

***Fusarium graminearum* quimiotipo Don en grano de cebada maltera cultivada en México**

Mirna Bobadilla-Meléndez¹
Mauro R. Zamora-Díaz²
Ana María Hernández-Anguiano^{3,§}

1 Campo Experimental Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Colonia Roque, Celaya, Guanajuato, México. CP. 38110. (bobadilla.mirna@inifap.gob.mx).

2 Campo Experimental Valle de México-INIFAP. Carretera los Reyes-Texcoco km 13.5, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. CP. 56250. (zamora.mauro@inifap.gob.mx).

3 Posgrado de Fitosanidad-Fitopatología-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56264. (ahernandez@colpos.mx).

Autora para correspondencia: ahernandez@colpos.mx

Resumen

Las especies de *Fusarium graminearum* ocasionan la fusariosis de la espiga, enfermedad importante que afecta el rendimiento y la calidad sanitaria del grano en varias regiones productoras de cebada. Entre las medidas de control se encuentra el uso de variedades resistentes, por lo que este trabajo tuvo como objetivos aislar y caracterizar morfológica y molecularmente aislamientos de *F. graminearum*, procedentes de diferentes regiones productoras de cebada maltera en México e identificar aquellos aislamientos con la mayor capacidad de producir toxina Don *in vitro* para reconocer fuentes de resistencia genética. Se obtuvieron 39 aislamientos con características morfológicas de *F. graminearum* asociados a grano de cebada maltera, proveniente de municipios de Valles Altos, Bajío y Tamaulipas. La reacción por PCR con los iniciadores especie-específicos Fg16N-F/Fg16N-R para *F. graminearum* confirmó la identidad de 38 de los 39 aislamientos. Las secuencias del producto con Fg16N de 21 aislamientos se alinearon con la secuencia del cromosoma 1 de *Fusarium graminearum*, depositada en la base de datos del GenBank-NCBI. La reacción de PCR con los iniciadores ToxP1/ToxP2 indicaron que 17 de los 39 aislamientos corresponden al quimiotipo de *F. graminearum* productor de toxina Don. Cinco de 33 aislamientos, analizados por la prueba Ridascreen[®] Fast Don, registraron la mayor capacidad de producir Don *in vitro* (3.4 y 17 ppm), por lo que pueden ser considerados para identificar fuentes de resistencia a la fusariosis de la espiga en programas de mejoramiento genético de cebada maltera en el país.

Palabras clave:

Hordeum vulgare, deoxynivalenol, micotoxina.



License (open-access): Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia **Creative Commons**

La fusariosis de la espiga es una enfermedad de gran importancia económica en cereales de grano pequeño como la cebada (*Hordeum vulgare* L.). Esta enfermedad es ocasionada por un complejo de especies de *Fusarium* entre ellas *Fusarium graminearum* Schwabe (Teleomorfo *Gibberella zeae* (Schweinitz) (Mert-Türk *et al.*, 2014). Gilchrist-Saavedra (2000) reportó la presencia de la fusariosis de la espiga en México, en regiones de Valles Altos y del Bajío. Estas regiones comprenden los estados de Hidalgo, Estado de México, Puebla y Tlaxcala y los de Guanajuato, Jalisco y Michoacán, donde se cultiva cebada maltera bajo condiciones de temporal y riego, respectivamente.

F. graminearum es un hongo que se caracteriza por producir toxinas que dañan la salud de animales y personas que consumen granos o productos de cebada contaminados (Bezerra *et al.*, 2014; FDA, 2010), entre las que destacan las del grupo de los tricotecenos como el deoxinivalenol (Don) y el nivalenol (NIV) (Mert-Türk *et al.*, 2014). Estas toxinas se consideran como un factor de virulencia asociado con la capacidad del hongo de producir aislamientos con diferente grado de patogenicidad (Mesterházy, 2002; Malhipour *et al.*, 2012).

Entre las estrategias recomendadas de control de la fusariosis de la espiga se encontró el uso de variedades resistentes para disminuir la incidencia del hongo en el grano (McMullen *et al.*, 2012). Por lo anterior, es necesario contar con una colección de cepas de *F. graminearum*, aisladas de las variedades y líneas experimentales de cebada maltera, cultivadas en las diferentes regiones geográficas de México, para identificar fuentes de resistencia que puedan ser utilizadas en cruzamientos realizados por los programas de mejoramiento genético de cebada de instituciones de investigación nacional e internacional para controlar la enfermedad (Bobadilla *et al.*, 2019).

Este trabajo tuvo como objetivo principal aislar y caracterizar morfológica y molecularmente aislamientos de *F. graminearum* procedentes de diferentes regiones productoras de cebada maltera en México e identificar aquellas cepas con la mayor capacidad de producir toxina Don *in vitro*, para estudios posteriores de búsqueda de fuentes de resistencia genética a la fusariosis de la espiga.

Durante los ciclos 2021, 2022 y 2023 de producción de cebada maltera, se colectaron 257 muestras de espigas con y sin síntomas de manchado de grano de las variedades Adabella, Alina, Armida, Blanca, Esperanza y Esmeralda) y de 131 líneas experimentales del programa de Cebada del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). En la región de Valles Altos se colectaron 68 muestras (19 en Hidalgo, 16 en Tlaxcala, 17 en el Estado de México y 16 en Puebla); 19 en Baja California; 156 en el Bajío (136 en Guanajuato, 12 en Jalisco y 8 en Michoacán), y 14 en Tamaulipas. De cada muestra se tomaron al azar 240 semillas para su análisis por la prueba de papel secante y congelación (Warham *et al.*, 1997).

Previo a la prueba, la semilla se desinfectó con hipoclorito de sodio (Reasol^{MR}) al 5% por 1 min en agitación mecánica, y se enjuagó dos veces con agua destilada estéril. Los aislamientos con características morfológicas de *F. graminearum* (Leslie y Summerell, 2006) se purificaron por cultivo monospórico en agua-agar (BD Bioxon[®]), se cultivaron en agua-agar-hoja de clavel y papa-dextrosa agar (BD Bioxon[®]) y se almacenaron en aceite mineral (Mier *et al.*, 2002) y papel filtro Whatman #1 (Fong *et al.*, 2000).

De cada aislamiento se extrajo ADN a partir de micelio liofilizado con el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Joint Research Centre of the European Commission, 2007). La calidad y cantidad del ADN extraído se verificó en un NanoDrop ND-1000. Para confirmar la identidad y determinar el quimio tipo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se establecieron reacciones con los iniciadores especie-específicos Fg16N-Forward

5' ACAGATGACAAGATTCAGGCACA 3' y Fg16N-reverse 5' TTCTTTGACATCTGTTCAACCCA 3' (Nicholson *et al.*, 1998) y con los iniciadores, ToxP1 5' GCCGTGGGGRTAAAAGTCAAA 3' y ToxP2 5' TGACAAGTCCCGGTCGCACTAGCA 3' los cuales amplifican una región intergénica entre los genes Tri5 y Tri6 relacionados con la síntesis de las toxinas Don y Niv (Li *et al.*, 2005).

Cada reacción fue de un volumen final de 12 µl con la misma formulación, excepto para la alineación. Desnaturalización inicial 95 °C, 10 min; 40 ciclos: desnaturalización 95 °C, 30 s; alineación 60 °C, 60 s (Fg16N) o 65 °C, 60 s (ToxP); extensión 72 °C, 72 s; extensión final 72 °C, 10 min.

Las reacciones se establecieron en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradiente Thermal Cycler, los productos se analizaron por electroforesis en agarosa al 2% y se visualizaron en un fotodocumentador UVP PhotoDoc-It™, Fisher Scientific. Como referencia se incluyó en el gel el marcador ØX174 (PhiX174) /HaeIII (Fermentas y BioLabs, respectivamente).

El producto de PCR con Fg16N de 21 cepas se envió a secuenciar a Macrogen CIA (<http://dna.macrogen>), Korea y las secuencias se compararon con Ncbi Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar su relación con *Fusarium graminearum*. La capacidad de los aislamientos para producir Don *in vitro* se evaluó mediante la prueba de Ridascreen® Fast Don (inmunoensayo enzimático (Elisa)) utilizando muestras de harina (2 g) obtenidas de grano de arroz (Sos® Arroz Sushi, super extra) colonizado con el hongo, y con placas, reactivos y protocolo de Ridascreen® Fast Don.

Los datos se analizaron con Statistical Analysis Software (SAS) Versión 9.4, para Windows, bajo un diseño completamente al azar, y la comparación de medias por el método de Tukey ($\alpha=0.05$). Del total de semilla (61 680 semillas) analizada de Valles Altos, Bajío y Tamaulipas, se obtuvieron 39 aislamientos con características morfológicas de *F. graminearum* (Leslie y Summerell, 2006) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Identificación molecular de especie y quimiotipo y producción de toxina Don *in vitro*.

Localidad	Clave aislamiento	PCR		Especie alineada	Don (ppm)*
		Fg16N	ToxP		
Almoloya, Hidalgo	AL5R10	+	-		0.1c
	AL6R32	+	-	<i>F. graminearum</i> [§]	0c
	AL9R32	+	-		0c
Cuautepec, Hidalgo	HGO1	+	+	<i>F. graminearum</i>	nd
	HGO2	+	+	<i>F. graminearum</i>	nd
Nanacamilpa, Tlaxcala	NA0R20	+	-		0c
	NA5R20	+	+	<i>F. graminearum</i>	1.6c
	NA8R20	+	+		2.6c
	NA9R10	+	+		2.9c
	NA11R30	+	+		0.1c
	NA16R10	+	-		0c
	NA16R20	+	-	<i>F. graminearum</i>	0.1c
Santa Lucía, Edo. de México	SL1	+	+		nd
	SL3R21	+	+		2.3c
	SL10R10	+	+	<i>F. graminearum</i>	3.4bc
	SL3R22	+	+		1c
	SL3R23	+	+	<i>F. graminearum</i>	9.2b
	SL3R24	+	+	<i>F. graminearum</i>	5bc
	SL6R10	+	-	<i>F. graminearum</i>	0c
	SL8R10	+	-	<i>F. graminearum</i>	0c
	SL4R10	+	-		0c
	SL5R30	+	-	<i>F. graminearum</i>	0.1c
Cuyuaco, Puebla	CU0R10	+	-	<i>F. graminearum</i>	0c
	CU1R30	+	+	<i>F. graminearum</i>	17.0a
	CU6R30	+	+	<i>F. graminearum</i>	3.6bc
	CU13R10	+	-		0.1c
	CU9R11E	+	-	<i>F. graminearum</i>	0c

Localidad	Clave aislamiento	PCR		Especie alineada	Don (ppm) [*]
		Fg16N	ToxP		
Celaya, Guanajuato	CU8R36E	+	-		0c
	CEN1	+	-		0c
	CEN2	+	-	<i>F. graminearum</i>	0c
	CEN3	+	-		0c
	CEN4	+	-		0.1c
	CEN8	+	-	<i>F. graminearum</i>	0c
	CEN9	+	-		0c
	CEE1	+	-	<i>F. graminearum</i>	0.1c
	CEFS31	+	-		0.1c
Tepatitlán, Jalisco	JA1	-	+	<i>F. graminearum</i>	nd
Río Bravo, Tamaulipas	TAMPS1	+	+	<i>F. graminearum</i>	nd
	TAMPS2	+	+	<i>F. graminearum</i>	nd

+/-= amplificación/no amplificación de banda; nd= no se determinó; ^{*}= 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; [‡]= *Fusarium graminearum chromosome 1*.

De la semilla de Baja California y Michoacán no se aisló el hongo. Con excepción de JA1, todos los aislamientos amplificaron la banda esperada de 280 pares de bases (pb) con Fg16N-F/Fg16N-R (Nicholson et al., 1998). Las secuencias (aproximadamente 250 pb) del producto con Fg16N de 21 cepas (tomadas al azar por localidad), incluyendo la de JA1, se alinearon con la secuencia del cromosoma 1 de *F. graminearum*, número de accesión HG970332, depositada en la base de datos del GenBank-NCBI (Cuadro 1). Los índices de similitud estuvieron entre 99 y 96%.

En la reacción con ToxP1/ToxP2, 17 aislamientos de Valles Altos (14), Jalisco (1) y Tamaulipas (2) amplificaron una banda de 300 pb (Cuadro 1). Es importante indicar que estos iniciadores detectan simultáneamente dos fragmentos: uno de 300 pb para el quimiotipo de *F. graminearum* productor de Don y otro de 360 pb para el quimiotipo de *F. graminearum* productor de NIV (Li et al., 2005). Ningún aislamiento de Guanajuato amplificó con estos iniciadores. Con excepción de NA11R30, 10 de los aislamientos que amplificaron con ToxP1/ToxP2 registraron producción de Don in vitro, observándose diferencias (Tukey $\alpha= 0.05$) en los niveles de producción.

Posiblemente los aislamientos que amplificaron con Fg16N, pero que no amplificaron con ToxP ni registraron producción de Don, correspondan a otros quimiotipos de *F. graminearum* (Walker et al., 2001).

En general, los resultados indican que en las regiones productoras de cebada maltera de Valles Altos, Bajío, Baja California y Tamaulipas la incidencia de *F. graminearum* fue baja (menor a 1%), y que los 39 aislamientos obtenidos presentan variación genética (Tukey $\alpha= 0.05$) no solamente entre los aislamientos provenientes de diferentes estados, sino entre los aislados en colectas de un mismo municipio (Cuadro 1). La investigación de Cerón-Bustamante et al. (2018) no detectó a *F. graminearum* entre las especies de *Fusarium* asociadas a espigas de trigo con fusariosis de la espiga, colectadas en las regiones productoras de trigo de Valles Altos, Bajío y Oaxaca.

Conclusiones

Se obtuvieron 39 aislamientos con características morfológicas de *F. graminearum* asociados a grano de cebada maltera cosechado en municipios de Valles Altos, Bajío y Tamaulipas. En 38 aislamientos se confirmó su identidad mediante PCR con los iniciadores especie-específicos Fg16N-F/Fg16N-R. Las secuencias del producto con Fg16N de 21 aislamientos, incluida la de JA1 que no amplificó, se alinearon con la secuencia del cromosoma 1 de *Fusarium graminearum*, depositada en la base de datos del GenBank-NCBI.

La reacción de PCR con los iniciadores ToxP1/ToxP2 indicó que 17 de los 39 aislamientos corresponden al quimiotipo de *F. graminearum* productor de toxina Don. Los aislamientos SL10R10, SL3R23, SL3R24, CU1R30 y CU6R30, analizados por la prueba Ridascreen® Fast Don, tuvieron alta capacidad de producir Don *in vitro* (entre 3.4 y 17 ppm), por lo que pueden ser considerados para identificar fuentes de resistencia a la fusariosis de la espiga en programas de mejoramiento de cebada maltera en el país.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca 1136066 otorgada a la primera autora para estudios de doctorado. Al Dr. Pawan K. Singh del Centro Internacional de Maíz y Trigo (CIMMYT) por su apoyo para realizar los análisis en su laboratorio.

Bibliografía

- 1 Bezerra, R. M. E.; Oliveira, F. F. Ch.; Feitosa, M. F. E.; Florindo, G. M. I. and Rondina D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*. 36(1):159-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>.
- 2 Bobadilla, M. M.; Hernández-Anguiano, A. M.; Zamora-Díaz, M. R. y Vargas-Hernández, M. 2019. Evaluación de líneas de cebada maltera a fusariosis de la espiga y acumulación de deoxinivalenol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10(3):485-498. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.916>.
- 3 Cerón-Bustamante, M.; Ward, T. J.; Kelly, A.; Vaughan, M. M.; McCormick, S. P.; Cowger, C.; Leyva-Mir, S. G.; Villaseñor-Mir, H. E.; Ayala-Escobar, V. and Nava-Díaz, C. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.003>.
- 4 FDA. 2010. Food and Drug Administration. 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>.
- 5 Fong, Y. K.; Anuar, S.; Lim, H. P.; Tham, F. Y. and Sanderson, F. R. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. *Mycologist*. 14(3):127-130. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(00\)80090-7](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(00)80090-7).
- 6 Gilchrist-Saavedra, L. I. 2000. Problemas fitosanitarios de los cereales de grano pequeño en los Valles Altos de México. Serie de Conferencias Magistrales. *In: XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, AC. Revista Mexicana de Fitopatología*. 18(2):132-137. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61218211>.
- 7 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. 1-10 pp.
- 8 Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. First edition. Ed. Blackwell Publishing. USA. 387 p.
- 9 Li, H. P.; Wu, A. B.; Zhao, Ch. S.; Scholten, O.; Löffler, H. and Liao, Y. C. 2005. Development of a generic PCR detection of deoxynivalenol- and nivalenol-chemotypes of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiology Letters*. 243(2):505-511. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.01.015>.
- 10 Malhipour, A.; Gilbert, J.; Piercey-Normore, M. and Cloutier, S. 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. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-11-0866-RE>.

- 11 Mert-Türk, F.; Gencer, R. and Kahrirman, F. 2014. Chemotyping of the *Fusarium graminearum* isolates and variation in aggressiveness against wheat heads. The Journal of Animal & Plant Sciences. 24(6):1858-1862. <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-24-6/40.pdf>. ISSN: 1018-7081.
- 12 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(7):675-684. <https://doi.org/10.1023/A:1020631114063>.
- 13 McMullen, M.; Bergstrom, G.; De Wolf, E.; Dill-Macky, R.; Hershman, D.; Shaner, G. and Sanford, D. V. 2012. A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: fusarium head blight. Plant Disease. 96(12):1712-1721. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0291-FE>.
- 14 Mier, T.; Toriello, C. y Ulloa, M. 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco (UAM)-X. México, DF. 54-57 pp. ISBN 970654609X.
- 15 Nicholson, P.; Simpson, D. R.; Weston, G.; Rezanoor, H. N.; Lees, A. K.; Parry, D. W. and Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiological and Molecular Plant Pathology. 53(1):17-37. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0170>.
- 16 Warham, E. J.; Butler, L. D. y Sutton, R. C. 1997. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). El Batán, Texcoco, Estado de México. ISBN: 968-6923-71-3. 84 p.
- 17 Walker, L. S.; Leath, S.; Hagler, Jr. W. M. and Murphy, J. P. 2001. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium head blight in North Carolina. Plant Disease. 85(4):404-410. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.4.404>.



Fusarium graminearum quimiotipo Don en grano de cebada maltera cultivada en México

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 December 2024
Date accepted: 01 April 2025
Publication date: 16 April 2025
Publication date: Feb-Mar 2025
Volume: 16
Issue: 2
Electronic Location Identifier: e3502
DOI: 10.29312/remexca.v16i2.3502
Funded by: Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías
Funded by: Centro Internacional de Maíz y Trigo
Award ID: 1136066

Categories

Subject: Nota de investigación

Palabras clave:

Palabras clave:

Hordeum vulgare
deoxynivalenol
micotoxina.

Counts

Figures: 0

Tables: 1

Equations: 0

References: 17

Pages: 0