

Evaluación de líneas de cebada maltera a fusariosis de la espiga y acumulación de deoxinivalenol

Mirna Bobadilla Meléndez¹
Ana María Hernández-Anguiano^{1§}
Mauro R. Zamora-Díaz²
Mateo Vargas-Hernández³

¹Posgrado de Fitosanidad-Fitopatología-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. CP. 56230. (bobadilla.mirna@colpos.mx). ²INIFAP-CEVAMEX. Carretera los Reyes-Texcoco km 13.5, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. CP. 56250. (zamora.mauro@inifap.gob.mx). ³Universidad Autónoma Chapingo. carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco, Estado de México, CP. 56230. (vargas-mateo@hotmail.com).

§Autor para correspondencia: ahernandez@colpos.mx.

Resumen

La fusariosis de la espiga por *Fusarium graminearum* es una 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 y a la acumulación de deoxinivalenol (DON) en 131 líneas avanzadas de cebada maltera seleccionadas por su tolerancia a roya 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 avanzadas 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*. 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. La información generada en este estudio 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: *Fusarium graminearum*, *Hordeum vulgare*, micotoxina DON, resistencia.

Recibido: enero de 2019

Aceptado: marzo de 2019

Introducción

La fusariosis de la espiga, también conocida como roña de la espiga o *Fusarium* head blight (FHB, por sus siglas en inglés), es una enfermedad importante en los cereales de grano pequeño como cebada (*Hordeum vulgare* L.). Esta enfermedad, ocasionada por algunas especies de *Fusarium* entre las que destaca *F. graminearum* (Schwabe) (Salas *et al.*, 1999), ataca principalmente en la etapa de floración a grano lechoso afectando el rendimiento y la calidad sanitaria del grano. Ireta y Gilchrist (1994) reportaron pérdidas de 17% en rendimiento en trigo en la zona productora de Valles Altos de México; sin embargo, se han registrado pérdidas de hasta 50% en otras partes del mundo (Windels, 2000). El consumo de granos o productos de cebada maltera contaminados 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 *Fusarium* (Bezerra *et al.*, 2014).

Por las implicaciones a la salud humana y animal de la toxina DON, también conocida como vomitoxina por ocasionar vómito en las personas y rechazo del alimento en animales (Zain, 2011), 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 siguientes 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 el rendimiento, afecta la calidad sanitaria del grano y repercute negativamente en los sectores agropecuario, alimenticio e industrial. Por otra parte, Malhipour y Gilbert (2012); De la Torre-Hernández *et al.* (2014) reportan que la toxina DON es un factor de virulencia y la asocian con la capacidad de las especies de *Fusarium* que la producen de causar enfermedad en su hospedante. De Wolf *et al.* (2003); Bondalapati *et al.* (2012) indican que condiciones de humedad relativa alrededor de 90 % y temperatura de 15 a 30 °C durante el periodo de anthesis son favorables para el desarrollo de la fusariosis y la acumulación de DON.

El Programa de Cebada del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) tiene trabajos de cruza para el mejoramiento de cebada maltera contando actualmente con 131 líneas avanzadas con tolerancia a roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* West), a roya de la hoja (*P. hordei* Oth), mancha reticulada (*Drechslera teres* Sacc), tizón foliar (*Bipolaris sorokiniana*) y escaldadura de la hoja (*Rhynchosporium secalis* (Oud) J. J. Davis), 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 CI14064, las 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). Considerando que entre las medidas recomendadas de control de la fusariosis de la espiga

se encuentra el uso de variedades resistentes para disminuir la incidencia de *Fusarium* en el grano (Horevaj *et al.*, 2011; McMullen *et al.*, 2012), los objetivos de este trabajo fueron: evaluar la resistencia a la fusariosis de las 131 líneas avanzadas de cebada maltera del Programa de Cebada del INIFAP-CEVAMEX en condiciones de invernadero; y, cuantificar los niveles de producción de toxina DON en semilla de cebada maltera cosechada de espigas inoculadas con *F. graminearum*.

La información generada en este trabajo es relevante y puede utilizarse como punto de partida en un programa de cruzamientos de cebada maltera en el que incluya, en el conjunto de enfermedades, a la fusariosis de la espiga y a la acumulación de toxina DON en grano.

Materiales y métodos

Este estudio se llevó a cabo durante el ciclo invierno-primavera de los años 2015, 2016 y 2017, en el Colegio de Postgraduados, *Campus* Montecillo, Estado de México. El *campus* está a una altitud de 2240 msnm, presenta clima templado subhúmedo, con precipitación media anual de 700 mm, con régimen de lluvias en verano. Las plantas se establecieron en un invernadero de 437.5 m² construido con plástico transparente y piso de tierra sin condiciones ambientales controladas. Durante el periodo de inoculación de las plantas, en el invernadero se registró una temperatura promedio de 20 °C (con mínimo de 9 °C y máximo de 35 °C); HR de 46.6 % (con mínimo de 26.5 % y máximo 68.9 %), con un sensor automático HOB0 H8 (Onset Computer corporation, USA).

Germoplasma y establecimiento de plantas

La semilla de 131 líneas avanzadas de cebada maltera, organizadas en sublotes: 03 (30 líneas), 02 (30 líneas), 01 (25 líneas) y Elite (16 líneas), de seis hileras de grano; y el sub lote 02A (30 líneas), de dos hileras, fue proporcionada por el Programa de Cebada del INIFAP-CEVAMEX. Se destaca que la selección de las líneas fue a partir del sub lote 03 seguido del 02A, 02, 01 y finalizando con Elite. Es decir, los sublotes 03 y Elite representan los sublotes de menor y mayor ciclo de selección, respectivamente. Como testigos se incluyó semilla de las variedades: Seebe, CDC Copeland, Xena, AC Ranger, Kasota y AC Lacombe, proporcionada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), El Batán, así como de las variedades: Gobernadora, Adabella, Esmeralda y Shenmai 1, proporcionada por el INIFAP-CEVAMEX (Cuadro 1).

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

Variedad	Núm. 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 <i>et al.</i> , 2004; Marchand <i>et al.</i> , 2008).
Seebe	2	Registrada como MR, en ocasiones se comporta como R (Helm <i>et al.</i> , 1996; He <i>et al.</i> , 2015).
Moderadamente resistente (MR) ó moderadamente susceptible (MS)		
Adabella	6	Variedad MR con tolerancia (Zamora <i>et al.</i> , 2008).

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

La semilla se sembró por duplicado en bolsas de plástico (25 x 25 cm) con sustrato peat moss (Promix®) esterilizado con vapor. Por cada línea y variedad testigo se depositaron 10 semillas por bolsa. Al inicio del cultivo se dieron tres riegos por gravedad con agua de pozo por semana; después de la floración, las plantas se regaron diariamente por aspersión. Para la fertilización de las plantas se utilizó triple 16 (16-16-16), 18-46-00 y urea (Yara®) aplicando la fórmula 100-46-30. El fósforo y el potasio se aplicaron en su totalidad a los ocho días después de la siembra; el nitrógeno solo el 50% y el restante, a los 60 días después de la siembra. Durante el ciclo de 2017 se colocó una malla sombra de 75% para generar condiciones frescas en el invernadero.

Cepas y preparación de inóculo

En el Cuadro 2 se presenta la relación de cepas de *F. graminearum* empleadas para las inoculaciones en invernadero durante los tres años de estudio. Estas cepas son monospóricas aisladas de granos infectados con *F. graminearum*. En 2015 se utilizó la cepa CIMFU1189 aislada de granos de trigo colectados en Toluca, Edo. de México; mientras que en 2016, la mezcla de las cepas CIMFU1308, CIMFU1310, CIMFU1312 y CIMFU1313 aisladas de granos de trigo. Todas estas cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología del CIMMYT y se utilizaron por su alta capacidad para producir DON (Cuadro 2).

Cuadro 2. Relación de cepas de *F. graminearum* empleadas para las inoculaciones en invernadero.

Año	Fuente: clave cepa	Origen Huésped	Producción toxina DON (ppm kg ⁻¹)	Inoculación [†] de espigas
2015	CIMMYT: CIMFU1189	Trigo	14.5	Por aspersión
2016	CIMMYT: CIMFU1313, CIMFU1310, CIMFU1308, CIMFU1312	Trigo	16.1, 17, 18.1 y 18.8, respectivamente (con promedio de 17.5)	Por punción
2017	Este estudio: SL10R10, CU6R30, SL3R24, SL3R23 y CU1R30	Cebada	3.4, 3.6, 5, 9.2 y 17, respectivamente (con promedio de 7.6)	Por aspersión

[†]= en 2015 con 100 000 conidios mL⁻¹; en 2016 y 2017 con 70 000 conidios mL⁻¹.

En tanto que, en 2017 se aplicó la mezcla de las cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 aisladas de granos de cebada maltera colectados en Cuyuaco (CU), Puebla y Santa Lucía (SL), Edo de México. Estas últimas cepas se aislaron, identificaron y caracterizaron para este estudio (datos no mostrados) y se seleccionaron también por su alta capacidad para producir DON (Cuadro 2). En 2016 el Laboratorio de Fitopatología de Trigo del CIMMYT proporcionó la mezcla con las cuatro cepas para la inoculación de las plantas; mientras que en 2015 y 2017 las mezclas se prepararon en el Laboratorio de Enfermedades en Postcosecha, del Posgrado de Fitopatología, del Colegio de Posgraduados.

Para esto un fragmento de papel filtro Whatman^{TM1} estéril con crecimiento del hongo, almacenado por 5 meses a 4°C, se colocó en una caja Petri con PDA y se incubó a temperatura ambiente. Después de 10 días se cortaron círculos de medio con crecimiento del hongo (4 mm) y se depositaron en matraces de 250 mL con 50 mL de medio líquido de frijol chino (*Vigna radiata* (L.) Wilezek) estéril para la producción de conidios (Bai, 1996). Los matraces inoculados se mantuvieron en agitación (Agitador Lab-Line[®]) con luz blanca continua (lámpara Fulgore[®], 250 V, 32 W) a temperatura ambiente por 7 días. La suspensión obtenida se filtró a través de una gaza estéril y la concentración de conidios se estimó en un hematocitómetro. Todas las suspensiones se mantuvieron a -10 °C hasta su utilización.

Inoculación de espigas

En 2015 las espigas se inocularon en la etapa de grano lechoso por aspersión con un inóculo de 100 000 conidios mL⁻¹; mientras que en 2016 por punción con 70 000 conidios mL⁻¹, cuando las plantas empezaron a emitir las espigas. Para esto, una gota de 10 µL se colocó en la espiguilla central de la espiga con una jeringa hipodérmica (Engle *et al.*, 2003). En 2017 la inoculación fue al inicio del espigamiento por aspersión con un inóculo de 70 000 conidios mL⁻¹ (Cuadro 2).

A diferencia de los dos ciclos anteriores, en este ciclo las espigas se inocularon nuevamente a los cuatro días después de la primera inoculación por el mismo método y con la misma cantidad de inóculo. Inmediatamente después de cada inoculación, las espigas se cubrieron por 48 h con una bolsa de plástico transparente, previamente asperjada con agua estéril. El piso de tierra del invernadero se regó diariamente para tener un ambiente de alta humedad relativa alrededor de las plantas.

Evaluación de incidencia, severidad e índice de fusariosis

Por línea se evaluaron de 1 a 10 espigas seleccionadas al azar a los 21 días después de la inoculación por aspersión; y a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación por punción. En la inoculación por aspersión se evaluó la resistencia Tipo I (resistencia a la infección inicial) mientras que en la inoculación por punción la resistencia Tipo II (resistencia a la dispersión a través del raquis) (McMullen *et al.*, 2012). Por lo anterior las variables evaluadas fueron.

Porcentaje de incidencia (número de espigas con síntomas x 100/ total de espigas inoculadas); porcentaje de severidad de la enfermedad (número de granos con síntomas x 100/ total de granos por espiga) con una escala de 1 a 9 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% de granos con fusariosis. También se evaluó el índice de fusariosis (IFHB por sus siglas en inglés) (% incidencia x % severidad/ 100 (Groth *et al.*, 1999).

Análisis estadístico

Los valores de las variables porcentaje de incidencia, porcentaje de severidad e índice IFHB mostraron una distribución no simétrica en una prueba de bondad de ajuste por lo que 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.

Análisis de toxina DON

Semilla de 56 líneas de los sublotos Elite (10 líneas), 01 (8 líneas), 02 (11 líneas), 02A (14 líneas) y 03 (13 líneas), del ciclo 2017, se analizaron con los reactivos y protocolo de RIDASCREEN®FAST DON (r-Biopharm) [inmunoensayo enzimático (ELISA)]. Con excepción de las líneas 15, 33 y 131 de los sublotos Elite, 01 y 03, respectivamente, todas esas líneas (53 líneas) se comportaron como resistentes a la fusariosis; las tres líneas restantes, como susceptibles. Así mismo se analizó semilla de los testigos Seebe, Shenmai 1 y Kasota como referencia de testigos R, MR y S, respectivamente. Toda la semilla de las líneas y la de los testigos se cosecharon en madurez fisiológica de espigas inoculadas con la mezcla de cepas SL10R10, CU6R30, SL3R24, SL3R23 y CU1R30, durante dicho ciclo.

La semilla de cada línea y testigo 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 depositó 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.

Las reacciones se establecieron por duplicado en placas con 96 pocillos, sensibilizadas con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-deoxinivalenol. De cada una de las 59 muestras y de cada estándar (0, 0.222, 0.666, 2 y 6 ppm de deoxinivalenol en agua) se tomaron 50 µL 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

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 (variedades) 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).

Cuadro 3. Índice de fusariosis (IFHB) registrado en las variedades testigo de cebada en respuesta a la inoculación[†] con cepas de *F. graminearum* durante tres años de evaluación en invernadero.

Variedad	2015			2016			2017		
	R1	R2	Ā	R1	R2	Ā	R1	R2	Ā
Resistente o moderadamente resistente									
Gobernadora				4.5	1.4	3	3.2	2.5	2.8
Seebe	0	2.8	1.4	2.1	0.8	1.5	0.5	1.8	1.2
Moderadamente resistentes o moderadamente susceptible									
Adabella	9.4	6.8	8.1						
Shenmai 1				3.5	7.3	5.4	12.1	3.6	7.8
CDC-Copeland	0	11.8	5.9	0.9	1.8	1.3	22.1	0.9	11.5
Xena	0	26.9	13.5	2.4	1	1.7	8	2.9	5.4
Moderadamente susceptible o susceptible									
Esmeralda	4	2.1	3.1						
AC Lacombe	8.9	8.8	8.8	4.4	2.3	3.3	14.9	0.9	7.9
AC Ranger	4.4	2.2	3.3	1.7	0.3	1	17.1	1.4	9.3
Kasota	6.7	13.3	10	2.8	5.9	4.4	12.4	24.9	18.6

[†]= 2015 por aspersión con cepa CIMFU1189. Por punción en 2016 con mezcla de cepas CIMFU1308, CIMFU1310, CIMFU1312 y CIMFU 1313; y aspersión en 2017 con mezcla de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30. R1= repetición 1; R2= repetición 2. Ā= promedio.

La variación entre repeticiones (plantas) de una misma variedad (Cuadro 3) puede estar relacionada con la etapa fenológica de la planta al momento de la inoculación y con el microambiente generado cuando la planta se cubrió con la bolsa de plástico para favorecer la enfermedad. Es posible que la diferencia en valores entre las repeticiones de una variedad pueda ser resultado de un escape a la enfermedad y no un reflejo de la resistencia de la planta. Así, durante el ciclo 2015 se tomó como referencia el valor de IFHB registrado en Seebe (1.4, R), Adabella (8.1, MR) y Xena (13.5, S), 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 ≥ 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 destacó la línea 94 por haber registrado el mayor índice IFHB (29), seguida de la línea 6 (23) del sublote Elite y de la línea 33 (18) del sublote 01. Estas tres líneas registraron nivel 3 (18-30 %) en la escala de severidad (Chrpová *et al.*, 2011) e incidencia de 0 a 100%. En el Cuadro 4 se ilustra la clasificación de 56 líneas por tipo de respuesta R, MR o S para el ciclo 2015.

Durante el ciclo 2016 se tomó como referencia el índice IFHB registrado por los testigos Seebe (1.5, R), Gobernadora (3, MR) y Kasota (4.4, S) (Cuadro 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 ≥ 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 de este cultivo.

Los datos anteriores indican que las plantas inoculadas por aspersión (ciclo 2015) registraron mayor severidad (nivel 3) que las inoculadas por punción (nivel 2, ciclo 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 4 se ilustra la clasificación de 56 líneas por tipo de respuesta R, MR o S para el ciclo 2016. En el ciclo 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) para la clasificación de las líneas. En este ciclo se registró incidencia de la enfermedad que varió de 0 a 100 % y de severidad con nivel máximo de 5 (0 a 43 %), dependiendo del sublote 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 ≥ 12 de IFHB, respectivamente. Es posible que la mayor severidad (nivel 5) registrada en este ciclo 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 (5 cepas vs 1 cepa), nivel de inóculo (70 000 vs 100000 conidios mL⁻¹), al origen de la cepa (cebada vs trigo), al número de inoculaciones (2 vs 1), a la etapa fenológica (emisión de espigas vs grano lechoso) y a las condiciones ambientales del invernadero. En el Cuadro 4 se ilustra la clasificación de 56 líneas por tipo de respuesta R, MR o S para el ciclo 2017.

Cuadro 4. Clasificación de las líneas de cebada en resistentes (R), moderadamente resistentes (MR) y susceptibles (S) de acuerdo a la respuesta de IFHB[†] así como a la acumulación de DON.

Sublote Núm. de línea	Respuesta IFHB			DON (ppm kg ⁻¹) ^{‡‡}		
	2015	2016	2017	0 - 4 (R)	5 - 11 (MR)	≥ 12 (S)
Elite 1	S	MR	R			15.6 - 17.4
3	MR	MR	R	1.7 - 2		
4	R	MR	R	3 - 3.1		
5	MR	MR	R			13.4 - 20.3
7	MR	MR	R			10 - 14.8
8	R	MR	R		5.9 - 6	
9	MR	MR	R	3.5 - 4.4		
12	MR	MR	R	2.7 - 3.4		

Sublote Núm. de línea	Respuesta IFHB			DON (ppm kg ⁻¹) ^{‡‡}		
	2015	2016	2017	0 - 4 (R)	5 - 11 (MR)	≥12 (S)
14	R	S	R			17.7 - 18
15	S	MR	S			17.1 - 19.1
01 18	R	MR	R		7.7 - 10.8	
21	MR	R	MR			11.3 - 16.2
23	S	MR	R			21 - 30.4
28	R	MR	R	0.11 - 0.13		
33	S	MR	S			16.7 - 19.7
30	R	R	R	0.7 - 0.8		
36	MR	MR	R			13.9 - 19.4
41	R	R	R		5.1 - 5.1	
02 42	R	S	R	2.1 - 2		
46	R	S	R			16.3 - 20
47	R	R	R	0.6 - 0.8		
48	R	MR	R	3.2 - 3.3		
53	MR	MR	R		6.4 - 6.9	
56	R	S	R	1.2 - 1.3		
58	R	S	R		5.1 - 5.2	
63	R	R	R		10.5 - 11.1	
65	R	R	R	0.01 - 0.04		
67	R	S	R			11.7 - 13.6
68	S	R	R			11.3 - 12.7
02A 72	R	MR	R		4.8 - 7.2	
73	R	R	R	0.01 - 0.02		
75	R	S	R		5.4 - 50	
79	R	MR	R		8.4 - 10.1	
81	R	S	R		6.8 - 8.9	
82	R	S	R			24 - 22.8
85	S	MR	R	3.6 - 4.2		
87	R	S	R	0.5 - 0.7		
90	MR	S	R	0 - 0		
91	R	R	R	0.1 - 0.1		
93	R	S	R	2.7 - 4.2		
96	R	MR	R	0 - 0		
98	R	S	R		5.4 - 6	
100	S	S	R	1.7 - 5.2		
03 103	R	S	R	0.8 - 1.3		
106	R	MR	R		7.7 - 9.3	
109	R	R	R		9 - 11.8	
112	R	MR	R	0.09 - 0.12		
114	MR	MR	R	0.8 - 0.8		
116	R	MR	R	0.4 - 0.7		
119	MR	R	R			19.1 - 22.4
122	R	MR	R			14.5 - 14.6

Sublote Núm. de línea	Respuesta IFHB			DON (ppm kg ⁻¹) [‡] ¥		
	2015	2016	2017	0 - 4 (R)	5 - 11 (MR)	≥12 (S)
123	R	R	R	1.5 - 1.7		
124	R	R	R		8.1 - 9.8	
125	R	S	R	1 - 1.5		
127	MR	S	R	2 - 4.8		
131	R	MR	S			12.4 - 13.9

[†]= inoculación por aspersión en 2015 y 2017 y por punción en 2016. [‡]= referencia: Seebe (R, 3.4 -4), Shenmai 1 (MR, 5.8 - 10.1) y Kasota (S, 22.0-22.8). [¥]= límite detección= 0.2 ppm kg⁻¹; límite cuantificación= 0.36 ppm kg⁻¹ para avena.

En la Figura 1 se ilustran los síntomas de la fusariosis en las espiguillas y en el raquis de espigas inoculadas con *F. graminearum*.



Figura 1. Espigas de líneas de cebada maltera después de la inoculación por aspersión con mezcla de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de *F. graminearum* en invernadero en 2017. Desarrollo de fusariosis: A) línea 29 sin síntomas; B) línea 123 con índice bajo; C) línea 62 con índice moderado; D) línea 33 con índice alto. Espigas en estado de grano masoso (A) y grano lechoso (B, C, y D). La flecha indica el oscurecimiento y chupado de espiguillas enfermas.

Los granos enfermos se caracterizaron por presentar aspecto arrugado, chupado y coloración café, síntomas característicos de la enfermedad. El análisis estadístico de los valores de incidencia y severidad de la enfermedad mostró diferencia ($p \leq 0.01$) entre las líneas y los sublotes (Cuadro 5).

Esta diferencia se puede atribuir a los aspectos mencionados anteriormente o a una combinación de ambos además de la variabilidad genética entre líneas por el número de ciclos de selección que existe en cada sublote y al tipo de inoculación.

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 [†]	GLD [‡]	% incidencia			% severidad			IFHB		
			2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017
Sublote	5	138	1	0.0001	0.0001	1	0.0001	0.0001	1	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); [†]GLN= grados de libertad del numerador; [‡]GLD= grados de libertad del denominador; L(S)= Líneas (Sublotes)

Detección y cuantificación de DON en semilla inoculada

La inoculación de espigas de 56 líneas de los sublotes Elite (10 líneas), 01 (ocho líneas), 02 (11 líneas), 02A (14 líneas) y 03 (13 líneas), por aspersión con la mezcla de cepas CU1R30, SL3R23, SL3R24, SL10R10 y CU6R30 de *F. graminearum*, en invernadero en 2017, resultó en la acumulación de toxina DON en semilla de 49 líneas de cebada maltera analizadas (Cuadro 4). 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⁻¹) y del límite de cuantificación (0.36 ppm kg⁻¹) para la avena, de acuerdo al protocolo de RIDASCREEN®FAST DON (r-Biopharm).

Tomando como referencia el intervalo de valores de acumulación de DON en los testigos Seebe (R, 3.4 - 4 ppm kg⁻¹), Shenmai 1 (MR, 5.8-10.1 ppm kg⁻¹) y Kasota (S, 22.0-22.8 ppm kg⁻¹), las líneas se clasificaron como: R, 26 líneas, MR, 14 líneas y S, 16 líneas (Cuadro 4). Se encontró bajo coeficiente de correlación (r = 0.5682) al relacionar los valores promedio de contenido de DON y de severidad de la enfermedad de las 56 líneas y de las tres variedades testigo (Figura 2).

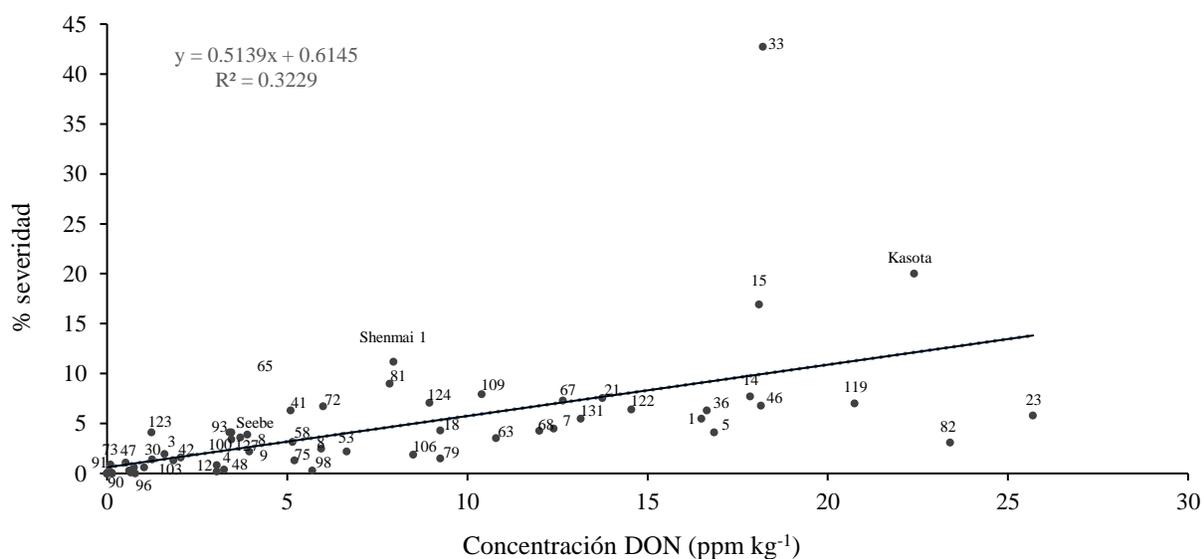


Figura 2. Correlación de severidad de la enfermedad y acumulación de DON en semilla de espigas inoculadas por aspersión con mezcla de cepas de *F. graminearum*, en invernadero en 2017. Los números dentro de la figura indican el número de la línea.

Esta baja correlación se ilustra con los valores obtenidos por las líneas 23, 82 y 119 (23.2 ppm kg⁻¹ en promedio de DON) clasificadas como R en ese mismo año (Cuadro 4). En contraste las líneas 15, 33 y 131, clasificadas como S a la fusariosis en 2017, acumularon alto contenido de DON (16.4 ppm kg⁻¹ en promedio). Por lo anterior las líneas 15 y 33 de los sublotes Elite y 01, respectivamente, podrían considerarse como testigos S en estudios futuros de cruzamientos para búsqueda de resistencia 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 ($r= 0.36$ 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.

Li *et al.* (2015) reportaron que plantas transgénicas de trigo que sintetizan la enzima UDP-glucosiltransferasa (HvUGT13248) de cebada exhibieron alta resistencia a la dispersión de la fusariosis en el raquis; es decir, mostraron resistencia tipo II. La enzima HvUGT13248 metaboliza a la toxina DON a un compuesto menos tóxico (DON3-O-glucósido). En el presente estudio se desconoce el o los mecanismos involucrados en aquellas líneas clasificadas en 2017 como R (26 líneas) o MR (14 líneas) a la acumulación de DON y a la infección por *F. graminearum* (resistencia tipo I). Al analizar las respuestas para índice IFHB y acumulación de DON del Cuadro 4, se deduce que, en general, 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 fueron presentando menos líneas resistentes a la fusariosis y más líneas susceptibles a la acumulación de DON.

Porque al transformar el número total de líneas de cada sub lote en porcentaje, los sublotes de menor ciclo de selección presentaron un porcentaje más alto de líneas clasificadas como R. En contraste, los sublotes de mayor ciclo de selección registraron más porcentaje de líneas clasificadas como S.

Conclusiones

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 de la espiga en respuesta a la inoculación con *F. graminearum*. 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. La información generada en este estudio es relevante ya que indica que estas siete 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.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca 1136066 otorgada a la primera autora durante sus estudios de doctorado. Al CIMMYT a través del Dr. Pawan Kumar Singh quien generosamente compartió su laboratorio, materiales y experiencia; de la Dra. Mónica Mezzalama por sus acertados comentarios durante el

desarrollo de la investigación; y de la MC. Nériida Lozano Ramírez por su apoyo en el análisis de la toxina DON. Al Dr. Aquiles Carballo Carballo del Colegio de Postgraduados por las facilidades dadas en el invernadero para el establecimiento de las pruebas de evaluación de resistencia.

Literatura citada

- Bai, G-H. and Shaner, G. 1996. Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. *Plant Disease*. 80(9):975-979.
- Bondalapati, K. D.; Stein, J. M.; Neate, S. M.; Halley, S. H.; Osborne, L. E. and Hollings C. R. 2012. Development of weather-based predictive models for *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation for spring malting barley. *Plant Dis*. 96:673-680.
- 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*. 36:159-165.
- 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.; Sánchez-Rangel, D.; Galeana-Sánchez, E. y Plasencia-de la Parra, J. 2014. Fumonisin – síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides* - maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 17(1):77-91
- De Wolf, E. D.; Madden, L. V. and Lipps, P. E. 2003. Risk assessment models for wheat *Fusarium* head blight epidemics based on withinseason weather data. *Phytopathology*. 93:428-435.
- Engle, J. S.; Madden, L. V. and Lipps, P. E. 2003. Evaluation of inoculation methods to determine resistance reactions of wheat to *Fusarium graminearum*. *Plant Disease*. 87(12):1530-1535.
- 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>.
- Geddes, J.; Eudes, F.; Toker, J. R.; Legge, W.G. and Selinger, L. B. 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. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18(2):132-137.
- Groth, J. V.; Ozmon, E. A. and Busch, R. H. 1999. Repeatability and relationship of incidence and severity measures of scab of wheat caused by *Fusarium graminearum* in inoculated nurseries. *Plant Dis*. 83:1033-1038.
- He, X.; Osman, M.; Helm, J.; Capettini, F. and Singh, P. K. 2015. Evaluation of Canadian barley breeding lines for *Fusarium* head blight resistance. *Can. J. Plant Sci*. 95:923-929.
- Helm, J. H.; Cortez, M. J.; Salmon D. F.; Jedel, P. E. and Stewart, W. M. 1996. Registration of 'Seebe' barley. *Crop Science*. 36:808-809.
- Horevaj, P. L. R. Gale and E. A Millus. 2011. Resistance in winter wheat lines to initial infection and spread within spikes by deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of *Fusarium graminearum*. *Plant Disease*. 95(1):31-37
- Ireta, M. J. and Gilchrist, S. L. 1994. *Fusarium* head scab of wheat (*Fusarium graminearum* Schwabe). Wheat special report No. 21b. CIMMYT. México, DF. 25 p.
- Jansen, C.; Wettstein, D.; Schäfer, W.; Karl-Heinz K.; Felk A. and Maier, F. J. 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *PNAS*. 102(46):16892-16897.

- Khatibi, P. A.; Berger, G.; Liu, S.; Brooks, W. S.; Griffey, C. A. and Schmale, D. G. 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.
- Li, X.; Shin, S.; Heinen, S.; Dill-Macky, R.; Berthiller, F.; Nersesian, N.; Clemente, T.; McCormick, S., and Muehlbauer, G J. 2015. Transgenic wheat expressing a barley UDP-glucosyltransferase detoxifies deoxynivalenol and provides high levels of resistance to *Fusarium graminearum*. 28(11):1237-46.
- Malhipour, A. and J. Gilbert. 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.; Fonquerne G.; Clermont, I.; Laroche, L.; Huynh, T. T. and Belzile, F. J. 2008. Androgenic response of barley accessions and F1s with *Fusarium* head blight resistance. *Plant Cell Rep.* 27(3):443-451.
- McCallum, B. D. and Tekauz, A. 2002. Influence of inoculation method and growth stage on *Fusarium* head blight in barley, *Can. J. Plant Pathol.* 24:7780.
- McCallum, B. D.; Tekauz, A. and Gilbert, J. 2004. Reaction of a diverse collection of barley lines to *Fusarium* head blight. *Plant Disease.* 88(2):167-174.
- 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.
- Therrien, M. C. 2002. Registration of 'AC Ranger' barley. *Crop Sci.* 42:987-993.
- Salas, B.; Steffenson, B. J.; Casper, H. H.; Tacke, B.; Prom, L. K.; Fetch, T. G., Jr. and Schwarz, P. B. 1999. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. *Plant Dis.* 83(7):667-674.
- Vivar, H. E; Gilchrist, L.; Hayes, P.; Zongzhen, L.; Steffenson, B.; Franco, J. and Henry, M. 1997. Head scab resistant barley form malting and food. *Cereal Research Communications.* 25(3):393-697.
- Windels, C. E. 2000. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the northern great plains. *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.; Márquez, C. L. A.; Ramírez, P. F. e Ibáñez, C. A. M. 1997. Esmeralda. Variedad de cebada maltera para los Valles Altos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Centro de Investigación Regional del Centro-Campo Experimental Valle de México. Folleto técnico número 5.
- Zamora, D. M.; Solano, H. S.; Gómez, M. R.; Rojas, M. I.; Ireta, M. J.; Garza, G. R. y Ortiz T. C. 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.; Gilchrist, L.; Hayes, P.; Kleinhofs A; Kudrna, D.; Liu, Z.; Prom, L.; Steffenson, B.; Toojinda, T. and Vivar, H. 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.