



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

## FUENTES DE RESISTENCIA A LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA POR *Fusarium graminearum* Schwabe Y PRODUCCIÓN DE DEOXINIVALENOL EN CEBADA MALTERA (*Hordeum vulgare* L.)

MIRNA BOBADILLA MELÉNDEZ

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

Junio 2018

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe M.C. Mirna Bobadilla Meléndez, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dra. Ana María Hernández Anguiano, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis FUENTES DE RESISTENCIA A LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA POR *Fusarium graminearum* Schwabe Y PRODUCCIÓN DE DEOXINIVALENOL EN CEBADA MALTERA (*Hordeum vulgare* L.)

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 06 de Junio de 2018

Firma del  
Alumno (a)

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Fuentes de resistencia a la fusariosis de la espiga por *Fusarium graminearum* Schwabe y producción de deoxinivalenol en cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.)** realizada por la alumna: Mirna Bobadilla Meléndez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

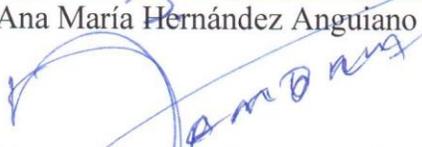
DOCTORA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

  
Dra. Ana María Hernández Anguiano

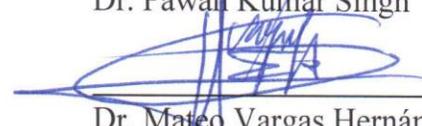
ASESOR

  
Dr. Mauro Refugio Zamora Díaz

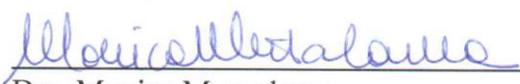
ASESOR

  
Dr. Pawan Kumar Singh

ASESOR

  
Dr. Mateo Vargas Hernández

ASESORA

  
Dra. Monica Mezzalama

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2018

**Fuentes de resistencia a la fusariosis de la espiga por *Fusarium graminearum* Schwabe y producción de deoxinivalenol en cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.)**

Mirna Bobadilla Meléndez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2018

**RESUMEN**

La fusariosis de la espiga por *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* (Schweinitz)) es una enfermedad devastadora de la cebada a nivel internacional. La enfermedad afecta no solo el rendimiento sino también la calidad del grano por la producción de deoxinivalenol (DON), compuesto tóxico del grupo de los tricotecenos, que daña la salud de personas y animales que consumen granos contaminados. Entre las medidas de control se encuentra el uso de variedades resistentes por lo que este trabajo tuvo como objetivo general evaluar la resistencia a la fusariosis y a la acumulación de DON en 131 líneas avanzadas de cebada maltera seleccionadas por su tolerancia a roya lineal amarilla, roya de la hoja, mancha reticulada, tizón foliar y escaldadura de la hoja, del programa de Cebada del INIFAP-CEVAMEX. Durante tres años las líneas 30, 47, 65 y 123, así como las líneas 73, 91 y 96, de seis y dos hileras de grano, respectivamente, registraron síntomas muy bajos de fusariosis en respuesta a la inoculación con *F. graminearum* en pruebas en invernadero. Aunque la severidad de la enfermedad no se relacionó ( $r = 0.5682$ ) con la acumulación de DON, estas líneas registraron muy baja o nula producción de toxina cuando se analizaron con la prueba RIDASCREEN® FAST DON de ELISA. La información generada en este estudio es relevante ya que indica que estas líneas resistentes a la enfermedad y a la acumulación de DON tienen potencial para utilizarse como fuentes de resistencia en un programa de cruzamientos en cebada maltera que incluya en el conjunto de enfermedades a la fusariosis de la espiga.

**Palabras clave:** *Fusarium graminearum*, *Hordeum vulgare*, resistencia, Deoxinivalenol.

**Resistance sources to Fusarium head blight by *Fusarium graminearum* Schwabe and deoxynivalenol production in malting barley advanced lines (*Hordeum vulgare* L.)**

Mirna Bobadilla Meléndez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2018

**ABSTRACT**

Fusarium head blight (FHB) caused by *Fusarium graminearum* Schwabe (telomorph *Gibberella zeae* (Schweinitz)) is a devastating disease in many barley production areas throughout the world. This disease affects not only the yield but also the quality of the grain due to the production of deoxynivalenol (DON), a toxic compound of the trichothecene group, that is harmful to human and animals that consume contaminated grain with the fungus. The use of resistant varieties, among others control measures, is very important, so this work had as a general objective to evaluate the resistance to FHB and the accumulation of DON in 131 malting barley advanced lines, selected for their tolerance to yellow rust, leaf rust, net blotch, leaf blight and leaf scald, of the INIFAP-CEVAMEX barley program. For three years the advanced lines 30, 47, 65 and 123, as well as lines 73, 91 and 96, six and two rows lines, respectively, registered very low symptoms of FHB in response to inoculation with *F. graminearum* in greenhouse tests. Although the severity of the disease was not related ( $r = 0.5682$ ) to the accumulation of DON, these lines registered very low or no toxin production when analyzed with the RIDASCREEN® FAST DON ELISA test. The information generated in this study is relevant since it indicates that these resistant lines to FHB and DON accumulation have the potential to be considered as sources of resistance to FHB in a crossbreeding program in malting barley.

**Key words:** *Fusarium graminearum*, *Hordeum vulgare*, resistance, Deoxynivalenol

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de postgrado e investigación, a través de la beca número 1136066.

Al Colegio de Postgraduados, institución que me dio la oportunidad de hacer mis estudio de posgrado y brindarme los recursos para el cumplimiento de mi plan de estudios.

Al Postgrado de Fitosanidad - Fitopatología, Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados por brindarme las facilidades para realizar mis estudios de Doctorado.

A la Dra. Ana María Hernández Anguiano por su valioso apoyo, dirección y comprensión durante el proceso de mis estudios e investigación.

Al Dr. Mauro R. Zamora Díaz, investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, por su valiosa asesoría y confianza para evaluar las líneas avanzadas de cebada maltera.

Al Dr. Pawan Kumar Singh, investigador del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por su valiosa asesoría, experiencias compartidas en el tema de la fusariosis de la espiga en cebada y por permitirme trabajar en el laboratorio a su digno cargo en el CIMMYT.

A la Dra. Mónica Mezzalama, investigadora del CIMMYT, por su asesoría y comentarios en la presente investigación.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández, de la Universidad Autónoma Chapingo, por su asesoría en el análisis estadístico y disposición para revisión de datos.

A la Ing. Selene Ramírez Mercado por su valiosa colaboración en el aislamiento de cepas de *F. graminearum*, de semilla de cebada, colectada en Valles Altos.

A la M.C. Nérida Lozano Ramírez, del laboratorio de Fitopatología de Trigo del CIMMYT, por su apoyo en diversas actividades de laboratorio y en el análisis de la micotoxina DON.

Al Dr. Aquiles Carballo Carballo, de la orientación en Producción de Semillas del Colegio de Postgraduados, por facilitarme un espacio en el invernadero a su cargo para el establecimiento de las pruebas de evaluación de resistencia.

Al Dr. Cristian Nava Díaz, por su orientación en el envío de muestras de DNA para su secuenciación.

Al Dr. Sergio Sandoval Islas, por sus comentarios y apoyo como Sinodal.

A mis amigos Eridani, Camilo, Rocio, Miguel, Faby, Mariana, Betza, Lili,..., por su amistad y apoyo durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

## DEDICATORIA

A mi mamá. Cirila Meléndez Sánchez, por alentarme durante estos años para concluir este proyecto profesional.

A mi papá: Edilberto Bobadilla Martínez<sup>†</sup> por todas sus enseñanzas

A mi hermana: Yareli y mis sobrin@s: Ana Karen y Alonso, por su apoyo y amor.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>LISTA DE CUADROS</b>	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xii
<b>INTRODUCCION GENERAL</b>	1
<b>CAPÍTULO I. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Fusarium graminearum</i> DE SEMILLA DE CEBADA MALTERA DE DIFERENTES REGIONES GEOGRÁFICAS DE MÉXICO</b>	
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
Fusariosis de la espiga en cebada y trigo	6
Variabilidad patogénica entre aislamientos de <i>F. graminearum</i>	7
OBJETIVO e HIPÓTESIS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Material biológico	9
Aislamiento por la prueba de papel secante y congelación	11
Caracterización molecular	12
Crecimiento de las cepas y obtención de micelio	13
Extracción de ADN	13
Amplificación por PCR	14
Secuenciación	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i>	17
Caracterización Molecular	25
CONCLUSIONES	30
<b>CAPÍTULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE LA TOXINA DEOXINIVALENOL PRODUCIDOS POR CEPAS DE <i>F. graminearum</i> AISLADAS DE CEBADA MALTERA</b>	
RESUMEN	31
ABSTRACT	32
INTRODUCCIÓN	33
Micotoxinas producidas por <i>F. graminearum</i>	33
Deoxinivalenol como factor de virulencia	33
OBJETIVO e HIPÓTESIS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Cepas de <i>Fusarium graminearum</i>	36
Establecimiento de la prueba ELISA RIDAS SCREEN® FAST DON	37
Preparación de la placa ELISA RIDASCREEN® FAST DON	39
PCR para confirmación de quimiotipo DON	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Producción de deoxinivalenol (DON).	44
Identificación molecular del quimiotipo DON por PCR	46
CONCLUSIONES	50

<b>CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA EN LÍNEAS AVANZADAS DE CEBADA MALTERA DEL INIFAP A LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA</b>	
RESUMEN	51
ABSTRACT	52
INTRODUCCIÓN	53
Cultivo de cebada	53
Importancia económica de la fusariosis en cebada	54
Síntomas de la fusariosis en cebada	55
Epidemiología de la fusariosis de la espiga en cebada	55
Programa de cruzas para el mejoramiento de cebada del INIFAP	56
OBJETIVO e HIPÓTESIS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	57
Evaluación en Campo	58
Evaluación en invernadero	61
Estación invierno-primavera 2015	61
Estación invierno-primavera 2016	64
Estación invierno-primavera 2017	67
Análisis estadístico	71
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
Resistencia en campo	74
Resistencia en invernadero	77
Evaluación invierno-primavera 2015	77
Evaluación invierno-primavera 2016	79
Evaluación invierno-primavera 2017	81
Clasificación de las líneas durante cuatro años de evaluación	85
Clasificación de líneas por tipo de resistencia	92
CONCLUSIONES	100
<b>CAPÍTULO IV. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE DEOXINIVALENOL EN SEMILLA DE CEBADA MALTERA DE PLANTAS INOCULADAS CON <i>Fusarium graminearum</i></b>	
RESUMEN	101
ABSTRACT	102
INTRODUCCIÓN	103
Efecto del consumo de grano contaminado con toxina DON	103
Límites de tolerancia de DON en grano contaminado	103
Prueba serológica para la detección de DON	104
OBJETIVO e HIPÓTESIS	105
MATERIALES Y MÉTODOS	105
Análisis de toxina DON	106
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107
Detección y cuantificación de DON en semilla	107
CONCLUSIONES	111
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	113
<b>LITERATURA CITADA</b>	114
<b>ANEXOS</b>	120

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
Cuadro 1. 1	Estados y Municipios en donde se colectaron muestras de espigas de cebada maltera para aislar cepas de <i>F. graminearum</i> , durante los ciclos agrícolas de 2014 a 2016.	10
Cuadro 1.2	Reactivos empleados en el establecimiento de la reacción de PCR para la identificación de las cepas de <i>F. graminearum</i> , aisladas de semilla de cebada maltera.	15
Cuadro 1.3	Condiciones establecidas para la reacción de PCR con el iniciador FG16N.	15
Cuadro 1.4	Cepas enviadas a Macrogen para su secuenciación con el iniciador FG16N.	16
Cuadro 1.5	Cepas de <i>F. graminearum</i> aisladas de semilla de cebada maltera colectada en diferentes regiones durante los ciclos primavera-verano 2014 y otoño-invierno 2015-2016.	18
Cuadro 1.6	Tamaño de macroconidios y presencia de clamidosporas en cepas de <i>F. graminearum</i> .	19
Cuadro 1.7	Número de cepa, clave y resultado de amplificación por PCR con el iniciador FG16N de material genético de las cepas de <i>F. graminearum</i> .	27
Cuadro 1.8	Comparación de la secuencia de 20 cepas de <i>F. graminearum</i> en la base de datos del Gene Bank.	29
Cuadro 2. 1	Quimotipos de <i>F. graminearum</i> <sup>†</sup> reportados de acuerdo a la literatura.	34
Cuadro 2.2	Relación de cepas de <i>F. graminearum</i> aisladas de semilla de cebada maltera colectada en diferentes regiones geográficas de México en los ciclos agrícolas 2014-2016.	38
Cuadro 2.3	Reactivos empleados para la reacción de PCR en la identificación de las cepas de <i>F. graminearum</i> productoras de toxina DON.	43
Cuadro 2.4	Condiciones establecidas para la reacción de PCR con el iniciador ToxP.	43
Cuadro 2.5	Niveles en ppm de DON producidos por las cepas de <i>F. graminearum</i> , aisladas de la región de Valles Altos de 2014 a 2016.	45
Cuadro 2.6	Comparación de valores medios de los niveles DON producidos por las cepas de <i>F. graminearum</i> aisladas de semilla de cebada maltera.	47
Cuadro 2.7	Caracterización de cepas de <i>F. graminearum</i> de acuerdo a la amplificación del fragmento del quimiotipo deoxinivalenol (DON) y producción de DON <i>in vitro</i> .	48
Cuadro 3.1	Valores promedio de temperatura y humedad relativa <sup>‡</sup> de las regiones donde se cultivaron las líneas de cebada maltera, registradas en 2014.	59
Cuadro 3.2	Líneas avanzadas de cebada maltera, diseño experimental latices regulares y arreglo estadístico, establecidas en el ciclo agrícola P-V 2014.	60
Cuadro 3. 3	Análisis comparativo de valores para número de espigas con fusariosis, índice IFHB y severidad de la fusariosis en líneas testigo de cebada maltera. En campo por infección natural y en invernadero por inoculación <sup>†</sup> con <i>F. graminearum</i> <sup>‡</sup> , de 2014 a 2017.	73
Cuadro. 3. 4	Líneas avanzadas de cebada maltera organizadas en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo al número de espigas con síntomas registrado durante el ciclo primavera-verano 2014, en campo.	76
Cuadro 3. 5	Líneas avanzadas de cebada maltera organizadas en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo al índice IFHB registrado durante el ciclo primavera 2015, en invernadero.	78

Cuadro 3. 6	Líneas avanzadas de cebada maltera organizadas en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo al índice IFHB registrado durante el ciclo primavera 2016, en invernadero.	80
Cuadro 3. 7	Líneas avanzadas de cebada maltera organizadas en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo al índice IFHB registrado durante el ciclo invierno-primavera 2017, en invernadero.	82
Cuadro 3. 8	Clasificación de líneas de cebada maltera como resistentes a la infección inicial y a la dispersión de la fusariosis. Estas líneas registraron una respuesta de resistente (R) a la inoculación natural en campo y a la artificial por aspersión, en 2015y 2017, y a la punción en 2016, en invernadero.	87
Cuadro 3. 9	Clasificación de líneas de cebada maltera como moderadamente resistentes (MR) a la fusariosis por haber registrado respuestas R y MR en campo e invernadero, durante cuatro años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión, en 2015 y 2017, y por punción en 2016.	88
Cuadro 3. 10	Clasificación de líneas de cebada maltera como susceptibles (S) a la fusariosis por haber registrado al menos una respuesta S en campo o invernadero, durante cuatro años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión en 2015 y 2017, y por punción en 2016.	90
Cuadro 3. 11	Comparación en porcentaje de líneas de cebada maltera de acuerdo a la respuesta a la fusariosis de la espiga en condiciones de invernadero y campo registrada de 2014 a 2017.	92
Cuadro 3. 12	Clasificación de líneas de cebada maltera como resistentes (R) de acuerdo a la infección inicial (resistencia Tipo I) de la fusariosis por haber registrado solamente respuestas R en campo e invernadero durante tres años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión.	93
Cuadro 3. 13	Clasificación de líneas de cebada maltera como moderadamente resistentes (MR) de acuerdo a la infección inicial (resistencia Tipo I) de la fusariosis por haber registrado tanto respuestas R como MR en campo e invernadero, durante tres años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión.	94
Cuadro 3. 14	Clasificación de líneas de cebada maltera como susceptibles (S) de acuerdo a la infección inicial (resistencia Tipo I) de la fusariosis por haber registrado al menos una respuesta S en campo o invernadero, durante tres años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión.	95
Cuadro 3. 15	Clasificación de líneas de cebada maltera como resistentes (R) de acuerdo a la dispersión de la infección (resistencia Tipo II) de la fusariosis por haber registrado solamente respuestas R en invernadero, durante 2016.	96
Cuadro 3. 16	Clasificación de líneas de cebada maltera como moderadamente resistentes (MR) de acuerdo a la dispersión de la infección (resistencia Tipo II) de la fusariosis por haber registrado respuesta MR, en invernadero durante 2016.	97
Cuadro 3. 17	Clasificación de líneas de cebada maltera como susceptibles (S) de acuerdo a la dispersión de la infección (resistencia Tipo II) de la fusariosis por haber registrado al menos una respuesta S en invernadero, durante el 2016.	98
Cuadro 3. 18	Comparación en porcentaje de líneas de cebada maltera entre los tipo de resistencia a la fusariosis de la espiga en invernadero, durante tres años de evaluación el para la resistencia Tipo I y de un año para la Tipo II.	99
Cuadro 4.1	Porcentaje de severidad y clasificación de las líneas de cebada en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo a la acumulación de DON.	109

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
Figura 1.1	Grupos representativos organizados por color de micelio y centro de la colonia de cepas características de <i>F. graminearum</i> . Grupo I, con color pálido solo en el centro de la colonia, el resto hialino; Grupo II, con color tenue tanto en el centro como en el resto de la colonia; Grupo III, con color toda la colonia pero más intenso en el centro de la colonia; y, Grupo IV, con color intenso toda la colonia <b>A</b> ) Con color rojizo: cepas CU1R30 (21), SL10R10 (12), SL3R22 (13) y SL3R24 (15) de 15 días de crecimiento en medio AHC. <b>B</b> ) Con color naranja: cepas CU1R30 (21), SL10R10 (12), NA8R20 (6) y NA5R20 (5) de 7 días de crecimiento en PDA	21
Figura 1.2	Grupo I. Características de centro color naranja pálido de colonia de cepa CU1R30 (21) de <i>F. graminearum</i> de 7 días de crecimiento en PDA. Abajo en horizontal se presentan las características morfológicas de fiálide ( <b>fi</b> ) y macroconidio ( <b>ma</b> ), de la cepa 21 de 15 días de crecimiento en AHC, al microscopio compuesto (10 x y 40x).	22
Figura 1.3	Grupo II. Características de centro color naranja tenue de colonia de cepas NA9R10 (7), SL10R10 (12) y CU6R30 (22) de <i>F. graminearum</i> de 7 días en PDA. Abajo en horizontal se presentan las características morfológicas de macroconidio ( <b>ma</b> ), clamidosporas (cl), fiálide ( <b>fi</b> ) y esporodoquio ( <b>es</b> ), de dichas cepas de 15 días de crecimiento en AHC, al microscopio compuesto (40X).	23
Figura 1.4	Grupo III. Características de color naranja de la colonia, color intenso en el centro. Cepas NA8R20 (6), SL3R21 (11), SLR22 (13) y SL3R23 (14) de <i>F. graminearum</i> de 7 días de crecimiento en PDA. Abajo en horizontal se presentan las características morfológicas de macroconidio ( <b>ma</b> ), clamidosporas (cl), fiálide ( <b>fi</b> ) y esporodoquio ( <b>es</b> ), de dichas cepas de 15 días de crecimiento en AHC, al microscopio compuesto (40X).	24
Figura 1.5	Grupo IV. Características de color naranja intenso de micelio y centro de la colonia. Cepas NA5R20 (5) y SL3R24 (15) de <i>F. graminearum</i> de 7 días de crecimiento en PDA. Abajo en horizontal se presentan las características morfológicas de macroconidio ( <b>ma</b> ), clamidosporas y ( <b>cl</b> ), fiálide ( <b>fi</b> ) de dichas cepas de 15 días de crecimiento en AHC, al microscopio compuesto (40X).	25
Figura 1.6	Productos de amplificación con el iniciador FG16N. <b>A</b> ) Productos obtenidos en septiembre de 2016 para cepa 1, 2 y 3 de Hidalgo; de la 4 a la 10 de Tlaxcala.; de la 11 a la 19 del Estado de México; de la 20 a la 25 de Puebla.; y de la 26 a la 33 de Guanajuato. Los productos de 34 y 35 corresponden a las cepas 10 y 18. <b>B</b> ) Productos obtenidos en noviembre de 2016 para las cepas indicadas anteriormente y para las cepas 34 de Jalisco, 35 y 36 de Hidalgo, 37 y 38 de Tamaulipas y 39 de México. Los productos 40 y 41 corresponden a dos cepas aisladas de espigas de cebada inoculadas en invernadero (primavera 2016) con coctel de cuatro cepas de <i>F. graminearum</i> proporcionadas por CIMMYT. += Control positivo (material de cepas de <i>F. graminearum</i> proporcionadas por CIMMYT). - = Control negativo (agua). Marcador molecular (M.M.) ØX174.	28
Figura 2.1	Diagrama de carga para la placa ELISA RIDASCREEN® FAST DON con los estándares marcados en los pozos de A1 a E1 y las soluciones de las	41

	muestras en los pozos de F1 a F5, primera repetición; y de G5 a G9, para la segunda.	
Figura 2.2	Productos de amplificación con el iniciador ToxP. <b>A)</b> Productos obtenidos en septiembre de 2016 para las cepas 1, 2 y 3 de Hidalgo; de la 4 a la 10 de Tlaxcala.; de la 11 a la 19 del Estado de México; de la 20 a la 25 de Puebla.; y de la 26 a la 33 de Guanajuato. Los productos de 34 y 35 corresponden también a las cepas 10 y 18. <b>B)</b> Productos obtenidos en noviembre de 2016 para las cepas indicadas anteriormente y para las cepas 34 de Jalisco, 35 y 36 de Hidalgo, 37 y 38 de Tamaulipas y 39 de México. Los productos 40 y 41 corresponden a dos cepas aisladas de espigas inoculadas en invernadero (primavera 2016) con coctel de cuatro cepas de <i>F. graminearum</i> proporcionadas por CIMMYT. += Control positivo (material de cepas de <i>F. graminearum</i> proporcionadas por CIMMYT). - = Control negativo (agua). Marcador molecular (M.M.) ØX174.	49
Figura 3.1	Cultivo de cebada maltera cultivada en campo. <b>A)</b> En etapa de llenado de grano en Almoloya. <b>B)</b> En etapa de grano masoso con síntomas de la fusariosis de la espiga en Almoloya, Hidalgo.	60
Figura 3.2	Plantas de cebada maltera en invernadero <b>A)</b> Plantas en etapa de floración con malla sombra. <b>B)</b> Plantas después de la inoculación con cepas de <i>Fusarium graminearum</i> cubiertas con bolsa de plástico.	69
Figura 3.3	Cuantificación de granos totales por espiga y granos con síntoma de fusariosis. <b>A)</b> Espiga de seis hileras de granos y <b>B)</b> espiga de dos hileras de granos.	70
Figura 3.4	Espigas de cebada maltera, cosechadas de plantas inoculadas en invernadero, estación invierno-primavera 2017. Las espigas se depositaron en una bolsa de papel con perforaciones para su almacenamiento. El asterisco indica la bolsa con número de línea y repetición (R1).	70
Figura 3.5	Espigas de cebada maltera, cosechadas de plantas inoculadas en invernadero durante la estación invierno-primavera 2017. Las plantas se inocularon con suspensión de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de <i>F. graminearum</i> . <b>A)</b> Espiga sin síntomas; <b>B)</b> espiga considerada como resistente; <b>C)</b> moderadamente resistente; y <b>D)</b> susceptible. La flecha indica el síntoma de la enfermedad en espiguilla.	83
Figura 3.6	Espigas de cebada maltera, cosechadas de plantas inoculadas en invernadero durante la estación invierno-primavera 2017. Las plantas se inocularon con suspensión de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de <i>F. graminearum</i> . <b>A)</b> Espigas de línea 86, sin síntomas; <b>B)</b> espigas de línea 63 clasificada como R; <b>C)</b> espigas de línea 76 clasificada como MR; <b>D)</b> espigas de línea 33 clasificada como S. La flecha indica el síntoma de la enfermedad en grano.	84
Figura 3.7	Espigas de variedades testigo de cebada maltera cosechadas de plantas inoculadas en invernadero durante la estación invierno-primavera 2017 e inoculadas con suspensión de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de <i>F. graminearum</i> . <b>A)</b> Espigas de la variedad resistente Seebe; <b>B)</b> de Shemai, moderadamente resistente; y <b>C)</b> Kasota susceptibles. La flecha indica el síntoma de la enfermedad en grano.	85
Figura 4.1	Correlación de severidad de la enfermedad y acumulación de DON en semilla de espigas inoculadas por aspersión con mezcla de cepas de <i>F. graminearum</i> , en invernadero en 2017. Los valores son promedio de dos repeticiones y los números dentro de la figura indican la línea.	111

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En México la producción de cebada en 2017 fue de 982,074 toneladas, cultivadas en una superficie de aproximadamente 364, 453 ha, establecidas en condiciones de temporal y riego. El rendimiento bajo estas condiciones es diferente; mientras que con riego es de 5 a 6 ton/ha, en temporal es de solo 1.5 a 2 ton/ha (SIAP, 2017). Sin embargo, en la región de Valles Altos, situada en la Meseta Central, esta última forma de producción es la que prevalece durante el ciclo primavera-verano; en contraste, en la región del Bajío, el sistema de producción es de riego durante el ciclo otoño-invierno (Zamora, *et al.*, 2008). La producción de grano obtenida se destina principalmente a la industria maltera para la elaboración de cerveza y en menor cantidad a la industria de alimentos balanceados para la elaboración de alimentos para ganado (Windels, 2000).

En las zonas productoras de México, el cultivo de cebada maltera se ve afectado por diversas enfermedades, entre ellas, la fusariosis de la espiga (Gilchrist-Saavedra, 2000; Zamora et al., 2008) la cual es una enfermedad devastadora de importancia económica. Esta enfermedad también conocida como roña de la espiga, tizón de la espiga, tizón de la cabeza de la cebada o *Fusarium head blight* (FHB, por sus siglas en inglés) es ocasionada por diversas especies del género *Fusarium*. Actualmente se han identificado alrededor de 20 especies relacionadas con esta enfermedad; por ejemplo, en trigo proveniente de diferentes ambientes agroecológicos de México, se ha registrado a: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. boothii*, *F. cerealis*, *F. meridionale*, *F. sambucinum* y *F. poae* (Ireta y Gilchrist, 1994; Cerón-Bustamante et al., 2018). Sin embargo, *F. graminearum* Schwabe (Teleomorfo *Gibberella zae* (Schweinitz) se considera como la especie predominante asociada a la fusariosis de la espiga (Mert-Türk et al., 2014). Ireta y Gilchrist (1994) y Gilchrist-Saavedra (2000) reportaron la presencia de la fusariosis de la espiga en regiones de

Valles Altos de los estados de Jalisco, Michoacán, México, Tlaxcala e Hidalgo, donde se cultiva trigo, cebada y triticale, bajo condiciones de temporal así como en la región del Bajío en Guanajuato. En 1994 Ireta y Gilchrist reportaron que el área total afectada por la fusariosis de la espiga fue de aproximadamente 170,000 ha.

*F. graminearum* es una especie que se caracteriza por tener aislamientos con diferente grado de patogenicidad la cual se ha relacionado con la capacidad de producir micotoxinas principalmente del grupo de los tricótesenos. Las micotoxinas son metabolitos secundarios, de bajo peso molecular, relacionadas con la capacidad del hongo de infectar, colonizar e inducir síntomas en su hospedante (Gunupuru et al., 2017). Entre las micotoxinas destaca el deoxinivalenol (DON) que daña la salud de personas y animales que consumen granos o productos de cebada maltera contaminados con repercusiones en los sectores agropecuario, alimenticio e industrial (Gilchrist-Saavedra, 2000). Cabe señalar que la micotoxina DON es producida por las diferentes especies de *Fusarium* que ocasionan la fusariosis de la espiga como *F. graminearum* y *F. culmorum* (Chrpová et al., 2011). Esta micotoxina es soluble en agua y termoestable, resiste temperaturas de hasta 180 °C (Méndez-Albores y Moreno-Martínez, 2009).

En el cultivo de cebada la fusariosis se presenta principalmente en regiones con clima cálido y lluvias frecuentes durante la etapa de emisión de espiga y hasta la madurez fisiológica. En estas regiones, la enfermedad se ve favorecida cuando las temperaturas se encuentran entre 25 a 30°C, y están acompañadas de alta humedad relativa, mayor o igual a 90 % (Bondalapati et al., 2012). El alto contenido de rocío también favorece el desarrollo de la enfermedad ocasionando rápido marchitamiento de las espigas en variedades con potencial de alto rendimiento con impacto considerable en la producción (McMullen et al., 1997). Por otra parte, cambios en el manejo agronómico como la labranza de conservación favorecen el

incremento del nivel de inóculo en el suelo (Miller et al., 1998). Numerosos reportes publicados sobre la enfermedad (Khatibi et al., 2012; Berger et al., 2014; Gunupuru et al., 2017) y el hongo (Malihipour et al., 2012; Mert-Türk et al., 2014; Bozac et al., 2016), sugieren que la fusariosis es de interés actual para la comunidad científica por los riesgos que representa el cambio climático para el desarrollo de la enfermedad en regiones donde ésta se encuentra ausente por no tener las condiciones favorables.

Entre las medidas de control de la fusariosis de la espiga se encuentra el uso de variedades resistentes por lo que este trabajo tuvo como objetivo general evaluar la resistencia a esta enfermedad y a la acumulación de DON en 131 líneas avanzadas de cebada maltera seleccionadas por su tolerancia a roya lineal amarilla, roya de la hoja, mancha reticulada, tizón foliar y escaldadura de la hoja, del programa de Cebada del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) así como contar con una colección de aislamientos de *F. graminearum* aislados de variedades de cebada maltera, cultivadas en diferentes regiones geográficas de México, para seleccionar los de mayor virulencia por su capacidad de producir micotoxina DON y poderlos utilizar en la identificación de las líneas avanzadas con resistencia a la fusariosis de la espiga del programa de cruzamientos del INIFAP-CEVAMEX.

**CAPITULO I. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium graminearum***  
**DE SEMILLA DE CEBADA MALTERA DE DIFERENTES REGIONES**  
**GEOGRÁFICAS DE MÉXICO**

**RESUMEN**

De 257 muestras de semilla de cebada maltera, colectadas en 19 municipios del país, y analizadas por la prueba de papel secante y congelación, se obtuvieron 39 aislamientos identificados morfológicamente como *Fusarium graminearum* Schwabe: 10 del Estado de México, ocho de Guanajuato, siete de Tlaxcala, seis de Puebla, cinco de Hidalgo, dos de Tamaulipas, y uno de Jalisco. De semilla proveniente de Baja California y Michoacán no se aisló al hongo. Las colonias de estas cepas se encontraron de color naranja en papa dextrosa agar (PDA) y rojizo en agar-hoja de clavel. De acuerdo a la intensidad del naranja las cepas se organizaron en grupos. Grupo I, naranja pálido solo en el centro de la colonia, el resto hialino; Grupo II, naranja tenue tanto en el centro como en el resto de la colonia; Grupo III, naranja toda la colonia pero con centro naranja-cobrizo; y, Grupo IV, naranja-cobrizo toda la colonia. Las cepas mantuvieron su posición en el grupo cuando se agruparon de acuerdo al color rojizo. Con excepción de la cepa CEN3, todas las cepas amplificaron por PCR una banda de 280 pb con el iniciador FG16N, específico para *F. graminearum*. La no amplificación con el material de CEN3 indica que esta cepa pudiera corresponder a otra especie de *Fusarium* relacionada como lo es *F. culmorum* o *F. crookwellense*, también reportadas como patógenas de cereales. La detección de *F. graminearum* en semilla colectada en las principales zonas productoras de cebada maltera en México representa un riesgo en la producción y calidad de este cultivo.

**Palabras clave:** *Fusarium graminearum*, semilla de cebada maltera, iniciador FG16N

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Fusarium graminearum* FROM  
MALTERE BARLEY SEED OF DIFFERENT GEOGRAPHICAL REGIONS OF  
MEXICO**

**ABSTRACT**

Thirty-nine isolates out of 257 barley seed samples, collected in 19 producing municipalities of the country, and analyzed by the freezing blotter test, were morphologically identified as *Fusarium graminearum* Schwabe: 10 from the State of Mexico, eight from Guanajuato, seven from Tlaxcala, six from Puebla, five from Hidalgo, two from Tamaulipas, and one from Jalisco. The fungus was not isolated from seed originated in Baja California and in Michoacán. The strains were characterized by producing orange colonies on potato dextrose agar (PDA) and reddish on leaf-agar carnation. According to the intensity of the orange, the strains were organized in groups. Group I, pale orange only in the center of the colony, the rest hyaline; Group II, faint orange both in the center and in the rest of the colony; Group III, orange all the colony but with orange-copper center; and, Group IV, orange-copper throughout the colony. These strains maintained their position in the group when they were grouped according to the reddish color. With the exception of one strain (CEN3), all strains amplified by PCR a 280 bp band with the FG16N primer, specific for *F. graminearum*. The non-amplification with the CEN3 material indicates that this strain could correspond to another species of *Fusarium* related to *F. graminearum* such as *F. culmorum* or *F. crookwellense*, also reported as pathogenic of cereals.

**Key words:** *Fusarium graminearum*, malting barley seed, primer FG16N

## INTRODUCCIÓN

### ***Fusariosis de la espiga en cebada y trigo***

La fusariosis de la espiga es una enfermedad devastadora de importancia económica en cereales de grano pequeño como cebada (*Hordeum vulgare* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), avena (*Avena sativa* L) y triticale (*Triticosecale* Wittm). Esta enfermedad, también conocida como roña de la espiga, tizón de la espiga, tizón de la cabeza de la cebada o Fusarium head blight (FHB, por sus siglas en inglés), es ocasionada por diversas especies del género *Fusarium*. Actualmente se han identificado alrededor de 20 especies relacionadas con esta enfermedad, en los cultivos anteriormente indicados, entre las que destacan por su frecuencia e importancia *F. culmorum* (Chrpová, et al. 2011, Spanic et al., 2018), *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides* y *F. graminearum* (Salas et al., 1999).

En semilla de trigo proveniente de diferentes ambientes agroecológicos de México se ha encontrado también que es un complejo de especies de *Fusarium* las responsables de la fusariosis. Entre estas especies destacan: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. boothii*, *F. ceralis*, *F. meridionale*, *F. sambucinum* y *F. poae*, (Ireta y Gilchrist, 1994; Cerón-Bustamante et al., 2018). Sin embargo, *F. graminearum* Schwabe (Teleomorfo *Gibberella zae* (Schweinitz) se considera como la especie predominante asociada a la fusariosis de la espiga (Mert-Türk et al., 2014).

El desarrollo de la fusariosis en las principales zonas de producción de cebada se ha relacionado con la implementación de la labranza mínima (retención de residuos de cosecha) (Miller et al., 1998). Ireta y Gilchrist (1994) y Gilchrist-Saavedra (2000) reportaron la presencia de la fusariosis de la espiga en México, en regiones de Valles Altos, Jalisco, Michoacán, México, Tlaxcala e Hidalgo, donde se cultiva trigo, cebada y triticale bajo

condiciones de temporal; y en la región del Bajío en Guanajuato, donde ocasionalmente se siembran estos cultivos con riego durante el verano. En 1994 Ireta y Gilchrist reportaron que el área afectada total por la fusariosis de la espiga era de aproximadamente 170,000 ha. En las bases de datos consultadas durante este estudio no se encontró más información sobre la enfermedad, específicamente atacando cebada maltera ni sobre el área actual afectada o de desarrollo de epifitias en ese cultivo.

### ***Variabilidad patogénica entre aislamientos de F. graminearum***

*F. graminearum* es una especie que se caracteriza por tener aislamientos con diferente grado de patogenicidad a diversas especies y cultivares de cereales. El grado de patogenicidad de los aislamientos se ha relacionado con su capacidad de producir micotoxinas principalmente las del grupo de los tricótesenos. Entre éstas destaca el deoxinivalenol (DON), toxina que daña la salud de animales y personas que consumen granos o productos de cebada maltera contaminados con repercusiones en los sectores agropecuario, alimenticio e industrial (Gilchrist-Saavedra, 2000). Esta micotoxina se considera un factor de virulencia asociado con la capacidad de causar infección por el hongo (Malhipour et al., 2012; De la Torre-Hernández, et al., 2014).

En México es necesario generar información sobre las principales especies causantes de la fusariosis de la espiga en cebada y contar con una colección de cepas de *F. graminearum*, aisladas de las nuevas variedades de cebada maltera que se están cultivando en las diferentes regiones geográficas de México. Lo anterior es relevante para identificar fuentes de resistencia en el programa de cruzamientos de cebada maltera del INIPAP-CEVAMEX a la fusariosis de la espiga. De la colección generada se seleccionarán al menos cinco cepas de

aquellas con mayor capacidad de producir la micotoxina DON para pruebas de resistencia en invernadero.

## **OBJETIVO**

Aislar e identificar cepas de *Fusarium graminearum* de semilla de cebada maltera procedente de diferentes regiones agroecológicas de México.

## **HIPÓTESIS**

Existe diversidad genética entre las cepas de *F. graminearun*, aisladas de semilla de cebada maltera, procedente de las diferentes regiones productoras de cebada en México.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La semilla fue proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) cuyo personal se encargó de la colecta de espigas. La colecta se hizo en diferentes regiones agroecológicas correspondientes a nueve estados de la República Mexicana (Cuadro 1.1). En total se procesaron 257 muestras de 22 variedades y líneas de cebada maltera. El aislamiento por la prueba de papel secante y congelación e identificación taxonómica de cepas de *F. graminearum*, se estableció en el Laboratorio de Enfermedades en Postcosecha, del Posgrado de Fitosanidad-Fitopatología, del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, en Montecillo, Estado de México. Mientras que la identificación molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de las cepas de *F. graminearum* se llevó a cabo en el Laboratorio de

Fitopatología de Trigo, del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), El Batán, Texcoco, México.

### ***Material biológico***

Inicialmente se partió de una colección de 25 cepas de *F. graminearum*, aisladas de semilla de 16 líneas Elite de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.), cultivadas en el ciclo agrícola primavera-verano 2014, en condiciones de temporal, en Valles Altos de la mesa central de México (Cuadro 1. 1) (Ramírez, 2017). Sin embargo, con la finalidad de incrementar el número de cepas de la colección se estableció una nueva colecta de espigas, durante el ciclo agrícola otoño-invierno 2014-2015, en Celaya y Guanajuato, y 2015-2016, en las regiones productoras de Baja California, Jalisco, Michoacán, Guanajuato y Tamaulipas, con condiciones de riego, y nuevamente en los estados de Hidalgo (Cuauhtepac de Hinojosa) y Estado de México (Santa Lucia) donde el cultivo estuvo bajo condiciones de temporal (Cuadro 1. 1). En esta nueva colecta se procuró coleccionar espigas con manchado de grano.

La identificación taxonómica de las cepas fue de acuerdo al Manual de Laboratorio del CIMMYT (Warham et al., 1997) y al manual The Fusarium Laboratory Manual (Leslie y Summerell, 2006). Para la esporulación las cepas se sembraron en medio de cultivo de agar agua con hojas de clavel. Se registraron las características morfológicas de los macroconidios (tamaño, forma y rasgos de la célula apical y célula pie) y de las clamidosporas, si presentes, en preparaciones microscópicas semi-permanentes, así como el color de la colonia en cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA, BD BIOXON®) y AHC (Anexo 1).

**Cuadro 1. 1.** Estados y Municipios en donde se colectaron muestras de espigas de cebada maltera para aislar cepas de *F. graminearum*, durante los ciclos agrícolas de 2014 a 2016.

Estado	Municipio	No. de muestras	Ciclo agrícola	Variedad y línea
BC	Mexicali	19	O-I 2015-2016	Esperanza, Armida, Alina, Esmeralda, Adabella y Líneas experimentales
Guanajuato	10 <sup>†</sup>	136	O-I 2014-2015 2015 - 2016	Adabella, Esperanza, Armida, Alina, Esmeralda, Maravilla y líneas experimentales M-179, M-185, M-10542, F6 6HC 6731, F6 6HC 6867
Hidalgo	Almoleya	16	P-V	Líneas Elite
	Cuautepec	3	2014, 2015	Esmeralda
Jalisco	Tepatitlán de Morelos	12	O-I 2015-2016	Esmeralda, Esperanza, Blanca
Michoacán	Venustiano Carranza	8	O-I 2015-2016	Esperanza, Alina
México	Santa Lucia	16	P-V	Líneas Elite
		1	2014, 2015	Línea experimental
Puebla	Cyuaco	16	P-V 2014	Líneas Elite
Tamaulipas	Rio Bravo	14	O-I 2015-2016	Líneas experimentales
Tlaxcala	Nanacamilpa	16	P-V 2014	Líneas Elite

BC = Baja California

<sup>†</sup>Cortázar, Jaral del Progreso, Valle de Santiago, Salamanca, Celaya, Juventino Rosas, Villagrán, Irapuato, Abasolo y Pueblo Nuevo. O-I= otoño-invierno. P-V= primavera-verano

### ***Aislamiento por la prueba de papel secante y congelación***

Para la detección y aislamiento de *F. graminearum* de semilla de cebada se estableció la prueba de papel secante y congelación de acuerdo a las indicaciones del Manual de Laboratorio “Ensayos para la semilla de maíz y trigo” del CIMMYT (Warham et al., 1997). De cada línea y variedad de cebada se tomó una submuestra de 240 semillas la cual se distribuyó en sublotos (repeticiones) de 80 semillas cada uno. Cada repetición se sometió a un tratamiento previo con hipoclorito de sodio (Reasol<sup>MR</sup>) al 5% por 1 minuto, en agitación, y a dos enjuagues con agua destilada estéril. Después de la desinfección, las semillas se colocaron en una caja transparente con tapa (30x23x10 cm), sobre papel filtro y sanitas humedecidas con agua destilada estéril, de acuerdo a un patrón de columnas (10) e hileras (8) utilizando para esto una placa de acrílico con perforaciones. Una vez colocada la semilla, la placa se retiró y la caja se cerró y selló con plástico adherible para mantener la humedad. Las cajas con las semillas de todos los materiales se incubaron a temperatura ambiente del laboratorio por 48 h; después a -20 °C por 48 h; y finalmente, a temperatura ambiente por siete días para favorecer el desarrollo fúngico.

Para la detección de *Fusarium* las colonias fúngicas, desarrolladas sobre la semilla, se examinaron con una lupa y microscopios compuesto (Olympus, modelo CHK) y estereoscópico (Velab, modelo VE-S4). La identificación de las cepas de *Fusarium* fue con el Manual de Laboratorio del CIMMYT (Warham et al., 1997), y del Manual The *Fusarium* Laboratory Manual (Leslie y Summerell 2006) de acuerdo a las características de los macroconidios. La purificación de 39 cepas, identificadas morfológicamente como *F. graminearum*, se hizo por cultivo monospórico (Leslie y Summerell, 2006), y el almacenamiento en aceite mineral (Mier et al., 2002) y en papel filtro Whatman #1 (Fong et al., 2000). A cada una de las 39 cepas de *F. graminearum* se le asignó una clave la cual se

generó tomando como referencia la localidad de procedencia de la semilla, el número de la línea y la repetición de donde fue aislada dicha cepa. De esta manera las cepas se almacenaron para estudios futuros de: confirmación molecular de especie y quimiotipo, análisis de producción de toxina deoxinivalenol (DON) y prueba de selección de material resistente.

### ***Caracterización molecular***

Se confirmó molecularmente la identidad de las 39 cepas, aisladas de semilla de cebada maltera e identificadas morfológicamente como *F. graminearum*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Inicialmente esta prueba se estableció en septiembre de 2016 con el iniciador especie-específico FG16N (Nicholson *et al.*, 1998) y con material genético de cultivos monospóricos de 33 cepas: 25 aisladas de líneas élite de Almoloya, Hidalgo (AL, tres cepas), Nanacamilpa, Tlaxcala (NA, siete cepas), Santa Lucia, México (SL, nueve cepas) y Cuyuaco, Puebla (CU, seis cepas); así como, ocho cepas de las variedades y líneas experimentales de Celaya, Guanajuato (CEE).

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos, la prueba de PCR se repitió en noviembre de 2016 y se estableció con el material de las 33 cepas indicadas anteriormente, además de material de las seis cepas restantes obtenidas de las variedades y líneas experimentales de los estados de Hidalgo (HGO, dos cepas), México (SL, una cepa) Jalisco (JA, una cepa) y Tamaulipas (TAMPS, 2 cepas). Así mismo se incluyó material obtenido de dos cepas de *F. graminearum* aisladas de espigas de cebada maltera con síntoma de fusariosis. Dichas espigas se obtuvieron de plantas de las 131 líneas de cebada maltera inoculadas con un coctel de cuatro cepas de *F. graminearum* (aisladas de trigo y proporcionadas por CIMMYT) en invernadero durante la primavera de 2016.

### ***Crecimiento de las cepas y obtención de micelio***

El crecimiento micelial de las cepas se llevó a cabo en medio de cultivo líquido con extracto de levadura (BD BBL<sup>®</sup>) y sacarosa (BD Bioxon<sup>®</sup>). En un matraz de 250 mL con 50 mL de medio estéril, se agregaron cuatro discos de crecimiento micelial, de la cepa correspondiente de 15 días de crecimiento en PDA. Los matraces con el medio inoculado se taparon con algodón y aluminio y se mantuvieron en agitación (Eberbach Corporation Ann Arbor, Michigan. 115 Volts.) por 5 días a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) del laboratorio. Después de la incubación, se filtró el medio con crecimiento del hongo a través de papel filtro Whatman No. 4, el cual se colocó sobre un embudo Buchner de porcelana montado en un matraz kitasato, conectado a una bomba de vacío (GE, modelo 5KH33DN16GX). El crecimiento micelial, se colectó con una espátula y se colocó en tubos Eppendorf (2 mL) los cuales se cubrieron con papel aluminio al que se le hicieron pequeñas perforaciones. Los tubos se colocaron en un ultracongelador (Revco, modelo ULT1786-3-138) por 2 h y posteriormente se mantuvieron en un liofilizador (Virtis<sup>®</sup> BenchTop<sup>™</sup> Serie“K”) por 5 días para su secado.

### ***Extracción de ADN***

La extracción del ADN (ácido desoxirribonucleíco) del micelio liofilizado de cada una de las cepas se hizo por el método CETAB (Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide), de acuerdo al protocolo “Maize seeds sampling and DNA extraction” del Joint Research Centre of the European Commision (2007) (Anexo 2). Para la extracción de ADN, en un tubo Eppendorf (2 mL) con dos balines de acero (4 mm de diámetro) se colocó un poco de micelio seco de la cepa correspondiente. El tubo cerrado se colocó en un molino (GenoGrinder 2010, Zymo Research) y la masa micelial se molió por 3 min para obtener un polvo fino.

Posteriormente se pesaron 100 mg de la muestra obtenida para ser sometida al protocolo de extracción de ADN como se describe en el Anexo 2.

Previo al establecimiento de la prueba de PCR se estimó la concentración del ADN de cada una de las 39 cepas en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Una vez conocida la concentración se ajustó la suspensión con agua para obtener una concentración final de 5 a 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . Muestras de 100  $\mu\text{L}$  con dicha concentración de ADN se guardaron en Tubos Eppendorf® en refrigeración para utilizarse en la confirmación de la especie con el iniciador FG16N y del quimiotipo con el iniciador ToxP (Anexo 3).

### ***Amplificación por PCR***

La identidad de las 39 cepas, identificadas morfológicamente como *F. graminearum*, se confirmó por la prueba de PCR con el par de iniciadores especie-específico FG16N Forward (F) (5'-ACA GAT GAC AAG ATT CAG GCA CA-3') y FG16N Reverse (R) (5'-TTC TTT GAC ATC TGT TCA ACC CA-3') (Nicholson *et al.*, 1998) con una banda esperada de 280 pares de bases (bp por sus siglas en inglés). Cada reacción de PCR fue de un volumen final de 12  $\mu\text{L}$  con la formulación descrita en el Cuadro 1.2. La reacción de PCR se efectuó en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient Thermal Cycler con el programa indicado en el Cuadro 1.3.

**Cuadro 1.2.** Reactivos empleados en el establecimiento de la reacción de PCR para la identificación de las cepas de *F. graminearum*, aisladas de semilla de cebada maltera.

Reactivo	Concentración	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
RedTaq® ReadyMix®	2x	6.0
FG16N F	500 nM	0.6
FG16N R	500 nM	0.6
Agua grado molecular		3.8
DNA	5 -50 ng $\mu\text{L}^{-1}$	1.0

### *Electroforesis*

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 %, se tiñó con EnviroSafe DNA stain y se visualizó en un fotodocumentador UVP. Como referencia, en el gel se incluyó el marcador de peso molecular para fragmentos de ADN ØX174 (PhiX174)/Hae III (de Fermentas y BioLabs, respectivamente). Anexo 4

**Cuadro 1.3.** Condiciones establecidas para la reacción de PCR con el iniciador FG16N.

Condición	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	10 min
<i>40 ciclos:</i>		
Desnaturalización	95	30 seg
Alineación	60	60 seg
Extensión	72	72 seg
Extensión final	72	10 min
Conservación DNA	4	

### Secuenciación

Considerando, en general, la amplificación con el par de iniciadores FG16N y la producción de toxina DON, el producto de PCR de 20 cepas de *F. graminearum*, indicadas en el Cuadro 1.4, se envió a secuenciar en una dirección (de 5´ a 3´) a la empresa Macrogen CIA (<http://dna.macrogen>), Korea. Las secuencias se compararon utilizando NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Cuadro 1.4.** Cepas enviadas a Macrogen para su secuenciación con el iniciador FG16N.

No. cepa	Clave de cepa	Origen	
		Localidad	Estado
2	AL6R32	Almoloya	Hidalgo
5	NA5R20	Nanacamilpa	Tlaxcala
10	NA16R20	Nanacamilpa	Tlaxcala
12	SL10R10	Santa Lucia	México
14	SL3R23	Santa Lucia	México
15	SL3R24	Santa Lucia	México
16	SL6R10	Santa Lucia	México
17	SL8R10	Santa Lucia	México
19	SL5R30	Santa Lucia	México
20	CU0R10	Cuyoaco	Puebla
21	CU1R30	Cuyoaco	Puebla
22	CU6R30	Cuyoaco	Puebla
24	CU9R11E	Cuyoaco	Puebla
27	CEN2	Celaya	Guanajuato
30	CEN8	Celaya	Guanajuato
32	CEE1	Celaya	Guanajuato
34	JA1	Tepatitlán	Jalisco
36	HGO2	Cuatepec	Hidalgo
37	TAMPS1	Río Bravo	Tamaulipas
38	TAMPS2	Río Bravo	Tamaulipas

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Aislamientos de Fusarium graminearum*

De 257 muestras de semilla de cebada maltera, colectadas en 19 municipios productores del país, y analizadas por la prueba de papel secante y congelación, se obtuvieron en total 39 aislamientos que se identificaron morfológicamente como *F. graminearum*: 10 del Estado de México, ocho de Guanajuato, siete de Tlaxcala, seis de Puebla, cinco de Hidalgo, dos de Tamaulipas, y una de Jalisco (Cuadro 1.5). De las muestras provenientes de Baja California y Michoacán no se aislaron cepas de *F. graminearum*. Con excepción de Michoacán, los resultados anteriores confirman lo reportado por Ireta y Gilchrist (1994) y Gilchrist-Saavedra (2000) sobre la presencia de *F. graminearum* en esas regiones donde se cultiva cebada bajo condiciones de temporal. En este estudio no se aisló *F. graminearum* de las ocho muestras de semilla colectada en el Municipio de Venustiano Carranza, Mich, ciclo O-I, 2015-2016. Posiblemente en esta región la incidencia es baja o bien las condiciones ambientales no fueron favorables para el desarrollo de la fusariosis.

En el Cuadro 1.6 se muestran las dimensiones promedio de los macroconidios y formación de clamidosporas de las cepas identificadas morfológicamente como *F. graminearum*. En general las cepas presentaron macroconidios delgados, de paredes gruesas con una longitud que varió entre 52 a 64 micras de largo y de 5 a 6 micras de ancho. La presencia de clamidosporas se observó solo en el 20 % de las cepas: en dos de Tlaxcala (clave NA), en cuatro del Estado de México (clave SL), y en una de Tamaulipas (clave TA).

La formación de clamidosporas se registró principalmente en las hifas de manera individual, en pares y en cadena, pero también se encontraron formándose en los conidios. Leslie y Summerell (2006) indican que la velocidad de producción de clamidosporas por *F.*

*graminearum* es variable y que la ausencia de estas no es de importancia en el diagnóstico del hongo.

**Cuadro 1.5.** Cepas de *F. graminearum* aisladas de semilla de cebada maltera colectada en diferentes regiones durante los ciclos primavera-verano 2014 y otoño-invierno 2015-2016.

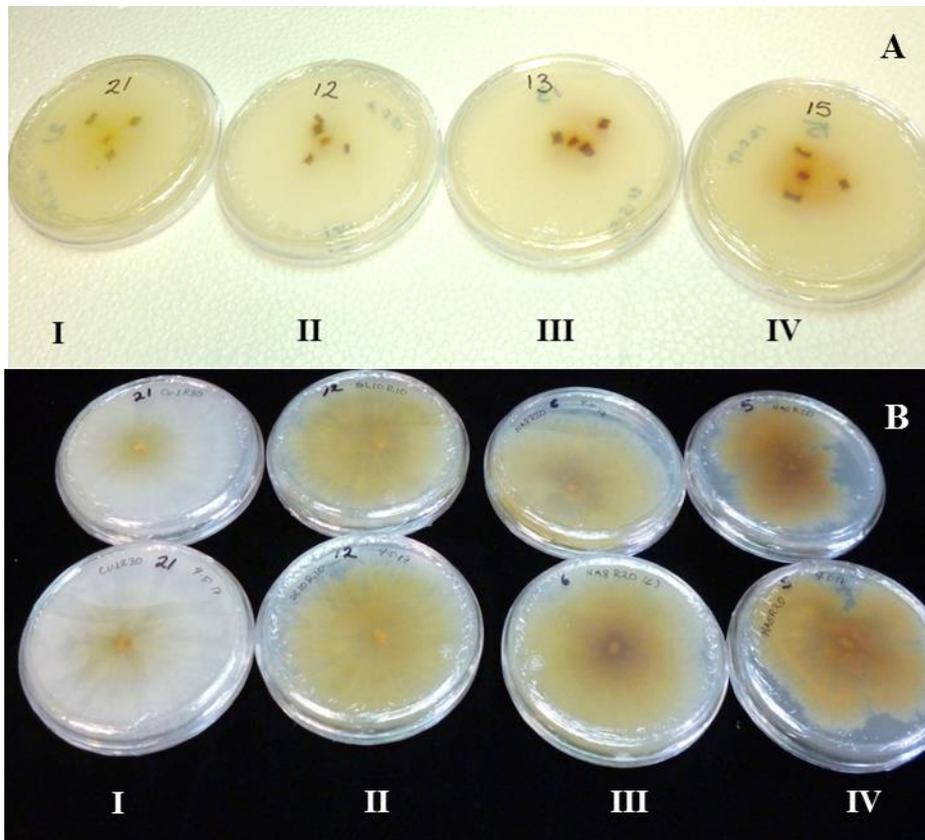
Estado	Municipio	No. de cepas	Clave de cepas
Guanajuato	Celaya	8	CEN1, CEN2, CEN3, CEN4, CEN8, CEN9, CEE1 y CEFS31
Hidalgo	Almoloya	3	AL5R10, AL6R23 y AL9R32
	Cuautepec	2	HGO1, HGO2
Jalisco	Tepatitlán	1	JA1
México	Santa Lucia	10	SL3R21, SL10R10, SL3R22, SL3R23, SL3R24, SL6R10, SL8R10, SL4R10, SL5R30 y SL1
Puebla	Cuyuaco	6	CU0R10, CU1R30, CU6R30, CU13R10, CU9R11E y CU8R36E
Tamaulipas	Rio Bravo	2	TAMPS1 y TAMPS2
Tlaxcala	Nanacamilpa	7	NA0R20, NA5R20, NA8R20, NA9R10, NA11R30, NA16R10 y NA16R20

Las cepas de *F. graminearum* se caracterizaron por producir colonias color naranja cuando se crecieron en papa dextrosa agar (PDA). Sin embargo entre las cepas se observaron diferencias en la intensidad del color naranja de las colonias en PDA; estas diferencias fueron independientes del origen (localidad) de la semilla de donde fue aislada la cepa.

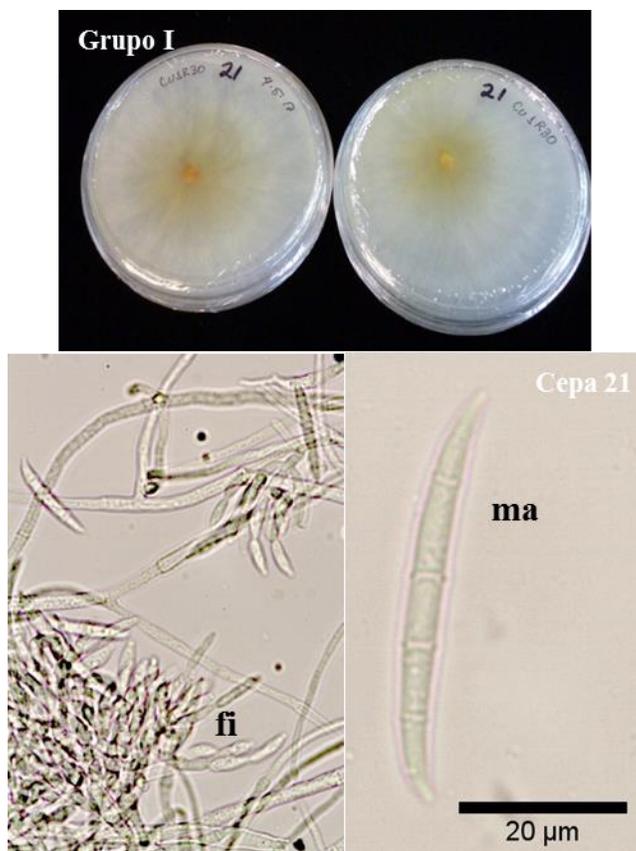
**Cuadro 1.6.** Tamaño de macroconidios y presencia de clamidosporas en cepas de *F. graminearum*.

Número Clave de cepa	Macroconidio (µm)		Clamidosporas
	Largo	Ancho	
1. AL5R10	60	6	Ausentes
2. AL6R32	60	6	Ausentes
3. AL9R32	58	6	Ausentes
4. NA0R20	58	6	Ausentes
5. NA5R20	53	5	Individuales
6. NA8R20	60	5	En cadena
7. NA9R10	55	5	Ausentes
8. NA11R30	59	5	Ausentes
9. NA16R10	52	5	Ausentes
10. NA16R20	59	5	Ausentes
11. SL3R21	60	5	Individuales
12. SL10R10	58	5	En cadena e individuales
13. SL3R22	62	5	En pares y en conidios
14. SL3R23	62	5	Ausentes
15. SL3R24	62	5	En cadena
16. SL6R10	59	5	Ausentes
17. SL8R10	64	5	Ausentes
18. SL4R10	55	5	Ausentes
19. SL5R30	58	5	Ausentes
20. CU0R10	52	5	Ausentes
21. CU1R30	53	5	Ausentes
22. CU6R30	56	5	Ausentes
23. CU13R10	54	5	Ausentes
24. CU9R11E	59	5	Ausentes
25. CU8R36E	64	5	Ausentes
26. CEN1	58	6	Ausentes
27. CEN2	57	5	Ausentes
28. CEN3	54	5	Ausentes
29. CEN4	57	5	Ausentes
30. CEN8	52	5	Ausentes
31. CEN9	55	5	Ausentes
32. CEE1	55	5	Ausentes
33. CEFS31	60	5	Ausentes
34. JA1	53	5	Ausentes
35. HGO1	62	5	Ausentes
36. HGO2	56	5	Ausentes
37. TAMPS1	61	5	En conidios
38. TAMPS2	62	5	Ausentes
39. SL1	57	5	Ausentes

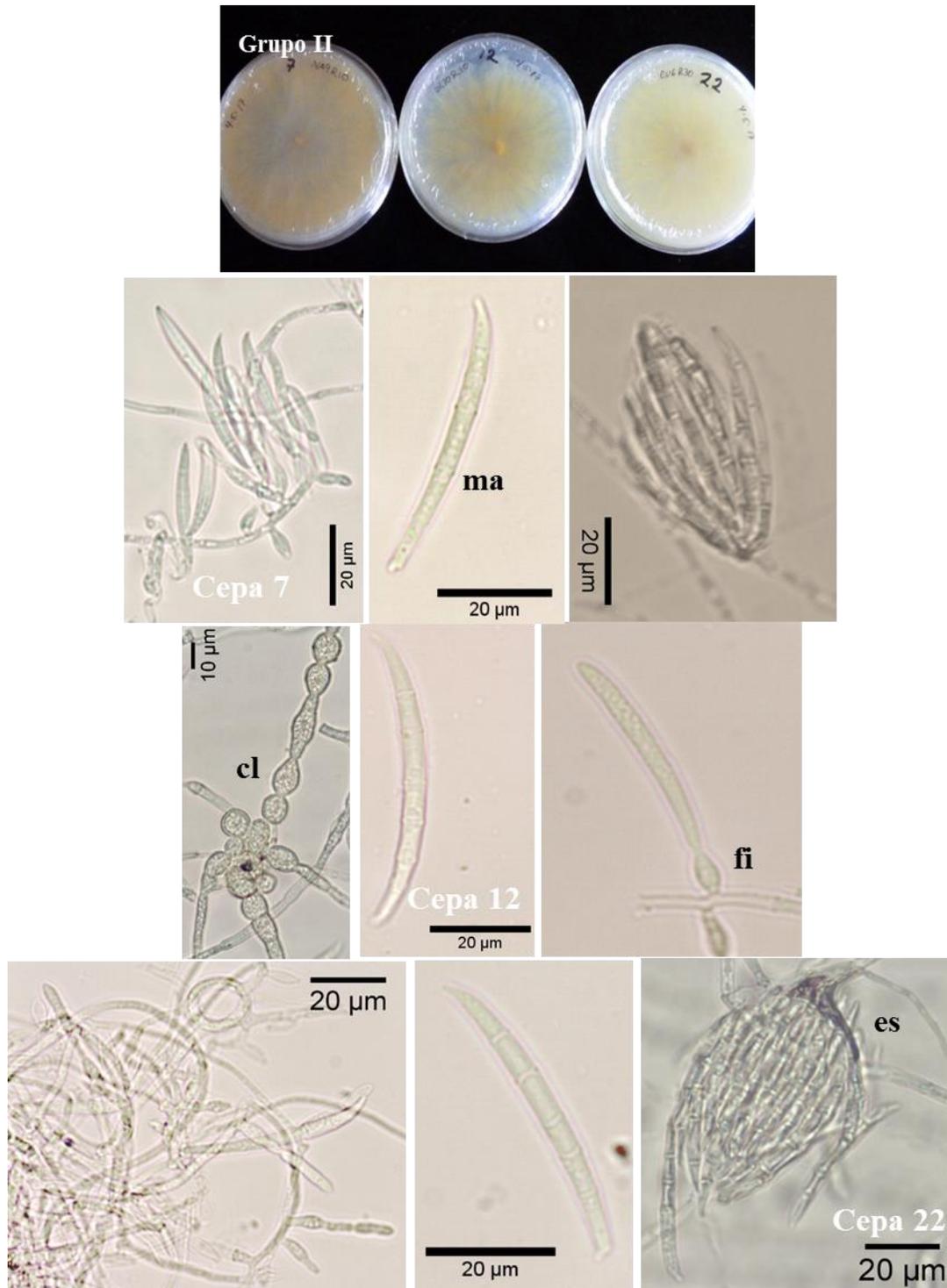
En la Figura 1.1 se presentan los cuatro grupos representativos en los que se agruparon algunas de las cepas seleccionadas: Grupo I, con color naranja pálido solo en el centro de la colonia, el resto hialino (cepa CU1R30); Grupo II, con color naranja tenue tanto en el centro como en el resto de la colonia (cepas NA9R10, SL10R10 y CU6R30); Grupo III, con color naranja toda la colonia pero con centro naranja-cobrizo (cepas NA8R20, SL3R21, SLR22 y SL3R23); y, Grupo IV, con color naranja-cobrizo toda la colonia (cepas NA5R20 y SL3R24). Cuando las cepas se crecieron en el medio agar, hoja de clavel (AHC), el micelio se encontró también con color pero en este caso se observó rojizo y con variación en su intensidad dependiendo de la cepa. Al organizarse por el color rojizo las cepas mantuvieron su posición en el grupo al que se les había asignado con el color naranja en PDA (Figura 1.1). Se observó que la esporulación de las cepas en AHC fue mayor que la registrada en PDA; solamente en AHC, las cepas registraron formación de esporodoquios, los cuales presentaron macroconidios de forma y tamaño similar (Figuras 1.2).



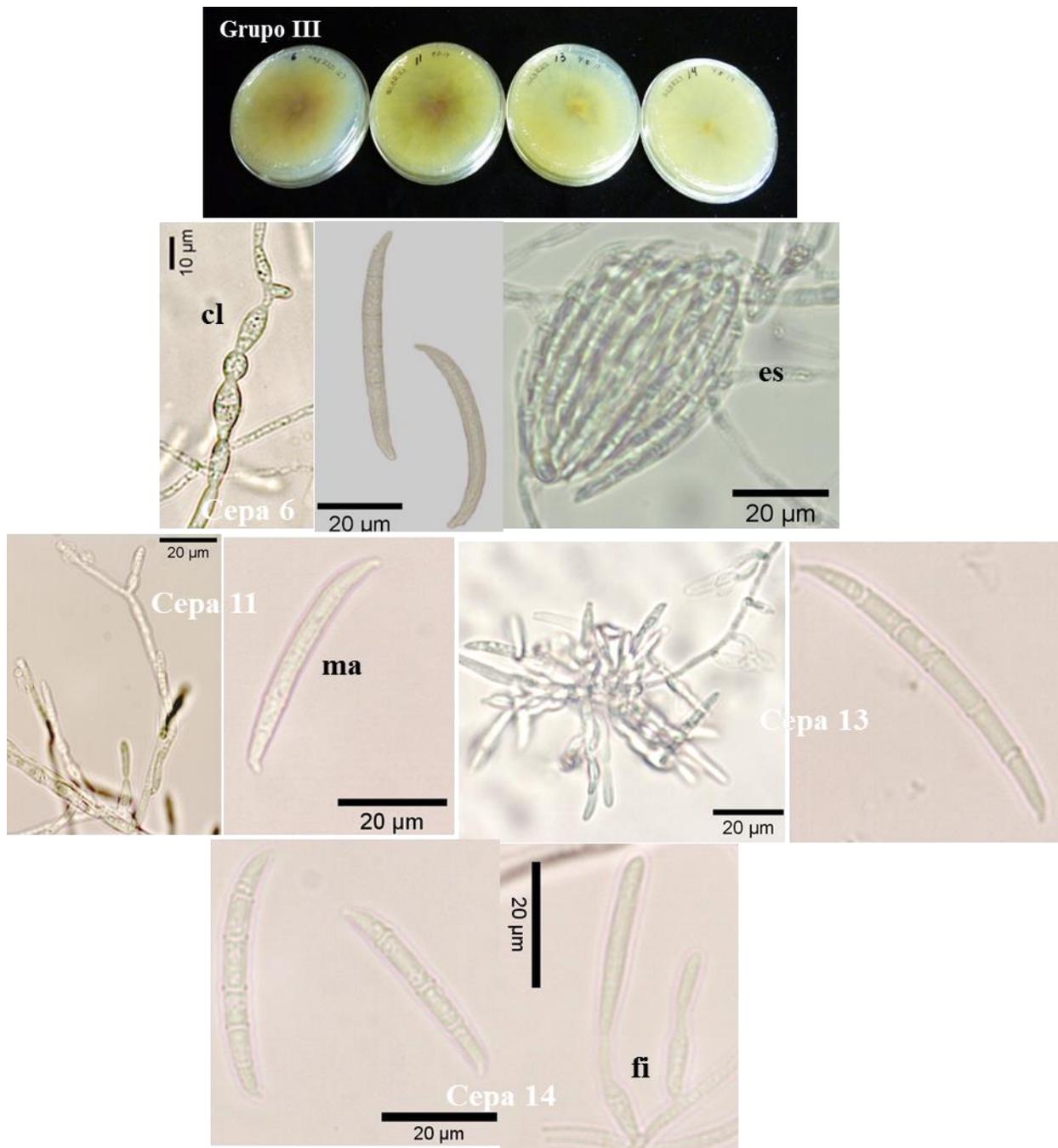
**Figura 1.1.** Grupos representativos organizados por color de micelio y del centro de la colonia de cepas representativas de *F. graminearum*. Grupo I, con color pálido solo en el centro de la colonia, el resto hialino; Grupo II, con color tenue tanto en el centro como en el resto de la colonia; Grupo III, con color toda la colonia pero más intenso en el centro de la colonia; y, Grupo IV, con color intenso toda la colonia **A)** Con color rojizo: cepas CU1R30 (21), SL10R10 (12), SL3R22 (13) y SL3R24 (15) de 15 días de crecimiento en medio AHC. **B)** Con color naranja: cepas CU1R30 (21), SL10R10 (12), NA8R20 (6) y NA5R20 (5) de 7 días de crecimiento en PDA.



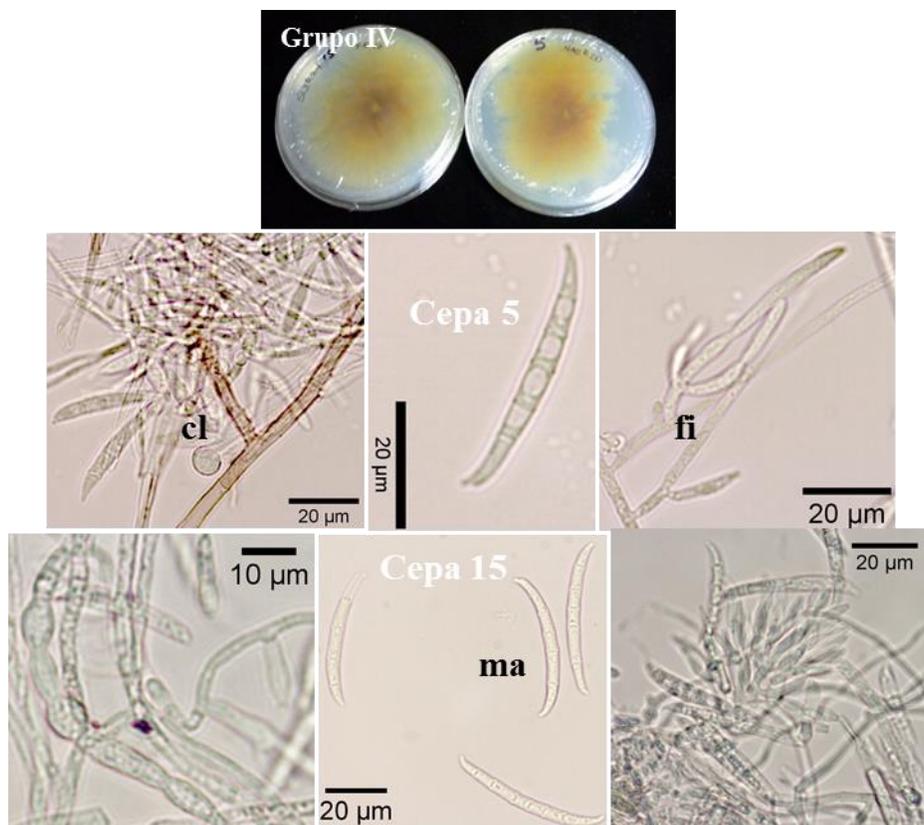
**Figura 1.2.** Grupo I. Características de centro color naranja pálido de colonia de cepa CU1R30 (21) de *F. graminearum* de 7 días de crecimiento en PDA. Abajo en horizontal se presentan las características morfológicas de fiálide (**fi**) y macroconidio (**ma**), de la cepa 21 de 15 días de crecimiento en AHC, al microscopio compuesto (10 x y 40x).



**Figura 1.3.** Grupo II. Características de centro color naranja tenue de colonia de cepas NA9R10 (7), SL10R10 (12) y CU6R30 (22) de *F. graminearum* de 7 días en PDA. Abajo en horizontal se presentan las características morfológicas de macroconidio (**ma**), clamidosporas (**cl**), fialide (**fi**) y esporoquicio (**es**), de dichas cepas de 15 días de crecimiento en AHC, al microscopio compuesto (40X).



**Figura 1.4.** Grupo III. Características de color naranja de la colonia, color intenso en el centro. Cepas NA8R20 (6), SL3R21 (11), SLR22 (13) y SL3R23 (14) de *F. graminearum* de 7 días de crecimiento en PDA. Abajo en horizontal se presentan las características morfológicas de macroconidio (**ma**), clamidosporas (**cl**), fiálide (**fi**) y esporodiquio (**es**), de dichas cepas de 15 días de crecimiento en AHC, al microscopio compuesto (40X).



**Figura 1.5.** Grupo IV. Características de color naranja intenso de micelio y centro de la colonia. Cepas NA5R20 (5) y SL3R24 (15) de *F. graminearum* de 7 días de crecimiento en PDA. Abajo en horizontal se presentan las características morfológicas de macroconidio (**ma**), clamidosporas y (**cl**), fialide (**fi**) de dichas cepas de 15 días de crecimiento en AHC, al microscopio compuesto (40X).

### ***Caracterización Molecular***

De 33 cepas identificadas morfológicamente como *F. graminearum*, 22 se confirmaron como tal por PCR con el iniciador específico FG16N (Nicholson *et al.*, 1998) (Cuadro 1.7). Estos resultados indican que las ocho cepas restantes (33 %) no corresponden a esta especie de *Fusarium*. Para confirmar dichos resultados, se estableció nuevamente la prueba con material genético de las 33 cepas anteriores más el material de las cepas JA1 (34), HGO (35 y 36), TAMPS (37 y 38) y SL1 (39), bajo las mismas condiciones. En este caso nuevamente ocho

cepas no registraron amplificación aunque estas fueron diferentes a las que no amplificaron en la primera reacción. Es decir se registró nuevamente un 33 % de cepas sin confirmar (Cuadro 1.7). Sin embargo, las cepas que no se confirmaron fueron diferentes a las de la primera reacción de PCR que se estableció. Por lo anterior, estos resultados indican que la no visualización de la banda esperada (280 pb) para dichas cepas pudiera estar más bien relacionada con una baja concentración del material amplificado (Nicholson et al., 1998; Bertechini et al., 2012). Con excepción de la cepa CEN3 (28), las 38 cepas se confirman en este estudio como *F. graminearum*. La consistencia del resultado de no amplificación con el material de la cepa 28 indica que esta cepa pudiera corresponder a otra especie de *Fusarium* relacionada con *F. graminearum* como lo es *F. culmorum* o *F. crookwellense*, especies también reportadas como patógenas de cereales (Miller et al., 1991). (Cuadro 1.7).

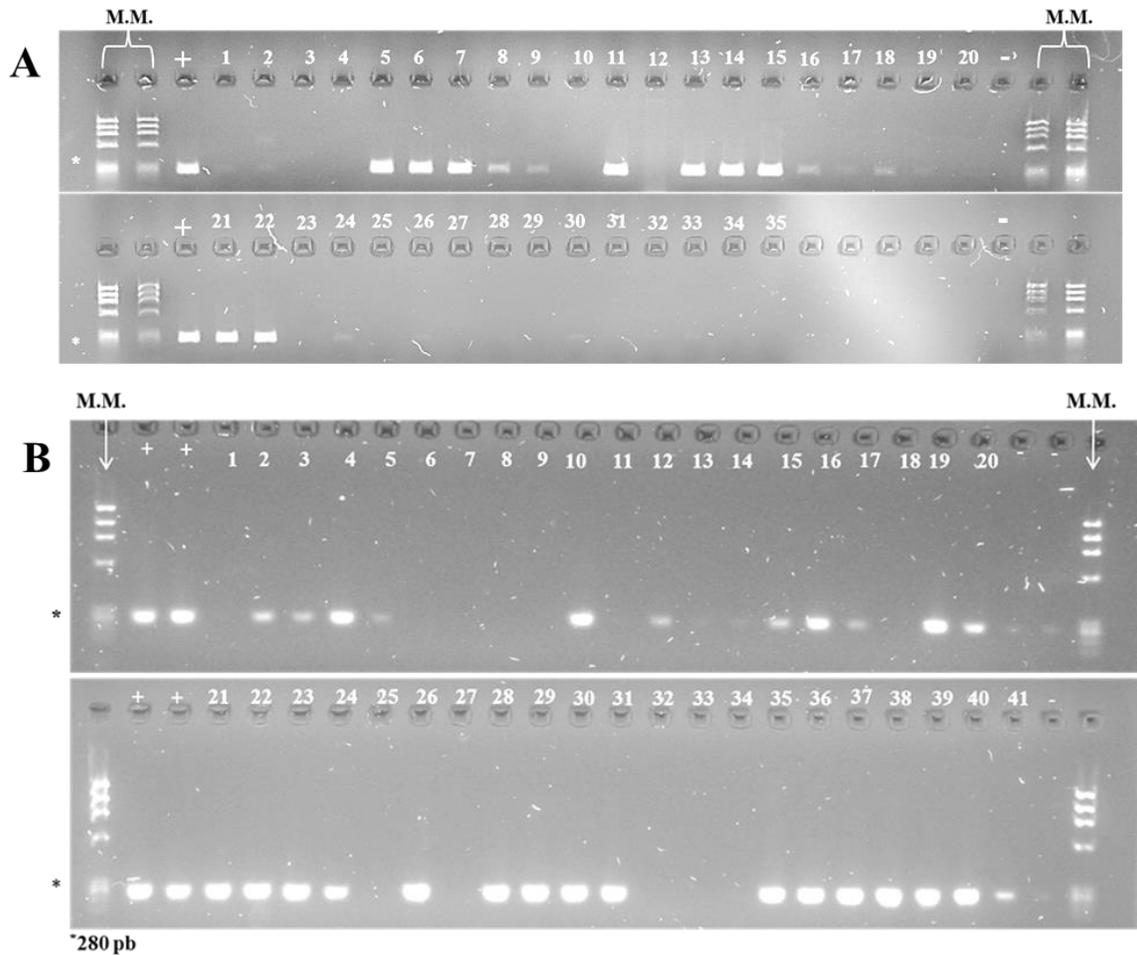
En la Figura 1.6 se muestran los productos amplificados con el iniciador especie-especifico FG16N; y en la Figura 2.2, los obtenidos con el iniciador ToxP para la toxina DON.

**Cuadro 1.7.** Número de cepa, clave y resultado de amplificación por PCR con el iniciador FG16N de material genético de las cepas de *F. graminearum*.

No. Cepa	Clave cepa	FG16N F/R	
		Sep-16 <sup>†</sup>	Nov -16 <sup>‡</sup>
1	AL5R10	+	-
2	AL6R32	+	+
3	AL9R32	-	+
4	NA0R20	-	+
5	NA5R20	+	+
6	NA8R20	+	-
7	NA9R10	+	-
8	NA11R30	+	-
9	NA16R10	+	-
10	NA16R20	-	+
11	SL3R21	+	-
12	SL10R10	-	+
13	SL3R22	+	+
14	SL3R23	+	+
15	SL3R24	+	+
16	SL6R10	+	+
17	SL8R10	+	+
18	SL4R10	+	-
19	SL5R30	+	+
20	CU0R10	-	+
21	CU1R30	+	+
22	CU6R30	+	+
23	CU13R10	-	+
24	CU9R11E	+	+
25	CU8R36E	-	+
26	CEN1	+	-
27	CEN2	-	+
28	CEN3	-	-
29	CEN4	-	+
30	CEN8	+	+
31	CEN9	-	+
32	CEE1	+	+
33	CEFS31	+	-
34	JA1		-
35	HGO1		-
36	HGO2		+
37	TAMPS1		+
38	TAMPS2		+
39	SL1		+

+ = Amplificación de banda esperada. - = sin amplificación de banda.

†‡= Fechas en las que se estableció la prueba: septiembre y noviembre de 2016.



**Figura 1.6** Productos de amplificación con el iniciador FG16N. **A)** Productos obtenidos en septiembre de 2016: columnas 1, 2 y 3 para cepas de Hidalgo; de la 4 a la 10 para las de Tlaxcala.; de la 11 a la 19 para las del Estado de México; de la 20 a la 25 de Puebla.; y de la 26 a la 33 de Guanajuato. Los productos de 34 y 35 corresponden a las cepas 10 y 18. **B)** Productos obtenidos en noviembre de 2016 para las cepas indicadas anteriormente y para las cepas: 34 de Jalisco, 35 y 36 de Hidalgo, 37 y 38 de Tamaulipas y 39 de México. Los productos 40 y 41 corresponden a dos cepas aisladas de espigas de cebada inoculadas en invernadero (primavera 2016) con coctel de cuatro cepas de *F. graminearum* proporcionadas por CIMMYT. + = Control positivo (material de cepas de *F. graminearum* proporcionadas por CIMMYT). - = Control negativo (agua). Marcador molecular (M.M.) ØX174.

**Cuadro 1.8.** Comparación de la secuencia de 20 cepas de *F. graminearum* en la base de datos del Gene Bank.

No. de Cepa	Clave de cepa	Identidad (%)	Gene
2	AL6R32	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
5	NA5R20	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
10	NA16R20	97	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
12	SL10R10	96	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
14	SL3R23	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
15	SL3R24	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
16	SL6R10	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
17	SL8R10	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
19	SL5R30	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
20	CU0R10	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
21	CU1R30	97	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
22	CU6R30	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
24	CU9R11E	97	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
27	CEN2	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
30	CEN8	99	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
32	CEE1	99	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
34	JA1	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
36	HGO2	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
37	TAMPS1	98	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome
38	TAMPS2	97	<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 1, complete genome

## CONCLUSIONES

- *Fusarium graminearum* se encontró presente en las principales regiones productoras de cebada maltera de Valles Altos y Bajío.
- Se encontró diversidad entre las cepas aisladas del hongo; diversidad que se manifestó por las diferencias del color naranja por el crecimiento del hongo en PDA.
- De 39 cepas identificadas morfológicamente como *F. graminearum*, 38 se confirmaron como tal por PCR con el iniciador específico FG16N; la cepa CEN3 (28), no confirmada con este iniciador, pudiera corresponde a otra especie de *Fusarium*.

En este estudio se confirma la hipótesis de que existe diversidad entre los aislamientos de *F. graminearum*, obtenidos de semilla de cebada maltera colectada en diferentes regiones productoras de México.

## **CAPITULO II. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE DEOXINIVALENOL PRODUCIDOS POR CEPAS DE *F. graminearum* AISLADAS DE CEBADA MALTERA**

### **RESUMEN**

Con la finalidad de generar información sobre el quimiotipo de *F. graminearum* presente en las principales regiones productoras de cebada maltera en México, se caracterizaron 33 aislamientos de acuerdo a su capacidad de producir deoxinivalenol (DON). Los aislamientos se aislaron de semilla de cebada maltera, infectada naturalmente, colectada durante los ciclos primavera-verano 2014 y otoño-invierno 2014-2015 y 2015-2016, en: Hidalgo (cinco cepas), Tlaxcala (siete cepas), Edo de México (10 cepas), Puebla (seis cepas) y Guanajuato (ocho cepas). Las cepas se diferenciaron por su capacidad de producir DON cuando se analizaron por la prueba ELISA RIDASCREEN®FAST DON. Las cepas SL3R23, del Estado de México, y CU1R30, de Puebla, destacaron por su alta producción de DON con 9.2 y 16.9 ppm, respectivamente. El resto de las cepas registró, en promedio, los valores siguientes: 24 cepas, 0 -  $\leq$  1 ppm; y siete cepas, entre 1 y 5 ppm. El quimiotipo se evaluó considerando la amplificación con el iniciador ToxP (banda esperada 300 pb) por PCR. El análisis de resultados indicó variación entre las cepas de una misma localidad y entre localidades. Cuatro de siete cepas de Tlaxcala resultaron DON positivas; similarmente, seis de 10 cepas del Edo de México y dos de seis cepas de Puebla, fueron DON positivas. Ninguna cepa de Hidalgo ni de Guanajuato resultó positiva al fragmento del quimiotipo DON. La presencia de cepas de *F. graminearum*, quimiotipo DON, representa un riesgo potencial para la producción de grano de cebada maltera.

**Palabras clave:** *Fusarium graminearum*, deoxinivalenol, ELISA, iniciador ToxP

**DETECTION AND QUANTIFICATION OF THE LEVELS OF  
DEOXYNIVALENOL PRODUCED BY CEPAS DE *F. graminearum* ISOLATED  
FROM MALTING BARLEY**

**ABSTRACT**

In order to generate information on the chemotype of *F. graminearum* present in the main producing regions of malting barley in Mexico, 33 isolates were characterized according to their capacity to produce deoxynivalenol (DON). Isolates were isolated from malting barley naturally infected seed, collected during the spring-summer 2014 and fall-winter 2014-2015 and 2015-2016 cycles in: Hidalgo (five strains), Tlaxcala (seven strains), Edo de México (10 strains), Puebla (six strains) and Guanajuato (eight strains). The strains were differentiated by their ability to produce DON when analyzed with the RIDASCREEN®FAST DON ELISA test. Strains SL3R23, from the State of Mexico, and CU1R30, from Puebla, stood out for their high production of DON with 9.2 and 16.9 ppm, respectively. The rest of the strains registered, on average, the following values: 24 strains,  $0 \leq 1$  ppm; and seven strains, between 1 and 5 ppm. The chemotype was evaluated considering the amplification with the ToxP primer (expected band 300 bp) by PCR. The analysis of results indicated variation between the strains of the same locality and between localities. Four of seven strains of Tlaxcala were DON positive; similarly, six of 10 strains of the Edo of Mexico and two of six strains of Puebla were DON positive. No strain from Hidalgo or Guanajuato was positive for the fragment of the DON chemotype. The presence of strains of *F. graminearum*, DON chemotype, represents a potential risk for the production of malting barley grain.

**Key words:** *Fusarium graminearum*, deoxynivalenol, ELISA, primer ToxP

## INTRODUCCIÓN

### *Micotoxinas producidas por F. graminearum*

Las especies del género *Fusarium* se caracterizan por producir diversas toxinas. Las toxinas son metabolitos secundarios, de bajo peso molecular, relacionadas con la capacidad del hongo de infectar, colonizar e inducir síntomas en su hospedante (Gunupuru et al., 2017). Entre las toxinas producidas por *Fusarium* relacionadas con la virulencia del hongo destacan, por su importancia sanitaria, el deoxinivalenol (DON), y el nivalenol (NIV) y sus derivados, pertenecientes al grupo de los tricotecenos (Logrieco et al., 2002). Estas micotoxinas también se han reportado como fuertes inhibidores de la síntesis de proteínas de las células eucarióticas (McLaughlin et al., 1977).

La identificación del quimiotipo de los aislamientos de *F. graminearum* es de importancia en la clasificación de los mismos por representar un riesgo potencial para la producción de granos en la industria de los alimentos. En el Cuadro 2.1 se ilustran los principales quimiotipos de *F. graminearum* reportados en la literatura.

### *Deoxinivalenol como factor de virulencia*

Estudios llevados a cabo por Bai et al., (2001) con la cepa GZT4 de *F. graminearum*, no productora de DON, y obtenida por mutación del gen *Tri5* (sintasa trichodieno) de la cepa GZ3639, mostraron que DON juega un papel importante en la dispersión de la fusariosis en la espiga de trigo y en consecuencia en la virulencia del hongo. En contraste Mesterházy (2002) reporta que DON es un factor de agresividad y que el nivel de producción de esta toxina está relacionado con la resistencia del hospedante.

**Cuadro 2. 1.** Quimotipos de *F. graminearum*<sup>†</sup> reportados de acuerdo a la literatura.

Origen de cepa	Quimiotipo	Referencia
China,	IA-3-acetil DON	Miller et al., 1991
México y Norte América	IB- 15-acetil DON	Miller et al., 1991
China	DON	Li et al., 2005
	NIV	
México	15-acetil-DON	Malhipour et al., 2012
Turquía	15-acetil-DON	Mert-Türk et. al., 2014
Canadá	3-acetil-DON	van der Lee et al., 2015
Uruguay	15-acetil-DON	
México	15-acetil-DON	Cerón-Bustamante et al., 2018
Rumania	DON	Bozac et al., 2016
	15-Acetil DON	
	NIV	
	NIV-DON	

<sup>†</sup> Trátase de *F. graminearum* en *sensu stricto* o *sensu lato*.

Por su parte Malhipour et al., (2012) reportaron diferencias en la agresividad de aislamientos de *F. graminearum sensu stricto* del clan de *F. graminearum* y *F. crookwellense*. Estos investigadores observaron que los aislamientos correspondientes al tipo 15-ADON (deoxinivaleno, 15-acetil) del quimiotipo DON de *F. graminearum* fueron más agresivos que los del quimiotipo productor de NIV de *F. crookwellense* e indicaron que la severidad de la fusariosis de la espiga en cultivares y líneas de trigo fue mayor cuando las plantas se inocularon con los aislamientos productores de 15-ADON. Similarmente, Mert-Türk et al.

(2014), en un estudio llevado a cabo en condiciones de campo con plantas del cultivar de trigo Gömen, susceptible a la fusariosis, registraron alto índice de severidad de la enfermedad ( $P=0.05$ ) cuando inocularon las plantas con 17 aislamientos de *F. graminearum* del tipo 15-ADON. Aunque estos investigadores encontraron diferencias en agresividad entre aislamientos, agresividad, estimada como severidad de la enfermedad o peso de mil granos. Para cumplir con los objetivos de este estudio se tomará lo indicado por Bos y Parleviet (1995) respecto a que el término virulencia es el que está relacionado con la capacidad relativa de un patógeno para causar síntomas en su hospedante.

Cabe señalar que el deoxinivalenol (DON) es una micotoxina producida no solo por *F. graminearum* sino también por algunas otras especies de *Fusarium* como *F. culmorum* (Chrpová *et al.*, 2011). La micotoxina DON es soluble en agua y termoestable. Méndez-Albores y Moreno-Martínez (2009) reportaron que DON resiste temperaturas de hasta 180 °C.

Actualmente se carece de información básica relevante sobre el o los quimiotipos de los aislamientos de *F. graminearum* presentes en las principales regiones productoras de cebada maltera en México. Si presentes, se desconoce su quimiotipo y los niveles de producción. Contar con dicha información no solo es relevante para caracterizar los aislamientos de una región dada, en términos de su virulencia y de su potencial patogénico, sino también, para estudios de selección de aquellos aislamientos de *F. graminearum* con mayor capacidad de producción de micotoxina. Contar con aislamientos de mayor virulencia facilitará la identificación de fuentes de resistencia a la fusariosis de la espiga, en las líneas avanzadas de cebada maltera, del programa de cruzamientos para mejoramiento de líneas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CEVAMEX).

## **OBJETIVO**

Caracterizar 39 aislamientos de *F. graminearum*, aislados de semilla de cebada maltera, cosechada en diferentes estados de la República Mexicana, de acuerdo a su capacidad de producir la micotoxina deoxinivalenol (DON) por la prueba de ELISA RIDASCREEN®FAST DON, y de amplificar el fragmento del quimiotipo (DON) por PCR.

## **HIPÓTESIS**

Todos los aislamientos de *F. graminearum* corresponden al quimiotipo DON y tienen la misma capacidad de producir deoxinivalenol *in vitro*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El análisis de la producción de la micotoxina deoxinivalenol (DON) por la prueba de ELISA RIDASCREEN®FAST DON y la identificación molecular del quimiotipo DON por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de Trigo, del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), El Batán, Texcoco, México.

### ***Cepas de Fusarium graminearum***

Se evaluaron 33 cepas monospóricas de *F. graminearum* de 15 días de edad cultivadas en medio de papa-dextrosa agar (PDA, BD BIOXON®). Estas cepas se aislaron de semilla de cebada maltera cosechada en los ciclos de primavera-verano 2014 y otoño-invierno 2014-2015 y 2015-2016 en los estados siguientes: tres de Hidalgo; siete de Tlaxcala; nueve del Estado de México; seis de Puebla; y, ocho de Guanajuato (Cuadro 2.2). Después de su

aislamiento y purificación las cepas se conservaron en aceite mineral (Mier *et al.*, 2002) y en papel filtro Whatman #1 (Fong *et al.*, 2000).

### ***Establecimiento de la prueba ELISA RIDAS SCREEN® FAST DON***

La prueba RIDASCREEN® FAST DON (inmunoensayo enzimático (ELISA)) se estableció con muestras de harina (2 g) obtenidas de grano de arroz (SOS® Arroz Sushi, super extra) colonizado con el hongo, con placas, reactivos y protocolo, con algunas modificaciones, de RIDASCREEN® FAST DON.

*Preparación de muestra.*- En un matraz de 250 mL se colocaron 30 g de arroz grueso con 15 mL de agua destilada; después de 2 h, se esterilizó a 121 °C por 20 min. Discos de agar (4 mm) con crecimiento del hongo (cepa) se depositaron sobre el arroz y se incubó por 11 días a 24 °C, alternando 12 h luz blanca/luz amarilla (lámpara Philips 17W/Osram 75W) con 12 h de oscuridad. Transcurrida la incubación, los granos con crecimiento del hongo se vaciaron en tubos para centrifuga de 50 mL con fondo cónico (SARSTEDT) con tapas rosca perforadas y se mantuvieron a -80 °C por 2 h. Inmediatamente después se colocaron en un liofilizador (VirTis, benchtop K, Modelo 2KBTXL) por 4 día. Los granos infectados y deshidratados se molieron por 40 s en un molino Iwatani 200W (AC 100 V, 50-60 HZ Pushon. Japón) para obtener muestras homogéneas de harina contaminada.

**Cuadro 2.2.** Relación de cepas de *F. graminearum* aisladas de semilla de cebada maltera colectadas de diferentes regiones productoras, durante los ciclos agrícolas de 2014 a 2016.

<b>No. Cepa</b>	<b>Clave de cepa</b>	<b>Localidad</b>	<b>Estado</b>
1	AL5R10	Almoleya	Hidalgo
2	AL6R32	Almoleya	Hidalgo
3	AL9R32	Almoleya	Hidalgo
4	NA0R20	Nanacamilpa	Tlaxcala
5	NA5R20	Nanacamilpa	Tlaxcala
6	NA8R20	Nanacamilpa	Tlaxcala
7	NA9R10	Nanacamilpa	Tlaxcala
8	NA11R30	Nanacamilpa	Tlaxcala
9	NA16R10	Nanacamilpa	Tlaxcala
10	NA16R20	Nanacamilpa	Tlaxcala
11	SL3R21	Santa Lucia	México
12	SL10R10	Santa Lucia	México
13	SL3R22	Santa Lucia	México
14	SL3R23	Santa Lucia	México
15	SL3R24	Santa Lucia	México
16	SL6R10	Santa Lucia	México
17	SL8R10	Santa Lucia	México
18	SL4R10	Santa Lucia	México
19	SL5R30	Santa Lucia	México
20	CU0R10	Cuyoaco	Puebla
21	CU1R30	Cuyoaco	Puebla
22	CU6R30	Cuyoaco	Puebla
23	CU13R10	Cuyoaco	Puebla
24	CU9R11E	Cuyoaco	Puebla
25	CU8R36E	Cuyoaco	Puebla
26	CEN1	Celaya	Guanajuato
27	CEN2	Celaya	Guanajuato
28	CEN3	Celaya	Guanajuato
29	CEN4	Celaya	Guanajuato
30	CEN8	Celaya	Guanajuato
31	CEN9	Celaya	Guanajuato
32	CEE1	Celaya	Guanajuato
33	CEFS31	Celaya	Guanajuato

*Extracción.*- A un tubo para centrifuga de 50 mL con fondo cónico (SARSTEDT) con 2 g de harina se le agregaron 40 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente por 3 min en un agitador. De la suspensión obtenida, se tomó un mL, se depositó en un tubo Eppendorf® y se centrifugó a 13,000 rpm (MIKRO 220R Centrifuge) por 15 min para recuperar el sobrenadante (200 µL).

El sobrenadante acuoso (solución) de cada muestra (200 µL) se depositó en una placa de ELISA de acuerdo al diagrama de carga que se establecerá en la placa ELISA RIDASCREEN® FAST DON respetando los pocillos A1, B1, C1, D1 y E1 para los estándares 0, 0.222, 0.666, 2 y 6 ppm de deoxinivalenol, respectivamente (Figura 2.1). La placa se cubrió con papel aluminio y se mantuvo en refrigeración a 5 °C en cámara húmeda previo a la carga de las soluciones de las muestras en la placa ELISA RIDASCREEN® FAST DON.

#### ***Preparación de la placa ELISA RIDASCREEN® FAST DON***

Previo a la preparación de la placa con los anticuerpos de captura, los reactivos y la placa se sacaron del refrigerador y se mantuvieron a temperatura ambiente del laboratorio por aproximadamente 2 h. Durante ese tiempo se preparó el amortiguador de fosfatos 10 mM para el lavado de la placa, se prendió el equipo del lector de placas y se colocaron los accesorios requeridos en la mesa de trabajo: micropipetas monocanal y micropipeta multicanal de volumen variable (20-200 µL y 200-1000 µL), cronómetro, cuatro contenedores o charolas para el conjugado deoxinivalenol-peroxidasa (DON-E), anticuerpo anti-deoxinivalenol, substrato cromógeno y solución stop.

En la Figura 2.1 se muestra el diagrama de carga preestablecido de la placa ELISA RIDASCREEN® FAST DON. En general se siguió el procedimiento de carga del manual del kit con ajustes en el paso 4 sobre incubación y en el 6 de lavado.

1. Se agregaron 50  $\mu$ L de cada uno de los estándares iniciando con el estándar 0 (S1) seguido de los estándares 0.222 (S2), 0.666 (S3) y 2 (S4), y finalizando con el estándar 6 (S5) ppm de deoxinivalenol con la micropipeta monocanal.
2. Se agregaron 50  $\mu$ L de cada una de las muestras de las soluciones. Estas se depositaron por duplicado: para la repetición 1, a partir del pocillo F1 al F5; y del pocillo G5 al G9 para la repetición 2.
3. Se adicionaron 50  $\mu$ L del conjugado deoxinivalenol-enzima (tapón rojo) a los pocillos correspondientes. Se utilizó la micropipeta multicanal y las mismas puntas para colocar el conjugado evitando tocar la solución de los estándares y las muestras. La placa se agitó levemente sobre la mesa.
4. Se depositaron 50  $\mu$ L de anticuerpo anti-deoxinivalenol (tapón negro) a cada pozo, se mezcló e incubó en oscuridad (modificación a protocolo que no lo indica) a temperatura ambiente por 5 min.
5. Se vació el contenido de la placa y golpeó fuertemente (tres veces seguidas) el marco portapozos sobre varias hojas de papel absorbente limpio.
6. Se lavó la placa vertiendo 300  $\mu$ L del amortiguador de lavado por pozo con una micropipeta multicanal (Thermo Scientific). Entre cada lavado la placa se sacudió con fuerza sobre papel absorbente para eliminar restos de líquidos y burbujas. Este paso se repitió tres veces más (el protocolo indica solo dos veces).

7. En el intervalo de los 3 min siguientes se agregaron 100  $\mu$ L de sustrato/cromógeno (tapón marrón) a cada pozo, se mezcló el contenido, agitando suavemente la placa sobre la mesa, y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente.
8. Transcurridos los 3 min, inmediatamente se depositaron 100  $\mu$ L de la solución stop (tapón amarillo) a cada pocillo, mezclando suavemente el contenido de la placa, y se midió la absorción a 450 nm en un lector de placas de ELISA (LABOMED INC. EMR-500). Este último paso se hizo durante los siguientes 10 min.
9. Para la evaluación y análisis de los resultados se utilizó el programa RIDAWIN.EXE Ver. 1.77.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	4	12	20	28	3	11	19	27			
B	S2	5	13	21	29	4	12	20	28			
C	S3	6	14	22	30	5	13	21	29			
D	S4	7	15	23	31	6	14	22	30			
E	S5	8	16	24	32	7	15	23	31			
F	1	9	17	25	33	8	16	24	32			
G	2	10	18	26	1	9	17	25	33			
H	3	11	19	27	2	10	18	26				

**Figura 2.1.** Diagrama de carga para la placa ELISA RIDASCREEN® FAST DON con los estándares marcados en los pozos de A1 a E1 y las soluciones de las muestras en los pozos de F1 a F5, primera repetición; y de G5 a G9, para la segunda.

### ***PCR para confirmación de quimiotipo DON***

Con la finalidad de identificar molecularmente el quimiotipo de deoxinivalenol (DON) entre las 33 cepas, se estableció una reacción de PCR con material genético de cultivos monospóricos y con el par de iniciadores ToxP1 (5'-GCCGTGGGGRTAAAAGTCAAA-3') y ToxP2 (5'-TGACAAGTCCGGTCGCACTAGCA-3') los cuales amplifican una banda esperada de 300 pb (Li et al., 2005).

Para la amplificación se tomaron muestras de suspensiones de DNA de cada una de las cepas mantenidas en tubos Eppendorf® en refrigeración. La concentración de las muestras se encontró en el intervalo de 5 a 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADN. Cada reacción de PCR tuvo un volumen final de 12  $\mu\text{L}$  con la formulación descrita en el Cuadro 2.3. Las condiciones establecidas para la reacción fueron las que se describen en el Cuadro 2.4.

### ***Electroforesis***

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 %, se tiñó con EnviroSafe DNA stain, y se visualizó en un fotodocumentador UVP. Como referencia para ubicar el producto esperado de 300 pb en el gel se incluyó el marcador molecular  $\Phi\text{X174}$  ( $\Phi\text{X174}$ ) /Hae III (Fermentas y BioLabs, respectivamente). Los productos se visualizaron en un fotodocumentador UVP.

**Cuadro 2.3.** Reactivos empleados para la reacción de PCR en la identificación de las cepas de *F. graminearum* productoras de toxina DON.

Reactivo	Concentración	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
RedTaq® ReadyMix®	2x	6.0
ToxP1 F	500 nM	0.6
Tox P2 R	500 nM	0.6
Agua		3.8
DNA	5 -50 ng $\mu\text{L}^{-1}$	1.0

**Cuadro 2.4.** Condiciones establecidas para la reacción de PCR con el iniciador ToxP.

Condición	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	10 min
<i>40 ciclos:</i>		
Desnaturalización	95	30 seg
Alineación	65	60 seg
Extensión	72	72 seg
Extensión final	72	10 min
Conservación DNA	4	

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del análisis de la producción de la micotoxina deoxivalenol (DON), por la prueba de ELISA RIDASCREEN®FAST DON, y de la identificación molecular del quimiotipo DON por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), con las 33 cepas de *F. graminearum*, aisladas de semilla de cebada maltera, durante los ciclos de 2014 a 2016, se presentan a continuación.

### ***Producción de deoxinivalenol (DON).***

La evaluación y el análisis de los resultados con el software RIDA®SOFT Win mostró diferencias en la capacidad de las 33 cepas de *F. graminearum* para producir la toxina DON. Solamente las cepas número 5, 6 y 7 (clave NA), 11, 12, 13, 14 y 15 (clave SL), 21 y 22 (clave CU) resultaron positivas a la producción de DON con niveles de 1 a 17 pp (Cuadro 2.5).

El nivel de las 24 cepas (73 %) restantes se encontró por debajo de los límites de detección (0.2 ppm/Kg) y cuantificación (0.36 ppm/Kg) para avena. De entre las cepas destacan por su capacidad de producción la cepa 14 (SL3R23) con 9.2 ppm y la 21 (CU1R30) con 17 ppm, aisladas de semilla cultivada en el Estado de México y Puebla, respectivamente (Cuadro 2.5). Estos resultados indican que la mayoría de los aislamientos que se encuentran en los estados de la región de Valles Altos son no productoras o de muy baja producción de toxina DON. Considerando la falta de información en la literatura sobre alguna escala de clasificación de cepas de *Fusarium* de acuerdo a su nivel de producción de toxina, con fines prácticos y de selección, en este estudio se elaboró la siguiente escala cualitativa para clasificar a las cepas: No productoras ( $0 - \leq 1$  ppm), 24 cepas; de muy baja producción (1-5 ppm), siete cepas; de baja producción (de 6 a 10 ppm) una cepa; y de mediana producción (11-17 ppm), una cepa. Al hacer los análisis estadísticos se encontró diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.01$ ) entre las cepas pero no entre localidades; y al hacer la comparación de medias por el método de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), se detectaron tres grupos como se indica en el Cuadro 2.6.

**Cuadro 2.5.** Niveles en ppm de DON producidos por las cepas de *F. graminearum*, aisladas de la región de Valles Altos de 2014 a 2016.

No.	Cepa <sup>†</sup>	R1 <sup>‡</sup>	R2	Media	No.	Cepa	RI	R2	Media
1	AL5R10	0.0	0.1	0.05 <sup>‡</sup>	18	SL4R10	0.0	0.0	0.02
2	AL6R32	0.0	0.0	0.02	19	SL5R30	0.0	0.2	0.13
3	AL9R32	0.0	0.0	0.02	20	CU0R10	0.0	0.0	0.00
4	NA0R20	0.0	0.0	0.02	21	CU1R30	11.3	22.6	16.95
5	NA5R20	1.5	1.7	1.60	22	CU6R30	3.6	3.6	3.60
6	NA8R20	2.4	2.7	2.55	23	CU13R10	0.0	0.2	0.11
7	NA9R10	2.9	2.8	2.85	24	CU9R11E	0.0	0.0	0.02
8	NA11R30	0.0	0.1	0.06	25	CU8R36E	0.0	0.0	0.03
9	NA16R10	0.0	0.0	0.04	26	CEN1	0.0	0.0	0.02
10	NA16R20	0.1	0.0	0.05	27	CEN2	0.0	0.0	0.00
11	SL3R21	2.3	2.2	2.25	28	CEN3	0.0	0.0	0.05
12	SL10R10	3.5	3.3	3.40	29	CEN4	0.2	0.0	0.12
13	SL3R22	1.0	0.9	0.93	30	CEN8	0.0	0.0	0.01
14	SL3R23	9.9	8.5	9.20	31	CEN9	0.0	0.0	0.04
15	SL3R24	5.8	4.1	4.95	32	CEE1	0.1	0.0	0.07
16	SL6R10	0.0	0.0	0.01	33	CEFS31	0.1	0.0	0.04
17	SL8R10	0.0	0.0	0.00					

<sup>†</sup>Cepas de: Hidalgo (AL), Tlaxcala (NA), México (SL) y Puebla (CU). RI, R2= repetición

<sup>‡</sup>Límite detección= 0.2 ppm/Kg; límite cuantificación= 0.36 ppm/Kg para avena.

### ***Identificación molecular del quimiotipo DON por PCR***

De 39 cepas analizadas, 17 cepas (44 %) amplificaron la banda esperada de 300 pb con el iniciador ToxP (Cuadro 2.7). El número de cepas que amplificaron para DON por localidad es: 4 de 7 cepas de Tlaxcala (cepas clave NA), 6 de 10 del Estado de México (cepas clave SL), 2 de 6 de Puebla (cepas clave CU), 2 de 5 de Hidalgo (claves HGO, AL), 1 de Jalisco (JA) y 2 de Tamaulipas (TAMPS). Estos resultados indican que dichas cepas corresponden al quimiotipo deoxinivalenol (DON) (Li et al., 2005) (Cuadro 2.7). También indican que hay variación en el genotipo para la producción de DON entre las cepas de una misma localidad y entre localidades (Cuadro 2.7, Figura 2.2). Entre las cepas (56%) que no amplificaron dicha banda se encuentra la cepa 28 (CEN3), la cual tampoco amplificó con el iniciador FGN16 para la confirmación de la especie. Confirmando con esto que la cepa CEN3 pudiera corresponder a una especie diferente a *F. graminearum*.

En contraste ninguna cepa de Guanajuato (cepas clave CE) amplificó dicha banda. Es posible que las cepas que no amplificaron la banda de 300 pb puedan corresponder a cualquiera de los quimiotipos de nivalenol (NIV), 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON) o 15-acetildeoxinivalenol (15-AcDON) (Bozac et al. 2016).

Por su capacidad de producir los mayores niveles de DON, las cepas de *F. graminearum*: CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30, aisladas de semilla de cebada maltera, se seleccionaron para formar la mezcla de cinco cepas a utilizarse en la prueba de identificación de fuentes de resistencia a la fusariosis en las líneas avanzadas de cebada maltera del programa del INIFAP, en condiciones de invernadero, durante el ciclo invierno-primavera 2017 (ver capítulo IV).

**Cuadro 2.6.** Comparación de valores medios de los niveles DON producidos por las cepas de *F. graminearum* aisladas de semilla de cebada maltera.

Cepa	Nivel de producción (ppm)	Cepa	Nivel de producción (ppm)
CU1R30	17.0a*	NA16R20	0.1c
SL3R23	9.2b	AL6R32	0.0c
SL3R24	5.0bc	CU8R36E	0.0c
CU6R30	3.6bc	NA0R20	0.0c
SL10R10	3.4bc	NA16R10	0.0c
NA9R10	2.9c	CEN1	0.0c
NA8R20	2.6c	CEN3	0.0c
SL3R21	2.3c	AL9R32	0.0c
NA5R20	1.6c	CEN8	0.0c
SL3R22	1.0c	CEN9	0.0c
CEN4	0.1c	CU0R10	0.0c
CU13R10	0.1c	CU9R11E	0.0c
SL5R30	0.1c	SL4R10	0.0c
CEE1	0.1c	CEN2	0.0c
AL5R10	0.1c	SL6R10	0.0c
NA11R30	0.1c	SL8R10	0.0c
CEFS31	0.1c		

\* Medias por columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes. Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

‡ Límite detección= 0.2 ppm/Kg; límite cuantificación= 0.36 ppm/Kg para avena.

Por su capacidad de producir los mayores niveles de DON, las cepas de *F. graminearum*: CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30, aisladas de semilla de cebada maltera, se seleccionaron para formar la mezcla de cinco cepas a utilizarse en la prueba de identificación de fuentes de resistencia a la fusariosis en las líneas avanzadas de cebada maltera del programa del INIFAP, en condiciones de invernadero, durante el ciclo invierno-primavera 2017 (ver capítulo IV).

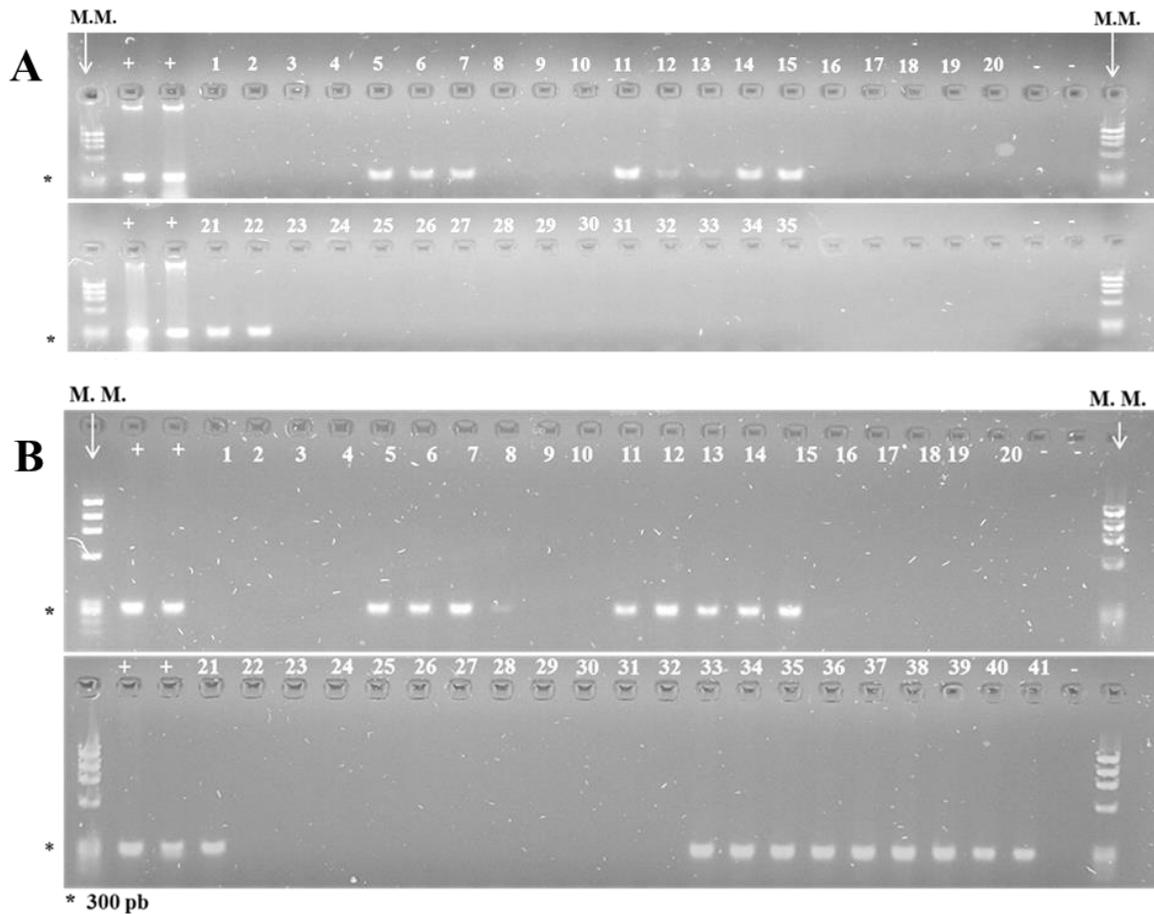
**Cuadro 2.7.** Caracterización de cepas de *F. graminearum* de acuerdo a la amplificación del fragmento del quimiotipo deoxinivalenol (DON) y producción de DON *in vitro*.

No. Cepa	Clave cepa	ToxP		Contenido DON (ppm)
		sep-16	nov-16	
1	AL5R10	-	-	0.1
2	AL6R32	-	-	0
3	AL9R32	-	-	0
4	NA0R20	-	-	0
5	NA5R20	+	+	1.6
6	NA8R20	+	+	2.6
7	NA9R10	+	+	2.9
8	NA11R30	-	+	0.1
9	NA16R10	-	-	0
10	NA16R20	-	-	0.1
11	SL3R21	+	+	2.3
12	SL10R10	+	+	3.4
13	SL3R22	+	+	1
14	SL3R23	+	+	9.2
15	SL3R24	+	+	5
16	SL6R10	-	-	0
17	SL8R10	-	-	0
18	SL4R10	-	-	0
19	SL5R30	-	-	0.1
20	CU0R10	-	-	0
21	CU1R30	+	+	17
22	CU6R30	+	+	3.6
23	CU13R10	-	-	0.1
24	CU9R11E	-	-	0
25	CU8R36E	-	-	0
26	CEN1	-	-	0
27	CEN2	-	-	0
28	CEN3	-	-	0
29	CEN4	-	-	0.1
30	CEN8	-	-	0
31	CEN9	-	-	0
32	CEE1	-	-	0.1
33	CEFS31	-	-	0.1
34	JA1		+	nd
35	HGO1		+	nd
36	HGO2		+	nd
37	TAMPS1		+	nd
38	TAMPS2		+	nd
39	SL1		+	nd

+ = Amplificación de banda esperada (300 pb). - = sin amplificación de banda.

†‡= Fechas en las que se estableció la prueba: septiembre y noviembre de 2016.

nd= no se determinó



**Figura 2.2.** Productos de amplificación con el iniciador ToxP. **A)** Productos obtenidos en septiembre de 2016 para las cepas 1, 2 y 3 de Hidalgo; de la 4 a la 10 de Tlaxcala.; de la 11 a la 19 del Estado de México; de la 20 a la 25 de Puebla.; y de la 26 a la 33 de Guanajuato. Los productos de 34 y 35 corresponden también a las cepas 10 y 18. **B)** Productos obtenidos en noviembre de 2016 para las cepas indicadas anteriormente y para las cepas 34 de Jalisco, 35 y 36 de Hidalgo, 37 y 38 de Tamaulipas y 39 de México. Los productos 40 y 41 corresponden a dos cepas aisladas de espigas inoculadas en invernadero (primavera 2016) con coctel de cuatro cepas de *F. graminearum* proporcionadas por CIMMYT. += Control positivo (material de cepas de *F. graminearum* proporcionadas por CIMMYT). - = Control negativo (agua). Marcador molecular (M.M.) ØX174.

## CONCLUSIONES

- Se caracterizaron 39 aislamientos de *F. graminearum*, aislados de semilla de cebada maltera, cosechada en Almoloya y Cuauhtepic, Hgo, Nanacamilpa, Tlax., Santa Lucía Edo. de México, Cuyuaco, Pue., Celaya, Gto., Tepatitlan de Morelos, Jal. y Río Bravo, Tam., de acuerdo a su capacidad de producir la micotoxina DON por la prueba de ELISA RIDASCREEN®FAST DON, y de amplificar el fragmento del quimiotipo DON con el iniciador ToxP por PCR.
- Del total de cepas de *F. graminearum*, 17 se identificaron como quimiotipo DON; las cepas restantes, pudieran ser no productoras o corresponder a otro quimiotipo.
- Se encontraron diferencias en la capacidad de las cepas de producir DON *in vitro*. Las cepas CU1R30, CU6R30 de Cuyuaco, Pue., y SL3R23 y SL3R24 y SL10R10 de Santa Lucía, Edo. de México, registraron la más alta producción (entre 3 y 17 ppm/Kg).
- Con excepción de la cepa NA11R30, la amplificación del quimiotipo DON se correlacionó positivamente con la producción de DON. La cepa NA11R30 identificada como quimiotipo DON fue no productora de DON *in vitro*.

Por lo anterior en este estudio se rechaza la hipótesis de que “todos los aislamientos de *F. graminearum* corresponden al quimiotipo DON y tienen la misma capacidad de producir deoxinivalenol *in vitro*”.

### CAPITULO III. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA EN LÍNEAS AVANZADAS DE CEBADA MALTERA DEL INIFAP A LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA

#### RESUMEN

La fusariosis de la espiga por *Fusarium graminearum* es una importante enfermedad que afecta el rendimiento y la calidad sanitaria del grano de cebada. Entre las medidas de control se encuentra el uso de variedades resistentes por lo que este trabajo tuvo como objetivos evaluar la resistencia a la fusariosis en 131 líneas avanzadas de cebada maltera seleccionadas por su tolerancia a roya lineal amarilla, roya de la hoja, mancha reticulada, tizón foliar y escaldadura de la hoja, del programa de Cebada del INIFAP-CEVAMEX. Durante cuatro años las líneas avanzadas 30, 63, 65, 109, 123 y 124, y las líneas 73 y 91, de seis y dos hileras de grano, respectivamente, registraron síntomas muy bajos de fusariosis cuando se inocularon con *F. graminearum*; asimismo, estas líneas presentaron resistencia tipo I y tipo II a la enfermedad cuando se inocularon por aspersion y punción, respectivamente. La información anterior es relevante ya que indica que estas líneas son resistentes a la enfermedad y tienen potencial para utilizarse como fuentes de resistencia en un programa de cruzamientos en cebada maltera que incluya en el conjunto de enfermedades a la fusariosis de la espiga.

**Palabras clave:** *F. graminearum*, *Hordeum vulgare*, resistencia, FHB

# EVALUATION OF THE RESISTANCE IN ADVANCED LINES OF MALTING BARLEY OF INIFAP TO FUSARIUM HEAD BLIGHT

## ABSTRACT

Fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum* is an important disease that affects the yield and phytosanitary quality of barley grain. Among the control measures is the use of resistant varieties, so this work had as objectives to evaluate the resistance to fusariosis in 131 advanced malting barley lines selected for their tolerance to yellow rust, leaf rust, reticulated spot, blight foliar and scald of the leaf, of the program of Barley of the INIFAP-CEVAMEX. For four years, the advanced lines 30, 63, 65, 109, 123 and 124, and lines 73 and 91, of six and two rows of grain, respectively, registered very low symptoms of fusariosis when inoculated with *F. graminearum*; likewise, these lines showed type I and type II resistance to the disease when they were inoculated by spraying and puncture, respectively. The above information is relevant because it indicates that these lines are resistant to the disease and have the potential to be used as sources of resistance in a crossbreeding program in malting barley that includes to Fusarium head blight additionally to other diseases.

**Key words:** *F. graminearum*, *Hordeum vulgare*, resistance, FHB severity.

## INTRODUCCIÓN

### *Cultivo de cebada*

A nivel mundial la cebada ocupa el cuarto lugar en la producción de cereales. El principal país productor de grano de cebada maltera es la Federación de Rusia que aportó aproximadamente 18 millones de toneladas, seguido de Alemania con 10.7 millones de toneladas. Aunque México no aparece entre los principales países productores a nivel internacional, la producción de este cultivo es significativa a nivel nacional. En 2017 se sembraron alrededor de 364, 453 ha, con una producción de 982,074 toneladas. Esta producción anual, de temporal y riego, representa el 5% de la producción registrada en Rusia. Bajo condiciones de riego el rendimiento nacional es de 5 a 6 ton/ha, mientras que en temporal es de 1.5 a 2 ton/ha (SIAP, 2017).

En México el cultivo de la cebada maltera se desarrolla principalmente en los Valles Altos de la Meseta Central, que comprende los estados de Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y México (Zamora, *et al.*, 2008), en donde se concentra la mayor superficie de siembra, bajo el régimen de temporal, en el ciclo primavera-verano. La región del Bajío, que comprende los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, San Luis Potosí y Jalisco, también destaca por su aportación en la producción de este cereal. Particularmente Guanajuato aporta la mayor superficie sembrada bajo el régimen de riego durante el ciclo otoño-invierno. La producción de cebada maltera se destina principalmente a la industria maltera para la elaboración de cerveza y en menor cantidad a la industria de alimentos balanceados, para la elaboración de alimentos para el ganado (Windels, 2000).

En las últimas dos décadas este cultivo ha registrado fluctuación en cuanto a la superficie cosechada y producción debido a diversos factores entre los que destacan la incidencia de

enfermedades. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2017) reportó que en 1990 se registró una superficie cosechada de 73.7 millones de hectáreas y una producción de 178 millones de ton; sin embargo, esta institución indicó que para 2010 la superficie cosechada disminuyó 35.6% y la producción 30.8%. Situación que continuó para 2016 en el que se cosecharon 46.9 millones de hectáreas con una producción de 141.3 millones de ton. A pesar de estas fluctuaciones a través del tiempo, el rendimiento de este cultivo se incrementó durante el periodo de 1990 a 2016. En este periodo el rendimiento promedio por hectárea pasó de 2 a 3 ton/ha.

### ***Importancia económica de la fusariosis en cebada***

En las zonas productoras de México, el cultivo de cebada maltera se ve afectado por diversas enfermedades entre las que destacan por su incidencia: roya lineal amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* West), roya de la hoja (*P. hordei* Otth), mancha reticulada (*Drechslera teres* (Sacc.) Shoem), tizón foliar (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker) y escaldadura de la hoja (*Rhynchosporium secalis* (Oud) J.J. Davis). Sin embargo, la enfermedad conocida como la fusariosis de la espiga, ocasionada por un complejo de especies de *Fusarium* (Gilchrist-Saavedra, 2000; Zamora et al., 2008), se ha presentado en las principales zonas productoras de este cultivo a nivel internacional ocasionando cuantiosas pérdidas directas e indirectas (Windels, 2000).

En Estados Unidos, durante el periodo de 1993 a 1998, la fusariosis ocasionó pérdidas económicas estimadas en 406 millones de dólares en el cultivo de cebada, en los estados de Dakota del Norte, Minnesota y Dakota del Sur (Windels, 2000). Por su parte, Nganje et al., (2004) reportaron que durante el periodo de 1998 a 2000, ésta enfermedad ocasionó pérdidas económicas directas de 136.4 millones de dólares por reducción del rendimiento, calidad de

malteo y uso forrajero; y, de 420 millones de dólares por pérdidas indirectas. Así mismo, estos autores indicaron que la disminución estimada del rendimiento durante ese periodo fue de 931 mil toneladas. McMullen, et al (1997) señalaron que los productores de cebada se enfrentaron a problemas de comercialización y exportación de su producto por esta enfermedad. En tanto que Windels (2000) indicó que los problemas con fusariosis obligó a los productores, los científicos y las autoridades del sector a tomar medidas para contrarrestar los efectos económicos ocasionados por esta enfermedad con la generación de información sobre manejo y liberación de variedades resistentes.

### ***Síntomas de la fusariosis en cebada***

Los síntomas de fusariosis de la espiga por especies de *Fusarium* son característicos en cultivos de grano pequeño, se desarrollan en el tejido de las espigas y están marcados por una necrosis prematura (Boddu et al., 2006). Los síntomas se manifiestan como cambios en la coloración, llenado y textura de grano. Se encuentran pequeñas diferencias en cuanto a la coloración del grano de trigo y de cebada. Mientras que en trigo las espigas con fusariosis se tornan de color blanco en cebada cambian a café marrón. En ambos cultivos con el tiempo los granos se marchitan, se deforman, y adquieren un aspecto arrugado. En algunos casos se observa coloración rosa o naranja por la esporulación del hongo en el grano (McMullen, et al 1997; McMullen et al., 2012).

### ***Epidemiología de la fusariosis de la espiga en cebada***

La fusariosis es una enfermedad devastadora en regiones con clima cálido y lluvias frecuentes durante la etapa de emisión de espiga y hasta la madurez fisiológica en el cultivo de cebada. En zonas con clima cálido, la enfermedad se ve favorecida cuando las temperaturas son altas,

entre 25 a 30°C, acompañadas de alta humedad relativa, mayor o igual a 90 %, durante el periodo de emisión de espiga (Bondalapati et al., 2012). El alto contenido de rocío también favorece el desarrollo de la enfermedad ocasionando rápido marchitamiento de las espigas en variedades con potencial de alto rendimiento con impacto considerable en la producción (McMullen et al., 1997). Por otra parte, cambios en el manejo agronómico como la labranza de conservación se ha visto (Miller et al., 1998) que favorece el incremento del nivel de inóculo en el suelo.

De la literatura consultada no se encontraron referencias reportadas durante la última década sobre el desarrollo de epidemias por la fusariosis de la espiga en cebada, a nivel internacional y nacional. Sin embargo, los numerosos reportes publicados sobre la enfermedad (Khatibi et al., 2012; Berger et al., 2014; Gunupuru et al., 2017) y el hongo (Malhipour et al., 2012; Mert-Türk et al., 2014; Bozac et al., 2016) en esta etapa, sugieren que la fusariosis sigue siendo de interés para la comunidad científica, posiblemente por los riesgos que representa el cambio climático para el desarrollo de la enfermedad.

### ***Programa de cruzas para el mejoramiento de cebada del INIFAP***

El Programa de Cebada del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) tiene trabajos de cruzas para el mejoramiento de cebada maltera contando actualmente con 131 líneas avanzadas con tolerancia a roya lineal amarilla, a roya de la hoja, mancha reticulada, tizón foliar y escaldadura de la hoja, enfermedades consideradas como las más frecuentes en las zonas productoras de los Valles Altos de México (Gilchrist-Saavedra, 2000; Zamora et al., 2008). Es importante mencionar que algunas líneas avanzadas de cebada tienen como progenitores a Gobernadora, Chevron y a CI14064, los cuales se utilizan como fuentes de

resistencia por desarrollar bajos niveles de fusariosis de la espiga (Zhu et al., 1999; McCallum et al., 2004; Marchand et al., 2008). El tema de resistencia genética de las variedades de cebada maltera generadas por el INIFAP a la fusariosis de la espiga ha sido poco explorado. Por lo anterior la generación de información es relevante para utilizarse como punto de partida en un programa de cruzamientos de cebada maltera en el que se incluya, en el conjunto de enfermedades, a la fusariosis de la espiga.

### **OBJETIVO**

Identificar fuentes de resistencia a la fusariosis de la espiga en líneas avanzadas de cebada maltera del programa del INIFAP-CEVAMEX, en condiciones de campo e invernadero.

### **HIPÓTESIS**

En el programa de cruzamientos de cebada maltera del INIFAP-CEVAMEX se tienen líneas resistentes a la fusariosis de la espiga.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la identificación de fuentes de resistencia a la fusariosis de la espiga en 131 líneas avanzadas de cebada maltera, del programa del INIFAP-CEVAMEX, se estableció una prueba en campo, durante el ciclo primavera-verano 2014; y tres en invernadero, durante el ciclo invierno-primavera en los años 2015, 2016 y 2017.

### ***Evaluación en Campo***

En el ciclo agrícola primavera-verano 2014 en condiciones de temporal se sembraron de manera mecánica las 131 líneas avanzadas de cebada maltera en regiones de Almoloya, Hidalgo; Nanacamilpa, Tlaxcala; Cuyuaco, Puebla; y Santa Lucia, Texcoco, México. Estas regiones se encuentran en el área geográfica conocida como Valles Altos, la cual se caracteriza por presentar condiciones climáticas favorables para la siembra de trigo y cebada así como para el desarrollo de la enfermedad. En forma natural en los campos de cultivo de estas regiones se ha registrado un alto nivel de inóculo de las diferentes especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis de la espiga, (Gilchrist-Saavedra, 2000) (Figura 3.1).

En el Cuadro 3.1 se indican las localidades así como las condiciones agroclimáticas donde se cultivaron las líneas de cebada maltera en campo.

Para la siembra las líneas se organizaron en sublotes denominados: 01 (25 líneas), 02 (30 líneas), 02A (30 líneas), 03 (30 líneas) y Elite (16 líneas), en base a los ciclos de selección que tienen los materiales. La siembra se estableció en un diseño experimental de latíces regulares, uno para cada sublote, donde la parcela experimental constó de cuatro surcos de 3 m de largo con una distancia entre surco de 0.30 m. La densidad de siembra fue de 100 Kg semilla ha<sup>-1</sup>, que es la recomendada para la siembra en temporal en Valles Altos, con una fertilización de 46 – 46 - 20 (Cuadro 3.2).

Para estimar la resistencia de las líneas a la infección natural de la fusariosis en campo se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad con la escala propuesta por Chrpová, *et al.* (2011) con nueve niveles donde: 1< 5%, 2=5–17%, 3=18–30%, 4=31–43%, 5=44–56%, 6=57–69%, 7=70–82%, 8=83–95% y 9>95%.

**Cuadro 3.1.** Valores promedio de temperatura y humedad relativa† de las regiones donde se cultivaron las líneas de cebada maltera, registradas en 2014.

<b>Localidad</b>	<b>Condición</b>
Santa Lucía, Texcoco, Estado de México	Altitud: 2280 msnm Clima: Templado semi-seco Temperatura: 15.9 °C Precipitación: 550-600 mm
Nanacamilpa, Tlaxcala	Altitud: 2600 msnm Clima: Templado- subhúmedo Temperatura: 13.0 °C Precipitación: 500-550 mm
Almoloya, Hidalgo	Altitud: 2520 msnm Clima: Templado- subhúmedo Temperatura: 11 °C Precipitación: 500-550 mm
Cuyoaco, Puebla	Altitud: 2900 msnm Clima: Templado- subhúmedo Temperatura: 12 °C Precipitación: 550-600 mm

†Red de estaciones agroclimáticas del INIFAP.

Las 131 líneas de cebada se establecieron en: Almoloya, el 5 de junio; en Cuyoaco, el 12 de junio; en Nanacamilpa, el 18 de junio; en Santa Lucía, el 26 de junio de 2014.

**Cuadro 3.2.** Líneas avanzadas de cebada maltera, diseño experimental latices regulares y arreglo estadístico, establecidas en el ciclo agrícola P-V 2014.

Sublotes	# de líneas	Repeticiones	Arreglo
Elite	16	4	4 x 4
01	25	3	5 x 5
02A	30	3	5 x 6
02	30	3	5 x 6
03	30	3	5 x 6
Total	131		



**Figura 3.1.** Cultivo de cebada maltera cultivada en campo. **A)** En etapa de llenado de grano en Almoloya. **B)** En etapa de grano masoso con síntomas de la fusariosis de la espiga en Almoloya, Hidalgo.

### ***Evaluación en invernadero***

Esta prueba se estableció en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, en un invernadero de 437.5 m<sup>2</sup> (12.5 x 35 m) construido con plástico transparente y piso de tierra, durante las estaciones de invierno-primavera 2015, 2016 y 2017.

### ***Estación invierno-primavera 2015***

#### ***Establecimiento de plantas***

Se establecieron dos lotes con semilla de las 131 líneas de cebada maltera de los ciclos de selección 01, 02, 02A, 03 y Elite. El primer lote se estableció el 19 de febrero y el segundo, el 26 de febrero de 2015, respectivamente. Como testigo se incluyeron plantas de las variedades “Seebe”, “CDC Copeland” (resistentes), Xena, AC Ranger (moderadamente resistentes), Kasota y AC Lacombe (susceptibles) proporcionadas por CIMMYT. Los lotes se establecieron en macetas de plástico (25 x 25 cm) con sustrato peat moss (Promix®). Cada línea y el testigo se sembraron por separado (10 semillas por maceta), el riego se dio por gravedad con agua de pozo, al inicio del cultivo se dieron tres riegos por semana, después de la etapa de floración, los riegos se dieron diario. Para la fertilización se aplicó la fórmula 100-46-30, estimando la pérdida de fertilizante por lixiviación debido a la frecuencia de los riegos, la cual se sustituyó con triple 16, 18-46-00 y urea (Yara®). La primera fertilización se realizó a los ocho días después de la siembra. Las unidades de fósforo y potasio se aplicaron en su totalidad en la primer fertilización, el nitrógeno se dividió en dos partes; se aplicó el 50 % en la primer fertilización y el otro 50 % a los 45 días.

### *Preparación de inóculo 2015*

Como inóculo se utilizó una cepa monospórica de *F. graminearum* aislada de trigo con capacidad de producir toxina deoxinivalenol (DON), registrada con la clave CIMFU 1189 colectada en Toluca, Estado de México, en el ciclo agrícola primavera-verano 2014, con un nivel de producción de DON de 14.5 ppm. Esta cepa fue proporcionada y caracterizada por personal del Laboratorio de Fitopatología, del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

Para la preparación de inóculo se colocaron cinco fragmentos (de un mm) de cultivo de PDA con crecimiento micelial en matraces con 200 mL de medio de frijol chino estéril. Después de la inoculación, los matraces se colocaron en agitación (Agitador Lab-Line®) con luz blanca continua (lámpara Fulgore®, 250 V, 32 W) a temperatura ambiente por 15 días.

Trascurrido el tiempo de incubación se filtró el medio a través de una gasa estéril para retirar el crecimiento micelial y estimar la producción de macroconidios mediante el conteo directo en un hematómetro para microscopio compuesto, después de este proceso, el volumen inicial fue de 124 mL. Se hicieron seis conteos, se obtuvo la media, y se multiplicó por la constante 2000 del hematómetro para obtener la concentración de esporas por mililitro.

$$\text{Número macroconidios/mL} = \text{Suma de 5 cuadrados principales (CP)} \times 2000$$

Por ejemplo, para calcular el número producido por la cepa CIMFU 1189 se tiene:

$$\text{Número de macroconidios/mL} = (22+25+27+24+20) \times 20000 = 236,000$$

Por otra parte, para preparar la suspensión a una concentración de 100,000 macroconidios/mL a partir de la suspensión inicial se aplicó la siguiente ecuación (Gilchrist-Saavedra et al, 2005):

$$C_i V_i = C_f V_f$$

Dónde:

$C_i$  = Concentración inicial = 236, 000 macroconidios

$V_i$  = Volumen inicial = 124 mL

$C_f$  = Concentración final deseada = 100, 000 macroconidios/mL

$V_f$  = Volumen final, desconocido

$$\text{Volumen final} = \frac{\text{Macroconidios por mL} \times \text{Volumen total original (mL)}}{\text{Macroconidios por mL deseado}}$$

$$\text{Volumen final} = \frac{236,000 \text{ macroconidios por mL} \times 124 \text{ mL}}{100,000 \text{ macroconidios por mL}}$$

Volumen final = 292 mL

Por lo tanto, se tiene que aforar con 168 mL de agua para alcanzar el volumen final de 292 mL con concentración de 100, 000 macroconidos.

Después de su preparación la suspensión se mantuvo en refrigeración a 4°C, por siete días.

### *Inoculación de plantas*

En la etapa de grano lechoso, las espigas se inocularon por aspersión con una suspensión de esporas (100 mil macroconidios por mL) de la cepa CIMFU 1189 de *F. graminearum*.

Inmediatamente después de la inoculación, las espigas se cubrieron con una bolsa de plástico transparente, previamente asperjada con agua, por 48 h para generar un ambiente de alta humedad relativa y favorecer la infección. A los 21 días después de la inoculación se evaluó

la severidad de la enfermedad, contando el número de granos por espiga y el número de granos con síntomas.

### ***Estación invierno-primavera 2016***

#### *Establecimiento de plantas*

El experimento se estableció el 27 de enero de 2016, con las 131 líneas de cebada maltera del INIFAP-CEVAMEX. Como variedades testigo se incluyeron plantas de la variedad “Gobernadora” y “Shenmai 1”, proporcionadas por el INIFAP, las cuales tienen cierta resistencia a la fusariosis de la espiga (McCallum et al., 2004); y plantas de las variedades, “Seebe”, “CDC Copeland” (resistentes), Xena, AC Ranger (moderadamente resistentes), Kasota y AC Lacombe (susceptibles), proporcionadas por CIMMYT (Anexo 5).

Todas las plantas de las líneas avanzadas, así como las de los testigos se establecieron en bolsas negras de plástico de 25 x 25 cm con sustrato peat moss (Promix®) previamente esterilizado con vapor. Para esto el sustrato se humedeció con agua de la llave, se colocó en costales de plástico y se esterilizó por 4 h. Después de la esterilización el sustrato se depositó sobre una superficie limpia durante 5 días para airearse a temperatura ambiente. De cada línea y testigo se colocaron 10 semillas por bolsa; cada línea y testigo constó de un duplicado. El riego se dio por gravedad con agua de pozo, cada tercer día. La fertilización nitrogenada se dividió en dos fracciones, la primera se aplicó cuando las plantas tuvieron alrededor de 10 cm de altura, junto con las unidades de fósforo y potasio, aplicando la fórmula 100-60-30, con los productos triple 16, 18-46-00 y urea (Yara®); la segunda fracción de nitrógeno se aplicó a los 45 días.

### *Cepas y preparación de inóculo*

El inóculo fue producido y proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología de Trigo del CIMMYT, que correspondió a una mezcla de cuatro cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo, cultivado en el ciclo agrícola primavera-verano 2015 en Toluca Estado de México, seleccionadas por su alta producción de micotoxina deoxinivalenol considerada como factor de virulencia. Las cepas están registradas como CIMFU 1308, CIMFU 1310, CIMFU 1312 y CIMFU 1313 con una concentración de DON de 18.10, 17.05, 18.75 y 16.13 ppm respectivamente. La producción del inóculo se realizó en medio de frijol chino con agitación. Se ajustó a una concentración de 70,000 conidios mL<sup>-1</sup>.

### *Inoculación de plantas*

Cuando las plantas iniciaron la etapa de floración se colocó, con una jeringa hipodérmica, una gota de 10 µL de una suspensión de macroconidios en la espiguilla central, en una sección previamente marcada (Engle et al., 2003). Se inocularon alrededor de 10 espigas por línea y duplicado. Inmediatamente después de la inoculación, las espigas se cubrieron con una bolsa de plástico transparente por 48 h para generar un microambiente de alta humedad relativa y favorecer la infección.

### *Evaluación de las variables de severidad, incidencia e índice de fusariosis*

A los 7, 14, 21 y 28 días después de retirar la bolsa de plástico transparente se hizo la evaluación de la enfermedad contando el número de granos enfermos y el total de granos por espiga, además del número de entrenudos infectados. Se evaluó la severidad registrando el número total de granos por espiga y el número de granos enfermos; y la incidencia con la cuantificación del número de espigas enfermas del total de espigas inoculadas. Estos

parámetros se expresaron en porcentaje. El índice de fusariosis (IFHB, Fusarium head blight index, por sus siglas en inglés), se obtuvo a través del porcentaje de incidencia y severidad, con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{Incidencia} = \frac{\text{Número de espigas con síntomas} \times 100}{\text{Total de espigas inoculadas}}$$

$$\% \text{Severidad} = \frac{\text{Número de granos con síntomas} \times 100}{\text{Total de granos}}$$

$$\text{IFHB} = \frac{\% \text{Incidencia} \times \% \text{Severidad}}{100}$$

#### *Cosecha de semilla*

En madurez fisiológica se cosecharon las espigas por línea, control y repetición para guardarse por separado, en bolsas de papel etiquetadas y perforadas a temperatura ambiente del laboratorio.

## ***Estación invierno-primavera 2017***

### *Establecimiento de plantas*

El 20 de diciembre de 2016, se establecieron las 131 líneas de cebada maltera, de los Sublotes 01, 02, 02A, 03 y Elite. Como variedades testigo se incluyeron: plantas de la variedad “Gobernadora” y “Shenmai 1” moderadamente resistentes, otorgadas por INFAP-CEVAMEX y plantas de las variedades “Seebe”, “CDC Copeland” (resistentes), Xena, AC Ranger (moderadamente resistentes), Kasota y AC Lacombe (susceptibles) proporcionadas por CIMMYT. El establecimiento y manejo agronómico se llevó a cabo de la misma forma que el realizado en la estación invierno-primavera 2016 pero en este caso se colocó malla sombra de 75% y las macetas se colocaron sobre un plástico para evitar daños por roedores.

### *Cepas y preparación de inóculo*

Cinco cepas monospóricas de *F. graminearum* con capacidad de producir la micotoxina DON se emplearon para las pruebas de selección en invernadero, durante el ciclo invierno 2017. Estas cepas, identificadas en el laboratorio con las claves CU1R30 (17 ppm de DON), SL3R23 (9.2 ppm de DON), SL3R24 (5 ppm de DON), SL10R10 (3.4 ppm de DON), CU6R30 (3.60 ppm de DON) se aislaron de semilla de cebada maltera del ciclo de cultivo primavera-verano 2014, colectadas en localidades de Valles Altos.

Para obtener el inóculo inicial se reactivaron las cepas mantenidas en papel filtro (Whatman™ 1) estéril durante cinco meses en condiciones de refrigeración (4°C). Dos fragmentos de papel filtro con crecimiento micelial, de cada una de las cepas de *F. graminearum*, se depositaron por separado en agar agua para reactivar el crecimiento micelial a temperatura ambiente de laboratorio. Posteriormente para inducir la producción de macroconidios, las cepas de *F. graminearum* se crecieron por separado en medio líquido de

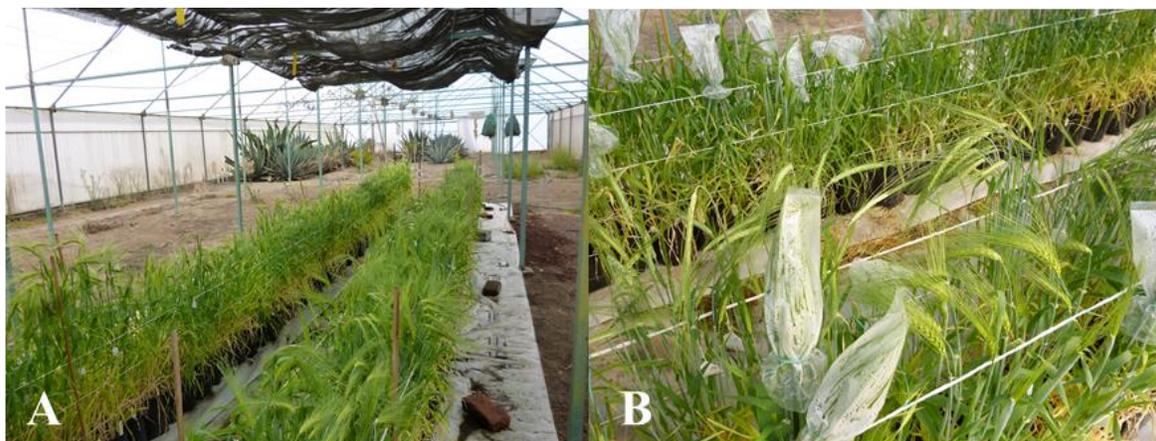
frijol chino (*Vigna radiata*) en agitación (Gilchrist-Saavedra et al., 2005). Para la preparación del medio se depositaron 20 g de frijol chino por litro de agua destilada y se hirvió por 20 min. El caldo se filtró a través de una gasa estéril, para retirar el frijol, y el filtrado, distribuido en matraces de 500 mL con 50 mL, se esterilizó a 15 libras de presión por 20 minutos. A las 24 h después de la preparación del medio, se depositaron cinco discos de 1 cm de diámetro de agar agua con crecimiento micelial por matraz y se mantuvo en agitación (Agitador Lab-Line®) durante cinco días a temperatura ambiente.

Trascurrido el tiempo de incubación se filtró el medio a través de una gasa estéril para retirar el crecimiento micelial. Se estimó la producción de macroconidios mediante el conteo directo. Para esto se tomaron alícuotas de la suspensión del medio de frijol chino con una pipeta Pasteur para estimar la concentración en un hematocímetro en microscopio compuesto. Posteriormente se promediaron los valores obtenidos para determinar la concentración de la suspensión de macroconidios (macroconidios/mL) en el volumen total original. Para llevar la suspensión de macroconidios a la concentración deseada (70, 000 macroconidios / mL) se utilizó la siguiente ecuación:  $C_i V_i = C_f V_f$  descrita en el apartado de preparación de inóculo de 2015.

#### *Inoculación de plantas*

Cuando las plantas estaban en la etapa de emisión de espiga (floración) se inocularon con una mezcla de cinco cepas de *F. graminearum* aisladas de cebada (CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10, CU6R30). Por espiga se asperjaron 200  $\mu$ L de la suspensión de macroconidios (70,000 macroconidios por mL) e inmediatamente después, las espigas se cubrieron con una bolsa de plástico transparente por 48 h (Figura 3.2) para generar un

microambiente de alta humedad relativa y favorecer la infección. Se realizó una segunda inoculación a los 4 días después de la primera inoculación.



**Figura 3.2.** Plantas de cebada maltera en invernadero. **A)** Plantas en etapa de floración con malla sombra. **B)** Plantas después de la inoculación con cepas de *F. graminearum* cubiertas con bolsa de plástico.

#### *Evaluación de la incidencia y severidad*

A los 21 días después de la segunda inoculación se evaluó la enfermedad (Figura 3.3) como se describió en el apartado de invierno-primavera 2016, aplicando las mismas fórmulas para la obtención de las variables de % severidad, % incidencia e IFHB.

#### *Cosecha de semilla de plantas inoculadas*

En madurez fisiológica se cosecharon las espigas por línea y control, se cortaron las aristas para colocar las espigas en una bolsa de papel perforada y se dejaron a temperatura ambiente en el invernadero para su secado (Figura 3.4). Posteriormente en el laboratorio se obtuvo la semilla de manera manual, eliminando el raquis y las aristas, dejando solo la semilla. La

semilla se guardó en bolsas de papel etiquetadas sin perforar y se conservaron en el laboratorio a temperatura ambiente.



**Figura 3.3.** Cuantificación de granos totales por espiga y granos con síntoma de fusariosis. **A)** Espiga de seis hileras de granos y **B)** espiga de dos hileras de granos.



**Figura 3.4.** Espigas de cebada maltera, cosechadas de plantas inoculadas en invernadero, estación invierno-primavera 2017. Las espigas se depositaron en una bolsa de papel con perforaciones para su almacenamiento. El asterisco indica la bolsa perforada con número de línea y repetición (R1).

### *Análisis estadístico*

Los valores de las variables: número de granos con síntomas, número de espigas con síntomas, porcentaje de incidencia, porcentaje de severidad e índice IFHB, mostraron una distribución no simétrica en una prueba de bondad de ajuste. Por lo anterior los datos se analizaron mediante un modelo lineal generalizado (Proc GLIMMIX) con distribución Poisson y función de enlace (link) log con el software SAS (Statistical Analysis Software) Versión 9.4, para Windows. La comparación de medias se hizo con las medias ajustadas por mínimos cuadrados (LSMeans)  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A continuación, se describen los resultados obtenidos durante cuatro años de evaluación de las líneas de cebada maltera del INIFAP-CEVAMEX, crecidas bajo diferentes condiciones de temperatura, humedad e inoculadas por aspersión o punción con cepas de *F. graminearum*. Los testigos reportados como resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) a la fusariosis, y empleados como referencia para la identificación de fuentes de resistencia en líneas avanzadas de cebada maltera, mostraron una respuesta variable. Bajo condiciones de temporal e inoculación natural (año 2014) los testigos fueron las variedades comerciales, Adabella y Esmeralda, caracterizados como moderadamente R y S, respectivamente. Dichos testigos también se incluyeron en la evaluación en invernadero en la estación invierno-primavera 2015; y a partir de este año, los testigos fueron las variedades de origen canadiense Seebe y CDC Copeland (R); AC Ranger y Xena (MR); y, AC Lacombe

y Kasota (S). En las estaciones de 2016 y 2017 se anexaron los testigos Gobernadora y Shenmai 1 (MR).

En general las variedades testigo mostraron un comportamiento variable en cuanto a su respuesta a la fusariosis. Los datos promedio muestran que testigos ya caracterizados como R se comportan como S y viceversa. Por ejemplo, Copeland caracterizado como R se comportó como S en 2017; esta variedad, presentó un índice de IFHB de 11.5 superior al obtenido por AC Lacombe (S) (7.9).

Las líneas avanzadas de cebada maltera también registraron variación en el índice IFHB. Por lo que se estableció un intervalo de valores para su clasificación considerando aquellos testigos con respuesta estable acorde a su caracterización y de esta manera clasificar las líneas como R, MR o S, (Cuadro 3. 3).

**Cuadro 3. 3.** Análisis comparativo de valores para número de espigas con fusariosis, índice IFHB y severidad de la fusariosis en líneas testigo de cebada maltera. En campo por infección natural y en invernadero por inoculación<sup>†</sup> con *F. graminearum*<sup>‡</sup>, de 2014 a 2017.

Testigo <sup>¥</sup>	Campo-2014					Invernadero											
	Número espigas con síntoma					% Severidad				IFHB							
	SL	AL	CU	NA	X	2015				2016			2017				
						R1	R2	X	IN	R1	R2	X	IN	R1	R2	X	IN
<b>R</b>									<b>0-5</b>				<b>0-1</b>				<b>0-5</b>
Seebe						0	2.8	1.4		2.1	0.8	1.5		0.5	1.8	1.2	
CDC						0.0	11.8	5.9		0.9	1.8	1.3		22.1	0.9	11.5	
Copeland																	
<b>MR</b>									<b>6-10</b>				<b>2-3</b>				<b>6-11</b>
Adabella	17	6	10	7	<b>10</b>	9.4	6.8	8.1									
Gobernadora										4.5	1.4	3.0		3.2	2.5	2.8	
Shenmai 1										3.5	7.3	5.4		12.1	3.6	7.8	
AC Ranger						4.4	2.2	3.3		1.7	0.3	1.0		17.1	1.4	9.3	
Xena						0.0	26.9	13.5		2.4	1.0	1.7		8.0	2.9	5.4	
<b>S</b>									<b>≥ 11</b>				<b>≥ 4</b>				<b>≥ 12</b>
Esmeralda	21	6	15	5	<b>12</b>	4.0	2.1	3.1									
AC Lacombe						8.9	8.8	8.8		4.4	2.3	3.3		14.9	0.9	7.9	
Kasota						6.7	13.3	10.0		2.8	5.9	4.4		12.4	24.9	18.6	

<sup>¥</sup>R= Resistente; MR= Moderadamente resistente; S= Susceptible

SL, Santa Lucia, Estado de México; Al, Almoloya, Hidalgo; CU, Cuyuaco, Puebla; NA, Nanacamilpa, Tlaxcala.

R1, R2, Repetición 1 y repetición 2, respectivamente; X promedio entre repeticiones.

<sup>†‡</sup>En 2015, por aspersión con una cepa de trigo; en 2016, por punción con cuatro cepas de trigo; y en 2017, por aspersión con cinco cepas de cebada.

Para la definición de intervalos (IN) se consideraron los valores obtenidos para: **R**, Seebe de 2015 a 2017; **MR**, Adabella, Gobernadora y Shenmai 1, durante 2015, 2016 y 2017, respectivamente; **S**, Xena en 2015 y Kasota en 2016 y 2017.

Con los intervalos definidos se procedió a clasificar en R, MR y S las 131 líneas de cebada maltera del INIFAP-CEVAMEX.

### ***Resistencia en campo***

El análisis de los resultados de la evaluación de espigas con fusariosis, en campo, mostró diferencias ( $p \leq 0.01$ ) entre los sublotos: 03 (30 líneas), 02 (30 líneas), 02A (30 líneas), 01 (25 líneas), y Elite (16 líneas), y entre localidades. Los sublotos 03, 02A y 02, de menor ciclo de selección, presentaron menor número de espigas con síntomas de la enfermedad; en contraste, los sublotos 01 y Elite, de mayor ciclo de selección, registraron mayor número de espigas con fusariosis. En Santa Lucia las 131 líneas, de todos los sublotos, mostraron el mayor número de espigas con fusariosis; en promedio, en esta localidad las líneas registraron 11 espigas con fusariosis. En Cuyoaco las líneas registraron seis espigas con síntomas de la enfermedad; y en Almoloya cinco y Nanacamilpa, cuatro espigas con fusariosis (Anexo 6).

Los resultados anteriores son congruentes debido a que en Santa Lucia y Cuyoaco se registra mayor precipitación. La precipitación media anual en estas localidades es de 550 a 600 mm; y la temperatura media anual es de 15 y 12 °C respectivamente. Mientras que, en Almoloya y Nanacamilpa la precipitación es de 500 a 550 mm y la temperatura de 11 y 13 °C, respectivamente. Sin embargo, en estas localidades se registra una humedad relativa de 60 a 80%. (<http://clima.inifap.gob.mx/redinifap/est.aspx?est=26473>).

Tomando como referencia los valores promedio de número de espigas con fusariosis, registrados en los testigos Adabella (10 espigas) y Esmeralda (12 espigas), se establecieron los intervalos: 1-5, 6-10 y  $\geq 11$  para clasificar a las líneas en R, MR y S, respectivamente. Los resultados del Cuadro 3.4 indican que a menor ciclo de selección se tuvo mayor número de líneas resistentes a la fusariosis; y que, a mayor ciclo de selección, mayor número de líneas S. Es decir, de 66 líneas (50 %) ubicadas en la categoría R, 21 líneas correspondieron al

sublote 03; en contraste, de 13 líneas registradas como S, seis líneas fueron del sublote Elite. El sublote 02A, con líneas de dos hileras de grano, no registró líneas S. En síntesis, se puede concluir que en campo, para el ciclo primavera-verano 2014, la mayoría de las líneas de todos los sublotes se comportaron como R y MR. La baja incidencia de la enfermedad en las líneas puede estar relacionada con escape a la enfermedad por condiciones no favorables de humedad y temperatura y, bajo nivel de inóculo en el suelo y el ambiente. Es posible que los datos obtenidos sean resultado de un escape a la enfermedad y no un reflejo de la resistencia de los materiales evaluados.

**Cuadro. 3. 4.** Líneas avanzadas de cebada maltera organizadas en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo al número de espigas con síntomas, registrado durante el ciclo primavera-verano 2014, en campo.

Sublote / Número de línea					Respuesta <sup>¥</sup> (IN)	Total de líneas (131)
Elite (16) <sup>‡</sup>	01 (25)	02 (30)	02A (30)	03 (30)		
	39	66, 68, 69	81, 91, 98, 100	108, 111, 112, 115, 123	<b>R (1-5)</b>	66
13	25, 31, 33, 36, 37	54, 65, 67	72, 75, 94, 95	106, 107, 116, 118, 120, 124		
7	19, 20, 23, 26, 30, 34, 38	42, 43, 46, 48, 63	73, 76, 79, 82, 84, 85, 89, 92, 93, 96, 99	102, 104, 105, 109, 110, 114, 117, 119, 122, 126		
					<b>MR (6-10)</b>	52
4, 9, 10, 11, 12	17, 21, 22, 24, 27, 28, 29, 32	47, 49, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 64, 70, 71	80, 83, 86, 88, 90, 97, 101	103, 113, 121, 125, 128, 129	<b>S (≥ 11)</b>	13
2, 14, 15		44, 45, 50, 51, 53, 61, 62	74, 77, 78, 87	127		
3, 6, 16	35, 40, 41	52		130		
1, 5, 8	18			131		

<sup>†</sup>Promedio de dos repeticiones. <sup>‡</sup>Número total de líneas por sublote

<sup>¥</sup>Tomando como referencia el número de espigas con síntomas de los testigos: Adabella (10); MR, y Esmeralda (12) S.

### ***Resistencia en invernadero***

Respuesta de las líneas a la infección y a la dispersión de la enfermedad. En este estudio se encontró variación en la respuesta tanto entre las 131 líneas de cebada maltera como también entre las 10 líneas testigo a la inoculación por punción y aspersion con las cepas de *F. graminearum*. Por lo anterior para clasificar la respuesta de resistente (R), moderadamente resistente (MR) y susceptible (S) se tomó como referencia el valor esperado de las variedades testigo (R, MR y S) de acuerdo al ciclo evaluado (Cuadro 3.3).

### ***Evaluación invierno-primavera 2015***

Las líneas se establecieron en dos fechas de siembra; sin embargo, no se encontraron diferencias en el índice IFHB entre fechas de siembra (Anexo 6). Durante este ciclo se tomó como referencia el valor de IFHB registrado en Seebe (1.4, R), Adabella (8.1, MR) y Xena (13.5, S) (Cuadro 3.3), quedando las 131 líneas clasificadas como: 82 líneas (63 %) R; 34 líneas (26 %) como MR; y 15 líneas (11 %) como S, por haber registrado un valor de 0 a 5, de 6 a 10, y  $\geq$  de 11 de IFHB, respectivamente. Todos los sublotos registraron líneas con los tres tipos de respuesta. En este ciclo, las líneas del sublote 02A (líneas de dos hileras) se encontraron muy precoces y entre ellas destacaron del sublote Elite las líneas 94, por haber registrado el mayor índice IFHB (29) y la línea 6 (23) así como la línea 33 (18) del sublote 01. Estas tres líneas registraron nivel 3 (18 – 30 %) en la escala de severidad (Chrprová et al., 2011) e incidencia de 0 a 100 %. En el Cuadro 3.5 se ilustra la clasificación de las 131 líneas por tipo de respuesta R, MR o S para el ciclo 2015.

**Cuadro 3. 5.** Líneas avanzadas de cebada maltera organizadas en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo al índice IFHB registrado durante el ciclo primavera 2015, en invernadero.

Sublote / Número de línea					Respuesta <sup>†‡</sup> (IN)	Total de líneas (131)
Elite (16) <sup>‡</sup>	01 (25)	02 (30)	02A (30)	03 (30)		
					<b>R (0-5)</b>	82
4, 16		43, 44, 45, 47, 48, 50, 52, 56, <b>63, 67</b>	<b>74, 75, 79, 81</b>	112, 123, 124		
	31	42, 54, 55, 57, 58, 59, 64		128		
14	18, 20, 24, 30, 34, 39	46, 66	78, 80, 87, 91, 92, 93, 95, 96, 98	103, 105, 108, 115, 116, 122		
8, 13	22, 28, 29, 38, 40, 41	49, 51, 60, 62, 65, 69, 71	72, 73, 76, 82, 99, 101	102, 106, 107, 109, 111, 125, 129, 130, 131		
					<b>MR (6-10)</b>	34
3, 5, 11	17, 19, 36, 37		84, 89, 90, 97	110, 114, 118, 119, 127		
2, 7, 9, 10, 12	21, 25, 26, 27, 32	53, 61, 70	77, 83, 88	113, 117		
					<b>S (≥ 11)</b>	15
15	23, 35		85, 86, 100	104, 126		
1, 6	33	68	94	120, 121		

<sup>†</sup>Promedio de dos repeticiones. <sup>‡</sup>Número total de líneas por sublote

<sup>¥</sup>Tomando como referencia la severidad del IFHB de los testigos: R, Seebe (1.4); MR, Adabella (8.1) y S, Xena (13.5).

### ***Evaluación invierno-primavera 2016***

Durante esta estación de 2016 se tomó como referencia el índice IFHB registrado por los testigos Seebe (1.5, R), Gobernadora (3.0, MR) y Kasota (4.4, S) (Cuadro 3.3). En general se registró incidencia de 25 a 100 %, severidad de nivel 2 (de 1 a 12 %) e índice de IFHB de 0 a 10. En la mayoría de las espigas, de todas las líneas, la necrosis se desarrolló solo en la espiguilla en la que se depositó el inóculo; es decir, la dispersión de la enfermedad a través del raquis fue baja. Sin embargo, en las líneas 84 y 92, del sublote 02A, la dispersión en el raquis fue más allá del punto de inoculación, aunque el síntoma de fusariosis no se observó en los granos cercanos. Es posible que el hongo haya quedado confinado en el raquis de la espiga de estas líneas. De acuerdo a los resultados obtenidos: 18 líneas (13.7 %) se comportaron como R; 69 líneas (52.7 %) como MR y 44 líneas (33.6 %) como S por haber registrado un valor de 0 a 1, de 2 a 3, y  $\geq$  de 4 de IFHB, respectivamente. De las líneas resistentes sobresalieron las líneas 63, del sublote 02, y 73 del sublote 02A, por no registrar síntomas de enfermedad. McCallum y Tekauz (2002) y Geddes et al. (2008) mencionan que la cebada muestra de manera natural resistencia a la dispersión de la fusariosis a través del raquis; mientras que Jansen et al. (2005) indican que la infección por *F. graminearum* se ve limitada por la inhibición del crecimiento de las hifas en el raquis. Los datos anteriores indican que las plantas inoculadas por aspersion (estación 2015) registraron mayor severidad (nivel 3) que las inoculadas por punción (nivel 2, estación 2016). McCallum y Tekauz (2002) mencionan que cuando la dispersión en la espiga es baja también lo es la severidad de la enfermedad. En el Cuadro 3.6 se ilustra la clasificación de las 131 líneas por tipo de respuesta.

**Cuadro 3. 6.** Líneas avanzadas de cebada maltera organizadas en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo al índice IFHB registrado durante la estación primavera 2016, en invernadero.

Sublote / Número de línea					Respuesta <sup>†‡</sup> (IN)	Total de líneas (131)
Elite (16) <sup>‡</sup>	01 (25)	02 (30)	02A (30)	03 (30)		
					<b>R (0-1)</b>	18
		63	74			
11	30, 37, 41	47, 62, 65, 68	73, 91	109, 113, 119, 123, 124, 129	<b>MR (2-3)</b>	69
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 12, 13	20, 21, 23, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 39	44, 49, 60, 71	85, 95, 96, 101	108, 110, 112, 116, 128, 131		
5, 6, 10, 15, 16	17, 18, 25, 35, 36, 38, 40	45, 48, 53, 57, 59, 69	72, 76, 78, 79, 84, 89, 94	105, 106, 107, 111, 114, 115, 118, 120, 121, 122	<b>S (≥ 4)</b>	44
14	19, 22, 24, 26	42, 43, 50, 51, 52, 56, 58, 61, 64, 66, 67, 70 46, 54, 55	75, 77, 81, 90, 92, 93, 97, 98, 99, 100 80, 82, 83, 86, 87, 88	103, 117, 125, 126, 127, 130 102, 104		

<sup>†</sup>Promedio de dos repeticiones. <sup>‡</sup>Número total de líneas por sublote

<sup>‡</sup>Tomando como referencia el IFHB de los testigos: R Seebe (1.4), MR Gobernadora (3.0) y S Kasota (4.4).

### ***Evaluación invierno-primavera 2017***

En esta estación de 2017 se tomó como referencia el índice de IFHB registrado por los testigos Seebe (1.2, R), Shenmai 1 (7.8, MR) y Kasota (18.6, S) (Cuadro 3.3) para la clasificación de las líneas. Se registró incidencia de la enfermedad que varió de 0 a 100 % y severidad con nivel máximo de 5 (0 a 43 %), dependiendo del sub lote y de la línea. Considerando lo anterior, las líneas se clasificaron como: 103 líneas (78.6 %) R; 13 líneas (9.9 %) MR; y 15 líneas (11.4 %) S por haber registrado un valor de 0 a 5, de 6 a 11, y  $\geq$  de 12 de IFHB, respectivamente. Es posible que la mayor severidad (nivel 5) registrada en esta estación de 2017 con relación a la registrada (nivel 3) en el 2015, en las espigas inoculadas por aspersión, se deba a varios factores: al inóculo empleado (cinco cepas vs una cepa), nivel de inóculo (70, 000 vs 100,000 macroconidios mL<sup>-1</sup>), al origen de la cepa (cebada vs trigo), al número de inoculaciones (dos vs una), a la etapa fenológica (emisión de espigas vs grano lechoso) y/o a las condiciones ambientales del invernadero (Anexo 7). En el Cuadro 3.7 se ilustra la clasificación de las 131 líneas por tipo de respuesta R, MR o S para la estación 2017.

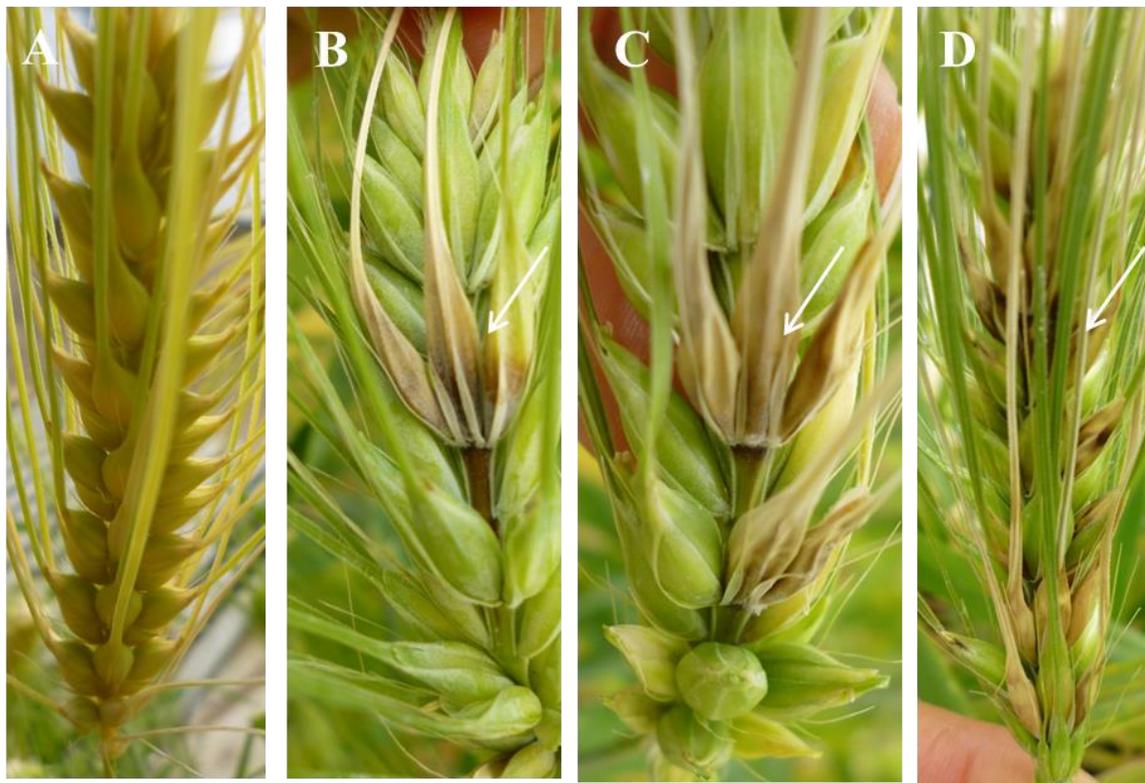
Síntomas de la fusariosis en las espiguillas y raquis de espigas, inoculadas con *F. graminearum* en este estudio, se ilustran en la Figura 3.5. Los granos enfermos se caracterizaron por presentar aspecto arrugado, chupado y coloración café, síntomas característicos de la enfermedad.

**Cuadro 3. 7.** Líneas avanzadas de cebada maltera organizadas en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo al índice IFHB registrado durante la estación invierno-primavera 2017, en invernadero.

Sublote / Número de línea					Respuesta <sup>†‡</sup>	Total de líneas (131)
Elite (16) <sup>‡</sup>	01 (25)	02 (30)	02A (30)	03 (30)		
					<b>R (0-5)</b>	
12	28, 29, 31,	47, 48, 51, 65, 66	73, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99	102, 104, 114, 117		26
3, 4, 6, 8, 9, 11, 13	20, 30, 37, 39	42, 43, 49, 52, 55, 56, 57, 58	75, 78, 79, 82, 89	103, 107, 110, 112, 115, 116, 123, 128		32
16	25, 26	53, 63	80, 85, 93, 100	106, 108, 111, 120, 127, 129		15
5, 7	18 23	44, 68	77 81, 84, 101	121, 125, 131 109, 113, 122, 126		9 8
1, 2, 14	27, 36, 40, 41	46, 64, 67	72	119, 124		13
	21, 22, 32 35	45, 70 54, 60, 62, 71	76 83	130	<b>MR (6-11)</b>	7 6
					<b>S (≥ 12)</b>	
15 10	17, 19, 34, 38 24, 33	50, 59, 61 69	74	105, 118		11 4

<sup>†</sup>Promedio de dos repeticiones. <sup>‡</sup>Número total de líneas por sublote

<sup>‡</sup>Tomando como referencia el índice IFHB de los testigos: R, Seebe (1.2); MR, Shenmai 1 (7.8) y S, Kasota (18.6).



**Figura 3. 5.** Espigas de cebada maltera, cosechadas de plantas inoculadas en invernadero durante la estación invierno-primavera 2017. Las plantas se inocularon con suspensión de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de *F. graminearum*. **A)** Espiga sin síntomas; **B)** espiga considerada como resistente; **C)** moderadamente resistente; y **D)** susceptible. La flecha indica el síntoma de la enfermedad en espiguilla.

Las espigas de las líneas de cebada maltera, cosechadas de plantas inoculadas con la suspensión de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de *F. graminearum* se observaron con y sin desarrollo de síntomas de fusariosis, en invernadero (Figura 3.6). Esta variación en el desarrollo de la enfermedad puede deberse a la variabilidad genética que hay entre las líneas, y a los diferentes ciclos de selección que tienen entre ellas.



**Figura 3. 6.** Espigas de cebada maltera, cosechadas de plantas inoculadas en invernadero durante la estación invierno-primavera 2017. Las plantas se inocularon con suspensión de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de *F. graminearum*. **A)** Espigas de línea 86, sin síntomas y **B)** espigas de línea 63, clasificadas como R; **C)** espigas de línea 76 clasificada como MR; y **D)** espigas de línea 33 clasificada como S. La flecha indica el síntoma de la enfermedad en grano.

Las espigas de los testigos Seebe, Shenmai 1 y Kasota aunque tuvieron un comportamiento acorde a su caracterización (R, MR y S, respectivamente) se encontraron con curvatura y bajo llenado de grano, (Figura 3.7). Posiblemente estos síntomas estén relacionados con el hecho de que estas variedades son de clima frío (Helm et al., 1996; Vivar et al., 1997) y que las altas temperaturas (Anexo 7), que se registraron en el invernadero durante su desarrollo las hayan afectado.



**Figura 3. 7.** Espigas de variedades testigo de cebada maltera cosechadas de plantas inoculadas en invernadero durante la estación invierno-primavera 2017 e inoculadas con suspensión de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de *F. graminearum*. **A)** Espigas de la variedad resistente Seebe; **B)** Shenmai 1, moderadamente resistente; y **C)** Kasota, susceptible. La flecha indica los síntomas de desviación de la espiga y de la enfermedad en grano.

### ***Clasificación de las líneas durante cuatro años de evaluación***

Al clasificar la respuesta para índice IFHB de las líneas por año, se encontró que, en general, conforme se fue avanzando en el ciclo de selección, es decir del sublote 03 (menor ciclo de selección) al sublote Elite (mayor ciclo de selección), se fueron presentando menos líneas R pero más líneas MR o S a la fusariosis (Cuadros 3.8, 3.9 y 3.10). Esto se deduce al transformar el número total de líneas de cada sublote en porcentaje (Cuadro 3.11).

Durante los cuatro años de evaluación se encontró que las siguientes líneas (6%) registraron consistentemente una respuesta R: línea 30, del sublote 01; líneas 63 y 65, del sublote 02;

líneas 73 y 91, del 02A; y líneas 109, 123 y 124, del sub lote 03. El sub lote Elite no registró líneas R a la fusariosis (Cuadro 3.8). En este periodo 51 líneas (39%) registraron una respuesta MR o R, en al menos un año de evaluación (Cuadro 3.9); y 72 líneas (55%) se clasificaron como S, al presentar ésta respuesta en al menos un año de evaluación (Cuadro 3.10).

Cabe señalar que el Programa de Mejoramiento de Cebada del INIFAP-CEVAMEX no hace selección para resistencia a la fusariosis de la espiga. Sin embargo, las líneas 30, 63, 65, 73, 91, 109, 123 y 124, de cebada maltera detectadas en este estudio con respuesta R, pueden ser consideradas en un nuevo programa de cruzamientos en cebada maltera que incluya, en el conjunto de enfermedades, a la fusariosis de la espiga.

**Cuadro 3. 8.** Clasificación de líneas de cebada maltera como resistentes a la infección inicial y a la dispersión de la fusariosis. Estas líneas registraron una respuesta de resistente (R) a la inoculación natural en campo y a la artificial por aspersión, en 2015 y 2017, y a la punción en 2016, en invernadero.

Sublote / No. de línea	Campo 2014	Invernadero		
		2015 <sup>†</sup>	2016 <sup>‡</sup>	2017 <sup>¥</sup>
<b>01</b>				
30	R	R	R	R
<b>02</b>				
63	R	R	R	R
65	R	R	R	R
<b>02A</b>				
73	R	R	R	R
91	R	R	R	R
<b>03</b>				
109	R	R	R	R
123	R	R	R	R
124	R	R	R	R

<sup>†</sup>Cepa de *F. graminearum* CIMFU1189; nivel de inóculo, 100, 000 conidios/mL. <sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CIMFU1308, 1310, 1312 y 1313; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL. <sup>¥</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL

**Cuadro 3. 9.** Clasificación de líneas de cebada maltera como moderadamente resistentes (MR) a la fusariosis por haber registrado respuestas R y MR en campo e invernadero, durante cuatro años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión, en 2015 y 2017, y por punción en 2016.

No. de línea	Campo 2014	Invernadero		
		2015 <sup>†</sup>	2016 <sup>‡</sup>	2017 <sup>¥</sup>
<b>Elite</b>				
2	MR	MR	MR	R
4	MR	R	MR	R
7	R	MR	MR	R
9	MR	MR	MR	R
11	MR	MR	R	R
12	MR	MR	MR	R
13	R	R	MR	R
<b>01</b>				
20	R	R	MR	R
21	MR	MR	MR	MR
25	R	MR	MR	R
27	MR	MR	MR	R
28	MR	R	MR	R
29	MR	R	MR	R
31	R	R	MR	R
32	MR	MR	MR	MR
36	R	MR	MR	R
37	R	MR	R	R
39	R	R	MR	R
<b>02</b>				
44	MR	R	MR	R
45	MR	R	MR	MR
47	MR	R	R	R
48	R	R	MR	R
49	MR	R	MR	R
53	MR	MR	MR	R
57	MR	R	MR	R
60	MR	R	MR	MR
62	MR	R	R	MR
71	MR	R	MR	MR

<sup>†</sup>Cepa de *F. graminearum* CIMFU1189; nivel de inóculo, 100, 000 conidios/mL. <sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CIMFU1308, 1310, 1312 y 1313; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL. <sup>¥</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL.

**Cuadro 3. 9.** Clasificación de líneas de cebada maltera como moderadamente resistentes (MR) a la fusariosis por haber registrado respuestas R y MR en campo e invernadero, durante cuatro años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión, en 2015 y 2017, y por punción en 2016... **Continuación**

No. de línea	Campo 2014	Invernadero		
		2015 <sup>†</sup>	2016 <sup>‡</sup>	2017 <sup>¥</sup>
<b>02A</b>				
72	R	R	MR	R
76	R	R	MR	MR
78	MR	R	MR	R
79	R	R	MR	R
84	R	MR	MR	R
89	R	MR	MR	R
95	R	R	MR	R
96	R	R	MR	R
101	MR	R	MR	R
<b>03</b>				
106	R	R	MR	R
107	R	R	MR	R
108	R	R	MR	R
110	R	MR	MR	R
111	R	R	MR	R
112	R	R	MR	R
113	MR	MR	R	R
114	R	MR	MR	R
115	R	R	MR	R
116	R	R	MR	R
119	R	MR	R	R
122	R	R	MR	R
128	MR	R	MR	R
129	MR	R	R	R

<sup>†</sup>Cepa de *F. graminearum* CIMFU1189; nivel de inóculo, 100, 000 conidios/mL. <sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CIMFU1308, 1310, 1312 y 1313; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL. <sup>¥</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL.

**Cuadro 3. 10.** Clasificación de líneas de cebada maltera como susceptibles (S) a la fusariosis por haber registrado al menos una respuesta S en campo o invernadero, durante cuatro años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión en 2015 y 2017, y por punción en 2016.

Sublote /No. de línea	Campo 2014	Invernadero		
		2015 <sup>†</sup>	2016 <sup>‡</sup>	2017 <sup>¥</sup>
<b>Elite /</b> 1	S	S	MR	R
3	S	MR	MR	R
5	S	MR	MR	R
6	S	S	MR	R
8	S	R	MR	R
10	MR	MR	MR	S
14	MR	R	S	R
15	MR	S	MR	S
16	S	R	MR	R
<b>01 /</b> 17	MR	MR	MR	S
18	S	R	MR	R
19	R	MR	S	S
22	MR	R	S	MR
23	R	S	MR	R
24	MR	R	S	S
26	R	MR	S	R
33	R	S	MR	S
34	R	R	MR	S
35	S	S	MR	MR
38	R	R	MR	S
40	S	R	MR	R
41	S	R	R	R
<b>02 /</b> 42	R	R	S	R
43	R	R	S	R
46	R	R	S	R
<b>50</b>	MR	R	S	S
51	MR	R	S	R
52	S	R	S	R
54	R	R	S	MR
55	MR	R	S	R
56	MR	R	S	R
58	MR	R	S	R
61	MR	MR	S	S
64	MR	R	S	R
66	R	R	S	R
67	R	R	S	R
68	R	S	R	R
69	R	R	MR	S
70	MR	MR	S	MR
75	R	R	S	R

<sup>†</sup>Cepa de *F. graminearum* CIMFU1189; nivel de inóculo, 100, 000 conidios/mL. <sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CIMFU1308, 1310, 1312 y 1313; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL. <sup>¥</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL

**Cuadro 3. 10.** Clasificación de líneas de cebada maltera como susceptibles (S) a la fusariosis por haber registrado al menos una S en campo e invernadero, durante cuatro años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión en 2015 y 2017, y por punción en 2016. ...**Continuación**

Sublote /No. de línea	Campo 2014	Invernadero		
		2015 <sup>†</sup>	2016 <sup>‡</sup>	2017 <sup>¥</sup>
<b>02A /</b> 74	MR	R	R	S
75	R	R	S	R
77	MR	MR	S	R
80	MR	R	S	R
81	R	R	S	R
82	R	R	S	R
83	MR	MR	S	MR
85	R	S	MR	R
86	MR	S	S	R
87	MR	R	S	R
88	MR	MR	S	R
90	MR	MR	S	R
92	R	R	S	R
93	R	R	S	R
94	R	S	MR	R
97	MR	MR	S	R
98	R	R	S	R
99	R	R	S	R
100	R	S	S	R
<b>03 /</b> 102	R	R	S	R
103	MR	R	S	R
104	R	S	S	R
105	R	R	MR	S
117	R	MR	S	R
118	R	MR	MR	S
120	R	S	MR	R
121	MR	S	MR	R
125	MR	R	S	R
126	R	S	S	R
127	MR	MR	S	R
130	S	R	S	MR
131	S	R	MR	R

<sup>†</sup>Cepa de *F. graminearum* CIMFU1189; nivel de inóculo, 100, 000 conidios/mL. <sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CIMFU1308, 1310, 1312 y 1313; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL. <sup>¥</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL.

**Cuadro 3. 11.** Comparación del porcentaje de líneas de cebada maltera de acuerdo a la respuesta a la fusariosis de la espiga en invernadero y campo durante el periodo 2014 a 2017.

Sublote / No. de líneas	% de Líneas con respuesta		
	R	MR	S
<b>Elite</b>			
16	0	44	56
<b>01</b>			
25	4	44	52
<b>02</b>			
30	7	33	60
<b>02A</b>			
30	7	30	63
<b>03</b>			
30	10	47	43

R, Resistente; MR, Moderadamente resistente; S, susceptible

### *Clasificación de líneas por tipo de resistencia*

Se analizó el tipo de respuesta de las líneas de acuerdo al método de inoculación (aspersión o punción) para deducir el tipo de resistencia de la línea (resistencia tipo I o resistencia tipo II).

*Resistencia tipo I.*- La resistencia tipo I es considerada como la resistencia a la infección inicial, y se evalúa a través de la inoculación de la planta por aspersión. La infección natural en campo se incluyó en este tipo de resistencia. Considerando lo anterior, los resultados indican que el 29 % de las líneas evaluadas presentaron resistencia a la infección inicial (Cuadro 3.12). Los sublotes 02A y 03 registraron el mayor número de líneas con resistencia tipo I; el 42% (55 líneas) fueron moderadamente resistentes a la infección inicial (Cuadro 3.13); y el 29% (38 líneas) se clasificaron como susceptibles a la infección inicial (Cuadro 3.14).

**Cuadro 3. 12.** Clasificación de líneas de cebada maltera como resistentes (R) de acuerdo a la infección inicial (resistencia Tipo I) de la fusariosis por haber registrado solamente respuestas R en campo e invernadero durante tres años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión.

No. de línea	Campo 2014	Invernadero		No. de línea	Campo 2014	Invernadero	
		2015 <sup>†</sup>	2017 <sup>‡</sup>			2015	2017
<b>Elite</b>				<b>02A</b>			
13	R	R	R	82	R	R	R
<b>01</b>				91	R	R	R
20	R	R	R	92	R	R	R
30	R	R	R	93	R	R	R
31	R	R	R	95	R	R	R
39	R	R	R	96	R	R	R
<b>02</b>				98	R	R	R
42	R	R	R	99	R	R	R
43	R	R	R	<b>03</b>			
46	R	R	R	102	R	R	R
48	R	R	R	106	R	R	R
63	R	R	R	107	R	R	R
65	R	R	R	108	R	R	R
66	R	R	R	109	R	R	R
67	R	R	R	111	R	R	R
<b>02A</b>				112	R	R	R
72	R	R	R	115	R	R	R
73	R	R	R	116	R	R	R
75	R	R	R	122	R	R	R
79	R	R	R	123	R	R	R
81	R	R	R	124	R	R	R

<sup>†</sup>Cepa de *F. graminearum* CIMFU1189; nivel de inóculo, 100, 000 conidios/mL

<sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL

**Cuadro 3. 13.** Clasificación de líneas de cebada maltera como moderadamente resistentes (MR) de acuerdo a la infección inicial (resistencia Tipo I) de la fusariosis por haber registrado tanto respuestas R como MR en campo e invernadero, durante tres años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión.

No. de línea	Campo 2014	Invernadero		No. de línea	Campo 2014	Invernadero	
		2015 <sup>†</sup>	2017 <sup>‡</sup>			2015	2017
<b>Elite</b>				<b>02</b>			
2	MR	MR	R	60	MR	R	MR
4	MR	R	R	62	MR	R	MR
7	R	MR	R	64	MR	R	R
9	MR	MR	R	70	MR	MR	MR
11	MR	MR	R	71	MR	R	MR
12	MR	MR	R	<b>02A</b>			
14	MR	R	R	76	R	R	MR
<b>01</b>				77	MR	MR	R
21	MR	MR	MR	78	MR	R	R
22	MR	R	MR	80	MR	R	R
25	R	MR	R	83	MR	MR	MR
26	R	MR	R	84	R	MR	R
27	MR	MR	R	87	MR	R	R
28	MR	R	R	88	MR	MR	R
29	MR	R	R	89	R	MR	R
32	MR	MR	MR	90	MR	MR	R
36	R	MR	R	97	MR	MR	R
37	R	MR	R	101	MR	R	R
<b>02</b>				<b>03</b>			
44	MR	R	R	103	MR	R	R
45	MR	R	MR	110	R	MR	R
47	MR	R	R	113	MR	MR	R
49	MR	R	R	114	R	MR	R
51	MR	R	R	117	R	MR	R
53	MR	MR	R	119	R	MR	R
54	R	R	MR	125	MR	R	R
55	MR	R	R	127	MR	MR	R
56	MR	R	R	128	MR	R	R
57	MR	R	R	129	MR	R	R
58	MR	R	R				

<sup>†</sup>Cepa de *F. graminearum* CIMFU1189; nivel de inóculo, 100, 000 conidios/mL

<sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL

**Cuadro 3. 14.** Clasificación de líneas de cebada maltera como susceptibles (S) de acuerdo a la infección inicial (resistencia Tipo I) de la fusariosis por haber registrado al menos una respuesta S en campo o invernadero, durante tres años de evaluación. En campo la inoculación fue natural y en invernadero artificial por aspersión.

No. de línea	Campo 2014	Invernadero		No. de línea	Campo 2014	Invernadero	
		2015 <sup>†</sup>	2017 <sup>‡</sup>			2015	2017
<b>Elite</b>				<b>02</b>			
1	S	S	R	52	S	R	R
3	S	MR	R	59	MR	R	S
5	S	MR	R	61	MR	MR	S
6	S	S	R	68	R	S	R
8	S	R	R	69	R	R	S
10	MR	MR	S	<b>02A</b>			
15	MR	S	S	74	MR	R	S
16	S	R	R	85	R	S	R
<b>01</b>				86	MR	S	R
17	MR	MR	S	94	R	S	R
18	S	R	R	100	R	S	R
19	R	MR	S	<b>03</b>			
23	R	S	R	104	R	S	R
24	MR	R	S	105	R	R	S
33	R	S	S	118	R	MR	S
34	R	R	S	120	R	S	R
35	S	S	MR	121	MR	S	R
38	R	R	S	126	R	S	R
40	S	R	R	130	S	R	MR
41	S	R	R	131	S	R	R
50	MR	R	S				

<sup>†</sup>Cepa de *F. graminearum* CIMFU1189; nivel de inóculo, 100, 000 conidios/mL

<sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30; nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL

*Resistencia tipo II.*- La resistencia tipo II es considerada como la resistencia a la dispersión de la enfermedad en la espiga, y se evalúa a través de la inoculación de la planta por punción. Considerando lo anterior, los resultados indican que el 14% de las líneas evaluadas presentaron resistencia a la dispersión (Cuadro 3.15). Los sublotos 02 y 03 registraron el

mayor número de líneas con resistencia tipo II; el 53% (69 líneas) fueron moderadamente resistentes a la dispersión (Cuadro 3.16); y el 33% (44 líneas) se clasificaron como susceptibles a la dispersión de la enfermedad (Cuadro 3.17).

**Cuadro 3. 15.** Clasificación de líneas de cebada maltera como resistentes (R) de acuerdo a la dispersión de la infección (resistencia Tipo II) de la fusariosis por haber registrado solamente respuestas R en invernadero, durante 2016.

<b>Sublote</b>	<b>No. de línea</b>	<b>Respuesta</b>
<b>Elite</b>		
<b>01</b>	11	R
	30	R
	37	R
	41	R
<b>02</b>	47	R
	62	R
	63	R
	65	R
	68	R
<b>02A</b>	73	R
	74	R
	91	R
<b>03</b>	109	R
	113	R
	119	R
	123	R
	124	R
	129	R

‡Mezcla de cepas de *F. graminearum* CIMFU1308, 1310, 1312 y 1313

Nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL

**Cuadro 3. 16.** Clasificación de líneas de cebada maltera como moderadamente resistentes (MR) de acuerdo a la dispersión de la infección (resistencia Tipo II) de la fusariosis por haber registrado respuesta MR, en invernadero durante 2016.

No. de línea	Respuesta <sup>‡</sup>	No. de línea	Respuesta	No. de línea	Respuesta
<b>Elite</b>		<b>01</b>		<b>02A</b>	
1	MR	32	MR	85	MR
2	MR	33	MR	89	MR
3	MR	34	MR	94	MR
4	MR	35	MR	95	MR
5	MR	36	MR	96	MR
6	MR	38	MR	101	MR
7	MR	39	MR	<b>03</b>	
8	MR	40	MR	105	MR
9	MR	<b>02</b>		106	MR
10	MR	44	MR	107	MR
12	MR	45	MR	108	MR
13	MR	48	MR	110	MR
15	MR	49	MR	111	MR
16	MR	53	MR	112	MR
<b>01</b>		57	MR	114	MR
17	MR	59	MR	115	MR
18	MR	60	MR	116	MR
20	MR	69	MR	118	MR
21	MR	71	MR	120	MR
23	MR	<b>02A</b>		121	MR
25	MR	72	MR	122	MR
27	MR	76	MR	128	MR
28	MR	78	MR	131	MR
29	MR	79	MR		
31	MR	84	MR		

<sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CIMFU1308, 1310, 1312 y 1313.

Nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL

**Cuadro 3. 17.** Clasificación de líneas de cebada maltera como susceptibles (S) de acuerdo a la dispersión de la infección (resistencia Tipo II) de la fusariosis por haber registrado al menos una respuesta S en invernadero, durante el 2016.

<b>Sublote</b>	<b>No. de línea</b>	<b>Respuesta<sup>‡</sup></b>	<b>Sublote</b>	<b>No. de línea</b>	<b>Respuesta</b>
<b>Elite</b>			<b>02A</b>		
	14	S		77	S
<b>01</b>				80	S
	19	S		81	S
	22	S		82	S
	24	S		83	S
	26	S		86	S
<b>02</b>				87	S
	42	S		88	S
	43	S		90	S
	46	S		92	S
	50	S		93	S
	51	S		97	S
	52	S		98	S
	54	S		99	S
	55	S		100	S
	56	S	<b>03</b>		
	58	S		102	S
	61	S		103	S
	64	S		104	S
	66	S		117	S
	67	S		125	S
	70	S		126	S
<b>02A</b>				127	S
	75	S		130	S

<sup>‡</sup>Mezcla de cepas de *F. graminearum* CIMFU1308, 1310, 1312 y 1313.

Nivel de inóculo, 70, 000 conidios/mL

Al analizar los resultados de tipo de infección en porcentaje se observa que conforme se fue avanzando en el ciclo de selección, es decir del sub lote 03 (menor ciclo de selección) al sub lote Elite (mayor ciclo de selección), se registraron menos líneas con resistencia tipo I y resistencia tipo II (Cuadro 3.18). Lo anterior indica que durante el programa de cruzamientos del INIFAP-CEVAMEX para el mejoramiento de cebada maltera con tolerancia a roya lineal amarilla, roya de la hoja, mancha reticulada, tizón foliar y escaldadura de la hoja, se fueron perdiendo algunas características relacionadas con la resistencia tipo I y tipo II de la fusariosis de la espiga en las 131 líneas evaluadas en este estudio.

**Cuadro 3. 18.** Comparación en porcentaje de líneas de cebada maltera entre los tipo de resistencia a la fusariosis de la espiga en invernadero, durante tres años de evaluación el para la resistencia Tipo I y de un año para la Tipo II.

Sublote # Líneas	% de líneas con respuesta					
	Tipo I			Tipo II		
	R	MR	S	R	MR	S
<b>Elite</b>						
16	6	44	50	6	88	6
<b>01</b>						
25	16	40	44	12	72	16
<b>02</b>						
30	27	53	20	17	33	50
<b>02A</b>						
30	43	40	17	10	37	53
<b>03</b>						
30	40	33	27	20	53	27

R, Resistente; MR, Moderadamente resistente; S, susceptible

## CONCLUSIONES

- Durante el periodo de 2014 a 2017, las líneas avanzadas 30, 63, 65, 109, 123 y 124, y las líneas 73 y 91, de seis y dos hileras de grano, respectivamente, registraron síntomas muy bajos de fusariosis de la espiga en infección natural y en respuesta a la inoculación por aspersión y punción con *F. graminearum*.
- Las líneas avanzadas 30, 63, 65, 73, 91, 109, 123 y 124, presentaron resistencia tipo I y resistencia tipo II a la fusariosis de la espiga.
- Las líneas avanzadas 15 y 33 registraron consistentemente respuesta susceptible a la fusariosis de espiga cuando se inocularon por aspersión por lo que podrían considerarse como testigos susceptibles en nuevos programas de cruzamientos.
- La información generada en este estudio es relevante ya que indica que las ocho líneas señaladas arriba son resistentes a la fusariosis de la espiga y tienen potencial para utilizarse como fuentes de resistencia en un programa de cruzamientos en cebada maltera que incluya en el conjunto de enfermedades a la fusariosis de la espiga.

En este estudio se acepta la hipótesis de que en el programa de cruzamientos de cebada maltera del INIFAP-CEVAMEX se tienen líneas resistentes a la fusariosis de la espiga.

**CAPITULO IV. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE  
DEOXINIVALENOL EN SEMILLA DE CEBADA MALTERA DE PLANTAS  
INOCULADAS CON *Fusarium graminearum***

**RESUMEN**

La fusariosis de la espiga ocasionada por *F. graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zae* (Schw.)) afecta la calidad sanitaria del grano por la producción de compuestos tóxicos como el deoxinivalenol (DON) o vomitoxina. El deoxinivalenol daña la salud de animales y personas que consumen granos o productos de cebada maltera contaminados. Por lo anterior el objetivo de este estudio fue evaluar la resistencia a la acumulación de DON en semilla de 56 líneas avanzadas de cebada maltera, seleccionadas por haberse comportado como resistentes (54 líneas) y susceptibles (2 líneas) a la fusariosis en invernadero. La semilla se cosecho de plantas inoculadas por aspersión con mezcla de cepas de *F. graminearum*, aisladas de semilla de cebada. Los resultados del análisis por la prueba RIDASCREEN® FAST DON indicaron diferencias entre las líneas en el contenido de DON en la semilla. Los niveles en el contenido de DON fueron de 0 a 30 ppm/Kg de los cuales se encontraron: 26 líneas con 0 a 4 ppm /Kg; 14 líneas con 5 a 11 ppm /Kg; y, 16 líneas con  $\geq 12$  ppm /Kg. Aunque el contenido de DON de las líneas susceptibles fue alto (18.1 ppm /Kg) no se encontró correlación positiva entre severidad de la enfermedad y contenido de DON. Los resultados indican que la resistencia a la fusariosis no necesariamente se correlaciona con la resistencia a la acumulación de la micotoxina DON en semilla de cebada maltera.

**Palabras clave:** Deoxinivalenol, *Fusarium graminearum*, *Hordeum vulgare*, semilla.

**DETECTION AND QUANTIFICATION OF DEOXYNIVALENOL LEVELS IN  
MALTING BARLEY SEED OF INOCULATED PLANTS WITH *Fusarium*  
*graminearum***

**ABSTRACT**

Fusarium head blight caused by *F. graminearum* Schwabe (teleomorph *Gibberella zeae* (Schw.)) affects the phytosanitary quality of the grain by the production of toxic compounds such as deoxynivalenol (DON) or vomitoxin. Deoxynivalenol damages the health of animals and people who consume contaminated grain or malting barley products. Therefore, the objective of this study was to evaluate the resistance to the accumulation of DON in seed of 56 advanced lines of malting barley, selected for having behaved as resistant (54 lines) and susceptible (2 lines) to Fusarium head blight in greenhouse. The seed was harvested from plants inoculated by sprinkling with a mixture of *F. graminearum* strains, isolated from barley seed. The results of the analysis by the RIDASCREEN® FAST DON test indicated differences between the lines in the DON content in the seed. The levels in the DON content were from 0 to 30 ppm / Kg of which were found: 26 lines with 0 to 4 ppm / Kg; 14 lines with 5 to 11 ppm / Kg; and, 16 lines with  $\geq 12$  ppm / Kg. Although the DON content of the susceptible lines was high (18.1 ppm / Kg), no positive correlation was found between severity of the disease and DON content. The results indicate that the resistance to Fusarium head blight does not necessarily correlate with the resistance to the accumulation of DON mycotoxin in malting barley seed.

**Key words:** Deoxynivalenol, *Fusarium graminearum*, *Hordeum vulgare*, seed.

## INTRODUCCIÓN

### *Efecto del consumo de grano contaminado con toxina DON*

El consumo de granos o productos de cebada maltera contaminados con *F. graminearum* afecta la salud de las personas y de los animales debido a la producción de compuestos tóxicos como el deoxinivalenol (DON), del grupo de los tricotecenos por el hongo (Bezerra et al., 2014). La micotoxina DON, ocasiona vómito en las personas y rechazo del alimento en animales de ahí que también se conozca como vomitoxina (Zain, 2011).

### *Límites de tolerancia de DON en grano contaminado*

La industria alimentaria ha implementado límites de tolerancia a la concentración de DON en el grano contaminado. Al respecto la agencia de drogas y alimentación norteamericana FDA (por sus siglas en inglés) establece los siguiente límites en granos y subproductos de granos de trigo: 1 ppm para productos de trigo (harina, salvado y germen) destinados para consumo humano; 5 ppm para productos de grano para alimentos para cerdos; de 10 ppm para granos y subproductos de grano para la elaboración de alimentos para ganado bovino y pollos; y de 30 ppm, en granos para destilería (FDA, 2010). Sin embargo, la industria cervecera estableció un límite de 0.5 ppm para la producción de malta (Windels, 2000). Lo anterior indica que la fusariosis es una enfermedad que limita no solo el rendimiento sino que también afecta la calidad sanitaria del grano repercutiendo negativamente en los sectores agropecuario, alimenticio e industrial. De Wolf et al. (2003) y Bondalapati et al. (2012) indican que condiciones de humedad relativa alrededor de 90 % y temperatura de 15 a 30 °C durante el periodo de antesis son favorables para el desarrollo de la fusariosis y la acumulación de DON en el grano.

### ***Prueba serológica para la detección de DON***

La prueba serológica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), o ensayo de inmunoabsorbencia ligada a una enzima, es una técnica bioquímica que permite detectar y cuantificar no solo microorganismos (bacterias, hongos, virus, entre otros) sino también moléculas (hormonas, proteínas y toxinas) en solución o en extracto de tejido. La técnica ELISA tiene como principios movilizar al antígeno o al anticuerpo, marcados con una enzima ( $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa), en una placa de poliestireno y cuantificar la generación de color, resultado de la actividad de la enzima con su sustrato. La reacción colorida generada se mide en un espectrofotómetro y el valor obtenido indica la presencia y cantidad del antígeno en la muestra (Albrechtsen, 2006).

Actualmente se cuenta con los tipos de ELISA siguientes: directo, indirecto, sándwich y competitivo. La diferencia entre ellos radica en si es el anticuerpo o el antígeno el que se marca con la enzima. En los tres primeros tipos es el anticuerpo el que se marca con la enzima; mientras que, en el último es el antígeno.

La ELISA competitiva se ha utilizado para la detección de la micotoxina zearalenona en alimento porcino (Dong et al., 2018) y para la detección de la micotoxina DON en semilla contaminada con especies de *Fusarium*.

A nivel comercial se cuenta con “kits” de ELISA competitiva los cuales son prácticos, rápidos, confiables, objetivos y automatizados. La reacción se establece en placas de poliestireno donde se forma el conjugado antígeno (micotoxina en este estudio)-anticuerpo (de captura y anti-deoxinivalenol) cuya presencia se evidencia por un cambio del sustrato cromógeno (de incoloro a color azul) en el medio por la enzima peroxidasa. La micotoxina DON problema compite con el conjugado deoxinivalenol-enzima por los sitios de unión del anticuerpo antideoxinivalenol (inmunoensayo enzimático competitivo).

Con la finalidad de generar información sobre la resistencia a la acumulación de la micotoxina DON en semilla de 54 líneas avanzadas de cebada maltera, que se comportaron como resistentes a la fusariosis en la prueba por aspersión en invernadero, durante la estación invierno-primavera 2017, el objetivo y la hipótesis de este trabajo fueron los siguientes.

### **OBJETIVO**

Detectar y cuantificar los niveles de producción de la micotoxina DON en semilla de 54 líneas resistentes y en semilla de dos líneas susceptibles de cebada maltera, cosechadas de plantas crecidas en invernadero e inoculadas con *F. graminearum*, con la prueba ELISA-RIDASCREEN® FAST DON.

### **HIPÓTESIS**

Al menos una línea avanzada de cebada maltera presenta resistencia a la fusariosis y a la acumulación de la micotoxina DON en semilla.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

La semilla utilizada para este estudio se obtuvo de las plantas crecidas para la investigación de la evaluación de la resistencia a la fusariosis de la espiga, descrita en el Capítulo III (página 79, Cuadro 3.7). Se seleccionó al azar la semilla de 54 líneas con respuesta de resistente (R) y la de las líneas 15 y 33, con respuesta de susceptible (S) a la fusariosis, de la estación invierno-primavera 2017. Se incluyó también semilla de las variedades comerciales Seebe, Shenmai 1 y Kasota, con respuesta a la fusariosis de R, MR y S, respectivamente, para analizarse y comparar su contenido con el de las líneas de cebada maltera.

En resumen, semilla de los sublotos Elite (10 líneas), 01 (8 líneas), 02 (11 líneas), 02A (14 líneas), 03 (13 líneas) así como de las variedades comerciales (testigos) Seebe, Shenmai 1 y Kasota se obtuvo de plantas inoculadas con una mezcla de las cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de *F. graminearum*, aisladas de cebada. Las plantas se inocularon en estado fenológico de emisión de espiga por aspersión con 200 µL de suspensión de macroconidios (70,000 macroconidios por mL) y se cubrieron con bolsas de plástico transparente por 48 h para favorecer la infección. Se realizó una segunda inoculación a los 4 días después de la primera inoculación. Las espigas de cada línea y variedad se cosecharon en madurez fisiológica, se colocaron en bolsas de papel perforadas por separado y se secaron a temperatura ambiente en el invernadero. La semilla se guardó en bolsas de papel etiquetadas y se conservó en el laboratorio a temperatura ambiente previo a su procesamiento.

### ***Análisis de toxina DON***

Después de tres meses de almacenamiento, la semilla de las 56 líneas y testigos (3) se analizó con los reactivos y protocolo de RIDASCREEN®FAST DON (r-Biopharm) (inmunoensayo enzimático (ELISA)). La semilla se molió por separado en un molino Iwatani 200W (AC 100 V, 50-60 HZ Pushon. Japón) por 40 s. La harina se recuperó en tubos Eppendorf de 50 mL con tapa rosca y se mezcló para homogeneizar. De cada material se tomó 2 g de harina y se depositaron por separado en un tubo Eppendorf de 50 mL para su análisis, con algunas modificaciones propuestas por CIMMYT. A esta muestra se le agregó 40 mL de agua y se agitó a 400 rpm por 3 min (Agitador Lab-line, modelo 4626). Un mililitro de la suspensión obtenida se depositó en un tubo Eppendorf de 2 mL para centrifugarse a 13,000 rpm (MIKRO 220R) por 15 min. Del sobrenadante obtenido se tomaron 200 µL y se almacenaron en

refrigeración para su posterior análisis, en las siguientes 24 h. Las reacciones se establecieron en placas de poliestireno con 96 pocillos, sensibilizadas con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-deoxinivalenol. De cada una de las 59 muestras (líneas y testigos) y de cada estándar (0, 0.222, 0.666, 2 y 6 ppm de deoxinivalenol en agua) se tomaron 50  $\mu$ L y se depositaron en la placa de acuerdo a un diagrama de carga preestablecido. La lectura de la placa se hizo en un lector de ELISA (LABOMED INC. EMR-500) a 450 nm; y la visualización de los datos, con el programa RIDAWIN.EXE Ver. 1.77.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Detección y cuantificación de DON en semilla*

Los resultados del análisis de la semilla, proveniente de las 56 líneas y variedades testigo (3) de cebada se muestran en el Cuadro 4.1. Las semillas de 49 líneas analizadas resultaron positivas a la acumulación de la micotoxina DON por la prueba RIDASCREEN®FAST DON (r-Biopharm). En contraste, la semilla de las líneas 28, 65, 73, 90, 91, 96 y 112 registró valores por debajo del límite de detección (0.2 ppm/Kg) y del límite de cuantificación (0.36 ppm/Kg) para avena, de acuerdo al protocolo de RIDASCREEN®FAST DON (r-Biopharm). Tomando como referencia el intervalo de valores registrado por los testigos Seebe (R, 3.4-4.0 ppm/Kg), Shenmai 1 (MR, 5.8–10.1 ppm/Kg) y Kasota (S, 22.0-22.8 ppm/Kg), las líneas se clasificaron como: R, 26 líneas, MR, 14 líneas y S, 16 líneas (Cuadro 4.1) a la acumulación de DON. Las líneas 15 y 33 incluidas como testigos S registraron concentraciones de  $\geq 12$  ppm/Kg.

Al relacionar los valores promedio de contenido de DON con los de severidad de la enfermedad, obtenidos en el estudio del capítulo III (página 78), se encontró bajo coeficiente de correlación ( $r = 0.5682$ ) (Figura 4.1). Esta baja correlación se ilustra con los valores obtenidos (23.2 ppm/Kg en promedio de DON) por las líneas 23, 82 y 119, clasificadas previamente como R a la fusariosis de la espiga resultaron susceptibles a la producción de DON (Cuadro 4.1). Sin embargo, las líneas 15 y 33, clasificadas como S a la fusariosis, acumularon alto contenido de DON (18.1 ppm/Kg en promedio) y se clasificaron como S a la acumulación de DON. Por lo anterior las líneas 15 y 33 de los sublotos Elite y 01, respectivamente, podrían considerarse como testigos S en estudios futuros de cruzamientos para búsqueda de resistencia a la fusariosis y a la acumulación de la micotoxina DON en cebada.

En la literatura no se encontró consenso en la relación entre el contenido de DON y las variables relacionadas con la producción. Mientras que Geddes et al. (2008) y Khatibi et al. (2012) reportaron baja correlación ( $r = 0.360$  y  $r = 0.44$ , respectivamente) entre el contenido de DON y la severidad de la fusariosis en cebada, Chrpova et al. (2011) reportaron alta correlación positiva entre los valores de síntomas visuales de la enfermedad y los de contenido de DON ( $r = 0.76$ ;  $P < 0.01$ ) así como con los del contenido de DON y el peso de grano por espiga ( $r = 0.62$ ;  $P < 0.01$ ) y entre los del contenido de DON y los de peso de mil granos ( $r = 0.71$ ;  $P < 0.01$ ) en ese mismo cultivo.

**Cuadro 4.1.** Porcentaje de severidad y clasificación de las líneas de cebada en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo a la acumulación de DON.

Sublote No. de línea	% Severidad <sup>†</sup>	DON (ppm / Kg) <sup>‡‡</sup>		
		0 – 4 (R)	5 - 11 (MR)	≥ 12 (S)
<b>Elite</b> 1	5.5			15.6 - 17.4
3	1.3	1.7 - 2.0		
4	0.8	3.0 - 3.1		
5	4.1			13.4 - 20.3
7	4.5			10.0 - 14.8
8	2.5		5.9 - 6.0	
9	2.2	3.5 - 4.4		
12	0.2	2.7 - 3.4		
14	7.7			17.7 - 18.0
15	17			17.1 - 19.1
<b>01</b> 18	4.3		7.7 - 10.8	
21	7.6			11.3 - 16.20
23	5.8			21.0 - 30.4
28	0.1	0.11 - 0.13		
30	0.6	0.7 - 0.8		
33	42.8			16.7 - 19.7
36	6.3			13.9 - 19.4
41	6.3		5.1 - 5.1	
<b>02</b> 42	1.6	2.1 - 2.0		
46	6.8			16.3 - 20.0
47	0.1	0.6 - 0.8		
48	0.4	3.2 - 3.3		
53	2.2		6.4 - 6.9	
56	1.4	1.2 - 1.3		
58	3.2		5.1 - 5.2	
63	3.5		10.5 - 11.1	
65	0.09	0.01 - 0.04		
67	7.3			11.7 - 13.6
68	4.3			11.3 - 12.7

<sup>†</sup>Plantas inoculadas por aspersión con mezcla de cepas de *F. graminearum* (70,000 macroconidios por mL).

<sup>‡</sup>Referencia: Seebe (R, 3.4 -4.0), Shenmai 1 (MR, 5.8–10.1) y Kasota (S, 22.0-22.8).

<sup>¥</sup>Límite detección= 0.2 ppm/Kg; límite cuantificación= 0.36 ppm/Kg para avena.

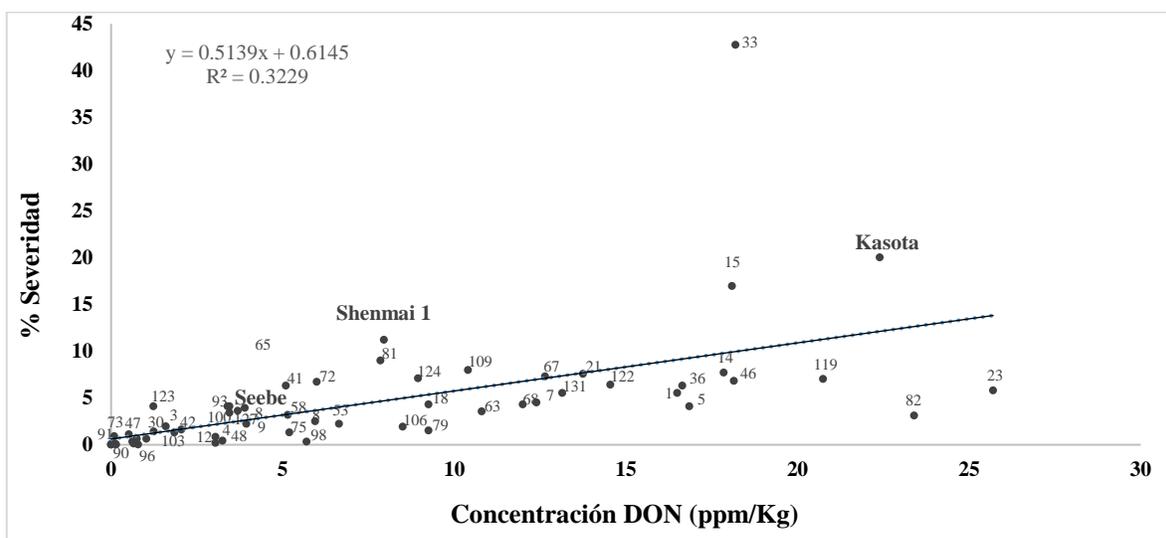
**Cuadro 4.1.** Porcentaje de severidad y clasificación de las líneas de cebada en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo a la acumulación de DON....Continuación.

Sublote No. de línea	% Severidad <sup>†</sup>	DON (ppm / Kg) <sup>‡‡</sup>		
		0 - 4 (R)	5 - 11 (MR)	≥ 12 (S)
<b>02A</b> 72	6.7		4.8 - 7.2	
73	0.0	0.01 - 0.02		
75	1.3		5.4 - 5.0	
79	1.5		8.4 - 10.1	
81	9.0		6.8 - 8.9	
82	3.1			24.0 - 22.8
85	3.9	3.6 - 4.2		
87	0.3	0.5 - 0.7		
90	0.0	0.0 - 0.0		
91	0.0	0.1 - 0.1		
93	4.1	2.7 - 4.2		
96	0.0	0.0 - 0.0		
98	0.3		5.4 - 6.0	
100	3.4	1.7 - 5.2		
<b>03</b> 103	0.6	0.8 - 1.3		
106	1.9		7.7 - 9.3	
109	8.0		9.0 - 11.8	
112	0.9	0.09 - 0.12		
114	0.0	0.8 - 0.8		
116	1.1	0.4 - 0.7		
119	7.0			19.1 - 22.4
122	6.4			14.5 - 14.6
123	2.0	1.5 - 1.7		
124	7.1		8.1 - 9.8	
125	4.1	1.0 - 1.5		
127	4.1	2.0 - 4.8		
131	5.5			12.4 - 13.9

<sup>†</sup>Plantas inoculadas por aspersión con mezcla de cepas de *F. graminearum* (70,000 macroconidios por mL).

<sup>‡</sup>Referencia: Seebe (R, 3.4 -4.0), Shenmai 1 (MR, 5.8–10.1) y Kasota (S, 22.0-22.8).

<sup>¥</sup>Límite detección= 0.2 ppm/Kg; límite cuantificación= 0.36 ppm/Kg para avena.



**Figura 4.1.** Correlación de severidad de la enfermedad y acumulación de micotoxina DON en semilla de espigas inoculadas por aspersión con mezcla de cepas de *F. graminearum*, en invernadero en 2017. Los valores son promedio de dos repeticiones y los números dentro de la figura indican la línea.

## CONCLUSIONES

- Se encontraron diferencias entre líneas de cebada maltera en el contenido de la micotoxina DON en semilla por la prueba RIDASCREEN® FAST DON. Del total de líneas, 49 resultaron positivas; y siete negativas, a la micotoxina.
- Los niveles en el contenido de DON fueron de 0 a 30 ppm/Kg y de acuerdo a este contenido las líneas se clasificaron como: R, 26 líneas (0 a 4 ppm /Kg); MR, 14 líneas (5 a 11 ppm /Kg); y S, 16 líneas ( $\geq 12$  ppm /Kg).
- La correlación fue baja ( $r = 0.5682$ ) entre severidad de la enfermedad y contenido de DON en 56 líneas de cebada maltera.

- Los resultados obtenidos en este estudio indican que la resistencia a la fusariosis no necesariamente se correlaciona con la resistencia a la acumulación de la micotoxina DON en semilla de cebada maltera.

En este estudio se acepta la hipótesis de que al menos una línea avanzada de cebada maltera presenta resistencia a la fusariosis y a la acumulación de la micotoxina DON en semilla de plantas crecidas en invernadero.

## CONCLUSIONES GENERALES

- *Fusarium graminearum* se encontró presente en las principales regiones productoras de cebada maltera de Valles Altos y Bajío. La diversidad genética entre 38 cepas aisladas, confirmadas molecularmente con el iniciador FG16N, se expresó por diferencias morfológicas (color de las colonias en PDA y agar-hojas de clavel) y niveles de producción de deoxinivalenol (de 0 a 17 ppm/Kg).
- Durante tres años las líneas avanzadas 30, 47, 65 y 123, y las líneas 73, 91 y 96, de seis y dos hileras de grano, respectivamente, registraron síntomas muy bajos de fusariosis en respuesta a la inoculación con *F. graminearum* en pruebas en invernadero. Aunque la severidad de la enfermedad no se relacionó ( $r = 0.5682$ ) con la acumulación de DON, estas líneas registraron muy baja o nula producción de micotoxina cuando se analizaron con la prueba RIDASCREEN® FAST DON de ELISA.
- La información generada en este estudio es relevante ya que indica que estas líneas resistentes a la enfermedad y a la acumulación de DON tienen potencial para utilizarse como fuentes de resistencia en un programa de cruzamientos en cebada maltera que incluya en el conjunto de enfermedades a la fusariosis de la espiga.

## LITERATURA CITADA

- Albrechtsen, S. E. 2006. Serological Testing Methods. *In*: Testing methods for seed transmitted viruses: principles and protocols. Chapter 5: 84- 147.
- Bai, G. H. and G. Shaner. 1996. Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. *Plant Disease*. 80(9):975-979.
- Bertechini, F. C., G. C. Almeida-Ferreira, K. Bertechine G., T. C. Albuquerque A., D. J. Tessmann, M. Machinski J., I. P. Barbosa-Tessmann. 2012. Use of the polymerase chain reaction for detection of *Fusarium graminearum* in bulgur wheat. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 32(1):201-208.
- Bezerra, R. M. E., F. Ch. Oliveira F., F. E. Feitosa M., M. I. Florindo G. and D. Rondina. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 36:159-165.
- Bondalapati, K. D., J. M. Stein, S. M. Neate, S. H. Halley, L. E. Osborne and C. R. Hollings. 2012. Development of weather-based predictive models for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation for spring malting barley. *Plant Dis*. 96:673-680.
- Boddu, J., S. Cho, W.M. Kruger and G. J. Muehlbauer. 2006. Transcriptome analysis of the barley–*Fusarium graminearum* interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19 (4): 407–417.
- Bos, L. and J.E. Parlevliet. 1995. Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Annu. Rev. Phytopathol*. 33: 269-102.
- Bozac, P., S. Popescu, D. Botau, O. M. Boldura, P. Pirvulescu. 2016. Molecular Characterization for some new *Fusarium* Isolates Collected from the West Part of Romania. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(3): 11560 – 11568.
- Cerón-Bustamante, M., T. J. Ward, A. Kelly, M. M. Vaughan, S. P. McCormick, C. Cowger, S. G. Leyva-Mir, H. E. Villaseñor-Mir, V. Ayala-Escobar, C. Nava-Díaz. 2018. Regional differences in the composition of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins associated with wheat in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*. 273: 11–19.
- Chrpová, J., V. Šíp, L. Štočková, L. Stemberková and L. Tvarůžek. 2011. Resistance to *Fusarium* Head Blight in Spring Barley. *Czech J. Genet. Plant Breed*. 47 (2): 58–63.

- De la Torre-Hernández, M. E., D. Sánchez-Rangel, E. Galeana-Sánchez y J. Plasencia-de la Parra. 2014. Fumonisinias – síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides* - maíz. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 17 (1):77-91.
- De Wolf, E. D., L. V. Madden and P. E. Lipps. 2003. Risk assessment models for wheat *Fusarium* head blight epidemics based on withinseason weather data. *Phytopathology*. 93:428-435.
- Dong, G., Y. Pan, Y. Wang, S. Ahmed, Z. Liu, D. Peng, Z. Yuan. 2018. Preparation of a broad-spectrum anti-zearalenone and its primary analogues antibody and its application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Chemistry* 247: 8–15.
- Engle, J. S., L. V. Madden and P. E. Lipps. 2003. Evaluation of Inoculation Methods to Determine Resistance Reactions of Wheat to *Fusarium graminearum*. *Plant Disease*. 87 (12):1530-1535.
- FAO. 2017. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. Estadísticas. Producción. Cultivos. <http://www.fao.org/home/es/>
- FDA. 2010. Guidance for Industry and FDA: Advisory Levels for Deoxynivalenol (DON) in Finished Wheat Products for Human Consumption and Grains and Grain By-Products used for Animal Feed. <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/ucm120184.htm>.
- Fong, Y. K., S. Anuar, H. P. Lim, F. Y. Tham and F. R. Sanderson. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. 14 (3): 127-130
- Geddes, J., F. Eudes, J. R. Toker, W.G. Legge and L. B. Selinger. 2008. Evaluation of inoculation methods on infection and deoxinivalenol production by *Fusarium graminearum* on barley. *Can. J. Plant Pathol.*30:63-73.
- Gilchrist-Saavedra, L. I. 2000. Problemas Fitosanitarios de los Cereales de Grano Pequeño en los Valles Altos de México. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Conferencias Magistrales. 18 (2):132-137.
- Gilchrist-Saavedra, L., G. Fuentes-Dávila, C. Martínez-Cano, R.M. López-Atilano, E. Duveiller, R.P. Singh, M. Henry y A I. García. 2005. Guía práctica para la

- identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT.
- Groth, J. V.; E. A. Ozmon and R. H. Busch. 1999. Repeatability and relationship of incidence and severity measures of scab of wheat caused by *Fusarium graminearum* in inoculated nurseries. *Plant Disease*. 83:1033-1038.
- Gunupuru, L. R.; A. Perochon. and F. M. Doohan. 2017. Deoxynivalenol resistance as a component of FHB resistance. *Trop. plant pathology*. 42:175–183.
- He, X., M. Osman, J. Helm, F. Capettini and P. K. Singh. 2015. Evaluation of Canadian barley breeding lines for *Fusarium* head blight resistance. *Can. J. Plant Sci.* 95: 923-929.
- Helm, J. H., M. J. Cortez, D. F. Salmon, P. E. Jedel and W. M. Stewart. 1996. Registration of ‘Seebe’ barley. *Crop Science*. 36:808-809.
- Ireta, M. J. and S. L. Gilchrist. 1994. *Fusarium* head scab of wheat (*Fusarium graminearum* Schwabe). Wheat special report No. 21b. CIMMYT. México, D.F. 25 p.
- Jansen, C., D. Wettstein, W. Schäfer, K. Karl-Heinz, A. Felk and F. J. Maier. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *PNAS*. 102 (46): 16892–16897.
- Joint Research Centre of the European Commission. 2007. Maize seeds sampling and DNA extraction. Report on the validation of a DNA extraction method from maize seeds and grains. 10 pp.
- Khatibi, P. A., G. Berger, S. Liu, W. S. Brooks, C. A. Griffey and D. G. Schmale. 2012. Resistance to *Fusarium* head blight and deoxinivalenol accumulation in Virginia barley. *Plant Dis*. 96:279-284.
- Kibite, S. 1993. AC Lacombe barley. *Can. J. Plant Sci.* 73: 1087-1089.
- Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First edition. Ed. Blackwell Publishing. USA. 387pp.
- Li, H.-P., A.-B. Wu, Ch.-S. Zhao, O. Scholten, H. Löffler, Y.-C. Liao. 2005. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters* 243: 505–511.

- Logrieco, A., G. Mulé, A. Moretti and A. Bottalico. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 597–609.
- McLaughlin, C. S., M. H. Vaughan, I. M. Campbell, C. W. Wei, M. E. Stafford and B. S. Hansen. 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. *In*: J. Rodricks, C. Hesseltine, M. Mehlman (Eds.), *Mycotoxins in Human and Animal Health*, Chem-Orbital, Park Forest. Pp 263-273.
- Malihipour, A. J. Gilbert, M. Piercey-Normore and S. Cloutier. 2012. Molecular phylogenetic analysis, trichothecene chemotype patterns, and variation in aggressiveness of *Fusarium* isolates causing head blight in wheat. *Plant Disease*. 96 (7):1016-1025.
- Marchand, S., G. Fonquerne, I. Clermont, L. Laroche, T. T. Huynh and F. J. Belzile. 2008. Androgenic response of barley accessions and F1s with *Fusarium* head blight resistance. *Plant Cell Rep.* 27 (3): 443-451.
- McCallum, B. D. and A. Tekauz. 2002. Influence of inoculation method and growth stage on *Fusarium* head blight in barley, *Can. J. Plant Pathol.* 24: 77–80 (2002).
- McCallum, B. D., A. Tekauz and J. Gilbert. 2004. Reaction of a diverse collection of barley lines to *Fusarium* head blight. *Plant Disease*. 88(2):167-174.
- McMullen, M., R. Jones and D. Gallenberg. 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*. 81 (12):1340-1348.
- McMullen, M., G. Bergstrom, E. De Wolf, R. Dill-Macky, D. Hershman, G. Shaner and D. V. Sanford. 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* Head Blight. *Plant Disease*. 96 (12): 1712-1721.
- Méndez-Albores, A. y E. Moreno-Martínez. 2009. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Revista Ciencia. Academia Mexicana de Ciencias.* 60(3): 1- 7.
- Mert-Türk, F., R. Gencer and F. Kahrman. 2014. Chemotyping of the *Fusarium graminearum* isolates and variation in aggressiveness against wheat heads. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(6): 1858-1862.
- Mesterházy, A. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* 108: 675–684.

- Miller, J. D., R. Greenhalgh, Y. Wang and M. Lu 1991. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia*, 83(2): 121-130.
- Miller, J. D., J. Culley, K. Fraser, S. Hubbard, F. Meloche, T. Quillet, W. L. Seaman, K. A. Seifer, K. Turkington and H. Voldeng. 1998. Effect of tillage practice on *Fusarium* head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20: 95–103.
- Mier, T., C. Toriello, M. Ulloa. 2002. Hongos Microscópicos saprobios y parásitos; Métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. México, D.F. 54-57 pp.
- Nicholson, P., D. R. Simpson, G. Weston, H. N. Rezanoor, A. K. Lees, D. W. Parry and D. Joyce. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 53:17-37.
- Nganje, W. E., D. A. Bangsund, F. L. Leistritz, W. W. Wilson and N. M. Tiapo. 2004. Regional economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley. *Rev. Agric. Econ.* 26:332-347.
- Ramírez, M. S. E. 2017. Aislamiento de *Fusarium* en líneas elite de cebada maltera cultivadas en Valles Altos, México. Tesis. Facultad de estudios superiores de Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, México. 47 pp.
- Salas, B., B. J. Steffenson, H. H. Casper, B. Tacke, L. K. Prom, T. G. Fetch Jr. and P. B. Schwarz. 1999. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Dis.* 83 (7):667-674.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2017. Cierre de la producción agrícola por estado. [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx)
- Spanic, V., T. Marcek, I. Abicic and B. Sarkanj 2018. Effects of *Fusarium* Head Blight on Wheat Grain and Malt Infected by *Fusarium culmorum*. *Toxins* 10 (17): 1-12.
- Therrien, M. C. 2002. Registration of ‘AC Ranger’ barley. *Crop Sci.* 42:987.
- van der Lee, T., H. Zhang, A. van Diepeningen and C. Waalwijk 2015. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review *Food Additives and Contaminants: Part A.* 32(4): 453–460.

- Vivar, H. E., L. Gilchrist, P. Hayes, L. Zongzhen, B. Steffenson, J. Franco and M. Henry. 1997. Head scab resistant barley form malting and food. *Cereal Research Communications*. 25 (3): 393-697.
- Warham, E. J., L.D. Butler y R.C. Sutton. 1997. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. CIMMYT. D.F. México. 84 pp.
- Windels, C. E. 2000. Economic and social impacts of Fusarium head blight: changing farms and rural communities in the northern great plains. *APS. Phytopathology*. 90 (1):17-21.
- Zain, M. E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15:129–144.
- Zamora, D. M.; L. A. Márquez C., F. Ramírez P. y A. M. Ibáñez C. 1997. Esmeralda. Variedad de cebada maltera para los Valles Altos. Folleto técnico número 5. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. Campo Experimental Valle de México.
- Zamora, D. M.; S. Solano H., R. Gómez M., I. Rojas M., J. Ireta M., R. Garza G. y C. Ortiz T. 2008. Adabella: variedad de cebada maltera para valles Altos de la Mesa Central de México. *Agricultura Técnica en México*. 34 (4): 491-493.
- Zhu, H., L. Gilchrist, P. Hayes, A. Kleinhofs, D. Kudrna, Z. Liu, L. Prom, B. Steffenson, T. Toojinda and H. Vivar. 1999. Does function follow form? Principal QTLs for Fusarium head blight (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled-haploid population of barley. *Theor Appl Genet*. 99:1221–1232.

# ANEXOS

## 1. Medios de cultivo

### *Agar – agua – hojas de clavel*

Agar bacteriológico (BD Bioxon®)

Agua destilada

Preparación: En un matraz de 1000 se coloca 10 gr de medio de cultivo agar bacteriológico marca Bioxon, se agrega 500 mL de agua destilada, se recomienda preparar la mitad del volumen de la capacidad del matraz para evitar derrames, se pone a esterilizar por 20 minutos a 15 libras de presión en la olla. Cuando el medio esta tibio se vacía en cajas Petri. Después de 24 h se colocan tres trozos de hoja de clavel.

### *Papa dextrosa agar (PDA)*

Papa dextrosa agra (BD Bioxon®)

Agua Destilada

Preparación. Se coloca 19 gr de medio de cultivo PDA en un matraz con 1000 ml, se agrega 500 mL de agua destilada y una barra magnética para agitación. En un agitador con plato caliente se disuelve el PDA, posteriormente se esterilizar por 20 minutos a 15 libras de presión en la olla.

### *Medio liquido de frijol chino*

Frijol chino (*Vigna radiata*)

Agua destilada

Preparación: En un matraz de se depositan 20 g de frijol chino por litro de agua destilada y se hierve por 20 min. El caldo se filtra a través de una gasa estéril, para retirar el frijol, se distribuye en volúmenes de 50 mL en matraces de 500 ml, y se esteriliza a 15 libras de presión por 20 minutos.

## 2. DNA extraction with CTAB method

(Based on protocol “Maize Seeds Sampling and DNA Extraction” from the Joint Research Centre of the European Commission)

- 1) Pre-warm all solutions to 50°C (not the Ethanol)
- 2) Weigh in 100 mg of samples to a 2 mL tube (remember to write down the exact amount if used for qPCR) and add a steel ball
- 3) Grind to a fine powder (Mill in ABC lab, maximum speed, 2 min)
- 4) Centrifuge for 1 min at 7200 x g in order to spin down the sample
- 5) Add 600 µL of CTAB extraction buffer and vortex well till the sample is completely solved
- 6) Incubate for 10 min at 65°C (mix 3 times during incubation)
- 7) Centrifuge for 10 min at 7200 x g (room temperature)
- 8) Transfer supernatant (450 µL) to a new 2 mL tube and add 50 µL of 10% CTAB solution
- 9) Move to the fume hood
- 10) Add 500 µL of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) and invert tube 20 times
- 11) Centrifuge for 10 min at 7200 x g (room temperature)
- 12) Collect the upper aqueous phase (~ 450 µL = 3 x 150 µL with 200 µL pipet) and transfer it to a new 2 mL tube (Collect very carefully and don't even touch the second layer!!! Centrifuge again if you do so. Be careful: the pipet draws relatively strong so the layer can be taken in even if the tip is only close to it)
- 13) Add three volumes (1.35 mL) of precipitation buffer, mix gently and incubate for 15 min at room temperature
- 14) Centrifuge for 15 min at 7200 x g (room temperature), a pellet should be visible at the bottom of the tube

- 15) Carefully discard the buffer solution by decanting
- 16) Add 500  $\mu\text{L}$  of 70% Ethanol; shake gently overhead to wash all buffer residues from the tube wall. Shake till the pellet is detached from the tube
- 17) Centrifuge for 5 min at 7200 x g (room temperature) and discard ethanol carefully
- 18) Add 200  $\mu\text{L}$  of 70% Ethanol; shake till the pellet is detached from the tube
- 19) Centrifuge for 5 min at 7200 x g (room temperature) and discard ethanol carefully
- 20) Place open tubes for 20 min under the fume hood to allow the ethanol to evaporate
- 21) When all ethanol has evaporated, add 100  $\mu\text{L}$  of TE buffer
- 22) Resuspend DNA by incubating for 15 min at 65°C in a thermomixer or at 4°C overnight

The following buffers and solutions are used in the DNA extraction procedure described:

**CTAB Extraction buffer**

- 1.4 M NaCl
- 2% (w/v) CTAB
- 0.1 M Tris-Base pH 8.0
- 0.02 M EDTA pH 8.0
- 1% (w/v) PVP 40000

**10% CTAB Solution**

- 10% (w/v) CTAB in 0.7M NaCl

**Precipitation Buffer**

- 1% (w/v) CTAB
- 0.05 M Tris-Base pH 8.0
- 0.01 M EDTA pH 8.0

**TE Buffer**

- 0.01 M Tris-Base pH 8.0
- 0.001 M EDTA pH 8.0

**Ethanol 70%**

### 3. Protocol of PCR primers FGN16 and ToxP

#### Preparation of ingredients

1. Adjust DNA solutions to a concentration of 5 to 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (use the NanoDrop for checking)
2. Take the PCR mix or the polymerase and the primers out the freezer and put on ice
3. Label the PCR tube strips or the plate

#### Preparation of PCR

1. Calculate master mix on the number of samples and the amounts for one samples of 12  $\mu\text{L}$

Reagent	Concentration	Amount ( $\mu\text{L}$ )
RedTaq® ReadyMix®	2x	6.0
Forward primer	500 nM	0.6
Reverse primer	500 nM	0.6
Water		3.8
DNA	5 -50 ng $\mu\text{L}^{-1}$	1.0

2. If you use a single channel pipette to distribute the mastermix, multiply amounts with 1.1 to be sure that you'll have enough. If you want to use a multichannel pipette, multiply with 1.2 instead of 1.1
3. prepare the master mix by mixing all ingredients (not the DNA) starting with the water.
4. Put the tube strips/plate on ice (e.g. in a the metal rack)
5. Distribute the master mix in the tube strips / plate. You don't need to change the pipette tip here.

6. Add DNA solutions to each tube/well. Make sure the DNA is solved in the master mix.

Use a new pipette tip for each tube/well

7. Close strips/plate with cap strip or adhesive seals (plate) and make sure it is airtight

8. If you use strip centrifuge with the small bench top centrifuge. plates can be knocked gently on the table or centrifuged with a plate centrifuged

### Running the PCR to FG16N

1. Put the strip/plate in the thermocycler and switch thermocycler on

2. Use the following program for primer system FG16N:

	Temperature (°C)	Time
Initial denaturation step	95	10 min
	95	30 sec
40 steps of	60	60 sec
	72	30 sec
Final elongation step	72	10 min
Conserve DNA	10	∞

3. The expected product size is 280 pb

### Running the PCR to ToxP

1. Put the strip/plate in the thermocycler and switch thermocycler on
2. Use the following program for primer system ToxP:

	Temperature (°C)	Time
Initial denaturation step	95	10 min
	95	30 sec
40 steps of	65	60 sec
	72	30 sec
Final elongation step	72	10 min
Conserve DNA	10	∞

3. The expected product size is 360 pb for a NIV producer and 300 pb for a DON producer

#### **4. Electrophoresis Protocol**

The concentration of agarose gel should be between 0.8% and 2.0% (w/v) which means 0.8 to 2.0 g agarose per 100 ml of buffer

The larger the expected PCR product is, the lower the concentration of the gel should be and vice versa. Get the information from the PCR protocol you use

You may use TBE buffer instead of TAE buffer, but make sure you use the same buffer for the gel and as electrophoresis buffer

##### **Preparation of electrophoresis gel**

1. Choose the gel cast and the comb you want to use, check if they are clean and put the comb in the gel cast
2. Fill the required amount of buffer in a screw cap bottle which has at least twice the volume of the buffer
3. Weigh in the required amount of agarose
4. Boil in microwave oven till all the agarose is solved and the liquid is clear (DON'T close the screw cap! Bottle may burst!)
5. Put the bottle on a shaker (Carefully, bottle may be extremely hot!) and shake at low frequency till the gel has cooled down to about 60°C (You can touch it with your hand without burning yourself immediately). If the gel has already begun to solidify you have to heat it up in the microwave oven again.
6. Add the ADN stain to the gel (EnviroSafe DNA stain, SYBR Green, SYBR Gold, ethidium bromide) in the quantity indicated by the manufacture ((EnviroSafe DNA stain: 1 µL per 20 mL of gel)

7. If the gel starts to solidify after you have added the DNA stain, DON'T heat it up again but discard! This is particularly important if you use ethidium bromide - toxic vapor!
8. fill the gel in the gel cast (comb needs to be in the gel cast before filling the gel) if you see air bubbles in the gel remove them with a pipette tip
9. Cover the gel with aluminum paper during solidification to avoid degradation of the DNA stain

### **Running electrophoresis**

1. Check if the gel is ready try with a finger at the very end of the gel, used gloves, gel may turn clear when it is solid but this may not be observed with low agarose concentration
2. Pull the comb out carefully and fill in the samples and DNA size marker
3. Transfer gel carefully to electrophoresis chamber
4. Make sure that the gel totally covered with buffer. If not, add buffer carefully and take care not to spill the samples out of the wells.
5. Close chamber and start electrophoresis (voltage: 5V/cm distance between poles; 170V is ok for the big SIGMA chambers)
6. Check electrophoresis, if ready (color markers have nearly reached the end of the gel) take out and place it on the UV illuminator on before you have put the camera hood in place. Take a picture
7. Discard gel (Gels stained with EnviroSafe DNA Stain, SYBR Green or SYBR Gold may be discarded through normal laboratory waste. However, gels stained with ethidium bromide need to be disposed of according to laboratory regulations and must not be discarded in the normal waste!)

## 5. Variedades testigos de cebada

**Cuadro 1.** Relación de variedades de cebada utilizadas como testigo y características de número de hileras de grano por espiga y de resistencia a la fusariosis de la espiga, según la literatura.

Variedad	Número de hileras	
	de grano por espiga	Resistencia a la enfermedad
Resistente (R) ó Moderadamente resistente (MR)		
Gobernadora	2	Variedad R, con el tiempo se ha comportado como MR (McCallum et al., 2004; Marchand et al., 2008).
Seebe	2	Registrada como MR, en ocasiones se comporta como R (Helm et al., 1996; He et al., 2015).
Moderadamente resistente (MR) ó moderadamente susceptible (MS)		
Adabella	6	Variedad MR con tolerancia (Zamora et al., 2008).
Shenmai 1	2	Nombre utilizado en China para referirse a una población segregante de Gobernadora (F <sub>4</sub> ) (Vivar et al., 1997).
CDC Copeland	2	Se comporta como MR y MS (He et al., 2015).
Xena	2	Se comporta como MR y MS (He et al., 2015).
MS ó Susceptible (S)		
Esmeralda	6	Variedad R pero con el tiempo se ha comportado como S (Zamora et al., 1997).
AC Lacombe	6	Variedad considerada entre MS y S (Kibite, 1993; He et al., 2015).
AC Ranger	6	Variedad considerada entre MS y S (Therrien, 2002).
Kasota	6	Variedad S (Helm et al., 1996).

## 6. Análisis estadísticos

**Cuadro 2.** Modelo Lineal Generalizado. Variables: número de espigas con síntomas y número de granos con síntomas evaluadas en líneas avanzadas de cebada maltera, en campo, ciclo primavera-verano (p-v) 2014

Factor	DF	Den DF	Pr > F	
			Numero de espigas con síntomas	Numero de grano con síntomas
Localidad	3	420	0.0001	0.0001
Sublote <sup>†</sup>	4	420	0.0001	0.0001
Línea (sublote)	136	420	0.0001	0.0001

Modelo Lineal Generalizado, distribución Poisson, link (log). DF = Grados de libertad de numerados; DenDF = Grados de libertad del denominador. † Considerando a las variedades testigo también como sublote.

**Cuadro 3.** Comparación de medias entre las localidades y sublotes de la variable espigas con síntomas, evaluada en líneas avanzadas de cebada maltera, establecidas en campo en el ciclo agrícola p-v 2014.

Localidad	Espigas con síntomas	Sublote	Espigas con síntomas
San Lucia	10.22 A	Elite	8.2548 A
Almoloaya	4.10 C	uno	5.373 B
Cuyoaco	5.14 B	dos	4.9916 B
Nanacamilpa	3.20 D	dos A	3.8421 C
LSD	0.37871	tres	4.139 C
		LSD	0.45205

LSMeans  $p \leq 0.05$

**Cuadro 4.** Comparación de medias entre las localidades y sublotes de la variable granos dañados, evaluada en líneas avanzadas de cebada maltera, establecidas en campo en el ciclo agrícola p-v 2014.

Localidad	Granos dañados	Sublote	Granos dañados
San Lucia	3.17 A	Elite	2.78 A
Almoloja	2.00 B	uno	2.33 A B
Cuyoaco	1.96 B	dos	2.16 B C
Nanacamilpa	1.38 C	dos A	1.33 D
LSD	0.23399	tres	1.88 C
		LSD	0.28377

LSMeans  $p \leq 0.05$

**Cuadro 5.** Resultados del análisis con el Modelo Lineal Generalizado de las variables registradas en las líneas avanzadas de cebada maltera inoculadas con *F. graminearum* durante 3 años, en invernadero.

Factor	GLN <sup>†</sup>	GLD <sup>‡</sup>	% Incidencia			% Severidad			IFHB		
			2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017
Sublote	5	138	1.0000	0.0001	0.0001	1.000	0.0001	0.0001	1.0000	0.0001	0.0001
L (S)	133	138	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

Modelo Lineal Generalizado, distribución Poisson, link (log). <sup>†</sup>GLN = Grados de libertad del numerador. <sup>‡</sup>GLD = Grados de libertad del denominador. L (S) = Líneas (Sublotes)

**Cuadro 6.** Comparación de medias entre los sublotes en las variables de incidencia y severidad evaluadas en líneas avanzadas de cebada maltera inoculadas con *F. graminearum* en condiciones de invernadero. Primavera 2016.

<b>Sublote</b>	<b>Incidencia</b>	<b>Sublote</b>	<b>Severidad</b>
Elite	73.5 A	Elite	73.5 A
uno	72.5 A	uno	72.5 A
dos	71.6 A B	dos	71.6 B A
tres	68.8 B	tres	68.8 B
Testigo	67.5 B C	Testigo	67.5 B C
dos A	63.4 C	dos A	63.4 C
LSD	2.67083		2.67083

LSMeans  $p \leq 0.05$

**Cuadro 7.** Comparación de medias entre los sublotes en las variables de incidencia y severidad evaluadas en líneas avanzadas de cebada maltera inoculadas con *F. graminearum* en condiciones de invernadero. Primavera 2016.

<b>Sublote</b>	<b>IFHB</b>	<b>Sublote</b>	<b>NEI</b>
Elite	73.5 A	Elite	4.3 A
uno	72.5 A	uno	4.3 A
dos	71.6 B A	dos	4.3 B A
tres	68.8 B	tres	4.2 B
Testigo	67.5 B C	Testigo	4.2 B C
dos A	63.4 C	dos A	4.1 C
LSD	2.67083	LSD	2.67083

LSMeans  $p \leq 0.05$ . IFHB = Índice de fusariosis. NEI = Numero de entrenudos infectados

## 7. Temperatura y humedad relativa

**Cuadro 8.** Registro promedio por mes de temperatura y humedad relativa en invernado, durante la etapa fenológica de emisión de espiga hasta madurez fisiológica de las 131 líneas avanzadas de cebada maltera. Evaluadas en las estaciones de invierno-primavera 2016 y 2017.

2016			2017		
Mes	T °C	HR (%)	Mes	T °C	HR
Marzo	20.3	47.1	Febrero	18.1	43.1
Abril	21.4	44.2	Marzo	17.9	49.4
Mayo	23.7	51.0	Abril	20.0	42.8
Promedio	<b>21.8</b>	<b>47.4</b>	Promedio	<b>18.6</b>	<b>45.1</b>