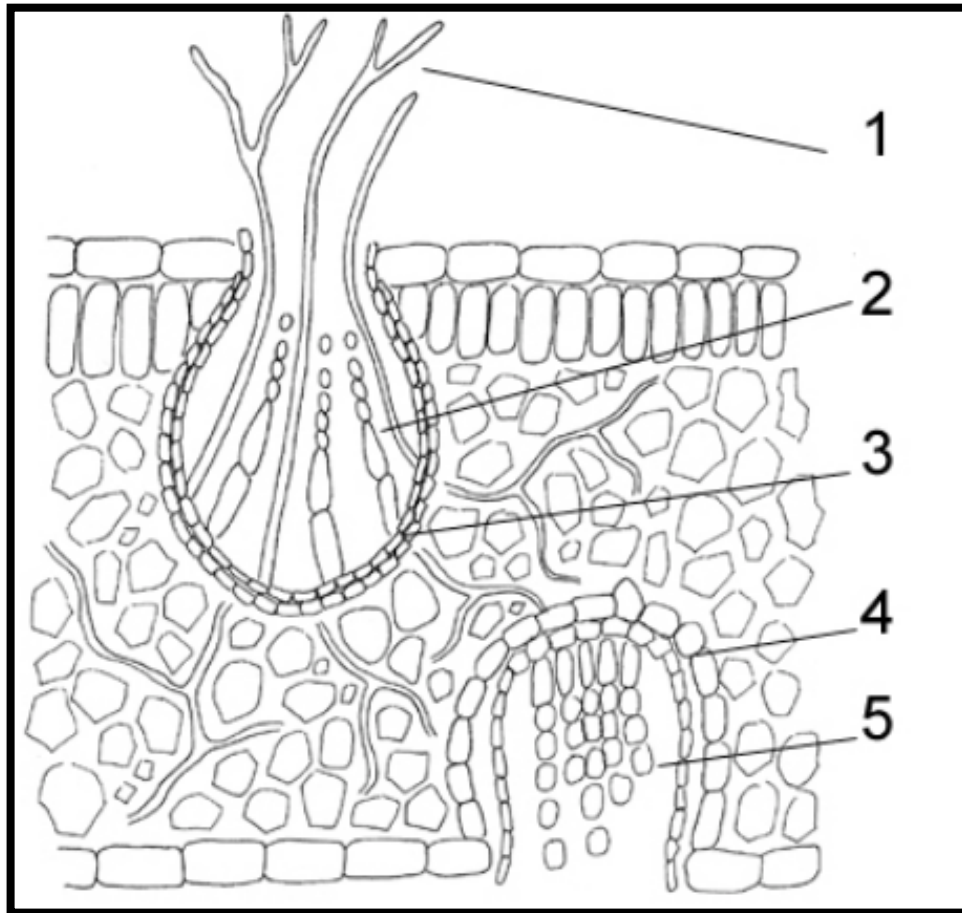


Figura 2. Representación esquemática de la fase (0) espermogonial y aecial (I). 1. Hifa receptora o tricógina, 2. Espermióforo, 3. Espermogonio, 4. Ecio, 5. Eciósporas. Imagen tomada de Plantas y Hongos (s.f.).

Uredo (II)

Los uredos algunas veces citados como uredinios, pueden estar rodeados por un peridio, por parafisos o simplemente por la epidermis del hospedante. En estas estructuras se forman las uredosporas o urediniosporas que constituyen la “fase repetitiva” de la roya, pudiendo producir sucesivos ciclos de infección, por lo que son las responsables de la rápida expansión de la enfermedad. Excepcionalmente, algunas royas producen un tipo modificado de uredosporas, denominadas anfiosporas, con paredes más gruesas, capaces de sobrevivir en condiciones adversas (Rubiales,

2000). Las uredosporas a menudo son equinuladas y mayormente presentan poros germinativos. En *Puccinia* spp., las uredosporas y las teliosporas se caracterizan por un desarrollo individual en pedicelos y son formadas por una y dos células, respectivamente (Piepenbring, 2015).

Telio (III)

Al aproximarse la madurez de la planta hospedante, se inicia la formación de teliosporas. En algunas royas comienzan a formarse en los uredios, de modo que al principio pueden aparecer uredosporas y teliosporas juntas, para acabar formándose sólo teliosporas. Estas esporas suelen constituir la fase de supervivencia (Rubiales, 2000). Además, la clasificación de las royas a nivel de géneros se basa principalmente en características de las teliosporas.

Basidio (IV)

Cuando se dan las condiciones favorables para la germinación de una teliospora, cada una de sus células emite un pequeño tubo, el promicelio, al que emigra el núcleo diploide; se produce la meiosis y se originan cuatro núcleos haploides que se separan a lo largo del promicelio y se forman septos entre ellos, quedando el promicelio dividido en cuatro células uninucleadas. Cada una de estas células emite un esterigma, en cuyo ápice se desarrolla una basidiospora y a la que migran los núcleos; en algunas ocasiones los núcleos sufren mitosis y las basidiosporas son binucleadas. Al madurar son expulsadas con fuerza del esterigma y dispersadas (Menéndez, 2014).

5.3.4 Origen de las royas

A través de la historia se han propuesto varias teorías sobre el origen probable de las royas y su relación con otros grupos de hongos. Dietel (1928), Gäumann (1964), Leppik (1961) y Donk (1972, 1973) especularon que las royas han evolucionado a partir de parásitos Auriculariales. Rogers (1934) y Olive (1957) consideraron que las royas derivaban de formas ancestrales tremellaceas, que a su vez se derivaron de Ascomycetes. Petersen (1975) también considero que la mayoría de los hongos basidiomicetos, incluidas las royas, se derivaron de un conjunto de hongos ascomicetos mediante la producción de ascosporas "exógenas". Hughes (1970), al examinar la ontogenia de las esporas de las royas, también sugirió que había una estrecha relación entre las royas y los hongos ascomicetos.

Uno de los trabajos más interesantes entorno al origen de las royas son los de Savile (1955, 1968, 1971a) quien especuló que las royas se derivaron de un linaje consistentemente parasitario, rastreable a través de un ascomiceto primitivo hasta los ficomicetos. Las relaciones de hospedante y

varias semejanzas morfológicas y citológicas mostraron que las royas se derivaron de un ascomiceto simple muy parecido al género *Taphrina* (Proto-*Taphrina*) quizás en un helecho marattiáceo, por lo que considero a *Taphrina* como un "ancestro vivo" de las royas. Además, añade que los proto-basidiomicetos adoptaron y necesitaron de mucha turgencia, pero no agua envolvente, para la descarga forzada de sus esporas externamente y aéreamente. Por lo que este nuevo proceso permitió cruzar una barrera formidable y completar su liberación del hábito acuático, en comparación de *Taphrina* que libera sus esporas en sus ascos al reventarlos en contacto con el agua libre y así dispersarse por este medio, mencionando que *Taphrina* ha mantenido el hábito ancestral y apenas ha cambiado en morfología. Además, resalta que, en raras ocasiones, bajo condiciones anormales, las esporas de *Taphrina* se forman externamente en esterigmas puntiagudos, simulando un basidiomiceto en todo menos en su descarga forzada.

5.3.5 Evolución de las royas

Si bien, se cree que la existencia de las primeras proto-royas aparecieron en hospedantes tales como helechos tropicales/subtropicales, produciendo solo teliosporas y basidios, estas proto-royas se vieron obligas a crear nuevas estructuras que permitieran su expansión así como la búsqueda de nuevos hospedantes (Shattock y Preece, 2000). Savile (1971a) afirma que el heteroecismo, claramente comenzó como un accidente, que evoluciono a medida que los cambios ecológicos reducían la posibilidad de que el tejido del helecho susceptible (el huésped principal) estuviera disponible cuando se descargaban las basidiosporas. Por lo tanto, se infiere que la necesidad de tejidos susceptibles en la temporada apropiada era crítica. Este heteroecismo aumento la distancia mínima promedio que debían recorrer las esporas para alcanzar un sustrato compatible, aumentando así la distancia media entre infecciones y reduciendo la población total. Se cree que este nuevo hospedante alterno fue una conífera del género *Abies*, donde se encuentran los estados espermagoniales y aeciales más primitivos (Savile 1971a; Hiratsuka y Sato, 1982). Para hacer practicable la alternancia entre helechos y coníferas como huéspedes, se requirieron de dos cambios más: (1) la evolución de los espermogonios para complementar la fusión de hifas y así acelerar la transferencia nuclear; y (2) la elaboración de aecios y uredinios para restablecer el nivel de población. Este trabajo planteo la idea de rastrear la evolución de las royas a través de la morfología comparativa y la relación del huésped (Savile, 1971a). Las relaciones roya-huésped, por lo tanto, son muy importantes al considerar la filogenia y el origen de los hongos de la roya (Hiratsuka y Sato, 1982). No solo podemos depender de la relación huésped-roya al clasificar y rastrear la historia evolutiva de las royas, sino que las royas

pueden ser útiles en la taxonomía y clasificación de plantas superiores y en la especulación sobre sus relaciones filogenéticas (Nannfeldt, 1968; Savile, 1971b , 1979 ; Anikister y Wahl, 1979).

Si bien, en la evolución de las royas, los ciclos de vida en expansión generaron espermogonios, aecios y uredinios que produjeron espermacios, aeciosporas y urediniosporas respectivamente para la expansión y dispersión de la población (Shattock y Preece, 2000; Savile 1971a). Resulta desconcertante imaginar que los ciclos de vida más complicados son las formas más primitivas (Hiratsuka y Sato, 1982). Sin embargo, estas expansiones resultaron en ciclos de vida reducidas (Jackson, 1931). Algo que debe resaltarse es que no se puede afirmar que una roya con ciclo de vida simple, surgió como resultado en la reducción de una especie completamente expandida, ya que pudo ser una roya con ciclo de vida primitiva que no tuvo necesidad de expandirse (Hennen y Buritica, 1980).

5.3.6 La evolución de las royas según Leppik

Leppik (1953, 1967, 1973) introdujo la idea de una "escalera hologenética" para explicar cómo evolucionaron las royas con grupos de plantas huésped al cambiar sus estados de esporas a grupos de plantas ecológicamente prósperos recién surgidos. Como ejemplo, analizó las especies existentes de *Melampsora* y especuló la secuencia de posibles cambios de huéspedes en el grupo. Sugirió que primero existieron royas teliosporosas en helechos (*proto-Melampsora*), y luego se produjo el estado aecial en coníferas (*pino-Melampsora*), luego de lo cual los estados telial y uredinial se desplazaron a Salicales (*salicio-Melampsora*). En la siguiente etapa, las royas cambiaron sus estados aeciales de hospedantes coníferos a angiospermas más modernas como Saxifragaceae, Euphorbiaceae y Liliaceae (*neo-Melampsora*) y finalmente produjeron muchas especies autoicas en estos hospedantes (*auto-Melampsora*). Además, introdujo el término "radiación biogénica" para especular sobre la secuencia de la escalera hologenética. Según él, en un grupo de royas heteroicas, a menudo una generación está restringida a un hospedante o grupo de hospedantes, mientras que otra generación parece propagarse con una gama más amplia de anfitriones. Esto sugiere que la generación que tiene el rango de huéspedes más amplio se estableció más tarde en la escala hologenética. Por ejemplo, especuló que para las royas de abetos y helechos actuales (*Uredinopsis*, *Milesina* y *Hyalopsora*), *Abies* (un abeto) es el huésped principal y muchos helechos son huéspedes secundarios establecidos más tarde en el tiempo geológico. Las royas irradiaron desde *Abies* debido a una gama más amplia de helechos huéspedes. Propuso además que un grupo aún más antiguo de helechos (tropicales o

subtropicales) debe haber sido el huésped principal de las royas de las coníferas antes de que los estados uredinial y telial cambiaran a los helechos modernos (templados).

5.3.7 Ciclo de vida de las royas

Los hongos causantes de las royas muestran una peculiaridad, y es que, dentro de su ciclo de vida pueden tener distintos tipos de esporas, teniendo relación con su hospedero y su función (Garay y Cruz, 2022). Estas pueden presentar 5 estructuras fructíferas y, en consecuencia, 5 tipos de esporas diferentes que se desarrollan de acuerdo a una determinada secuencia (cuadro 1) (Agrios, 2005).

Cuadro 1. Nombres de soros y esporas de las Royas, con los respectivos numerales para las generaciones y fases nucleares (Piepenbring, 2015).

Generación	Soro	Espora	Fase nuclear
0	Espermogonio	Espermacio	1n (→ P!)
I	Ecidio	Ecidiospora	n + n
II	Uredio	Uredospora	n + n
III	Telio	Teliospora	(C! →) 2n
IV	Basidio	Basidiospora	(M! →) 1n

De acuerdo con Agrios (2005), existen dos tipos de ciclo de vida, las royas que sólo producen teliosporas y basidiosporas denominadas como royas microcíclicas o royas de ciclo de vida corto, y royas macrocíclicas o de ciclo de vida largo, que además de producir teliosporas y basidiosporas, forman espermacios, eciosporas y uredosporas en este orden. Murace y Aprea (2012) mencionan que en algunas royas macrocíclicas, puede ocurrir que alguno de estos últimos tipos pueda faltar. Lindquist (1982) por su parte considera a estas royas como hemicíclicas. Sin embargo, en muchas revisiones de los ciclos de vida de la roya, se ignora la forma hemicíclica (Hiratsuka y Sato, 1982; Cummins y Hiratsuka, 1983).

La clasificación más reciente con respecto a los ciclos de vida de las royas corresponde a Piepenbring (2015), donde propone 5 tipos de ciclos (Cuadro 2). Para distinguir estos ciclos utiliza los siguientes términos:

- (1) Macrocíclico

Son royas que producen 5 estructuras fructíferas distintas con 5 tipos de esporas diferentes, estas pueden ser autoicas o heteroicas (Agrios, 2005; Hiratsuka y Sato, 1982).

(2) Demicíclico

En 1982 Hiratsuka y Sato, describieron la forma demicíclica como un ciclo de vida carente del estado uredinial, pudiendo ser autoicas o heteroicas. Sin embargo, Piepenbring (2015), además de considerar este criterio, clasifica dentro de este grupo a aquellas royas carentes del estado aecial, pero que cuentan con la fase uredinal (ver cuadro 2). Dando origen a 2 subtipos:

- Demicíclico sin fase aecial
- Demicíclico sin fase uredinal

Cabe resaltar que el termino demicíclico es una traducción del inglés “demicyclic”, donde el prefijo “demi” se traduce como “mitad o de tamaño medio” (Oxford Lexico, 2022), por consiguiente, se puede interpretar demicíclico: “como un ciclo de tamaño medio”.

Cuadro 2. Ciclos de vida y generaciones de Royas (Piepenbring, 2015).

Ciclo de Vida	Espermacios	Ecidiosporas	Uredosporas	Teliosporas	Basidiosporas
Macrocíclico	0	I	II	III	IV
Demicíclico sin I	0		II	III	IV
Demicíclico sin II	0	I		III	IV
Microcíclico	0			III	IV
Endocíclico	0	I			IV
Asexual II			II+II		

(3) Microcíclico

Este tipo de ciclo se caracteriza por la falta de ecidios y uredios (Hiratsuka y Sato, 1982).

(4) Endocíclico

Son un tipo de royas que no cuenta con uredios ni telios. Las ecidiosporas germinan formando basidios

por lo que también se pueden llamar teliosporas (Piepenbring 2015).

(5) Roya asexual

Cuando no se conoce la fase telial de una roya, ésta se puede clasificar como asexual, en la cual se observan solamente uredios. Algunas royas asexuales aparentemente perdieron la capacidad de formar teliosporas (Piepenbring, 2015).

5.3.8 Ciclo de *Puccinia graminis*

Puccinia graminis es una especie muy común para ilustrar el ciclo de vida de una roya, dado que su ciclo está bien definido y forma la base para el entendimiento de otros ciclos de vida de royas. Esta especie es el agente causal de la enfermedad de la roya negra, donde los síntomas más graves y económicamente importantes aparecen en el trigo y algunos cereales relacionados (como es el caso de la cebada, las avenas y el centeno), así como en otros pastos. Sin embargo, aunque dichos síntomas desde el punto de vista económico, aparecen también en las plantas del agracejo común (*Berberis vulgaris*) y en algunas otras especies silvestres de mahonia y agracejo, por lo que se trata de una rota heteroica (Agrios, 2005).

Piepenbring (2015) describe el ciclo de vida de *Puccinia graminis* de la siguiente manera: en la primavera, espermogonios se desarrollan en las hojas de *Berberis* sp., adentro se forman numerosas células diminutas, conocidas como espermacios. Se trata de gametos con un núcleo haploide cada uno, que requieren de células compatibles con las cuales se unen por plasmogamia. Los espermacios se liberan de los espermogonios en una gota dulce y pegajosa de néctar la cual es atractiva para insectos que dispersan los espermacios cuando se mueven de una planta hacia otra. Hifas receptoras sobresalen de los espermogonios y cuando un espermacio con un núcleo compatible entra en contacto con una hifa receptiva ambas células se fusionan. El núcleo del espermacio se mueve hacia adentro de la hifa receptiva, se multiplica por mitosis y los núcleos haploides migran a través de las hifas en el tejido de la planta para asociarse con los núcleos presentes formando dicarios. En el estado dicariótico, el hongo concluye el desarrollo de los ecidios con peridios que se abren y liberan las ecidiosporas dicarióticas para que sean dispersadas por el viento. Las ecidiosporas de *Puccinia graminis* no son capaces de reinfectar especies de *Berberis*. Necesitan plantas hospedantes de gramíneas para infectar sus hojas, colonizar el interior de las hojas y formar uredosporas por numerosas divisiones mitóticas de las células dicarióticas. Las uredosporas son capaces de reinfectar otras gramíneas hospedantes por lo que son eficientes para atacar un gran número de individuos de

su planta hospedante durante el verano en zonas templadas. Para sobrevivir durante el invierno, *Puccinia graminis* forma teliosporas que son esporas latentes con paredes gruesas y oscuras. Las teliosporas necesitan un período con temperaturas bajas para poder germinar durante la primavera del año siguiente. Cada teliospora cuenta con dos células que corresponden a probasidios dentro de los cuales los dos núcleos se fusionan formando un solo núcleo diploide en cada célula. Cada célula de una teliospora germina para formar un frambasidio con septos transversales. Cada célula basidial forma una sola basidiospora con un apéndice hilar en un esterigma más o menos curvado que permite una liberación con un impulso. Poco tiempo después, las células basidiales vacías colapsan. La basidiospora germina para formar una hifa infecciosa o un esterigma con una balistospora liberada con un impulso. Esta espora se llama espora secundaria y puede volver a formar otra balistospora, lo que se conoce como germinación repetitiva y continúa hasta que el hongo encuentre un sustrato adecuado o hasta que las sustancias nutritivas almacenadas en la célula hayan sido consumidas. Las basidiosporas o las esporas secundarias de *Puccinia graminis* infectan especies de *Berberis* o *Mahonia* (Berberidaceae) y de esta manera se completa el ciclo de vida de esta especie (Figura 3).

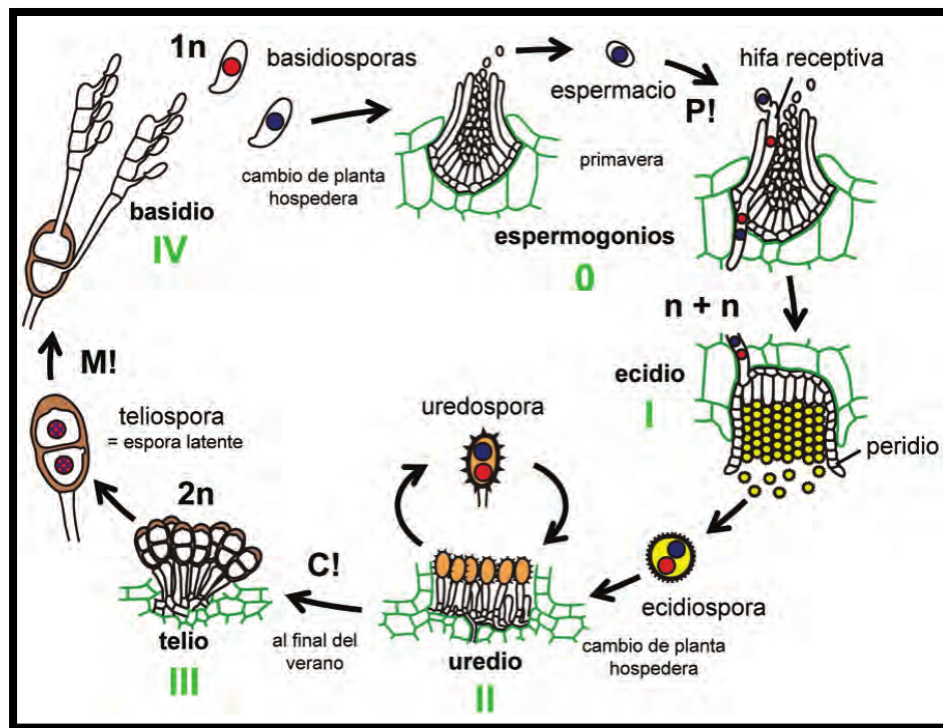


Figura 3. Ciclo de vida de *Puccinia graminis* (Pucciniales). Los espermogonios y ecidios se encuentran sobre hojas de *Berberis* sp. (hospedero alterno), los uredios y telios sobre hojas de gramíneas (Poaceae) (hospedero principal) (Piepenbring, 2015).

5.3.9 El proceso de infección biotrófica

Como parásitos obligados, las royas dependen completamente de la presencia de plantas hospedantes vivas para reproducirse y completar sus ciclos de vida. Como biótrofos, las royas están especialmente adaptadas para obtener nutrientes de las células vegetales vivas (Kolmer *et al.*, 2009).

Uredinia es la etapa de enfermedad económicamente importante para muchas royas. Las urediniosporas que son transportadas por las corrientes de viento se depositan en la superficie del huésped, generalmente por un evento de lluvia (Kolmer *et al.*, 2009). El proceso de infección de algunas *Puccinia* spp. (Staples y Macko, 1984) y *Uromyces* spp. (Mendgen y Hahn, 2002) ha sido estudiado en detalle. Las urediniosporas absorben agua, se hinchan y producen un tubo germinativo después de entrar en contacto con una película de agua libre en la superficie de la planta (Figura 4a). Después de 4–6 horas se produce el tubo germinativo. Para muchas royas, el crecimiento y la orientación del tubo germinativo están controlados por una respuesta tigmotrópica a la topografía de la superficie huésped (Wynn y Staples, 1981). Los tubos germinales continúan alargándose hasta que entran en contacto con un estoma. Las royas son muy específicas para la topografía y el estoma del hospedante, las royas inoculadas en plantas que no son hospedantes no localizan el estoma o es posible que ni siquiera germinen adecuadamente. Una vez que se encuentran los estomas, el tubo germinativo deja de alargarse y en la punta del tubo germinativo se forma un apresorio sobre el estoma. A esto le sigue la formación de una clavija de penetración desde el apresorio que empuja a través del estoma para ingresar al espacio intercelular dentro de la hoja huésped o tallo en el que se forma una vesícula subestomatal. Algunas royas, incluida la roya del tallo del trigo, la cebada y la avena (*P. graminis*), requieren que haya algo de luz para formar una vesícula subestomatal, ya que la roya responde a concentraciones aumentadas de CO₂. Las hifas de infección crecen desde la vesícula subestomatal hacia las células del mesófilo. La punta de la hifa de infección está delimitada por un tabique y forma una célula madre haustorial después de entrar en contacto con la pared celular del mesófilo. Se forma una clavija de penetración a partir de la célula madre haustorial, que permite la formación del haustorio que se invagina entre la pared de la célula huésped y la membrana extra haustorial que se deriva de la membrana plasmática de la célula huésped (Figura 4b). La absorción de nutrientes se produce a través de la membrana extrahaustorial. Es probable que las células huésped sean manipuladas por señales del haustorio para mantener la viabilidad a fin de permitir el transporte de azúcares y aminoácidos a través de la membrana extrahaustorial hacia el haustorio. Se forman haustorios adicionales cuando otras hifas infecciosas entran en contacto con las paredes

celulares del mesófilo. A los 7 a 10 días después de la infección inicial, el micelio en el tejido huésped forma células esporógenas en el espacio intercelular debajo de la epidermis. Los brotes de esporas de las células esporógenas rompen la superficie de la epidermis (Figura 4c) (Kolmer *et al.*, 2009). La urediniospora inicial, el pedicelo y finalmente las urediniosporas se forman sucesivamente en las yemas de esporas emergentes (Harder, 1984).

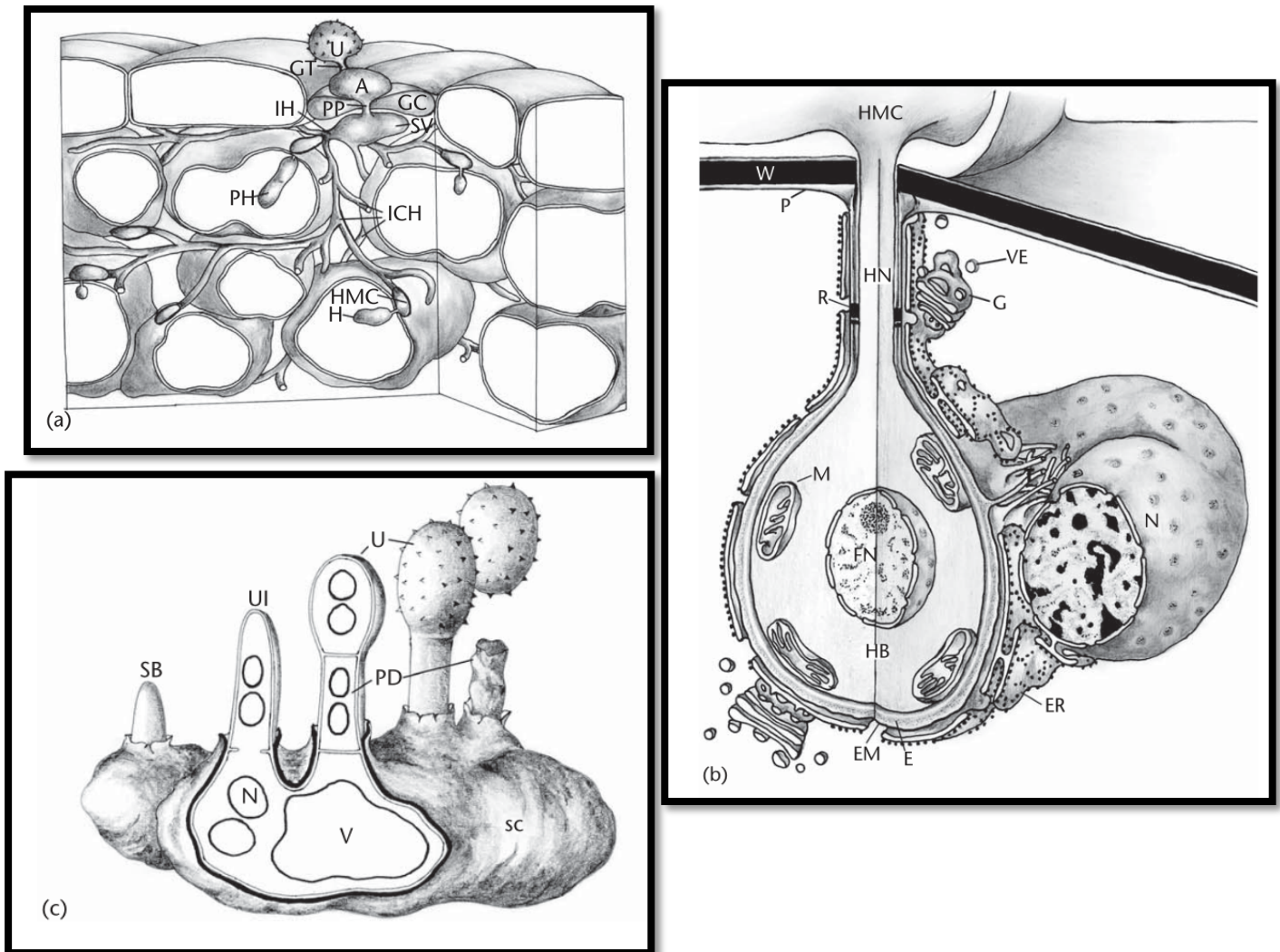


Figura 4. Representación esquemática de las estructuras de infección de un hongo de la roya de los cereales (Tomada de Kolmer *et al.*, 2009).

(a) Estructuras de infección Uredinial a las 60 horas. U, urediniospora; GT, tubo germinativo; A, apresorio; GC: célula guarda estomática; PP, clavija de penetración; SV, vesícula subestomatal; HI, hifas de infección; PH, haustorios primarios; ICH, hifas intercelulares; H, haustorios adicionales. Dibujado por James Chong. Reproducido de Harder (1984).

(b) Sección transversal de la célula huésped invadida en el sitio de penetración para mostrar la representación tridimensional de un haustorio maduro y la asociación con los orgánulos de la célula huésped. E, matriz

extrahaustorial; EM, membrana extrahaustorial; RE, retículo endoplásmico; FN, núcleo fúngico; G, cuerpo de Golgi; HB, cuerpo haustorial; HMC, célula madre haustorial; HN, cuello haustorial; M, mitocondrias; N, núcleo anfitrión; P, plasmalema; R, anillo de cuello; T, túbulo complejo; V, vesícula; W, pared de la célula huésped. Dibujado por James Chong. Reproducido de Harder y Chong (1984).

(c) Formación de urediniosporas en una hoja de cereal. U, urediniosporas; SC, célula esporógena; SB, brote de esporas; UI, inicial de urediniospora; PD, pedicelo; N, núcleo; V, vacuola. Dibujado por James Chong. Reproducido de Harder (1984). Usado por Kolmer *et al.* (2009) con permiso de Elsevier.

5.3.10 Daños ocasionados en plantas cultivadas

Muchas royas causan enfermedades serias en plantas cultivadas por lo que resultan pérdidas económicas (Cuadro 3).

La roya del café, *Hemileia vastatrix*, causa pérdidas económicas importantes en los cultivos de café en zonas tropicales y subtropicales porque numerosas manchas foliares reducen la capacidad fotosintética de las plantas. La roya del café se reportó por primera vez en Ceilán (ahora Sri Lanka), aproximadamente en el año 1869. Rápidamente se multiplicó e hizo imposible el cultivo de café en esta isla por lo que los campesinos empezaron a dedicarse al cultivo del té. Como resultado muchos europeos, sobre todo los ingleses que consumían el café de Sri Lanka, sustituyeron esta bebida por el té. La roya se propagó a muchos cultivos de café en el viejo mundo hasta que aproximadamente 100 años después de ser descubierta en Sri Lanka se detectó por primera vez en el hemisferio oeste en Brasil. Es un patógeno generalmente imposible de eliminar, solamente se logran mantener niveles bajos de infección aplicando fungicidas constantemente (Piepenbring, 2015).

Como parásitos de árboles royas pueden reducir el vigor de la planta y la calidad de la madera. Reducen la firmeza de los troncos contra el viento y hacen al árbol vulnerable contra otros parásitos. Las royas pueden ser muy agresivas en monocultivos de árboles introducidos, por ejemplo, *Olivea tectonae* en teca cultivada en el neotrópico. *Puccinia psidii* conocida originalmente por infectar la guayaba (*Psidium guajava*) y otras especies de Myrtaceae en América tropical saltó a otras especies de Myrtaceae, como *Eucalyptus* spp. y pomarrosa (*Syzygium jambos*) introducidas de otras partes del mundo hacia el área de distribución de esta roya. *Puccinia psidii* se dispersó alrededor del mundo, desde Norteamérica hacia Hawái, Japón y Australia. Ciertas royas atacan plantas ornamentales cultivadas reduciendo su valor estético (Piepenbring, 2015).

En gramíneas (Poaceae), las plantas infectadas por roya muestran una mayor pérdida de agua porque transpiran más y porque se evapora más agua a través de la epidermis rota. Además, el propio hongo elimina gran parte de los nutrientes y el agua que normalmente utilizaría la planta. La respiración de las plantas infectadas aumenta rápidamente durante el desarrollo de la uredia, pero posteriormente la respiración cae ligeramente por debajo de lo normal. La fotosíntesis de las plantas enfermas se reduce considerablemente debido a la destrucción de gran parte del área fotosintética y a la interferencia de las secreciones fúngicas con la actividad fotosintética de las áreas verdes restantes de la planta. El hongo también parece interferir con el desarrollo normal de las raíces y la absorción de nutrientes por parte de las raíces. Todos estos efectos reducen el número y tamaño normal de semillas en la planta. Además, induce una madurez más temprana de la planta, lo que reduce el tiempo disponible para que la semilla se llene. Las infecciones fuertes de roya antes o durante la etapa de floración de la planta son extremadamente dañinas y pueden causar la pérdida total del rendimiento, mientras que si ocurren infecciones fuertes más tarde, el daño al rendimiento es mucho menor (Agrios, 2005).

Cuadro 3. Royas (Pucciniales) importantes como patógenos de plantas cultivadas (Hospederos principales) (Piepenbring, 2015).

Especies de Royas	Plantas Hospederas	Enfermedades
<i>Hemileia vastatrix</i>	Café (<i>Coffea arabica</i>)	Roya del café
<i>Olivea tectonae</i>	Teca (<i>Tectona grandis</i>)	Roya de la teca
<i>Phakopsora gossypii</i>	Algodón (<i>Gossypium</i> spp.)	Roya del algodón
<i>Phakopsora meibomiaae</i>	Soja (<i>Glycine max</i>)	Roya de soja (en las Américas)
<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	Soja	Roya de soja (en Asia)
<i>Phakopsora zeae</i>	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Roya blanca de Guatemala
<i>Puccinia arachidis</i>	Maní (<i>Arachis hypogaea</i>)	Roya del maní
<i>Puccinia cymbopogonis</i> , <i>Puccinia nakanishikii</i> y otras especies	Hierba de limón (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Roya de la hierba de limón
<i>Puccinia graminis f. tritici</i>	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Roya negra del tallo del trigo

	(hospedero alterno de <i>Puccinia graminis</i> : especies de Berberidaceae)	
<i>Puccinia horiana</i>	Crisantemo (<i>Chrysanthemum</i> spp.)	Roya blanca del crisantemo
<i>Puccinia kuehnii</i>	Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	Roya de la caña de azúcar
<i>Puccinia melanocephala</i>	Caña de azúcar	Roya de la caña de azúcar
<i>Puccinia pittieriana</i>	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	Roya de la papa
<i>Puccinia polysora</i>	Maíz	Roya sureña, roya tropical
<i>Puccinia psidii</i>	Eucalipto (<i>Eucalyptus</i> spp.), guayabo (<i>Psidium guajava</i>), pomarroso (<i>Syzygium jambos</i>)	Roya del eucalipto, roya del guayabo, roya de la pomarroso
<i>Puccinia purpurea</i>	Hierba de limón, sorgo (<i>Sorghum vulgare</i>) (hospedero alterno: <i>Oxalis</i> spp.)	Roya de sorgo
<i>Puccinia sorghi</i>	Maíz (hospedero alterno: <i>Oxalis</i> spp.)	Roya común del maíz
<i>Puccinia thaliae</i>	Bandera española (<i>Canna indica</i>)	Roya
<i>Ravenelia humphreyana</i>	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (ornamental)	Roya
<i>Tranzschelia discolor</i>	Durazno (<i>Prunus persica</i>) (hospedero alterno: especies de Ranunculaceae)	Roya de la hoja
<i>Uredo musae</i>	Banano (<i>Musa</i> sp.)	Roya de la hoja
<i>Uromyces appendiculatus</i>	Frijoles (<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Phaseolus</i> spp.)	Roya del frijol
<i>Uromyces dianthi</i>	Clavel (<i>Dianthus</i> spp.)	Roya del clavel

	(hospedero alternativo: <i>Euphorbia</i> spp.)	
<i>Uromyces striatus</i>	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Roya de alfalfa
	(hospedero alternativo: especies de Euphorbiaceae)	
<i>Uromyces viciae-fabae</i>	Haba (<i>Vicia faba</i>), lenteja (<i>Lens culinaris</i>)	Roya de la hoja
<i>Uromyces vignae</i>	Rabiza (<i>Vigna unguiculata</i>)	Roya de la hoja

5.3.11 Control de royas

El control de las enfermedades de la roya en algunos cultivos, como los granos, se logra mediante variedades resistentes. En algunas royas vegetales, ornamentales y de árboles frutales, como la roya del cedro-manzano, la enfermedad se controla con aerosoles químicos. En otros, por ejemplo, la roya ampollosa del pino blanco, se ha intentado controlar mediante la eliminación del huésped alternativo (*Ribes* spp.) y evitando las zonas de alto riesgo de roya. Con el descubrimiento de varios fungicidas sistémicos contra las royas, el control de las enfermedades de la roya de las plantas anuales y de los árboles es posible con estos productos químicos aplicados como rociadores, cobertura de semillas, a drench o inyecciones. (Agrios, 2005).

En los últimos años, el control biológico de las royas se ha logrado mediante la aplicación de hongos antagonistas como *Darluca filum* en plantas de trigo y *Tuberculina máxima* en pinos, así como de bacterias como *Bacillus subtilis* sobre la superficie de plantas como el frijol, o bien al inocular previa y sistémicamente a las plantas con algunos virus que las hacen ser más resistentes a la infección ocasionada por el hongo (Agrios, 2005). Por otra parte, Gómez *et al.* (2018) realizaron estudios en selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*), donde se demostró un alto grado de micoparasitismo con hongos del género *Simplicillium*. Así mismo García *et al.* (2005) encontraron antagonismo del aislamiento de *Cladosporium* sp. sobre *Puccinia horiana* en laboratorio, sin embargo, la aplicación en invernadero de *Cladosporium* sp. no redujo significativamente la incidencia, ni el número de pústulas desarrolladas en la última hoja infectada, por lo que por ahora parece estar bastante lejana la posibilidad de controlar en el campo a las royas mediante cualquiera de estos métodos de control biológico.

5.3.12 Royas como control biológico

Algunas especies de royas se pueden utilizar para el control biológico de malezas (Piepenbring, 2015). Uno de los casos más citados es el uso de *Puccinia chondrillina* para el control de *Chondrilla juncea*. Maleza que fue un problema importante en las áreas de cultivo de trigo de Australia (Hasan, 1988). Este éxito se debió a los trabajos descritos por Wapshere (1970) y Hasan (1970), en los ambos mencionaban que las plantas fuertemente atacadas por *P. chondrillina* sobre *Chondrilla juncea* provocaban la muerte de este, o, en su defecto, resultaban severamente dañadas, reduciendo la producción de semillas y las reservas de almacenamiento en las raíces. Posteriormente Hasan realizó inoculaciones con varias cepas encontradas de *P. chondrillina* en el Mediterráneo, sobre importantes plantas de cultivo australianas, así como plantas miembros de las Asteraceae que estaban estrechamente relacionadas con la maleza *Chondrilla juncea* (Roskopf, 1999). El objetivo era exponer la especificidad de *P. chondrillina* sobre el género *Chondrilla* y determinar si, si se introdujera en Australia, la especie de roya no infectara alguna planta de cultivo importante (Hasan 1972), ya que para entonces no había sido registrada en Australia (McAlpine, 1906). Las pruebas se realizaron bajo una variedad de condiciones ambientales y no se encontró que ninguna de las plantas cultivadas estuviera infectada con la roya. Por lo tanto, el hongo de la roya se consideró suficientemente específico para *Chondrilla juncea*. La primera cepa de este hongo fue liberada en Australia en 1971. Al cabo de varios meses, la densidad de maleza de hoja estrecha comenzó a disminuir sustancialmente y hubo áreas inoculadas en las que la maleza ya no se consideraba un problema (Hasan, 1972, 1988). Posteriormente se supo que la única cepa de la roya liberada en Australia solo era capaz de controlar el fenotipo predominante de hoja estrecha de la maleza; por lo tanto, se requirieron múltiples cepas para el control exitoso de los fenotipos de hoja ancha e intermedia (Hasan, 1985). Más tarde, *Puccinia chondrillina* fue liberada en el oeste de los Estados Unidos, donde demostró ser el más efectivo de los agentes de biocontrol contra esta maleza (Supkoff *et al.*, 1988).

Otro ejemplo es la roya *Maravalia cryptostegiae*, que se caracteriza por atacar a la planta *Cryptostegia grandiflora*, la cual fue introducida de Madagascar a Australia y se convirtió en una especie invasora. Con la aplicación de la roya se logró controlar esta especie de planta (Evans, 1993).

5.4 Importancia de las royas en México

El sistema agronómico de México es de una amplia variedad, ya que cuenta con más de 200 productos diferentes agrícolas, donde la calidad y el valor de la producción se ve afectada en gran medida por

las enfermedades a las cuales los cultivos están expuestos. El 80% de estas enfermedades son producidas por hongos, entre los cuales las “royas” juegan un papel de suma importancia.

Más del 60% de las plantas cultivadas poseen al menos un tipo de roya, que les produce diversas enfermedades tales como la defoliación, deformación, manchado, marchitamiento y, cuando es severa la enfermedad, la muerte total de la planta (López, 1998).

En México se han registrado unos 60 géneros y un poco más de 600 especies tanto en plantas silvestres como cultivadas. Dos géneros de royas representan más del 50% de México, estas son *Uromyces* con más de 150 especies y *Puccinia* con más de 300 especies (López, 1984). A continuación, se indican las principales royas de importancia en México.

Cuadro 4. Royas que atacan cultivos de importancia en México (López, 1998).

Roya	Cultivo
<i>Puccinia sorghi</i>	Maíz
<i>Puccinia polysora</i>	Maíz
<i>Uromyces appendiculatus</i>	Frijol
<i>Puccinia melanocephala</i>	Caña de azúcar
<i>Puccinia purpurea</i>	Sorgo
<i>Puccinia kuehnii</i>	Caña de azúcar
<i>Puccinia graminis f. sp. tritici</i>	Trigo
<i>Hemileia vastatrix</i>	Café

Si bien, se mencionan las royas de mayor importancia económicas, cabe resaltar que existen más tipos de royas en cultivos agrícolas de menor explotación y plantas silvestres; que de acuerdo con López (1998) se desconoce su biología y ciclo de vida en más de un 90% de ellas, motivo por el cual ha sido difícil desarrollar alternativas de control efectivas o preventivas, de ahí la importancia de realizar estudios de campo y de invernadero para dilucidar la biología y ciclo de vida de estos parásitos.

5.5 *Puccinia sherardiana*

5.5.1 Clasificación botánica

Superreino: Eukaryota

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Pucciniomycetes

Orden: Pucciniales

Familia: Pucciniaceae

Género: Puccinia

Especie: *Puccinia sherardiana*

Fuente: NCBI, 2020b.

5.5.2 Morfometría y ciclo de vida

De acuerdo con Demers *et al.* (2015) mencionan que las características morfológicas de las telias de *P. sherardiana* identificadas sobre *Alcea Rosae*, son de color marrón oscuro, hipófilas, en racimos apretados. Las teliosporas por su parte, presentan una coloración marrón claro, a menudo con poros apicales o paredes divididas en los ápices, predominantemente bicelulares. Las dimensiones de las teliosporas unicelulares en promedio son $35 \times 24 \mu\text{m}$ y para las teliosporas bicelulares son de $47 \times 25 \mu\text{m}$. Las paredes laterales de las teliosporas demuestran un espesor de 1,5 a $3 \mu\text{m}$, con paredes apicales de 3 a $7 \mu\text{m}$ de espesor y pedicelos hialinos, de hasta $200 \mu\text{m}$ de largo.

En 2011, Dugan y Nazaire observaron que los telios de *P. sherardiana* se ubicaban principalmente en la parte adaxial de hojas de *Sidalcea malviflora*, mencionando que las teliosporas presentaban una dimensión promedio de $36.5-60 \times 21-25 \mu\text{m}$, teniendo pedicelos persistentes de $85-150 \mu\text{m}$ de largo y paredes laterales lisas de $2,0-3,5 \mu\text{m}$ de espesor.

Cabe mencionar que Briere y Franc (1998), citaron a los telios de *P. sherardiana* como anfigenos de color marrón oscuro rodeados de halos cloróticos tanto en el follaje como en los tallos, con unas teliosporas de una dimensión media de $30,8 \times 44,8 \mu\text{m}$.

Todos los autores anteriormente mencionados y añadiendo a Arthur (1962), concluyeron que *P. sherardiana* carece de aecios y uredinios, siendo clasificada como una roya de ciclo de vida microcíclica.

Antes del presente estudio no existían secuencias de nucleótidos u otros registros disponibles para *P. sherardiana* en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), y la identificación se realizaba mediante su morfología (Dugan y Nazaire, 2011).

5.5.3 Distribución

Puccinia sherardiana ha sido reportada en Estados Unidos (Arizona, California, Colorado, Nevada, Oregón, Washington, Idaho, Nebraska, Nuevo México, Texas, Utah, Wyoming, Montana y Dakota del Norte) infectando diferentes especies de los géneros *Alcea*, *Malvastrum*, *Sidalcea* y *Sphaeralcea*, dentro de la familia Malvaceae (Arthur, 1962; Briere y Franc, 1998; Horst, 2008; Dugan y Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). En el caso de México, Arthur (1962) menciona que en el país se encuentra *P. sherardiana*; además, muchos ejemplares se encuentran almacenados en diversos herbarios sobre los hospedantes *Sphaeralcea endlichii*, *Malvastrum coromandelianum* y *Sphaeralcea angustifolia* colectados en diferentes localidades de Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, Veracruz, Hidalgo, Ciudad de México y Estado de México; mientras que Demers *et al.*, (2015), identificaron esta roya en dos ejemplares (de origen desconocido) de *Sphaeralcea* sp., en intercepciones realizadas en El Paso, Texas, en mercancías que ingresaban por la frontera con México. Sin embargo, a la fecha no existen evidencias científicas que indiquen la presencia de *P. sherardiana* en México.

5.6 Municipio de Axapusco

5.6.1 Localización

El municipio de Axapusco se localiza en la parte noreste del estado de México (Figura 5); limita al oeste con el municipio de Temascalapa y al sur con el municipio de San Martín de las Pirámides y el municipio de Otumba, además al centro del territorio de Axapusco, se encuentra el municipio de Nopaltepec, rodeándolo por tres de sus costados. Al norte y al este sus límites corresponden al estado de Hidalgo (Figura 6). Sus coordenadas son 19°43'10" latitud norte y 98°47'50" longitud oeste, a una altura que fluctúa entre los 2,300 y 3100 metros sobre el nivel del mar (Gobierno del Estado de México, 2022; Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Secretaría de Gobernación, 2005).

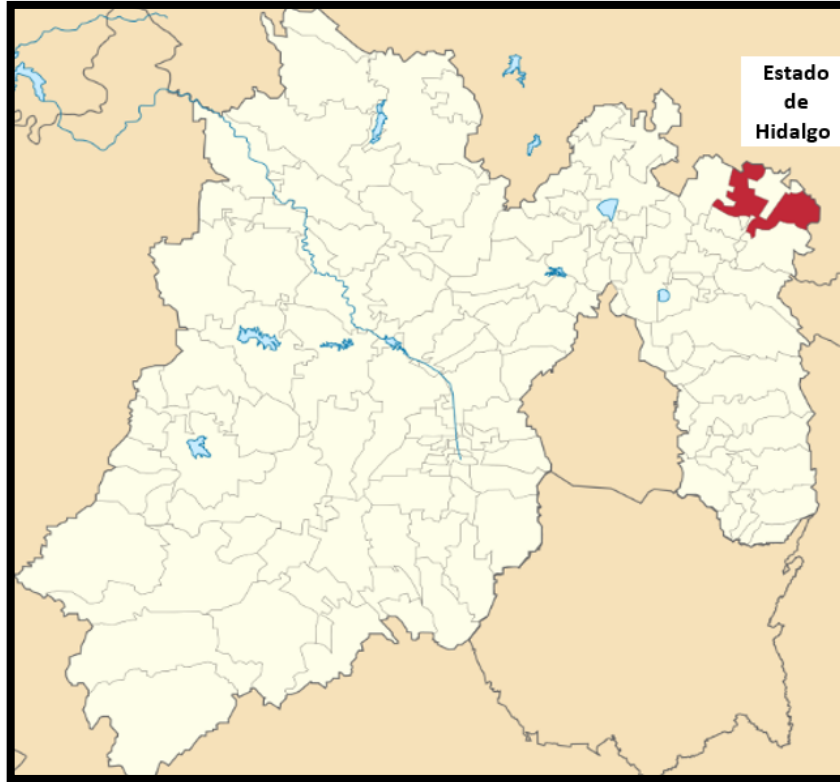


Figura 5. Mapa de localización del municipio de Axapusco en el Estado de México, México. El color rojo indica su ubicación. Ilustrado por Battroid, Man77.

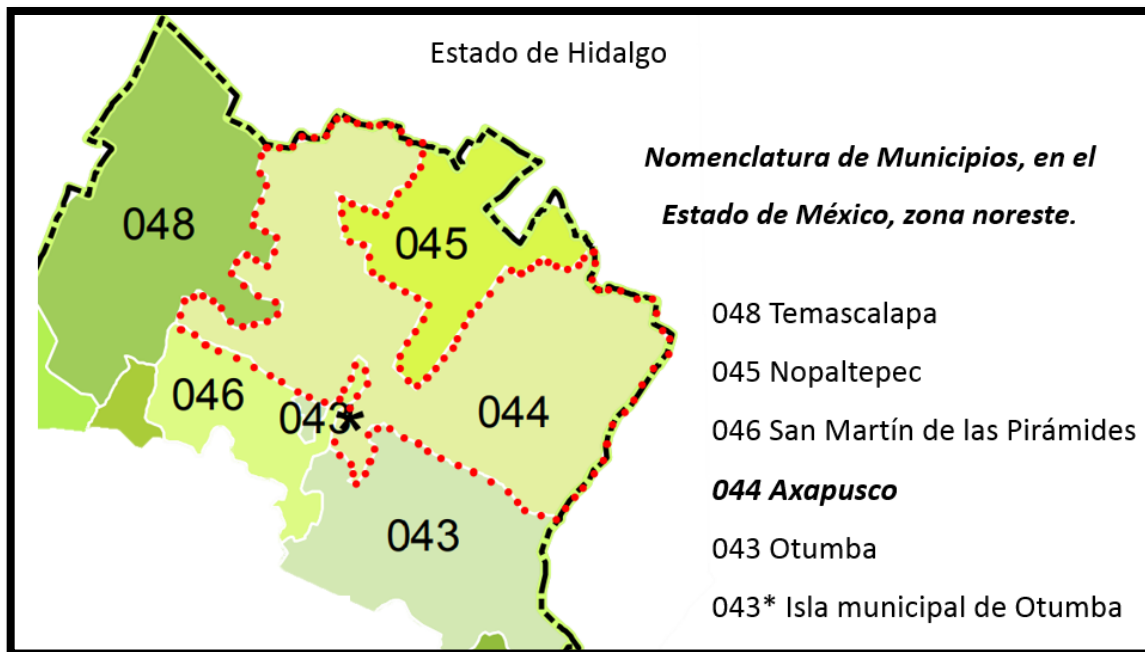


Figura 6. Municipios colindantes del municipio de Axapusco, Estado de México. La línea punteada de color rojo indica el perímetro del territorio. Imagen tomada del Atlas de Riesgos del Estado de México

publicada por la Coordinación General de Protección Civil 2018, con su respectiva modificación para ejemplificar las colindancias.

5.6.2 Clima

De acuerdo con el Instituto de Información e Investigación Geográfica, Estadística y Catastral del Estado de México de 1993 (la información de climas no se actualiza en periodos cortos, siendo esta la información más actualizada), Axapusco cuenta con 2 tipos de climas. Siguiendo la clasificación climática de Köppen, modificada por García (2004), el 58.86 % de su territorio corresponde a un clima “Seco-semiárido” con denominación $BS_1kw(w)(i')g$; y el 41.14 %, a un clima “Templado-subhúmedo” con denominaciones $C(w_0)(w)b(i')g$ y $C(w_1)(w)b(i')g$, este último en menor fracción en el municipio (Figura 7). Describiéndose de la siguiente manera:

- Denominación $BS_1kw(w)(i')g$:

Pertenece al grupo de clima Seco del subtipo semiárido; templado con lluvias en verano y muy escasa precipitación invernal; cuenta con poca oscilación térmica y máxima temperatura antes del solsticio de verano. (1)

- Denominación $C(w_0)(w)b(i')g$:

Pertenece al grupo de clima Templado del tipo subhúmedo, con régimen de lluvias en verano y un cociente de grado de humedad menor a 43.2, su precipitación invernal es muy escasa y la temperatura del mes más cálido es inferior a los 22 ° C; cuenta con poca oscilación térmica y la temperatura máxima se presenta antes del solsticio de verano. (1)

- Denominación $C(w_1)(w)b(i')g$:

La descripción es la similar a la anterior, la diferencia radica en cuanto al grado de humedad (Precipitación total anual en mm / Temperatura media anual en °C), con un cociente de entre 43.2 y 55.0. (1)

(1) Estas denominaciones fueron interpretadas siguiendo la siguiente literatura: García (2004), Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2005), y Orellana *et al.* (2010).

5.6.3 Flora

La vegetación es sobre todo de chaparrales y árboles medianos como el pirúl, destacando sobre todo las cactáceas y los magueyes; el área boscosa se encuentra en los terrenos de agostadero del cerro

Tepayotl, donde se encuentran pinos, cedro y encinos, en pequeña cantidad, debido a la sobre explotación y al pastoreo intensivo (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Secretaría de Gobernación, 2005).

5.6.4 Producción Agrícola

El 50.06% del territorio municipal es agrícola y se utiliza para la siembra de cultivos de temporal; las principales plantas cultivadas en el municipio son: avena forrajera, avena grano, cebada grano, frijol, maíz forrajero, maíz grano, trigo grano, entre otros. (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Secretaría de Gobernación, 2005).

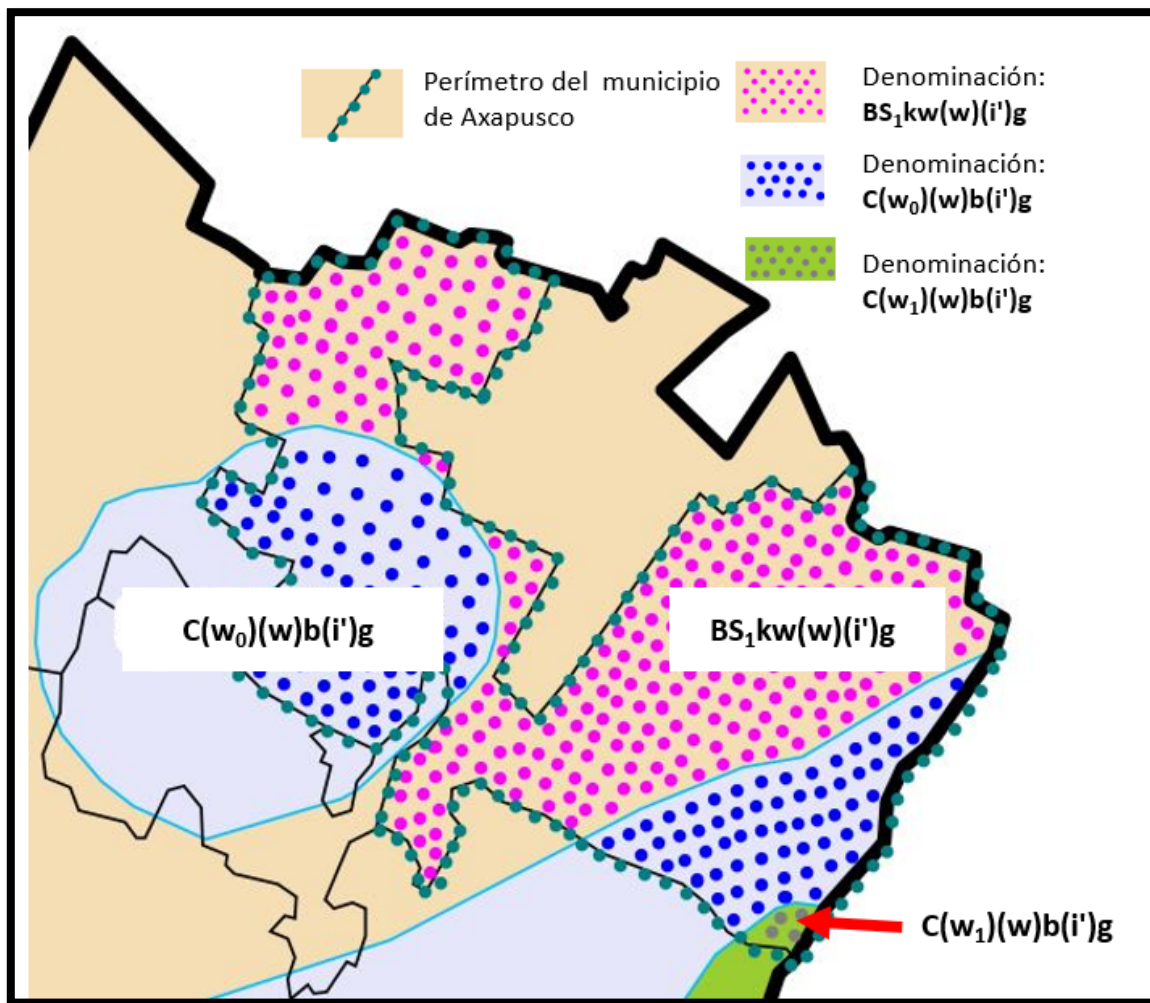


Figura 7. Denominaciones climáticas para el municipio de Axapusco, Estado de México. Imagen tomada del Atlas de Riesgos del Estado de México publicada por la Coordinación General de Protección Civil 2018, con su respectiva modificación para ilustrar las denominaciones climáticas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolección de material

Durante el 2017 y 2018, se recolectaron plantas de *S. angustifolia* con desarrollo de soros típicos de una infección por roya en la región de Santa María Aticpac, Axapusco, Estado de México (Figura 8). Adicionalmente, muestras de plantas en floración se recolectaron y acondicionaron para su posterior identificación con base en claves taxonómicas y comparación con especímenes presentes en herbario.

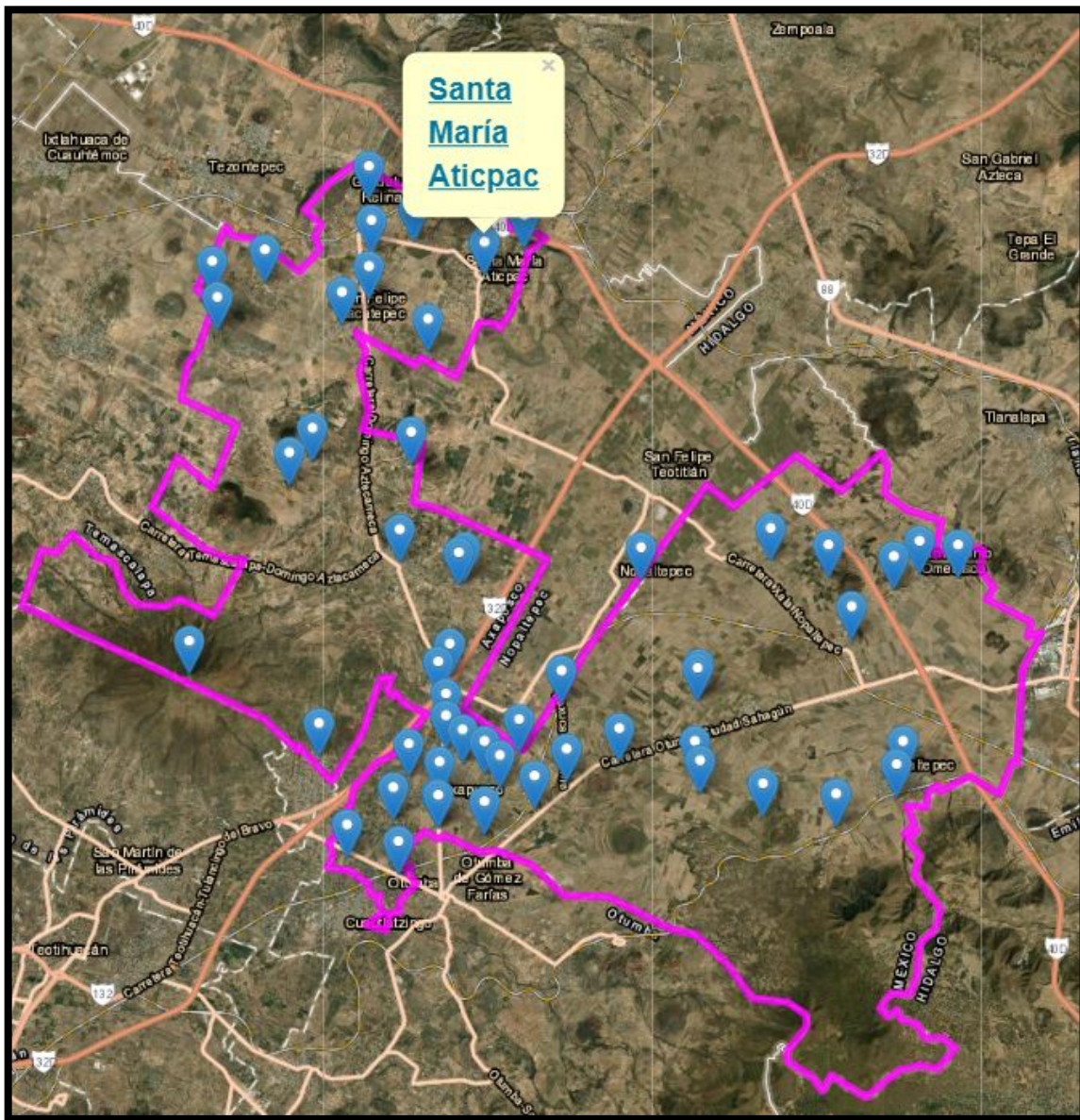


Figura 8. Fotografía satelital de la región de recolección de plantas de *S. angustifolia* con desarrollo de soros típicos de una infección por roya.

6.2 Caracterización morfológica

Para la descripción morfométrica, los espermacios, eciosporas y teliosporas, así como secciones de los espermogonios, ecios y telios se montaron por separado en una gota de lactofenol con azul de algodón sobre portaobjetos para su observación en microscopía de luz (Figura 9). Se determinó la morfología y tamaño de 50 esporas a una magnificación de 40X. Las estructuras superficiales de las eciosporas y teliosporas se observaron directamente usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss) (Figura 10). Las características de los telios y teliosporas se compararon con claves taxonómicas y descripciones realizadas previamente por Hotson (1934) y Arthur (1962). La descripción de los espermogonios, espermacios, ecios y eciosporas se realizaron por primera vez.

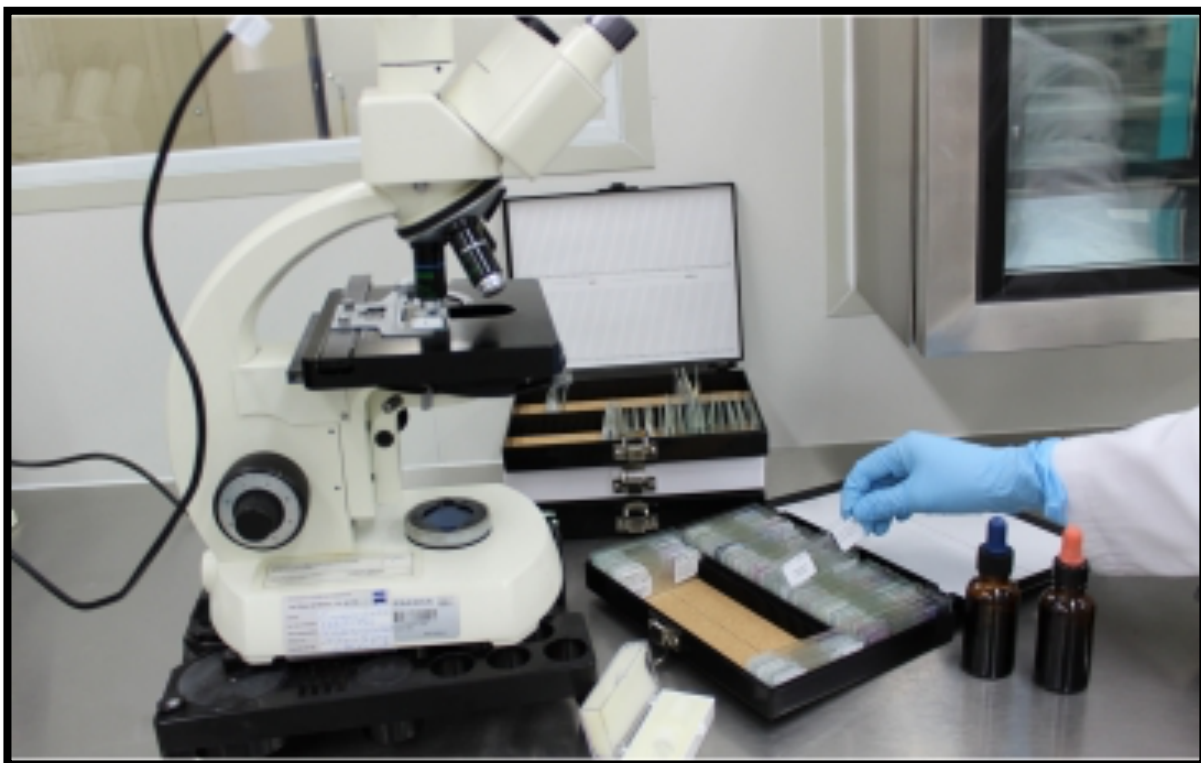


Figura 9. Montaje y observación de esporas de *Puccinia sherardiana*, llevado a cabo en el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).



Figura 10. Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss), propiedad del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

6.3 Extracción de ADN, PCR y secuenciación

Este proceso se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. Para confirmar la identidad del hongo, se rasparon eciosporas a partir de un ecio. El ADN genómico se extrajo usando el kit comercial DNeasy Plant (Qiagen, EE. UU.). Añadiendo a la muestra 400 μL de tampón AP1 y 4 μL de RNasa A. Se colocó en un vortex e incubo durante 10 min a 65 °C. Posteriormente se invirtió el tubo 2 o 3 veces durante la incubación. Nota: No se mezcló Buffer AP1 y RNase A antes de usar. Después se agregó 130 μL de tampón P3. Mezclando e incubando durante 5 min en hielo. Se recomienda centrifugar el lisado durante 5 min a 20 000 x g (14 000 rpm). Luego, se pipeteo el lisado en una columna giratoria QIAshredder colocada en un tubo de recolección de 2 mL. Centrifugando durante 2 min a 20000 x g. En seguida se transfirió el flujo a través de un tubo nuevo sin perturbar el sedimento presente. Añadiendo 1.5 volúmenes de Buffer AW1 y mezclando al pipetear. Prontamente se transfirió 650 μL de la mezcla a una columna giratoria DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 mL. Centrifugándose durante 1 min a ≥ 6000 x g (≥ 8000 rpm), desechando el flujo continuo. Se repitió este

paso con la muestra restante. Colocando la columna de centrifugación en un nuevo tubo de 2 mL. Agregando 500 μ L de tampón AW2 y centrifugando durante 1 min a $\geq 6000 \times g$, se desechó el flujo continuo, agregando otros 500 μ L de tampón AW2 y centrifugando durante 2 min a $20.000 \times g$. Nota: se retiró la columna de centrifugación del tubo de recolección con cuidado para que la columna no entrara en contacto con el flujo continuo. Posteriormente se transfirió la columna de centrifugación a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL o 2 mL, agregando 100 μ L de tampón AE para elución. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (15–25 °C). Por último se centrifugó durante 1 min a $\geq 6000 \times g$, dos veces.

La calidad del ADN fue verificado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% durante 30 minutos a 40 V, detectados por tinción con azul de bromofenol, los resultados se observaron bajo luz ultravioleta (UV) mediante un sistema de documentación de geles con transiluminador M-26X (UVP Ltd, EE. UU.). La concentración del ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

Se amplificó por PCR una secuencia parte del gen 28S del ADN ribosómico (incluyendo los dominios D1 y D2) usando los iniciadores LR0R y LR6 (Vilgalys y Hester, 1990). Cada mezcla de reacción (50 μ L) contuvo Buffer para PCR 1X, 0.02 U μ L⁻¹ de ADN polimerasa (Promega, EE. UU.), 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.8 Mm de cada iniciador, y 2 ng de ADN molde. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad C1000 (Bio-Rad Laboratories, EE. UU.) usando las siguientes condiciones: un paso desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, 35 ciclos a 95°C por 90 seg, 50°C por 60 seg, 72°C por 90 seg, seguido de una extensión final a 72°C por 7 min. Posteriormente los productos de PCR amplificados se purificaron usando el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, EE. UU.), y se secuenció en la empresa Macrogen (Seúl, Corea).

6.4 Pruebas de patogenicidad

Plantas de *S. angustifolia* se reprodujeron bajo condiciones aisladas en un invernadero ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo. Las plantas se colocaron en bolsas de polietileno con sustrato a base de agrolita, turba y tierra de monte en una proporción de 20, 30 y 50%, respectivamente; la mezcla se desinfectó en autoclave por tres veces durante 30 min cada una. Las plantas se regaron cada 5 días. De hojas con síntomas de roya, se recolectaron teliosporas con la ayuda de una aguja estéril y fueron resuspendidas en agua destilada estéril con Tween 20 al 0.01%. La concentración de esporas fue determinada utilizando una cámara de Neubauer y ajustada a 1×10^4 teliosporas mL⁻¹. El

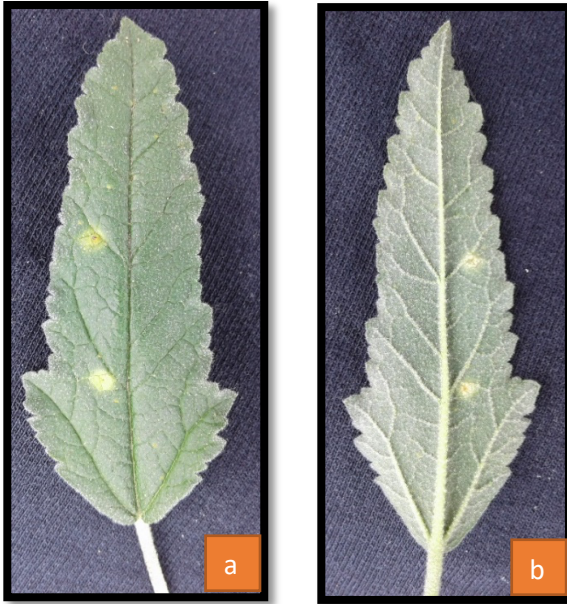
inóculo de 200 μ L (2000 esporas) fue aplicado de manera uniforme en la superficie adaxial de hojas individuales de plantas sanas mantenidas en invernadero durante 6 semanas. Las hojas previamente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar. Inmediatamente después de la inoculación, las plantas se colocaron en bolsas de plástico y se incubaron durante 72 horas a 100% de humedad relativa y una temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Transcurrido el tiempo, se retiraron las bolsas y las plantas continuaron su desarrollo en condiciones de invernadero. El experimento se repitió dos veces. La detección de síntomas y signos fue determinada por inspección visual diaria.

6.5 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa **Bioedit** y alineadas con el programa Codon Code Aligner v. 5.1.5 (<http://www.codoncode.com/aligner/>) y corregido por nucleótidos faltantes o mal posicionados mediante cromatogramas de referencia. Las secuencias de consenso obtenidas se compararon con secuencias homólogas en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) utilizando la herramienta de secuenciación de alineación local básica para consultas de secuencias de nucleótidos (BLASTN) (Altschul *et al.*, 1990), para identificación preliminar y para obtener secuencias de referencia para análisis filogenéticos. Posteriormente, con secuencias representativas de especies de roya (Cuadro 5), se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa MEGA X (v10.1.8) con el algoritmo ClustalW (Kumar *et al.*, 2018). La matriz obtenida se utilizó para realizar un análisis filogenético basado en el método de Máxima Parsimonia (MP), con búsqueda heurística y SPR (Subtree Pruning and Regrafting). El soporte de la topología interna del árbol filogenético se realizó mediante análisis bootstrap con 1000 interacciones (Felsenstein, 1985). Los números de acceso de las secuencias de este trabajo son: MT514509.1 y MN967778.2.

VII. RESULTADOS

7.1 Descripción de síntomas y signos



Los síntomas inician con una decoloración verde claro en forma de manchas circulares que se observan por ambos lados de la hoja (adaxial y abaxial) (Figura 11); en el centro se desarrollan pequeños puntos de color café claro que corresponden a la formación de los espermogonios.

Figura 11. Formación de manchas circulares color verde claro en hojas (a y b).

Posteriormente, las manchas se tornan de color amarillo claro y crecen en tamaño de forma irregular (Figura 12 a), en esta etapa en la parte abaxial se observa el desarrollo de ecios y eciosporas de color amarillo (Figura 12 b y c).

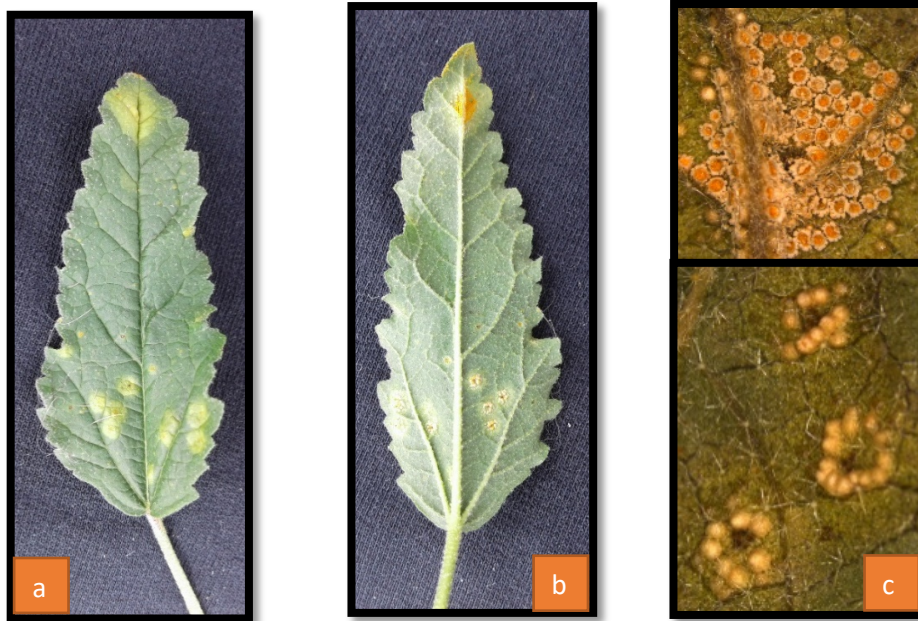


Figura 12. Desarrollo de ecios y eciosporas de color amarillo.

Después, se forman los telios (Figura 13) y estos dan origen a teliosporas, ambos casos suceden únicamente en la parte abaxial, así como en el tallo (Figura 13b); los telios están delimitados por halos cloróticos.



Figura 13. Desarrollo de telios en hoja (a) y tallo (b).



En la parte adaxial se distinguen lesiones de color café delimitadas por el halo clorótico (Figura 14), es común observar las dos fases en una misma hoja; sin embargo, al final del ciclo únicamente se observa la fase telial.

Figura 14. Telios delimitados por una halo clorótico.

7.2 Descripción morfológica

Los picnios (espermogonios) se desarrollaron en grupos pequeños y fueron epífilos, subepidermales, del grupo V tipo 4 (de acuerdo con la clasificación de Cummins y Hiratsuka, 2003), cafés claros, localizados en lados opuestos del ecio, globosos, de 120-150 μm de diámetro, con périfisis

abundantes creciendo hacia afuera (Figura 15). Las picniosporas (espermacios) fueron hialinos a amarillentos, no septados, elipsoidales a subglobosos, de $3.5 \times 2.5 \mu\text{m}$.

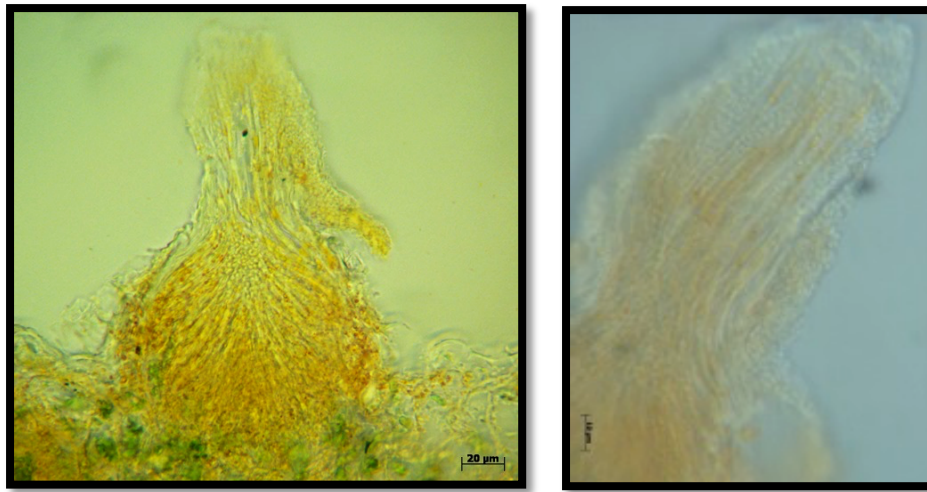


Figura 15. Corte longitudinal de un espermogonio.

Los ecios fueron hipófilos, cupulados, agrupados, café claro, de 219-230 μm de diámetro (Figs. 16 a y b).

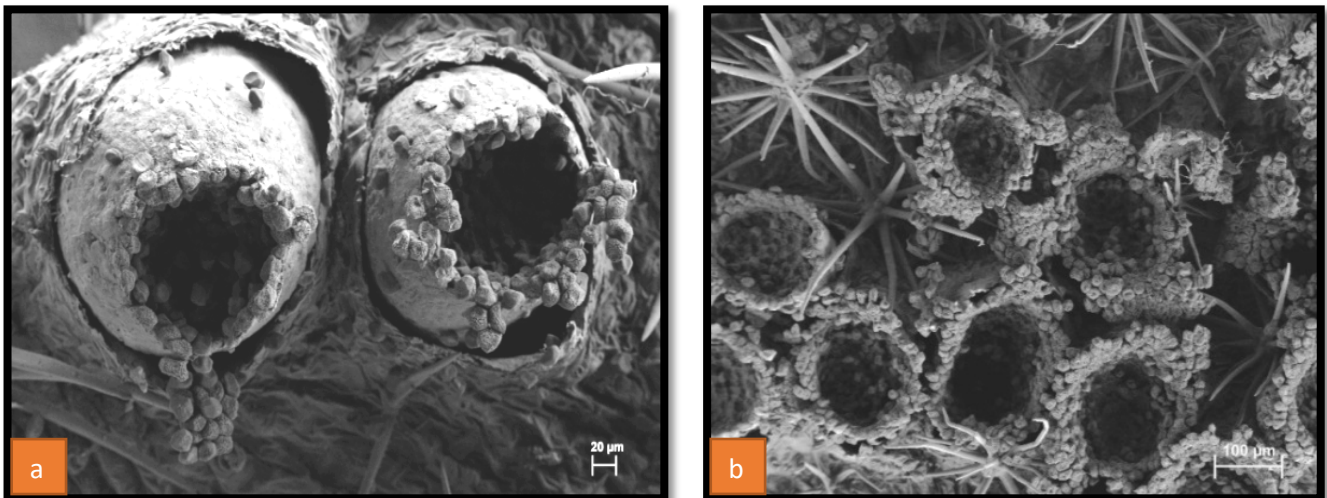


Figura 16. Ecios.

Las eciosporas fueron oblongas a elipsoidales, finamente equinuladas, de $16.46 \times 14.38 \mu\text{m}$, con pared hialina de $1.5 \mu\text{m}$ de grosor, pero con la parte interior café claro o amarillento (Figs. 17 a y b).

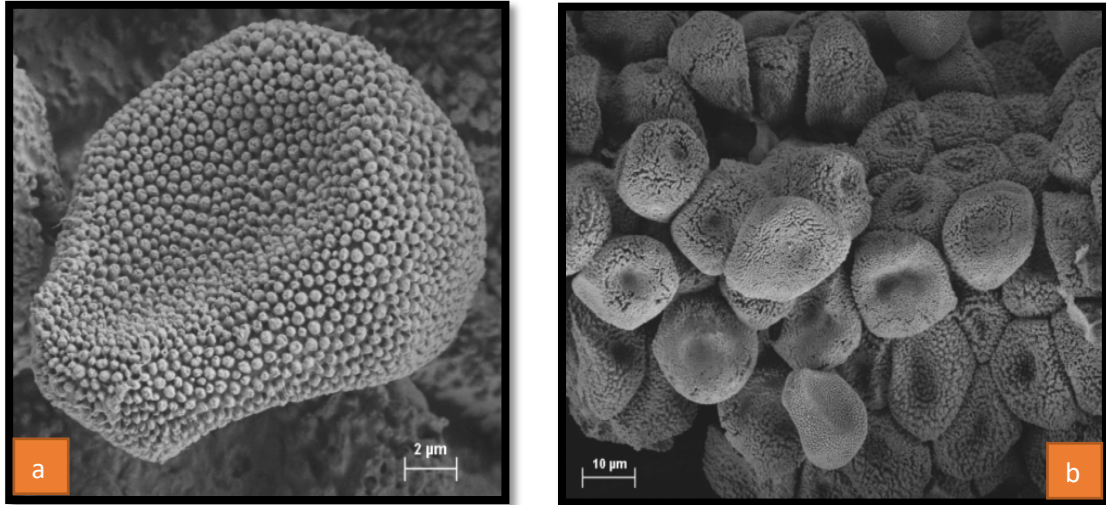


Figura 17. Eciosporas.

Se encontraron telios en tallos y hojas, siendo hipófilos, pulvinados, verrucosos, regularmente confluentes, café rojizo a café oscuro. Las teliosporas se observaron en grupos, mayormente elipsoidales a oblongas, con una constricción central, bicelulares, con poro apical, de tamaño promedio de $15 \times 42 \mu\text{m}$, lisa, café oscuro o café, con pared de $0.5\text{--}1.5 \mu\text{m}$ de grosor a los lados y $1.5\text{--}3 \mu\text{m}$ apicalmente (Figs. 18 a y b). Los pedicelos de las teliosporas fueron usualmente amarillentas, persistentes, de $105 \mu\text{m}$ de longitud y con paredes lisas de $1.5 \mu\text{m}$ de grosor (Fig. 18 b).

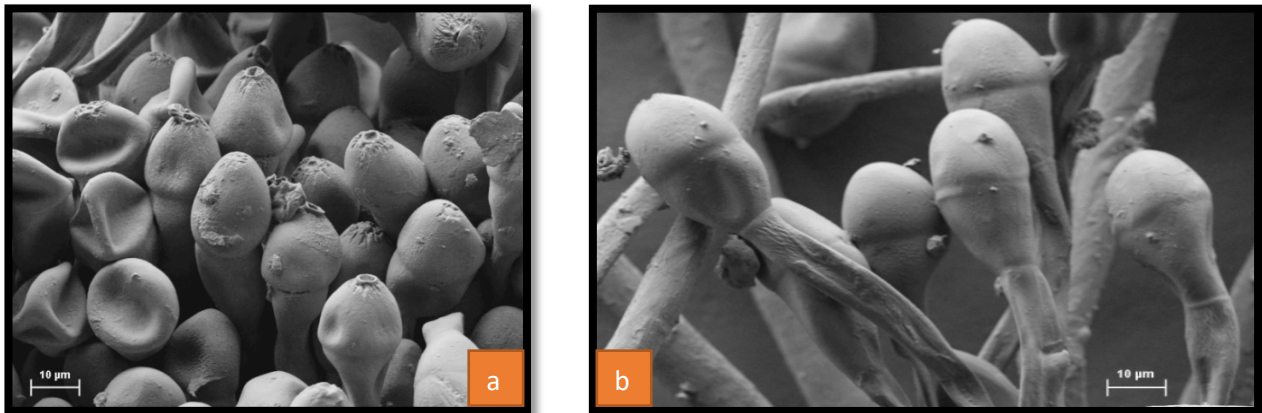


Figura 18. Teliosporas.

Basados en características morfológicas de las teliosporas, la roya se identificó como *Puccinia sherardiana* Körn (Arthur, 1962; Dugan y Nazaire, 2011; Demers *et al.*, 2015). El estado uredinial no se presentó durante el periodo de observaciones.

7.3 Pruebas de patogenicidad

Los síntomas foliares se observaron a los 15 días después de la inoculación en invernadero, tiempo en el cual se presentaron ecios en formación, los cuales posteriormente dieron origen a la formación de eciosporas, después de romper la epidermis de la hoja. Cinco días después se observó la formación de telios y teliosporas, estas últimas fueron observadas para completar los Postulados de Koch, sus características correspondieron con las observadas previamente para el caso de *P. sherardiana*.

7.4 Filogenia

El análisis BLAST de las secuencias consenso obtenidas en este trabajo permitió confirmar su identidad como *Puccinia sherardiana*. El árbol filogenético se construyó con las secuencias consenso; 16 secuencias de Pucciniales depositadas en GenBank, fueron seleccionadas por su alto nivel de identidad con la subunidad grande de la región ribosómica de ARN en el género *Puccinia* spp., también se utilizó *Taphrina deformans* (acceso: MH867217) como grupo de análisis externo (outgroup), y se seleccionó por no estar filogenéticamente relacionado con el hongo en estudio (Cuadro 5).

El alineamiento final de las secuencias fue de 695 sitios, de los cuales 129 fueron conservados, 551 variables pero no informativos, 434 informativos por parsimonia. La longitud del árbol filogenético con máxima parsimonia fue de 1261 pasos, con un índice de consistencia de 0.718477 (0.676685), índice de retención de 0.739736 (0.739736) e índice compuesto de 0.531484 (0.500568) para todos los sitios y sitios informativos de parsimonia (entre paréntesis). Este análisis involucró 18 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 695 posiciones en el conjunto de datos final (Kumar *et al.* 2018). El árbol filogenético tiene seis clados bien definidos. El porcentaje de árboles replicados en los que se agruparon los taxones asociados en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol de máxima parsimonia se obtuvo mediante el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (Nei y Kumar, 2000) con nivel de búsqueda 1 en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante las secuencias de adición aleatoria (10 repeticiones) (Figura 11). Estos clados permitieron identificar a nivel de especie que el hongo corresponde a *Puccinia sherardiana*, confirmando así los resultados obtenidos por morfología.

Cuadro 5. Secuencias utilizadas en los análisis filogenéticos de este estudio. Las secuencias se obtuvieron de NCBI o se generaron como parte de este estudio. La especie hospedante y la ubicación también se proporcionan cuando están disponibles.

Especies	Hospedero	Numero de acceso GenBank	País	Referencia
<i>Coleosporium</i> sp.	<i>Tussilago farfara</i>	KY783667	Alemania	Beenken <i>et al.</i> , 2017
<i>Neophysopella meliosmae-myrianthae</i>	NA	MK290822	Brasil	Santos <i>et al.</i> , 2018 (Unpublished)
<i>Gymnosporangium yamadae</i>	<i>Malus</i> sp.	MN605738.1	China	Zhao <i>et al.</i> , 2020
<i>Puccinia graminis</i>	<i>Anthoxanthum</i> sp.	MN686236	Ecuador	Barnes <i>et al.</i> , 2019 (Unpublished)
<i>Melampsora larici-populina</i>	<i>Populus</i> sp.	KY617835	Eslovenia	Piskur 2017a (Unpublished)
<i>Melampsora larici-epitea</i>	<i>Salix viminalis</i>	KY617852.1	Eslovenia	Piskur 2017b (Unpublished)
<i>Taphrina deformans</i>	NA	MH867217.1	Holanda	Vu <i>et al.</i> , 2019
<i>Aecidium raphiolepidis</i>	NA	MT419967.1	Japón	Kasuya <i>et al.</i> , 2020
<i>Puccinia sherardiana</i>	<i>Sphaeralcea angustifolia</i>	MT514509.1	México	Este estudio
<i>Puccinia sherardiana</i>	<i>Sphaeralcea angustifolia</i>	MN967778.2	México	Este estudio
<i>Puccinia graminis</i>	<i>Hordeum</i> sp.	HQ412648	Omán	Deadman <i>et al.</i> , 2011
<i>Hemileia vastatrix</i>	<i>Coffea arabica</i>	MN386222	Perú	Gamarra-Gamarra <i>et al.</i> , 2019 (Unpublished)

<i>Thekopsora minima</i>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	MN736468	Perú	Huarhua <i>et al.</i> , 2020
<i>Gymnosporangium asiaticum</i>	<i>Juniperus chinensis</i>	KX355285	Taiwan	Shen <i>et al.</i> , 2016
<i>Puccinia</i> sp.	<i>Marrubium globosum</i> subsp. <i>globosum</i>	KU872004.1	Turquía	Kabaktepe <i>et al.</i> , 2016
<i>Puccinia arundinariae</i>	<i>Arundinaria</i> sp.	DQ415277	USA	Aime <i>et al.</i> , 2006
<i>Puccinia sherardiana</i>	<i>Alcea rosea</i>	KT827313.1	USA	Demers <i>et al.</i> , 2015
<i>Coleosporium vernoniae</i>	<i>Elephantopus</i>	MG907230	USA	Aime <i>et al.</i> , 2018

NA = Not Available

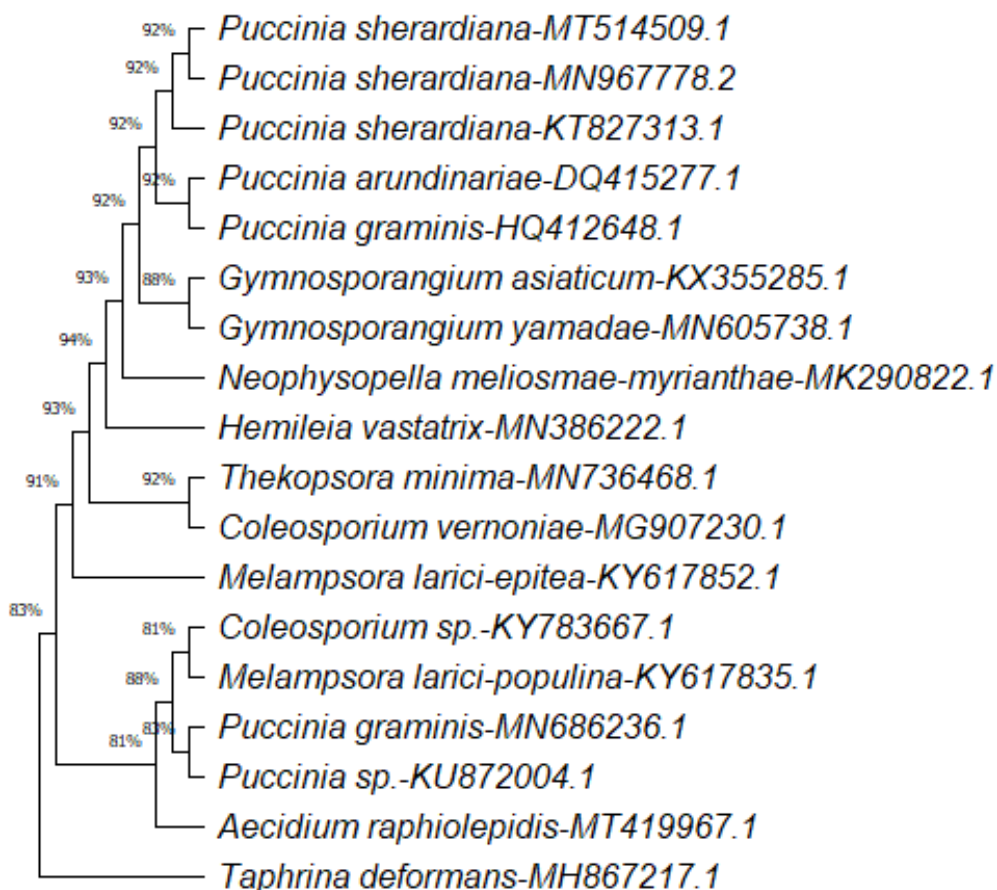


Figura 19. Árbol filogenético basado en secuencias de subunidad grande para *Puccinia sherardiana* obtenidas de la planta *Sphaeralcea angustifolia*, en la región de Santa María, Axapusco, Estado de México, México, y

secuencias obtenidas de GenBank. Las longitudes de las ramas se calcularon utilizando el método de ruta promedio y están en unidades del número de cambios en la secuencia completa. Se muestran junto a las ramas.

VIII. DISCUSIÓN

Por primera vez, se confirma de manera científica la presencia de *P. sherardiana* en México, en plantas de *Sphaeralcea angustifolia*. Dando soporte a los trabajos de Arthur (1962) y Demers *et al.* (2015), quienes anteriormente ya habían mencionado la presencia de *P. sherardiana* en nuestro país, sin embargo, sus observaciones nunca fueron comprobadas científicamente hasta ahora.

Los síntomas foliares son factibles de reproducir mediante la inoculación de plantas de *S. angustifolia* con teliosporas de *P. sherardiana* en condiciones de invernadero y en un período de 15 días con temperatura promedio de 22°C en el día y 18°C durante la noche. Por su parte, Briere y Franc (1998) completaron los postulados de Koch en un período de tiempo de 13 días al utilizar plantas de 8 semanas de edad y temperatura de 20 y 15 °C durante el día y noche, respectivamente.

En lo que respecta a la morfometría, las características de las teliosporas de *P. sherardiana* identificadas sobre *S. angustifolia* fueron similares a las reportadas por Arthur (1962), Briere y Franc (1998), Dugan y Nazaire (2011) y Demers *et al.* (2015). Sin embargo, se presentaron algunas diferencias, por ejemplo, en este estudio, las teliosporas fueron más angostas (15.8 µm), respecto al tamaño reportado (27–30 µm) por los autores anteriormente mencionados en diferentes hospedantes, 30.85 µm en *Sphaeralcea grossulariaefolia* y *S. munroana*, 21–25 µm en *Sidalcea malviflora*, y de 18–30 µm en *Alcea rosea*. Con respecto al desarrollo de telios, Briere y Franc (1998) reportaron que están presentes en ambos lados de la hoja en *S. grossulariaefolia* y *S. munroana*. Por su parte, Dugan y Nazaire (2011) observaron telios principalmente en la parte adaxial de hojas de *Sidalcea malviflora*, mientras que en este estudio solo se presentaron en la parte abaxial, además el color (marrón rojizo) descrito en los telios concuerda con lo señalado por Briere y Franc (1998) y Demers *et al.* (2015).

Se observa por primera vez la presencia de ecios y eciosporas, contraponiendo lo descrito por Arthur (1962), Briere y Franc (1998) y Dugan y Nazaire (2011), reclassificando así el ciclo de vida de *P. sherardiana*, en una roya demicíclica autoica sin fase uredinal. Savile (1971a) menciona, que una roya con ciclo de vida corto, aparentemente expanden su ciclo de vida y abandonan el hábito autoico cuando el hospedante susceptible no se encuentra disponible a medida que los cambios ecológicos reducen la población del hospedante. Sin embargo, a su trabajo falta agregar otro factor que puede alterar la disponibilidad del hospedante, que son las perturbaciones antropogénicas, ya que si bien, *S. angustifolia* no es considerada como una planta cultivada en México, si es recolectada de forma silvestre por los herboristas, con fines medicinales principalmente. Aunado a esto, las zonas de

agostadero dentro del municipio Axapusco Estado de México, reducen no solo las especies de *S. angustifolia* sino su flora en general (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Secretaría de Gobernación, 2005). Como último factor antropogénico, *S. angustifolia* es considerada como una maleza (Martínez, 2019), por lo que su eliminación en plantas cultivadas es evidente. Estos 3 factores dan pauta a pensar que las poblaciones de *S. angustifolia* han ido disminuyendo con el paso de los años, por lo que se deduce que *P. sherardiana* se encuentra en una fase de expansión que intenta buscar un hospedante alterno. Es razonable pensar en esto, ya que Arthur (1962), Briere y Franc (1998) y Dugan y Nazario (2011), aparentemente no reportaron ni describieron el estado espermogonial en Malvaceas donde se reportaron los hallazgos de *P. sherardiana*; simplemente mencionaron los estados de Telios y Basidios, por lo que se puede especular que no existe esta fase en dichos especímenes. Sin embargo, en este estudio si se encontró y describió dicha fase. De acuerdo con Savile (1971a), para que pueda existir una alternancia de hospedantes debe existir una evolución por parte de las royas, que consiste en la formación de estados espermogoniales para complementar la fusión de hifas y así acelerar la transferencia nuclear, dando paso a la elaboración de aecios y uredinios para restablecer el nivel de población. Si bien, la creación de nuevos estados esporicos ayudó a la expansión y dispersión de las royas, el mismo heteroecismo las volvió vulnerables, ya que si uno de los hospedantes desaparece también puede ocurrir la desaparición del hongo (Savile, 1971a). Por lo que una vez encontrado el hospedante adecuado y si las condiciones del entorno aseguran las poblaciones del hospedante, estas comienzan a reducir su ciclo, derivando en ciclos de vida reducidos (Jackson 1931) y en autoecismo, sin embargo, algo que debe resaltarse es que no se puede afirmar que una roya con ciclo de vida simple, surgió como resultado en la reducción de una especie completamente expandida, ya que pudo ser una roya con ciclo de vida primitiva que no tuvo necesidad de expandirse (Hennen y Buritica, 1980). Con base a este marco teórico y en las descripciones realizadas por varios autores anteriormente citados, se puede especular que *P. sherardiana* cuenta con ciclo de vida microcíclico en *S. angustifolia* según en las áreas geográficas estudiadas. Y aunque los especímenes estudiados se encontraban en condiciones similares a las anteriormente estudiadas, en este trabajo de investigación se encontró diferencias significativas en cuanto a su ciclo de vida, debido a perturbaciones antropogénicas que han vulnerado la población del hospedante, dando la creación de estados espermogonial y aecial, como resultado de una evolución que busca un hospedante alterno, sin embargo, aún no se confirma este heteroecismo, ya que estos estados se encuentran solamente en *S. angustifolia*, por lo que tiene 3 caminos a seguir: (1) convertiste en una roya macrocíclica heteroica (pudiendo tener como hospedante alterno una

planta cultivada); (2) convertirse en una roya macrocíclica autoica (debido a una dificultad para encontrar un huésped alterno); o (3) conservar el ciclo de vida demicíclico autoico (quizás el camino menos probable de acuerdo a evolución de las royas). Por estas razones es importante que en investigaciones futuras se determine el comportamiento del ciclo de vida de esta roya, monitoreando si existe alguna de las fases esporicas de *P. sherardiana* en plantas de la familia Malvaceae o cualquier otra especie, así como el implemento de análisis comparativos de múltiples especímenes de *P. sherardiana* de diferentes puntos geográficos, para corroborar si únicamente la vida demicíclica se presenta en esta zona, infiriendo si el antropocentrismo está induciendo la expansión de las royas.

IX. CONCLUSIONES

Por primera vez, en este trabajo se describen las características morfológicas de los espermogonios y espermacios y se reporta la fase ecial con la respectiva descripción de los ecios y eciosporas, con lo cual se clasifica a *P. sherardiana* como una roya demicíclica y no microcíclica como se reportó por Arthur (1962), Briere y Franc (1998) y Dugan y Nazaire (2011) al mencionar que la roya carece de la fase ecial y uredinial. Sin embargo, aún se desconoce si presenta o no la parte uredinial.

X. LITERATURA CITADA

- Agrios G. (2005). *Plant Pathology*. San Diego, Estados Unidos. 5ª ed. Academic Press. 922 p.
- Aime MC, Bell CD, Wilson AW. (2018). Deconstructing the evolutionary complexity between rust fungi (Pucciniales) and their plant hosts. *Studies in Mycology*. 89, 143–152.
- Aime MC, Matheny PB, Henk DA, Frieders EM, Nilsson RH, Piepenbring M, McLaughlin DJ, Szabo LJ, Begerow D, Sampaio JP, Bauer R, Weiss M, Oberwinkler F, Hibbert D. (2006). An overview of the higher-level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia*. 98, 896-905.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215, 403-410. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrade-Cetto A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 122, 163–171.
- Anikister Y. y Wahl I. (1979). Coevolution of the rust fungi on Gramineae and Liliaceae and their hosts. *Ann. Rev. Phytopathol*. 17, 367-403.
- Arthur JC. (1962). *Manual of the Rusts in United States and Canada*, with supplement by G.B. Cummins, New York. 498 + 24 pp.
- Barnes CW, Vivanco, Ordonez ME. (2019) *Puccinia graminis* isolate PPM-19 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. *NCBI*. Fecha de consulta: 7 de agosto de 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MN686236>
- Beenken L, Lutz M, Scholler M. (2017). DNA barcoding and phylogenetic analyses of the genus *Coleosporium* (Pucciniales) reveal that the North American goldenrod rust *C. solidaginis* is a neomycete on introduced and native *Solidago* species in Europe. *Mycol Prog*. 16, 1073–1085. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1357-2>
- Briere SC. y Franc GD. (1998). First Report of Leaf and Stem Rust Caused by *Puccinia sherardiana* on *Sphaeralcea grossulariaefolia* in North America and *S. munroana* in Wyoming. *Plant Disease*. 82(7), 831. Doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.7.831A>

- Calzada F, Basurto JC, Barbosa E, Velázquez C, Hernández NG, Ordoñez Razo RM, Luna DM, Mulia LY. (2017). Antiprotozoal Activities of Tiliroside and other Compounds from *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. *Pharmacognosy Res.* 9(2), 133-137. Doi: 10.4103/0974-8490.204644
- Coordinación General de Protección Civil. 2018. *Atlas de Riesgos del Estado de México*. Gobierno del Estado de México. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2022, disponible en: http://rmgir.proyectomesoamerica.org/PDFAtlasEstatales/ESTADO_MEXICO_2018.pdf
- Cummins G. y Hiratsuka Y. (1993). *Illustrated genera of rust fungi*. Rev Ed. APS Press, St. Paul.
- Cummins G. y Hiratsuka Y. (2003). *Illustrated genera of rust fungi*. American Phytopathological Society, St. Paul.
- Deadman M, Al-Sadi AM, Al-Maqbali Y, Farr D, Aime M. (2011). Additions to the rust fungi (Pucciniales) from northern Oman. *Sydowia.* 63, 155–168.
- Demers JE, Romberg MK, Castlebury LA. (2015). Microcyclic rusts of hollyhock (*Alcea rosea*). *International Mycological Association Fungus.* 6(2), 477-482. Doi: 10.5598/imafungus.2015.06.02.11
- Díaz JL. (1976). Uso de las plantas medicinales de México. *Monografías científicas* II, 1st ed. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, México, pp. 124.
- Dietel P. (1928). Uredinales. In: Engler A & Prantl K (eds) *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Engelmann, Leipzig. 2, 24–98.
- Donk MA. (1972). The heterobasidiomycetes: a reconnaissance II. Some problems connected with the restricted emendation. *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.* 75, 376-390
- Donk MA. (1973). The heterobasidiomycetes: a reconnaissance III. How to recognize a hasidiomycete? *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.* 76, 1-22.
- Dugan FM. y Nazaire M. (2011). First report of rust of *Sidalcea malviflora* (dwarf checkerbloom) caused by *Puccinia sherardiana* in Washington State. *North American Fungi.* 6(15), 1-5. Doi: <http://dx.doi:10.2509/naf2011.006.015>

- Evans HC. (1993). Studies on the rust *Maravalia cryptostegiae*, a potential biological control agent of rubber-vine weed (*Cryptostegia grandiflora*, Asclepiadaceae: Periplocoideae) in Australia, I: Life-cycle. *Mycopathologia*. 124,163-174.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Fryxell PA. (1992). Malvaceae (V). En: Sosa, V. (ed.). *Flora de Veracruz*. Fascículo 68. Instituto de Ecología. Xalapa, Veracruz, México.
- Fryxell PA. (1993). Malvaceae. En: Dávila A., P. D., J. L. Villaseñor R., R. Medina L. y O. Téllez V. (eds.). *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Fascículo 1. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Gamarra-Gamarra DP, Torres-Suarez G, Carrasco-Lozano EC. (2019). *Hemileia vastatrix* cultivar Limani voucher RAC011 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. *NCBI*. Fecha de consulta: 7 de agosto de 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN386222>
- Garay SE. y Cruz ES. (2022). *Las distintas esporas de las royas*. Instituto de Ecología, A.C. Fecha de consulta: 19 de agosto de 2022. Disponible en: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/component/content/article/17-ciencia-hoy/1586-las-distintas-esporas-de-las-royas>
- García E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía, UNAM. México. ISBN 970-32-1010-4.
- García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos G, Siordia G, Jimenez-Arellanes MA, Chávez-Soto MA, Meckes-Fischer M. (2012). *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytomedicine to treat chronic inflammation. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11(5), 468–477.
- García VR, Zavaleta ME, Rojas MRI, Leyva MSG, Kilpatrick SJ, Fuentes DG. (2005). Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. Causante de la Roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23(1), 79–86.
- Gäumann E. (1964). "Die Pilze". *Birkhauser Verlag*, Basel.

- Gobierno del Estado de México. (2022). *Municipio Axapusco*. Fecha de consulta: 9 de septiembre de 2022. Disponible en: <http://axapusco.edomex.gob.mx/localizacion-extension>
- Gómez DLCI, Pérez PE, Escamilla PE, Martínez BM, Carrión VGLL, Hernández LTI. (2018). Selección in vitro de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). *Revista mexicana de fitopatología*. 36(1), 172-183. Doi: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1708-1>
- Griffith C. (2019). *Angelensis - Anserinus*. Dictionary of Botanical Epithets. Fecha de consulta: 8 de enero de 2022. Disponible en: <http://botanicaepithets.net/dictionary/dictionary.25.html>
- Hahn, M. (2000). The Rust Fungi. In: Kronstad, J.W. (eds) *Fungal Pathology*. Springer, Dordrecht. Doi: https://doi.org/10.1007/978-94-015-9546-9_10
- Harder DE. (1984) Developmental ultrastructure of hyphae and spores. En: Bushnell WR and Roelfs AP (eds) *The Cereal Rusts*, vol. I. Orlando: Academic Press.
- Harder DE. y Chong J. (1984) Structure and physiology of Haustoria. En: Bushnell WR y Roelfs AP (eds) *The Cereal Rusts*, vol. I. Orlando: Academic Press.
- Hasan S. (1970). The possible control of skeleton weed, *Chondrilla juncea* L., using *Puccinia chondrillina* Bubak & Syd. *Proc. First Int. Symp. Biological Control Weeds*, 1969. Misc. Publ. no. I, C.I.B.C.
- Hasan S. (1972). Specificity and host specialization of *Puccinia chondrillina*. *Annals of Applied Biology*. 72, 257-263.
- Hasan S. (1985). Search in Greece and Turkey for *Puccinia chondrillina* strains suitable to Australian forms of skeleton weed. En "*Proceedings of the VI International Symposium on Biological Control of Weeds*, Vancouver, Aug. 19-25, 1984" (E. S. Delfosse, Ed.), pp. 625-632. Agriculture Canada, Ottawa.
- Hasan S. (1988). Biocontrol of weeds with microbes. En "*Biocontrol of Plant Diseases*" (K. G. Mukerji & K. L. Garg, Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. 129-151.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. (2001). *Ainsworth's & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th edition. International Mycological Institute. CAB International. Egham, UK.

- Hennen JF y Buritica P. (1980). A brief summary of modern rust taxonomy and evolutionary theory. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* 18, 243-256.
- Hiratsuka Y. y Sato S. (1982). Morphology and taxonomy of rust fungi. Pages 1-36 in: *The Rust Fungi*. K. J. Scott and A. K. Chakravorty, eds. Academic Press, London
- Horst RK. (2013). Host Plants. *En: Westcott's Plant Disease Handbook*. Springer, Dordrecht. Doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-2141-8_54
- Horst R. (2008). Host Plants and Their Diseases. *En: Horst R. (eds) Westcott's Plant Disease Handbook*. Springer, Dordrecht. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4585-1_4
- Hotson JW. (1934). Key to the rusts of the Pacific Northwest. *University of Washington Publications in Biology* 3. University of Washington Press, Seattle. 193 pp.
- Huarhua M, Acuña R, Martínez de la Parte E, Soto HJM, Aragón CL, Landeo S, Apaza TW. (2020). First Report of Blueberry Leaf Rust Caused by *Thekopsora minima* on *Vaccinium corymbosum* L. in Perú. *Plant Dis.* 104, 3077. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-20-0585-PDN>
- Hughes SJ. (1970). Ontogeny of spore forms in Uredinales. *Call. J. Bot.* 48, 2147-2157
- Instituto de Información e Investigación Geográfica, Estadística y Catastral del Estado de México. (1993). Clima. *En Atlas General del Estado de México*. Gobierno del Estado de México.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2005). Información de climas. *En Guía para la Interpretación de Cartografía Climatológica*. ISBN 970-13-4508-8.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Secretaría de Gobernación. (2005). *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México*. Fecha de consulta: 30 de enero de 2022. Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15016a.html>
- Jackson HS. (1931). Present evolutionary tendencies and the origin of life cycle in the Uredinales. *Mem. Torrey Bot. Club.* 18, 1-108.
- Kabaktepe S, Mutlu B, Karakuş Ş, Akata I. (2016). *Puccinia marrubii* (Pucciniaceae), a new rust species on *Marrubium globosum* subsp. *globosum* from Niğde and Malatya in Turkey. *Phytotaxa.* 272, 277–286. Doi: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.272.4.5>

- Kasuya T, Hosaka K, Kakishima M. (2020). *Gymnosporangium raphiolepidis* comb. nov. (Pucciniales) for *Aecidium raphiolepidis* inferred from phylogenetic evidence. *Phytotaxa*. 460, 110–114. Doi: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.460.1.7>
- Kirk PM, Cannon Pf, Minter DW, Stalpers JA. (2008). *Dictionary of the fungi*. 10th Ed. CABI, Wallingford, UK.
- Kolmer JA, Ordonez ME, Groth JV. (2009). The rust fungi. In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)* (pp. 1-8). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 35. 1547–1549. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- La Duke J. (s. f.) *Sphaeralcea*. Flora of North America. Fecha de consulta: 7 de enero de 2022. Disponible en: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=130861
- Leppik E. (1953). Some viewpoints on the phylogeny of rust fungi. I. Coniferous rusts. *Mycologia*. 45, 46-74.
- Leppik E. (1961). Some viewpoints on the phylogeny of rust fungi. III. Origin of grass rusts. *Mycologia*. 51, 512-528.
- Leppik E. (1967). Some viewpoints on the phylogeny of rust fungi. VI. Biogenic radiation. *Mycologia*. 59, 568-579.
- Leppik E. (1973) Origin and evolution of conifer rusts in the light of continental drift. *Mycopathol Mycol Appl.* 49,121–136.
- Lindquist J. (1982). *Royas de la República Argentina y zonas limítrofes*. INTA. 574 pp.
- López A. (1984). The rust fungi of Mexico. *Rept. Tottori Mycol. Inst. (Japan)*. 22, 158-163.
- López A. (1998). Importancia de las royas en la agricultura y silvicultura en México. *Foresta veracruzana*. 1(1), 49–52.
- Martínez LLE. (2019). *Las malváceas (Malvales: Malvaceae) y su importancia agrícola, ornamental, medicinal y como maleza* [Monografía]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- McAlpine D. (1906). *The rusts of Australia*. Department of Agriculture, Victoria. Melbourne: Brain.

- Mendgen K. y Hahn M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*. 7, 352–356.
- Menéndez J. (2014). *Basidiomycetes. Royas y Carbones*. Asturnatura. Fecha de consulta 8 de septiembre de 2022. Disponible en: <https://www.asturnatura.com/articulos/hongos/basidiomycetes-teliomycetes-uredinales-ustilaginales-royas-carbones-rust.php>
- Murace M. y Aprea A. (2012). *Las royas de las plantas (Basidiomycetes del orden Uredinales)*. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Fecha de consulta: 22 de agosto de 2022. Disponible en: https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/24712/mod_resource/content/1/Royas%20de%20los%20forestales.pdf#:~:text=Tema%3A%20Royas%20forestales*,s%C3%B3lo%20a%20ciertos%20g%C3%A9neros%20hospedantes.
- McVaugh R. (2001). Ochnaceae to Loasaceae. En: W. R. Anderson (ed.). *Flora Novo Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico, Vol. 3*. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.
- Nannfeldt JA. (1968). Fungi as plant taxonomists. *Acta Univ. Uppsala* 17 (Festskrift till Torngny Segerstedt) 85-95.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2020a). *Sphaeralcea angustifolia*. *Taxonomy browser*. Fecha de consulta: 4 de enero de 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=217322&lvl=3&link=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2020b). *Puccinia sherardiana*. *Taxonomy browser*. Fecha de consulta: 12 de enero de 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1819370&mode=info>
- Nei M. y Kumar S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, 1st Edition, New York
- Parmelee JA. 1980. *Puccinia sherardiana*. *Fungi Canadenses*. 173,1–2.
- Olive LS. (1957). Two new genera of the Ceratobasidiaceae and their phylogenetic significance. *Amer. J. Bot.* 44, 429- 435.

- Orellana R., Espadas C. y Nava F. (2010). Contexto Físico. En Durán R. y Mendéz M. (Eds.), *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán* (p. 3-27). Centro de Investigación Científica de Yucatán, Programa de Pequeñas Donaciones del Fondo para el Medio Ambiente Mundial, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente.
- Oxford Lexico. (2022). *Definición demi*. Fecha de consulta: 23 de agosto de 2022. Disponible en: <https://www.lexico.com/definition/demi->
- Piepenbring M. (2015). Introducción a la Micología en los Trópicos. The American Phytopathological Society (APS). Doi: <https://doi.org/10.1094/9780890546147.004>
- Piskur B. (2017a). *Melampsora larici-populina* isolate GE15_1_3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. *NCBI*. Fecha de consulta: 7 de agosto de 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY617835>
- Piskur B. (2017b). *Melampsora larici-epitea* isolate GE14_2_4 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. *NCBI*. Fecha de consulta: 7 de agosto de 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY617852.1>
- Pérez, H.J. y Nicasio T.M. (s.f.). Obtención de cultivos in vitro de la planta anti-inflamatoria *Sphaeralcea angustifolia* (Malvaceae) (Cav.) G. Don . XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Fecha de consulta: 28 de agosto de 2022. Disponible en: https://smbb.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_IX/CARTELES/CIX-18.pdf
- Petersen RH. (1975). The rust fungus life cycle. *Bot. Rev.* 40, 453-513.
- Plantas y Hongos. (s.f.). Tricógina. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2022. Disponible en: <https://www.plantasyhongos.es/glosario/tricogina.htm>
- Rogers DP. (1934). The basidium. *Stud. Nat. Hist. Univ. Iowa.* 16: 160-183.
- Romero-Cerecero O, Meckes-Fischer M, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer JE, Nicasio-Torres P, Pérez-García D, Tortoriello J. (2013). Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 147, 467-473. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.040>

- Romero-Cova S. (1988). *Hongos fitopatógenos*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. 347 p.
- Roskopf EN. Charudattan R, Kadir JB. (1999). Use of Plant Pathogens in Weed Control. En: Katar, E.H., Ed., *Handbook of Weed Control*, Academic Press, New York, 891-911. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012257305-7/50082-5>
- Rubiales, D. (2000). Royas. En Llácer G, López L, Trapero A, Bellos A (eds), *Patología vegetal (2.a ed., Vol. 2, pp. 847-863)*. Phytoma : Mundi-Prensa.
- Rzedowski GC y Rzedowski J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Santos R, Primiano I, Amorim L. (2018). *Neophytophthora meliosmae-myrianthae* isolate AGLR60 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. *NCBI*. Fecha de consulta: 7 de Agosto de 2022. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MK290822>
- Savile DBO. (1955). A phylogeny of the Basidiomycetes. *Can. J. Bot.*, 33, 60-104.
- Savile DBO. (1968). Possible interrelationships between fungal groups. En G. C. Ainsworth and A. S. Sussman (eds.), *The Fungi*, Academic Press, New York, 3, 649-675.
- Savile DBO. (1971a). Coevolution of the Rust Fungi and Their Hosts. *The Quarterly Review of Biology*, 46(3), 211-218.
- Savile DBO. (1971b). Generic disposition and pycnium type in the Uredinales. *Mycologia*. 63, 1089-1091.
- Savile DBO. (1979). Fungi as aids in higher plant classification. *Bot. Rev.* 45, 377-503.
- Shattock R y Preece T. (2000). Tranzschel revisited: modern studies of the relatedness of different rust fungi confirm his law. *Mycologist*, 14(3), 113-117. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(00\)80086-5](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(00)80086-5)

- Shen YM, Huang TC, Hung TH. (2016). Evaluation of inhibitory effect of fungicides on pear rust inocula. *Journal of Plant Medicine*. 58, 19–84. Doi: [https://doi.org/10.6716/JPM.201606_58\(2\).0004](https://doi.org/10.6716/JPM.201606_58(2).0004)
- Staples RC. y Macko V. (1984). Germination of urediospores and differentiation of infection structures. In: Bushnell WR and Roelfs AP (eds) *The Cereal Rusts*, vol. I. Orlando: Academic Press.
- Supkoff DM, Joley DB, Marois JJ. (1988). Effect of introduced biological control organisms on the density of *Chondrilla juncea* in California. *Journal of Applied Ecology*. 25, 1089-1095.
- Toome-Heller M. (2016). Latest Developments in the Research of Rust Fungi and Their Allies (Pucciniomycotina). En: Li DW (ed.). *Biology of Microfungi, Fungal Biology*. Springer Publishing Switzerland 147–168 pp. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_7
- UTA (Universidad de Texas en Austin). (2017). *Sphaeralcea angustifolia*. Lady Bird Johnson Wildflower Center. Fecha de consulta: 9 de enero de 2022. Disponible en: https://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=span3
- Vibrans H. (2009). *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. Ficha informativa. CONABIO (Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad). Fecha de consulta: 4 de enero de 2022. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/malvaceae/sphaeralcea-angustifolia/fichas/ficha.htm>
- Vilgalys R y Hester M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*. 172, 4238–4246.
- Villaseñor, R., J.L. y F.J. Espinosa. (1998). *Catálogo de malezas de México*. UNAM. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México.
- Vu D, Groenewald M, de Vries M, Gehrman T, Stielow B, Eberhardt U, Al-Hatmi A, Groenewald JZ, Cardinali G, Houbraken J, Boekhout T, Crous PW, Robert V, Verkley GJM. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud Mycol*. 92, 135–154. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>

- Wapshere AJ. (1970). The assessment of biological control potential of the organisms attacking *Chondrilla juncea* L. *Proc. First Int. Symp. Biological Control Weeds*, 1969. Misc. Publ. no. 1, C.I.B.C.
- Wynn WK. y Staples RC. (1981) Tropisms of fungi in host recognition. In: Staples RC and Toenniessen GA (eds) *Plant Disease Control: Resistance and Susceptibility*. New York: Wiley.
- Zhao P, Qi XH, Crous PW, Duan WJ, Cai L. (2020). *Gymnosporangium* species on *Malus*: species delineation, diversity and host alternation. *Persoonia*. 45, 68–100. Doi: <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.45.03>

XI. ANEXOS

Anexo 1. Ejemplar de *Sphaeralcea angustifolia*, en el municipio de Axapusco, Estado de México.



Anexo 2. Síntomas por el efecto de desarrollo de soros típicos de una infección causada por *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia*.



Anexo 3. Observación visual de una decoloración verde claro, en forma de manchas circulares, sobre el haz de las hojas de *Sphaeralcea angustifolia*, que corresponde, aparentemente, a la fase espermogonial de *Puccinia sherardiana*.



Anexo 4. Observación visual de ecios y telios de *Puccinia sherardiana*, en el envés de la hoja de *Sphaeralcea angustifolia*.



Anexo 5. Observación de pústulas causadas por *Puccinia sherardiana*, en el envés de *Sphaeralcea angustifolia*.



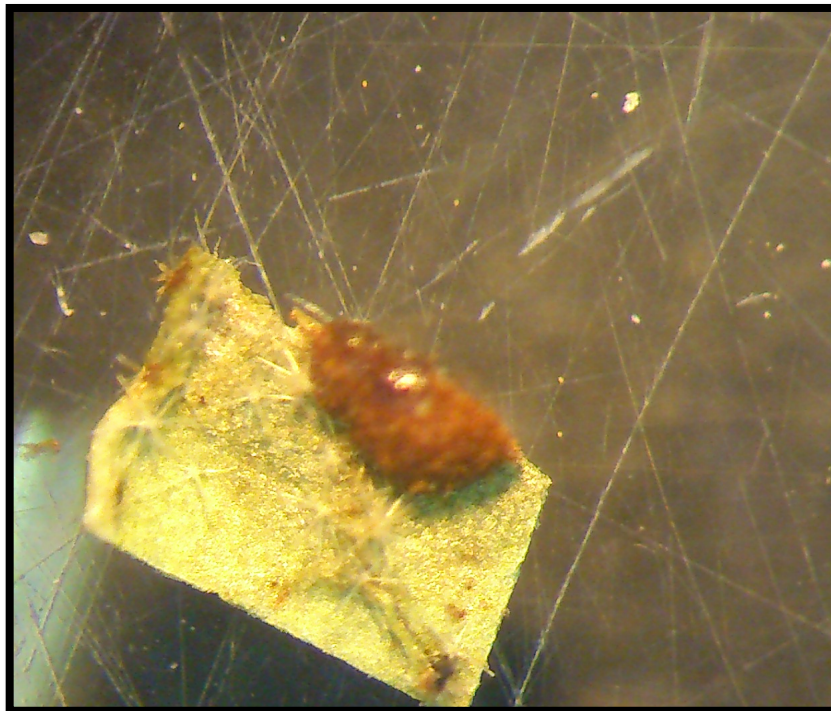
Anexo 6. Emisión de telios de *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia*.



Anexo 7. Observación de ecios de *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia* bajo el microscopio estereoscópico.



Anexo 8. Corte longitudinal de una pústula de *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia* bajo el microscopio estereoscópico.



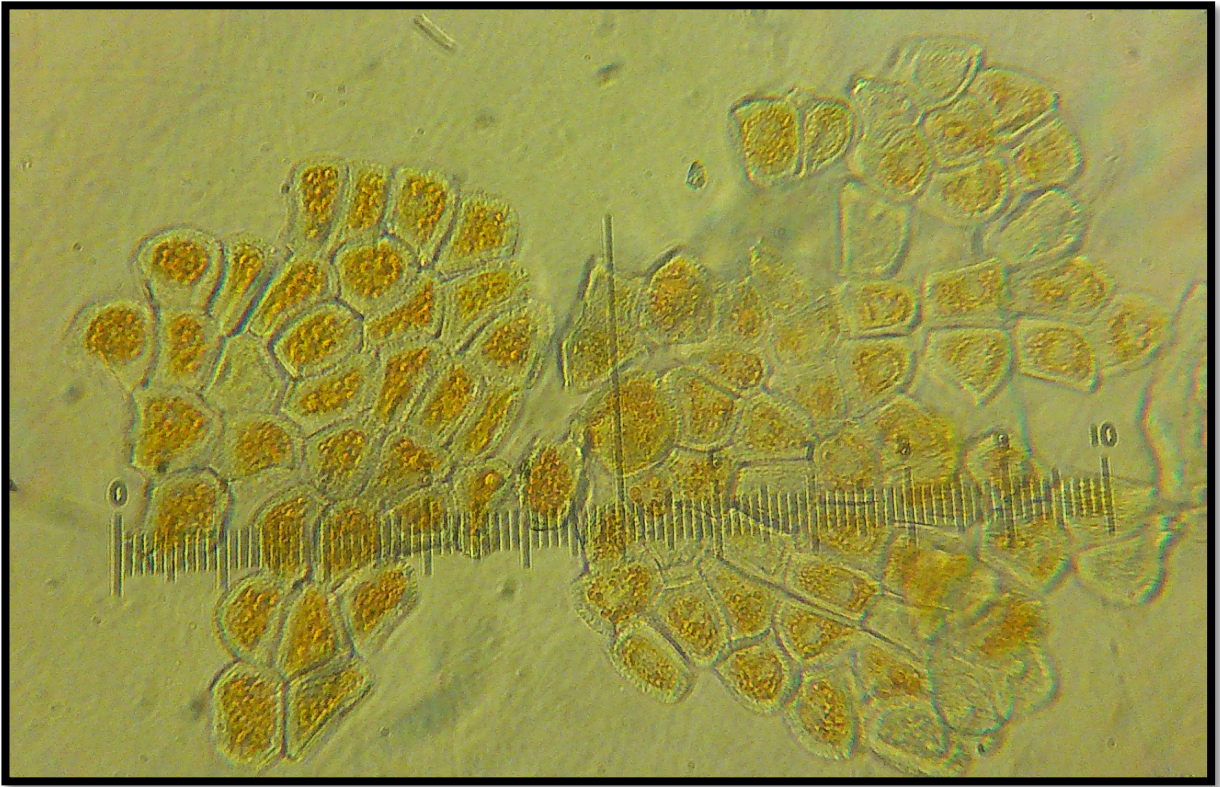
Anexo 9. Formación de ecios de *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia*.



Anexo 10. Rotura de ecios y liberación de eciosporas de *Puccinia sherardiana* en *Sphaeralcea angustifolia*.



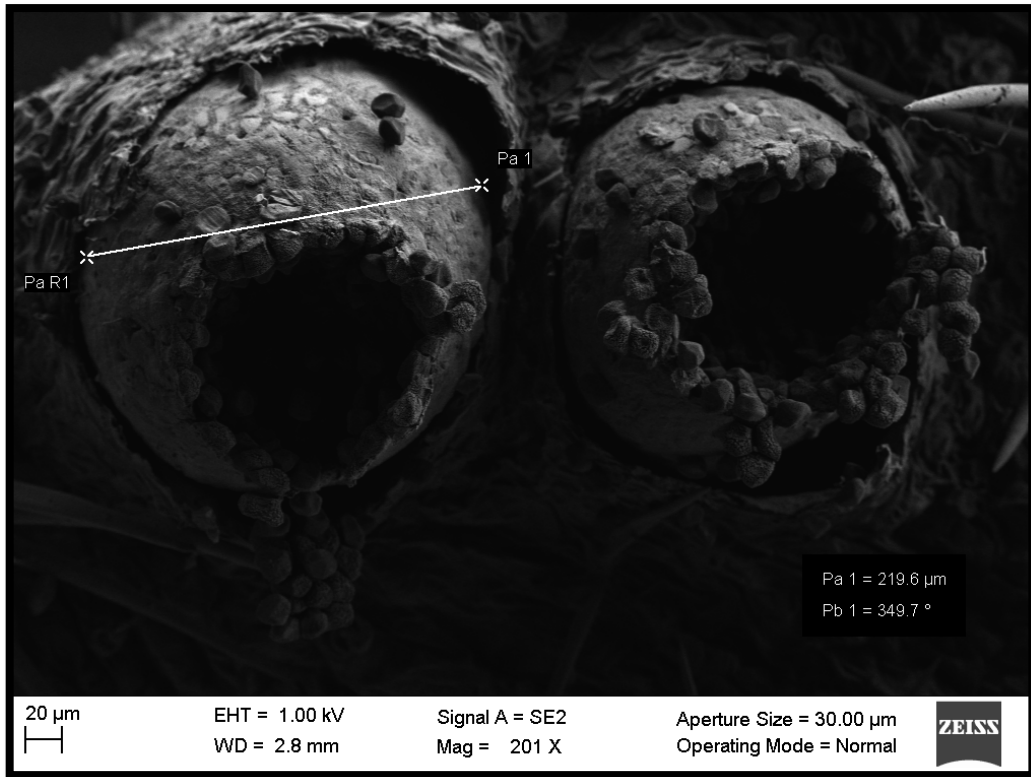
Anexo 11. Aeciosporas de *Puccinia sherardiana* vistas desde el microscopio de luz.



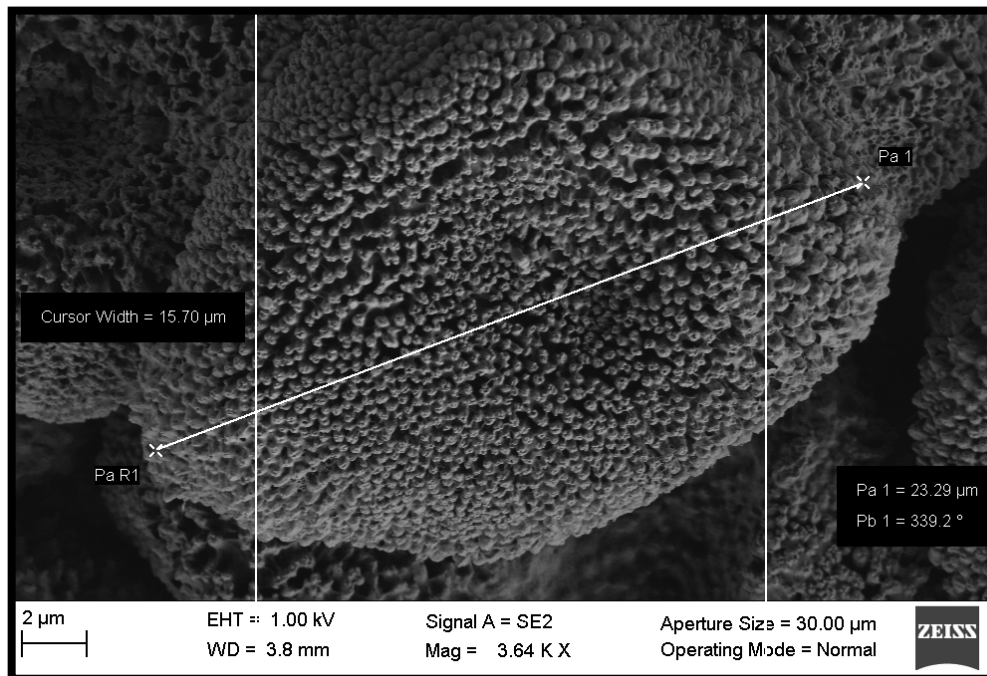
Anexo 12. Teliosporas de *Puccinia sherardiana* vistas desde el microscopio de luz.



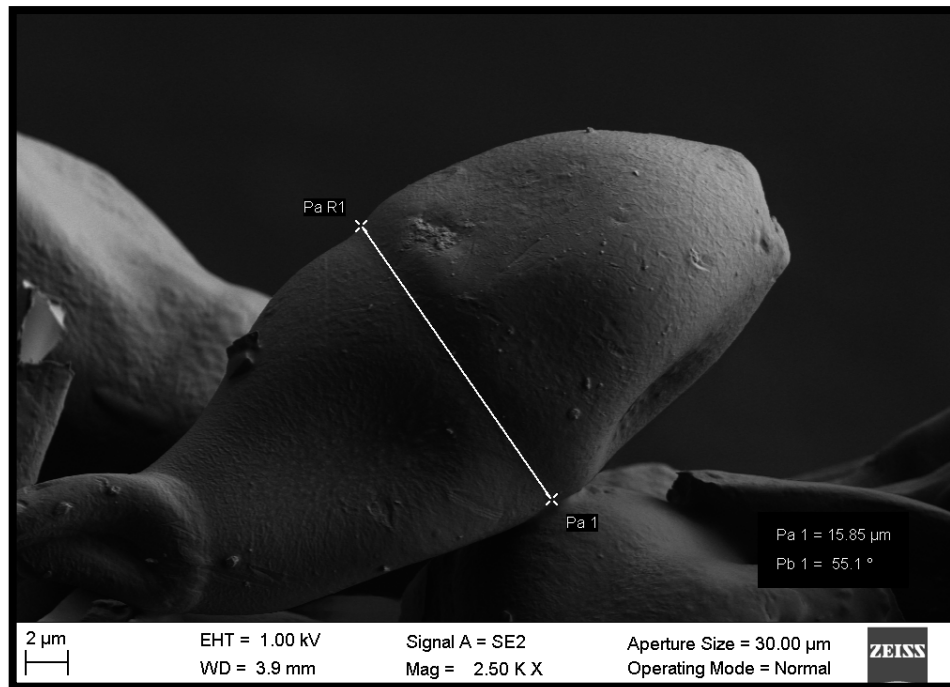
Anexo 13. Medición de un ecio de *Puccinia sherardiana* con el apoyo del software del Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss).



Anexo 14. Medición de una eciospora de *Puccinia sherardiana* con el apoyo del software del Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss).



Anexo 15. Medición de una teliospora de *Puccinia sherardiana* con el apoyo del software del Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss).



Anexo 16. Teliosporas de *Puccinia sherardiana* vistas con el apoyo del software del Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Carls Zeiss).

