



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**AISLAMIENTO DE *FUSARIUM* EN
LÍNEAS ÉLITE DE CEBADA MALTERA
CULTIVADAS EN VALLES ALTOS, MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA AGRÍCOLA

P R E S E N T A:

SELENE ELIZABETH RAMÍREZ MERCADO

ASESORA: DRA. ANA MARÍA HERNÁNDEZ ANGUIANO

COASESOR: DR. GUSTAVO MERCADO MANCERA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos **La Tesis:**

Aislamiento de Fusarium en líneas élite de cebada maltera cultivadas en Valles Altos, México

Que presenta la pasante: **SELENE ELIZABETH RAMÍREZ MERCADO**
Con número de cuenta: **40901824-2** para obtener el Título de: **Ingeniera Agrícola**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de noviembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Rosa Navarrete Maya	
VOCAL	Dr. Alejandro Espinosa Calderón	
SECRETARIO	Dr. Gustavo Mercado Mancera	
1er SUPLENTE	Dra. Margarita Tadeo Robledo	
2do SUPLENTE	Ing. Ángel Cipriano López Cortés	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)

LMCF/ntm*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios de nuestro país.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en especial a la Carrera de Ingeniería Agrícola por brindarme las mejores herramientas académicas para mi formación profesional y por permitirme conocer a excelentes profesores. Gracias

Al Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente dentro de sus instalaciones y proporcionarme los recursos necesarios para llevar a cabo mi proyecto dentro del Laboratorio de Patología de Semillas, del Posgrado de Fitopatología.

Especial agradecimiento a la Dra. Ana María Hernández Anguiano, asesora de tesis, por permitirme formar parte de su proyecto, por su dedicación, interés, apoyo, paciencia, comprensión, por darme los mejores consejos, por brindarme la oportunidad de vivir una gran experiencia y enseñarme más allá de ser estudiante una mejor persona, pero sobre todo por confiar en mí, gracias por todo.

A la M. en C. Mirna Bobadilla Melendez por formar parte importante de este gran proyecto, por brindarme su apoyo, paciencia, comprensión, por compartirme sus conocimientos y experiencia, pero sobre todo por su amistad y confianza, sin duda una gran persona y compañía en la etapa más importante de mi vida, gracias por todo.

Al Dr. Mauro Zamora Díaz, líder del programa de cebada en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por proporcionar las semillas de las líneas élite de cebada maltera, procedente de Valles Altos, México, utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Gustavo Mercado Mancera por apoyarme durante la carrera, no solo como profesor sino también como amigo, por sus consejos y su dedicación, por brindarme una gran amistad, muchas gracias.

A los miembros del jurado, la Dra. Rosa Navarrete Maya, el Dr. Gustavo Mercado Mancera, el Dr. Alejandro Espinosa Calderón, la Dra. Margarita Tadeo Robledo y el Ing. Ángel Cipriano López Cortés, por su disposición para leer mi trabajo de tesis y por sus valiosas observaciones y sugerencias a él.

Dedicatorias

A mi madre

Este proyecto lo dedico a mi madre, por ser mi apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por sus innumerables consejos, por su paciencia, su esfuerzo, sus desvelos, por todos los sacrificios y por enseñarme que no hay imposibles cuando el querer es poder, por ser mi mejor amiga y ser mi ejemplo a seguir, porque solo ella sabe lo difícil que ha sido este camino, pero sobre todo por ser mi compañera de vida, mi fuerza de cada día y es una gran bendición tenerla junto a mí, y a ella le debo lo que soy y le agradezco por la confianza que ha depositado en mí para cumplir mis sueños académicos, que hoy con gran sacrificio los vemos culminados. Te amo madre.

A mi padre

Por apoyarme incondicionalmente, por darme la oportunidad de crecer y desarrollarme tanto personalmente como profesionalmente, por ofrecerme el consejo oportuno en cada paso de mi vida, por escucharme, por su paciencia, por su cariño, por su confianza en mí y sobre todo por estar a mi lado en cada paso importante de mi vida, brindándome las herramientas para culminar mis sueños. Te amo padre.

A mi hijo

Por ser mi motorcito de vida, porque sin saber lo que sucedía en el exterior hizo mi sueño una realidad, por ser la mejor compañía que pude tener en este proyecto y el resto de mi vida, porque sin saberlo me motivaste a seguir adelante, cuando más cansada estaba, tus pataditas fueron mi impulso, y ahora después de casi dos años de vida eres y serás mi gran amor y bendecida me encuentro culminando esta etapa de mi vida contigo a mi lado. Te amo hijo.

A mi esposo

Por ser mi compañero y apoyo durante este largo camino, por motivarme con sus consejos y siempre darme ánimos, porque de él he aprendido a confiar en mi misma y no dudar de lo que soy capaz, por apoyarme en cada decisión que tomo y por acompañarme en cada momento de mi vida, pero sobre todo por ser un gran amigo, un gran esposo y un gran padre. Te amo pollito.

A mi hermano

Por poder contar contigo en los momentos más difíciles, por tus consejos tan certeros y por ser un gran tío, pero sobre todo por ser un gran hermano que siempre me defenderá y motivara en la vida. Te quiero.

A toda mi Familia

Porque no hay nadie como ustedes abuelos, tíos, sobrinos, primos, con sus consejos, con su amor y su apoyo, cada uno de ustedes han formen parte de lo que ahora soy.

A mis amigas

A Paulina, Mireya, Citlalmina, Laura, Connie y Areli, por hacer de este camino una gran experiencia, por aceptarme tal y como soy y por hacerme vivir los momentos más divertidos y emocionantes que he podido tener, sin duda la etapa de mi vida más divertida e inigualable, gracias por su compañía y su cariño, las quiero.

A mis amigos

A Julio, Fernando, Mario, Oscar, Roque y a todos aquellos que me brindaron su amistad, cariño y apoyo y me siento con la fortuna de poder seguir contando con ella, gracias por tan bonitos momentos.

Gracias

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	<i>i</i>
INDICE DE CUADROS	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iii</i>
	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	2
1.1.1. Objetivos particulares	3
1.2. Hipótesis	3
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Antecedentes de la cebada maltera en México	4
2.2. Descripción general del cultivo de cebada maltera	5
2.2.1. Clasificación taxonómica	5
2.2.2. Características morfológicas	6
2.3. Importancia económica y social del cultivo de cebada maltera	7
2.4. Producción nacional de cebada maltera	9
2.4.1. Superficie sembrada, cosechada y producción a nivel nacional y estatal	9
2.5. La producción de cebada en Valles Altos	11
2.6. Problemática fitosanitaria de la cebada en Valles Altos	11
2.6.1. Principales hongos que invaden la semilla de cebada	12
2.6.2. Fusariosis en el cultivo de cebada	13
2.6.3. Condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de <i>Fusarium</i>	14
2.7. Calidad de la semilla	15
2.7.1. Importancia de la semilla	15
2.7.2. Calidad sanitaria y pruebas de sanidad de semilla	15
2.7.2.1. Prueba de papel secante y congelación	17
2.8. Método de conservación a corto plazo de cepas de <i>Fusarium</i>	17
2.8.1. Conservación en aceite mineral	17
2.8.2. Crioconservación	18
2.8.3. Liofilización	19
2.8.4. Deshidratación	19

	Página
III. METODOLOGÍA	21
3.1. Sitio de estudio	21
3.2. Material biológico	21
3.3. Detección y aislamiento de especies de <i>Fusarium</i>	22
3.3.1. Prueba con papel secante y congelación	22
3.3.2. Identificación taxonómica de especies de <i>Fusarium</i>	24
3.4. Generación de colección de cepas <i>Fusarium graminearum</i>	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1. Micoflora asociada a la semilla de las líneas élite de cebada maltera	28
4.2. Especies de <i>Fusarium</i> aisladas e identificadas taxonómicamente	30
4.3. Colección de cepas de <i>F. graminearum</i>	39
V. CONCLUSIONES	41
VI. LITERATURA CITADA	42
ANEXOS	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales zonas de producción de cebada maltera en México (Aguilar y Schwentesius, 2004).	10
Figura 2. Células de paredes gruesas con gemación similares a las producidas por <i>Blastomyces</i> .	28
Figura 3. Conidio (A) y Clamidosporas (B) en cadena de <i>F. graminearum</i> cepa AL9R32.	35
Figura 4. Esporodoquio (A) y Conidio (B) de cepa NA8R00 y clamidosporas solas (C) y en cadena (D), de cepas NACR01 (C) y SL5R1 (D) de <i>F. equiseti</i> .	35
Figura 5. Conidios (A) y microconidios/mesoconidios (B) de <i>F. avenaceum</i> cepa AL9R31.	36
Figura 6. Conidios de <i>F. dimerum</i> cepa SL5R00.	37
Figura 7. Macroconidios de <i>F. sambucinum</i> cepa NA5R2.	37
Figura 8. Macro y microconidios (A) y clamidosporas (B) de <i>F. oxysporum</i> cepa SL16R00.	38
Figura 9. Conidios (A) y Clamidosporas (B) de <i>Fusarium</i> sp, cepa AL12R10.	38

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Producción agrícola de cebada, ciclo 2014: Modalidad Riego + Temporal (SIAP-SAGARPA, 2014).	10
Cuadro 2. Géneros de hongos patógenos y enfermedades causadas en cebada (Hernández (1998) y Gutiérrez (2000) (citados por Muñoz (2008))).	13
Cuadro 3. Métodos de conservación de hongos y aspectos a considerar (Voget s/f).	20
Cuadro 4. Valores promedio de temperatura y humedad relativa* de las zonas donde se desarrollaron las líneas para la obtención de semilla de cebada maltera, registradas en 2014.	21
Cuadro 5. Esquema de establecimiento de prueba de papel secante y congelación para la detección de la micoflora asociada a la semilla de líneas élite de cebada por localidad.	23
Cuadro 6. Características de las colonias de los géneros de hongos asociados a semilla y las enfermedades que causan en el cultivo (Warham <i>et al.</i> , 1997).	24
Cuadro 7. Características morfológicas de especies de <i>Fusarium</i> de acuerdo a Warham <i>et al.</i> (1997).	26
Cuadro 8. Porcentaje promedio de incidencia de géneros de hongos detectados en semillas de las 16 líneas élite de cebada maltera por localidad en Valles Altos.	29
Cuadro 9. Número de cepas de especies de <i>Fusarium</i> aisladas por localidad.	31
Cuadro 10. Porcentaje del número de cepas obtenidas por especie de <i>Fusarium</i> .	31
Cuadro 11. Incidencia de <i>F. graminearum</i> en semilla de líneas élite de cebada maltera, colectada en Valles Altos, estimada por la prueba de papel secante y congelación.	32
Cuadro 12. Clave de cepas de <i>F. graminearum</i> aisladas de semilla de líneas élite de cebada maltera, colectadas en Valles Altos, durante el ciclo primavera-verano 2014.	39

RESUMEN

En los últimos años se ha presentado la fusariosis o roña de la espiga atacando a variedades de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.) en Valles Altos, México. Esta enfermedad causada por *Fusarium* afecta la calidad sanitaria del grano por la producción de micotoxinas, como el deoxynivalenol (DON) que dañan la salud de las personas y de los animales que consumen granos o productos contaminados. Entre las medidas de control se recomienda el empleo de variedades resistentes; sin embargo, actualmente solo se cuenta con variedades susceptibles a esta enfermedad. En 2013 se inició un proyecto entre el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y el Colegio de Postgraduados para identificar fuentes de resistencia a la roña de la espiga y a la producción de DON en líneas generadas por el INIFAP, cultivadas en Valles Altos. El objetivo general del presente estudio fue aislar especies de *Fusarium* de líneas de cebada maltera para ser integradas a un estudio de selección de cepas de *F. graminearum* productoras de DON; y como objetivos particulares: 1) aislar especies de *Fusarium* de semilla de cebada cultivada en Valles Altos; 2) identificar taxonómicamente las especies de *Fusarium*; y 3) generar una colección de cepas de *F. graminearum*. Para la detección de la micoflora se utilizó el método de papel secante y congelación y para la identificación de géneros y especies se utilizó el Manual de laboratorio “Ensayos para la semilla de maíz y trigo” del CIMMYT y The *Fusarium* laboratory manual. Se detectó a los hongos: *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Gonatobotrys*, *Helminthosporium*, *Nigrospora* y *Ulocladium*. Aunque la incidencia de *Fusarium* fue baja se identificó a *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. avenaceum*, *F. dimerum*, *F. sambucinum* y *F. oxysporum*. En total se generó una colección de 25 cepas de *F. graminearum* de semilla de cebada.

I. INTRODUCCIÓN

En México, la producción de cebada (*Hordeum vulgare*) se desarrolla en la zona centro del país principalmente en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, México, Guanajuato, Puebla, Zacatecas, Michoacán y Querétaro. La cebada es una planta anual de gran importancia tanto para animales como para humanos y actualmente el quinto cereal más cultivado en el mundo.

El principal uso de la malta es para la producción de cerveza, la cual se encuentra dominada por dos grandes corporativos, Cervecería Modelo y Cervecería Cuauhtémoc-Moctezuma, las cuales a su vez han desarrollado sus propias comercializadoras de grano de cebada, las que celebran contratos con los productores agrícolas para la producción de las variedades malteras demandadas por la industria. Esto ha significado un estímulo para la producción de cebada maltera (Islas *et al.*, 2003).

Sin embargo, en los últimos dos años se ha presentado la fusariosis de la espiga, golpe blanco o tizón de la espiga, enfermedad fúngica, atacando la cebada en Valles Altos de México, que incluyen los estados de Tlaxcala, Puebla, Hidalgo y el Estado de México y es causada por un complejo de especies del género *Fusarium*, entre las que predominan: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* y *F. poae*. Sin embargo, *Fusarium graminearum* es la que ocurre con mayor frecuencia en el mundo.

Al igual que en trigo, en la cebada ocurre una baja en peso de los granos que están infectados con la fusariosis. Como un problema adicional es la presencia de varias micotoxinas, especialmente la llamada deoxynivalenol (DON). Esta micotoxina es muy estable durante todos los procesos de elaboración de la cerveza, afectando la calidad tanto de la malta como del producto ya terminado, además de la calidad del grano. Se ha observado que la presencia de *Fusarium* está muy relacionada con el efecto espumoso, es decir una sobreproducción de espuma en la cerveza (INIFAP, 2010).

Los daños causados por la fusariosis de la espiga son de tipo cuantitativo y cualitativo. Los primeros se manifiestan a través de la reducción del rendimiento, del número de granos por espiga y del peso de mil granos, debido a que el micelio de *Fusarium* impide el transporte de nutrientes para el desarrollo del grano. Las malterías no pueden utilizar cebada que ha sido severamente afectada por la fusariosis de la espiga porque, además de presentar menor extracto de malta (germinación controlada, proceso en el cual se consigue que el almidón de la malta se degrade parcialmente), poder diastático (capacidad de degradar el almidón en azúcares, función del contenido en enzimas) y porcentaje de germinación, pueden contribuir a la generación de olores desagradables en la cerveza y provocar el efecto de gushing (salida abrupta de espuma) ya que aportan cuerpo, así como color y dulzor, y contribuyen a mejorar la espuma. Los daños cualitativos se deben a la producción de micotoxinas nocivas para la salud del hombre y de los animales.

Es relativamente reciente el conocimiento que se tiene de las toxinas asociadas al hongo de *Fusarium graminearum*, presentes en el trigo y la cebada, además por los efectos que causan en humanos y animales, ha motivado la generación de mayor investigación sobre estas toxinas. En los últimos años se ha observado un incremento en la producción de cebada y a la importancia actual que presenta dicho cultivo en México, tanto en la industria maltera y cervecera como en su utilización para la alimentación animal, la contaminación con micotoxinas es el aspecto más importante de la fusariosis, a causa del riesgo que implica para la salud humana y la animal (Barrera, 1994). Actualmente en México no se cuenta con variedades de resistentes a la fusariosis.

Por lo tanto, es necesario determinar la incidencia de especies de *Fusarium* presentes en las nuevas variedades de cebada maltera que se están generando en los ambientes de la región cebadera, a través del análisis de muestras de grano en laboratorio para su identificación; para lo cual se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis.

1.1. Objetivo general

- Detectar y aislar especies de *Fusarium* de líneas élite de cebada maltera cultivadas en Valles Altos.

1.1.1. Objetivos particulares

- Detectar y aislar especies de *Fusarium* de semillas de cebada maltera cultivadas en zonas productoras de los estados de Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y México.
- Identificar taxonómicamente las especies de *Fusarium* aisladas de las líneas élite de cebada maltera.
- Generar una colección de material biológico de cepas de *Fusarium graminearum* para estudios futuros de evaluación de producción de micotoxinas DON.

1.2. Hipótesis

H_t: Son pocas las especies de *Fusarium* que se encuentran asociadas a la semilla de líneas élite de cebada maltera, cultivadas en Valles Altos.

II. ANTECEDENTES

2.1. Antecedentes de la cebada maltera en México

Se tienen antecedentes del cultivo de la cebada en las culturas Babilónica, Egipcia y China, en donde se cosechaba este producto de forma silvestre. Se considera que de manera accidental se descubrieron las propiedades de la cebada, cuando al estar almacenada cierto tiempo bajo condiciones de humedad favorables, la semilla germinaba y al ser empleada para la preparación de alimentos, éstos resultaban con mejor textura y sabor. Así, en forma deliberada se inició el proceso de germinación de cebada. En la actualidad, éste cereal se produce en casi todo el mundo, destinándolo principalmente a dos tipos de mercado, como alimento para ganado y para producción de malta. Particularmente en México, aproximadamente el 70 % de la cebada que se produce se destina para la industria maltera, y el 30 % restante para la alimentación de ganado (Aguilar y Schwentesius, 2004).

El desarrollo de la cebada maltera en México se inició en 1906, con el establecimiento de la primera fábrica de malta. El gobierno mexicano de aquella época permitió a los dueños de esta nueva industria la importación de cebada maltera, sin pago de impuestos, a cambio de fomentar el cultivo de este cereal para su abasto en el país. No obstante, hasta la década de los cuarenta la mayor parte de la cerveza producida en México se elaboró con malta importada. La segunda guerra mundial cambió el escenario, ya que las cervecerías se vieron imposibilitadas para importar la malta y empezaron a elaborarla a partir de la cebada disponible, que era de calidad forrajera (Medellín (1997) citado por Espinoza (2003)).

A iniciativa de las principales industrias cerveceras como la Cuauhtémoc, Moctezuma y Modelo de la época, en la década de 1950 se introdujeron semillas de cebada maltera provenientes del extranjero, principalmente de los Estados Unidos. Al inicio los rendimientos fueron bajos, debido en gran parte a que las variedades introducidas no se adaptaron a las condiciones agroclimáticas de México; las plantas se acamaban, desgranaban y eran tardías en su maduración. Cada cervecería promovía la siembra de estas variedades y competía con las otras en forma directa por la materia prima, a través de sus respectivos distribuidores de cerveza en la región, incluso de sus propios compradores. Muchos distribuidores se convirtieron en comisionistas, intermediarios y acaparadores. Los industriales de la cerveza llegaron a la conclusión de que la competencia por la materia prima nacional les arrojaba más problemas que beneficios. Por ello, en el año de 1958 las tres mayores

agroindustrias del ramo mencionadas fundaron Impulsora Agrícola S.A. de C.V., empresa que en la actualidad es controlada por dos consorcios cerveceros nacionales (Aguilar y Schwentesius, 2004).

Actualmente, las industrias cerveceras en México forman un duopolio en el que compiten por los consumidores en las diferentes regiones del país y por el mercado internacional, pero trabajan bajo un esquema de “cooperación”, encargando a Impulsora Agrícola S.A. de C.V., la adquisición de la materia prima (Aguilar y Schwentesius, 2004).

2.2. Descripción general del cultivo de cebada maltera

La cebada es un cultivo de estación corta y de maduración temprana, tolerante a una amplia gama de condiciones adversas, incluyendo el frío, la sequía y los suelos salinos. Prospera en un rango ambiental mucho más amplio que cualquier otro cereal, en climas desde subárticos hasta subtropicales. La temperatura adecuada para su desarrollo varía entre los 15°C y 31°C. Requiere poca humedad, entre los 400 y los 1300 mm de precipitación. Dada la amplia distribución geográfica de la cebada y su adaptabilidad única, existen miles de formas de este grano (Muñoz, 2008).

Además de las cebadas tradicionales de dos y seis hileras, se han desarrollado variedades desnudas para aplicaciones alimenticias. Dado que la cebada desnuda requiere poca limpieza después de ser cosechada, puede usarse el grano entero, incluyendo el salvado y el germen rico en nutrientes. Los productos alimenticios hechos a base de cebada desnuda son considerados alimentos de grano integral (Aguilar y Schwentesius, 2004).

2.2.1. Clasificación taxonómica

La cebada es una planta monocotiledónea, anual de gran importancia tanto para la alimentación de animales como de personas, actualmente ocupa el quinto lugar entre los cereales más sembrado en el mundo. La cebada pertenece a la familia de las Poáceas (gramíneas) y al género *Hordeum*. La clasificación botánica de la cebada es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia: Pooideae

Tribu: Triticeae

Género: *Hordeum*

Especie: *Hordeum vulgare* L.

Linnaeus (1757) clasificó a la cebada en cuatro diferentes especies cultivadas, de acuerdo a la fertilidad y a las diferencias morfológicas de las espigas. *Hordeum vulgare*, cuyo ancestro es *H. spontaneum* (silvestre), se caracteriza por producir una espiga con dos hileras, raquis quebradizo y germinación tardía; *H. distichum*, utilizado para la obtención de cerveza; y *H. hexastichum*, empleado básicamente como forraje para la alimentación animal. Tanto *H. distichum* como *H. hexastichum*, como especies cultivadas, se agrupan bajo el nombre único de *Hordeum vulgare* L., sub sp. vulgare (Agro Inversiones S.A., s/f).

2.2.2. Características morfológicas

La planta de cebada suele tener un color verde más claro que la del trigo la cual, en los primeros estadios de su desarrollo, suele ser más erguida.

Hojas: las hojas estrechas y color verde claro. La planta de cebada suele tener un color verde más claro que el del trigo y en los primeros estadios de su desarrollo la planta de trigo suele ser más erguida.

Raíces: El sistema radical es fasciculado, fibroso y alcanza poca profundidad en comparación con el de otros cereales. Se estima que un 60% del peso de las raíces se encuentra en los primeros 25 cm del suelo y que las raíces apenas alcanzan 1.20 m de profundidad.

Tallo: El tallo es erecto, grueso, formado por unos seis u ocho entrenudos, los cuales son más anchos en la parte central que en los extremos junto a los nudos. La altura de los tallos depende de las variedades y oscila desde 0.50 m a un metro.

Flores: Las flores son autógamas, con tres estambres y un pistilo de dos estigmas. Las flores abren después de haberse realizado la fecundación, lo que tiene importancia para la conservación de los caracteres de una variedad determinada.

Fruto: El fruto es un cariósipide, con las glumillas adheridas, salvo en el caso de la cebada desnuda.

Grano: El tamaño del grano depende de la influencia del ambiente y sus dimensiones varían, puede alcanzar una longitud máxima de 9.5 mm y una mínima de 6.0 mm de ancho, mide entre 1.5 y 4.0 mm (Ibarguren, 2014).

2.3. Importancia económica y social del cultivo de cebada maltera

La cebada ocupa el cuarto lugar entre los cereales más consumidos en el mundo, después del maíz, trigo y el arroz. La razón de su acogida en el mundo es por su adaptabilidad ambiental (Pérez, 2010). Dentro de los principales productores de cebada se encuentran: Unión Europea con 61.1, Rusia con 19, Canadá con 8.5, Australia con 9.4 y Ucrania con 9.7 millones de toneladas (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, 2016).

La producción mundial de cebada del año 2015 fue de 148.63 millones de toneladas. Los 145.24 millones de toneladas estimados este año podrían significar una disminución de 3.39 millones de toneladas o un 2.28 % en la producción de cebada alrededor del mundo (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, 2016).

La cebada es considerada como un producto estratégico y materia prima indispensable para la elaboración de cerveza. En la cadena agroalimentaria de la cebada maltera participan alrededor de 55,000 productores de cebada, dos grupos fabricantes de cerveza: el Grupo Modelo, que abarca alrededor del 56.4% del mercado, y Femsa que cubre el 43.6% del mercado consumidor de cerveza en México (Muñoz, 2008).

La industria cuenta con 17 plantas productoras de malta y cerveza en 11 estados del país. La tasa de crecimiento en promedio que la industria cervecera mostró en el periodo comprendido entre 1991 a 2003 fue del 12 % anual. Este sector aportó en el año 2004 el 1.6 % del Producto Interno Bruto Nacional y el 3.8 % de la recaudación fiscal total en México. La cadena productiva de esta Industria

genera unos 88,000 empleos directos y unos 800,000 empleos indirectos. Siendo el consumo per cápita anual de alrededor de 50 litros (SAGARPA (2005), INEGI (2005) citados por Muñoz (2008)).

La versatilidad de la cebada la convierte en un grupo apropiado para una gran variedad de usos, entre los principales destacan el forraje para ganado, el malteado y la alimentación humana. Se estima que dos terceras partes de la producción mundial de cebada se utiliza como forraje y grano en la alimentación de ganado vacuno, porcino y aviar y la tercera parte restante es utilizada para consumo humano principalmente en la elaboración de malta (USDA (2004) citado por Muñoz (2008)).

El cultivo de cebada representa una alternativa nutrimental, que ahorra costos con respecto al maíz y otros granos, para alimentar a diversos animales, incluidos el ganado vacuno lechero y cárnico, porcino, ovino y avícola. Si bien es comparable al maíz como fuente de energía; la cebada es significativamente más alta en proteínas, aminoácidos y fibras útiles. Los niveles proteínicos de la cebada generalmente varían entre 13.5 y 14.5 %, niveles superiores cuando se comparan con los del maíz (9.3 a 9.8 %) (Muñoz, 2008).

Debido a su amplia disponibilidad y a sus numerosas ventajas nutrimentales, la cebada es considerada un alimento importante en la dieta humana en muchas partes del mundo. La cebada tiene un alto contenido de fibra, antioxidantes benéficos y vitaminas del complejo B, aunque bajo contenido de grasas y cero colesterol.

Las investigaciones más recientes se han centrado en los beneficios potenciales de la cebada para la salud humana. Los resultados iniciales indican que la presencia de β -glutano, una forma de fibra asimilable, disminuye el colesterol en la sangre, ayuda a regular la respuesta de glucosa de la sangre y puede fortalecer el sistema inmunológico. Así mismo se están estudiando los efectos de la cebada sobre la reducción de los factores de riesgo de la diabetes al mejorar la salud intestinal y promover el mantenimiento de la pérdida de peso (Muñoz, 2008).

2.4. Producción nacional de cebada maltera

La producción de cebada en México ha aumentado en los últimos años, de tal forma que actualmente ocupa el quinto lugar en la producción nacional de granos, después del maíz, sorgo, trigo y frijol, desplazando de éste lugar al arroz y garbanzo (Espinoza, 2003).

La producción de cebada se concentra en el centro del país, siendo los estados más importantes Hidalgo 29.4 %, Tlaxcala 23.0 %, Guanajuato 18.9 %, Estado de México 11.6% y Puebla 9.0 %, que en conjunto aportaron el 92 % del volumen y valor generado en 2013 (FND-SHCP, 2014).

La producción nacional se distribuye en los dos ciclos agrícolas, lo cual representa una ventaja para la industria cervecera nacional ya que esto reduce los costos financieros, de logística y almacén, así como poder ajustar su demanda de acuerdo a su crecimiento en ventas. El estado de Hidalgo es el primer productor de cebada en el ciclo P-V, con una participación en el año agrícola 2008 del 31 % de la producción total. En cambio durante el ciclo Otoño-Invierno (O-I) el estado de Guanajuato es el primer productor con contribución en el año agrícola 2008 del 29 % de la producción total (SAGARPA, s/f).

En el ciclo Otoño-Invierno se obtiene alrededor del 20 % de la producción del año agrícola, concentrándose el 95% de este volumen en el último trimestre del año. Por su parte, en el ciclo Primavera-Verano se obtiene el 80% del volumen, que se obtiene casi en su totalidad en el segundo trimestre del año (FND-SHCP, 2014).

En México la cebada destinada al proceso de transformación para convertirse en malta es mayor al 90 % del total de la producción; el principal producto que se obtiene de la malta es la cerveza, cuyos subproductos se emplean para la alimentación de ganado además de la elaboración de químicos y solubles agregables (2000Agro, 2007).

2.4.1. Superficie sembrada, cosechada y producción a nivel nacional y estatal

En México se obtuvo una producción de 845 mil toneladas en una superficie sembrada de 321 mil hectáreas, con un rendimiento de 2.7 toneladas por hectárea, destinada principalmente para grano (Cuadro 1) (SIAP-SAGARPA, 2014).

Cuadro 1. Producción agrícola de cebada, ciclo 2014: Modalidad Riego + Temporal (SIAP-SAGARPA, 2014).

Uso	Superficie		Producción Rendimiento		Precio Medio Rural (PMR) (\$ ton ⁻¹)	Valor producción (Miles de pesos)
	Sembrada (ha)	Cosechada (ha)	(ton)	(ton ha ⁻¹)		
Grano	321,789.59	313,634.08	845,706.95	2.70	3,489.84	2,951,381.79
Semilla	1,620.00	1,620.00	8,131.00	5.02	4,318.95	35,117.37

Los estados de Hidalgo, México, Puebla y Tlaxcala aportaron el 68 % del grano producido en México, cultivado bajo condiciones de temporal. Sumando la cosecha de Guanajuato, donde se siembra bajo condiciones de riego, la cifra llega al 77 %; además, en el Altiplano Central se encuentran tres de las cuatro agroindustrias malteras del país (Aguilar y Schwentesius, 2004).

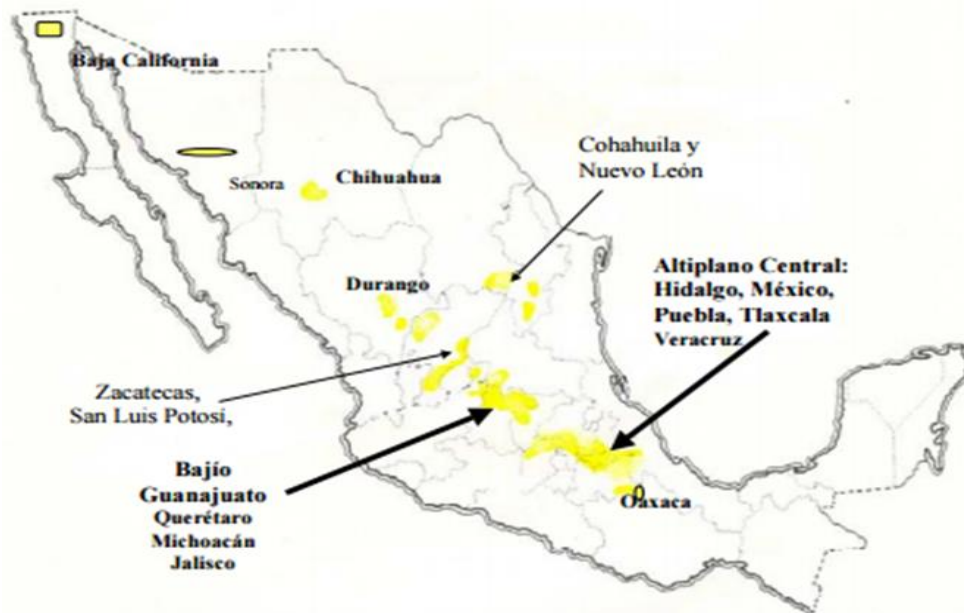


Figura 1. Principales zonas de producción de cebada maltera en México (Aguilar y Schwentesius, 2004).

2.5. La producción de cebada en Valles Altos

La cebada es un cultivo de gran importancia económica y social en la zona de los Valles Altos del país (Estado de México, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo); los agricultores la prefieren en lugar de otros granos debido a que se cultiva en forma extensiva y mecanizada. Su impacto en la economía de la región no solo se debe a la superficie sembrada y a la producción obtenida, sino que, es la mejor alternativa agrícola en el ciclo P-V para los productores de áreas de temporal con riesgo de heladas tempranas, ya que es de ciclo corto (114 días a cosecha) y se adaptan a suelos delgados y de lomerío, donde otros cultivos tienen serias restricciones para producir (Zepeda (1999) citado por Islas *et al.* (2003)). Los Estados de Hidalgo y Tlaxcala son los dos principales productores de cebada para grano de temporal en México. Ambos estados proporcionan casi la tercera parte de la producción total nacional. La cebada producida en ambos estados es de la especie *Hordeum sativum* Jess, de seis hileras de grano (López *et al.*, 2005).

El principal promotor de la cebada maltera en Tlaxcala, Hidalgo, Puebla y Estado de México es la empresa IASA, organismo filial del Grupo Modelo (organización cervecera más importante de México). IASA, además de comprar la cosecha, financia a los productores con fertilizantes, semillas y otros insumos (Zepeda (1999) citado por Islas, *et al.* (2003)).

2.6. Problemática fitosanitaria de la cebada en Valles Altos

Las regiones de los Altos, Santa Lucía Texcoco, Estado de México; Almoloya, Hidalgo; Nanacamilpa, Tlaxcala y Cuyuaco, Puebla, son climáticamente aptas para la siembra de trigo y cebada. Sin embargo, las numerosas enfermedades que se presentan en la región son una fuerte limitante de la producción, especialmente por el alto costo de los fungicidas y de su aplicación. En el caso de la producción de semillas, se debe tener presente que el grano infectado constituye el inóculo primario de la gran mayoría de las enfermedades (Gilchrist, 2000).

En general, las manchas foliares han ocupado un lugar prioritario en Valles Altos, pero hoy día los cambios en los métodos culturales dirigidos hacia la labranza mínima (por ejemplo, retener los residuos de cosecha) han favorecido el incremento de inóculo de las manchas foliares y de las

diferentes especies de *Fusarium* que causan fusariosis de la espiga, y por ende provocan una mayor incidencia de enfermedades.

La fusariosis se ha convertido en un nuevo problema fitosanitario no sólo por su efecto en los rendimientos, sino también por su impacto en la calidad del grano por las toxinas que produce el hongo *Fusarium* con afectos en la salud humana y animal (Gilchrist, 2000).

La fusariosis constituye uno de los factores más importantes que limitan el rendimiento. El sistema de mercadeo americano ha devaluado enormemente el grano de cebada debido a que la tolerancia a esta enfermedad es de cero y los compradores de cebada de Dakota del Norte evitan las compras del cereal; en China, el daño es severo y se le conoce desde hace 35 años (Gilchrist, 2000).

2.6.1. Principales hongos que invaden la semilla de cebada

El potencial de rendimiento de las distintas variedades de cebada se encuentra limitado por diversos factores de manejo agronómico entre los que destacan: la deficiente preparación del suelo, siembra fuera de la estación de crecimiento, inadecuada cantidad y mala calidad de semilla utilizada, deficiente fertilización en cuanto a dosis y aplicación, así como por factores bióticos. Dentro de este último factor sobresalen las enfermedades causadas por algunas especies de hongos y/o sus derivados, que en el cultivo de cebada maltera, de manera específica, pueden afectar la germinación del grano, además de afectar la producción de amilasa y de igual modo alterar los subsecuentes procesos de fermentación por tener efectos adversos en la calidad de la levadura. Por otro lado la presencia de hongos en la malta presenta riesgos para la salud humana debido a la posible presencia de micotoxinas y a los efectos que pueden resultar en la calidad de la cerveza específicamente en lo relacionado a sus propiedades físicas y organolépticas (Muñoz, 2008).

Hernández (1998) y Gutiérrez (2000) (citados por Muñoz, 2008) reportaron un total de 10 géneros de hongos patógenos para el cultivo de la cebada en México (Cuadro 2). Cabe señalar que las especies pertenecientes a estos géneros y sus características intrínsecas dependen fundamentalmente del vegetal que invaden, el clima y la región geográfica en la cual se desarrollan.

Cuadro 2. Géneros de hongos patógenos y enfermedades causadas en cebada (Hernández (1998) y Gutiérrez (2000) (citados por Muñoz (2008)).

Género	Nombre común de la enfermedad	Parte afectada
<i>Alternaria</i>	Mancha negra del grano. Tizón de la hoja.	Semilla, hoja y espiga.
<i>Aspergillus</i>	Pudrición.	Semillas.
<i>Cladosporium</i>	Pudrición.	Hoja, tallo, espiga y semilla.
<i>Erysiphe</i>	Cenicilla.	Hojas, tallo y espiga.
<i>Fusarium</i>	Roña de la espiga. Pudrición de la espiga.	Tallo, espiga, semilla y raíz.
<i>Helminthosporium</i>	Mancha Oval. Mancha reticulada. Raya Foliar.	Hoja, tallo, espiga, semilla y raíz.
<i>Pythium</i>	Pudrición.	Tallo, semilla y raíz.
<i>Puccinia</i>	Roya.	Hojas, tallo y espiga.
<i>Sclerotium</i>	Pudrición.	Hojas y tallo.
<i>Ustilago</i>	Carbones.	Espiga y semilla.

2.6.2. Fusariosis en el cultivo de cebada

En los últimos años se ha presentado la fusariosis atacando la cebada en Valles Altos, México, región que incluye los estados de Tlaxcala, Puebla, Hidalgo y el Estado de México. Al igual que en trigo, en la cebada ocurre una baja en peso de los granos que están infectados con la fusariosis. Como un problema adicional es la presencia de varias micotoxinas, especialmente la llamada deoxynivalenol, mejor conocida como DON. Esta micotoxina es muy estable durante todos los procesos de elaboración de la cerveza, afectando la calidad tanto de la malta como del producto ya terminado. Además de la calidad del grano y la presencia de micotoxinas, se ha observado que la presencia de *Fusarium* está muy relacionada con el efecto “espumoso”, término empleado para referirse a la sobreproducción de espuma en la cerveza (INIFAP, 2010).

La fusariosis o tizón de la espiga del trigo es causada principalmente por *Fusarium graminearum* (Schwabe), aunque en Holanda y en algunas regiones del centro de Europa se menciona a *F. culmorum* como la especie más importante. En Polonia se ha demostrado que *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. nivale* tienen un grado similar de patogenicidad (severo/fuerte) en cereales, y que *F. avenaceum* tiene una patogenicidad de débil a media. *F. graminearum* ataca las espigas del trigo, particularmente los órganos florales, reduciendo así la formación o llenado de granos. El inóculo principal está constituido por macroconidios o ascosporas (teleomorfo: *Gibberella zeae* (Schw.) Petch), el cual es diseminado por el viento y la lluvia. El momento de la infección ocurre durante o después de la floración, directamente sobre las anteras que salen de las glumas. Los conidios se depositan sobre las anteras, germinan y penetran hasta el ovario, estimulados por la mayor concentración de colina y betaína en los granos de polen y anteras. La espiguilla infectada pierde clorofila rápidamente y se torna descolorida, posteriormente toma un color rosa o salmón, especialmente en la base y bordes de las glumas. Si la humedad se mantiene alta, la espiguilla enferma es invadida por hongos saprófitos que le dan una coloración oscura o negra, razón por la que, equivocadamente, le han llamado "carbón de la espiga". En campo es común observar que las primeras espiguillas infectadas por la fusariosis se encuentren en el tercio medio de la espiga, debido a que ahí es donde se inicia la antesis. Si las condiciones ambientales permanecen favorables, la infección avanza a las espiguillas adyacentes, y en pocos casos puede llegar a infectar toda la espiga incluyendo el raquis o pedúnculo de la misma. Cuando la infección por *F. graminearum* es fuerte, los granos dañados son cubiertos con el micelio del hongo y toman una apariencia de masa algodonosa de color rosa. Si la severidad del ataque es moderada los granos pueden quedar chupados y bajos de peso, además de tomar una coloración blanquecina (Gilchrist, 2000).

2.6.3. Condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de *Fusarium*

Las condiciones ambientales son determinantes en el proceso de penetración y en general en la infección de *Fusarium*. Algunos investigadores reportan que a nivel de campo y en condiciones favorables los primeros síntomas de la fusariosis se aprecian a los dos o tres días, después de la infección; sin embargo, en algunos casos estos se presentan a los cinco días. Los síntomas de la infección se observan en las glumas y sobre los granos (Kohli, 1989).

Uno de los factores principales que favorecen el desarrollo de la fusariosis son las temperaturas cálidas. Ireta y Gilchrist (1994) indicaron que temperaturas entre 16 y 36 °C, con óptimo de 32 °C,

son las requeridas para la producción de inóculo y dispersión de *F. graminearum*. Estas temperaturas acompañadas de alta humedad relativa, días cortos de baja intensidad lumínica favorecen el desarrollo de la enfermedad. Otros factores son los suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio. También las heridas ocasionadas a las raíces por maquinaria o nematodos como *Melodogyne incognita* aumentan la susceptibilidad al marchitamiento y favorecen el desarrollo del hongo (González, 2006).

También las plantaciones continuas así como los residuos y materia orgánica en el suelo incrementan la densidad del inóculo, el cual puede estar formado por clamidosporas que pueden persistir entre 5 y 15 años en ausencia de plantas (Bello, s/f).

2.7. Calidad de la semilla

2.7.1. Importancia de la semilla

Las plantas se cultivan para obtener semillas y una gran variedad de productos alimenticios, fibras u otros tipos de productos que satisfacen gran parte de las necesidades humanas. La semilla es el principal insumo en la producción de la mayoría de los cultivos básicos; por lo que para obtener los mayores rendimientos se requiere el uso de semillas de calidad. La calidad de la semilla la determinan las características físicas, genéticas, fisiológicas y fitosanitarias de la misma.

2.7.2. Calidad sanitaria y pruebas de sanidad de semilla

Las semillas son portadoras de microorganismos y agentes infecciosos presentes en su interior, aunque en la superficie también pueden encontrarse. La calidad fitosanitaria se refiere al hecho de que la semilla se encuentre libre de microorganismos tales como hongos, bacterias y nematodos así como de agentes infecciosos, como los virus y viroides, que representan una seria amenaza para la producción y conservación de semillas (CIAT (1979) citado por Barrera (1994)).

Debido a que la sanidad de semillas es de vital importancia, se han desarrollado pruebas que tienen por objeto detectar e identificar los organismos patógenos presentes en las semillas, apreciar los daños causados en ellas y prever las posibles consecuencias de las infecciones existentes (Besnier (1989) citado por Barrera (1994)). La utilización de las pruebas de sanidad de semilla es de

importancia para la detección oportuna del inóculo, que bajo ciertas condiciones puede desarrollar e incrementar progresivamente la enfermedad y por ende reducir el potencial de producción del cultivo. También lo son para evitar la introducción de nuevas enfermedades en regiones donde no existían por la entrada de lotes de semillas infectadas. Las pruebas para identificar patógenos transmitidos por semilla son estándares utilizados en la determinación de semillas de buena calidad.

Algunas enfermedades transmitidas por semilla son causa de control cuarentenario y de una certificación estricta, que permite evaluar la calidad sanitaria del lote y de conocer las causas de la baja germinación o deficiente desarrollo en campo.

La obtención de semillas de alta calidad sanitaria puede lograrse mediante el control pre-cosecha de las enfermedades transmitidas por semilla a través de: a) selección de áreas de producción libres o de baja prevalencia de enfermedades; b) prácticas culturales tales como fechas de siembra, rotación de cultivos, fertilización adecuada, y eliminación de malezas hospederas de plagas y enfermedades; c) inspección en origen, que consiste en la inspección de campos de producción de semillas, así como la determinación de problemas potenciales que pueden ser detectados y eliminados previo a la cosecha (Copeland y McDonald (1985) citados por Barrera (1994)).

Las pruebas de sanidad de semilla incluyen:

1. Examen visual: El examen de las semillas en forma externa o interna, macroscópica o microscópicamente, para detectar la presencia de patógenos. Este examen considera también la prueba del embrión.
2. Incubación: La incubación de las semillas en agar o en papel secante húmedo para favorecer el desarrollo o expresión de microorganismos como hongos y bacterias. Como ejemplos tenemos la prueba en placa de agar, la prueba con papel secante o papel secante y congelación.
3. Desarrollo de síntomas: La germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas en condiciones que favorecen la producción de síntomas característicos de importancia en el diagnóstico.
4. Pruebas moleculares: Pruebas que incluyen la utilización de sondas específicas u oligonucleótidos específicos para ciertos patógenos.

5. Pruebas inmumológicas: Pruebas que utilizan anticuerpos y antígenos específicos. Entre estas tenemos la prueba ELISA (por sus siglas en inglés) para bacterias y virus.

Todas estas pruebas se usan ordinariamente para la detección e identificación de microorganismos transmitidos por semilla (Warham *et al.*, 1997) y tienen ventajas y desventajas.

2.7.2.1. Prueba de papel secante y congelación

En la prueba con papel secante y congelación, se incuban las semillas durante cierto tiempo en condiciones ambientales específicas para que los hongos presentes en la semilla se manifiesten; se observa entonces, la aparición de signos del desarrollo del hongo mismo.

Se identifican los distintos hongos por características tales como forma, tamaño, septación, color y formación de cadenas de conidios; características de conidióforos, disposición de conidio sobre el conidióforo, características del micelio, densidad y color de las colonias, entre otras.

Los principales factores que favorecen el crecimiento y fructificación del hongo así como el desarrollo de los síntomas en la planta son la temperatura, la humedad, la luz y el periodo de incubación. Estos factores se analizan en relación con la normalización en los protocolos recomendados por la Asociación Internacional para las pruebas de semillas (ISTA, por sus siglas en inglés) (Warham *et al.*, 1997).

2.8. Método de conservación a corto plazo de cepas de *Fusarium*

Son métodos que ayudan al mantenimiento de las cepas, generalmente, para su uso frecuente donde se requiere que éstas se mantengan activas, sin cambios morfológicos o genéticos (Dilia, 2006). Entre otros están los siguientes.

2.8.1. Conservación en aceite mineral

La conservación en aceite fue usado por primera vez en 1957 por Buell y Weston, quienes obtuvieron resultados exitosos y actualmente sigue teniendo vigencia en las colecciones internacionales (Dilia, 2006).

Composición del aceite mineral. El aceite mineral es un compuesto de aceites lubricantes producidos a partir del petróleo o de la hulla; son una serie de materias aceitosas que contienen como principal componente mezclas de hidrocarburos alifáticos de base parafina (Raymond (1980) citado por Dilia (2006)).

Principio del método. Este método consiste en reducir con aceite mineral estéril un cultivo que se encuentre en condiciones óptimas de crecimiento micelial y esporulación, generalmente se utiliza aceite mineral de alta calidad de grado medicinal (Jong y Atkins (1986) citados por Dilia (2006)).

Esta técnica disminuye la deshidratación del medio, retarda la actividad metabólica del cultivo por la reducción de la tensión del oxígeno (aunque algunos hongos continúan creciendo bajo aceite), además de reducir la posibilidad de infestación por ácaros (Jong y Birmingham (2001) citados por Dilia (2006)). Este método es ampliamente aplicable a formas no esporuladas o estrictamente miceliales, para las cuales la liofilización o la criopreservación no puede ser utilizadas. Es utilizado en pequeñas colecciones donde la criopreservación y la liofilización no resultan económicos (Jong y Birmingham (2001) citados por Dilia (2006)). Un amplio rango de hongos han sobrevivido bajo este método, Algunas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* han permanecido viables por 40 años, así mismo algunos microorganismos pueden conservar propiedades particulares, como la producción de esclerocios, ascosporas y abundante esporulación (Smith y Onions (1994) citados por Dilia (2006)).

2.8.2. Crioconservación

La crioconservación o criopreservación es un método muy conocido y utilizado en la actualidad. Su principio radica en que toda célula, tejido u organismo sometido a bajas temperaturas disminuye sus funciones vitales permaneciendo en estado de dormancia por periodos prolongados, es decir, sus actividades metabólicas están suprimidas (Pinzón *et al.*, 2009).

El material biológico se conserva en un rango de -20 °C a -196 °C (nitrógeno líquido). En nitrógeno líquido se obtiene la temperatura práctica más baja disponible, pero a la temperatura de equilibrio, la difusión molecular es extremadamente lenta y la probabilidad de que ocurran reacciones químicas es prácticamente nula.

El proceso de congelamiento y descongelamiento produce cambios en las células que pueden resultar letales, por lo que el proceso puede ser perjudicial, a través de la formación de cristales de hielo,

exosmósis, aumentando la solubilidad de gases, la deshidratación, la concentración de osmolitos y disminución del pH, alteraciones de la actividad enzimática, acumulación de metabolitos, incremento del contacto entre moléculas, ruptura de puentes de H, distorsión de macromoléculas, solidificación, pérdida de la integridad de membranas, ruptura de emulsiones, entre otros.

En el descongelamiento se debe controlar la velocidad de enfriamiento es aceptable $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y ser lo más rápido posible (Pinzón *et al.*, 2009).

2.8.3. Liofilización

La liofilización es el método más utilizado para la conservación de microorganismos por las colecciones internacionales de cultivos. Se basa en paralizar el metabolismo por deshidratación celular sometiendo la muestra a congelación y sublimación. La disminución en el contenido de humedad residual da lugar a un material compacto que se disuelve posteriormente con facilidad. Este es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos, los líofilos pueden almacenarse a temperatura ambiente, con lo cual su envío se facilita (Pinzón *et al.*, 2009).

Sin embargo, este método de conservación a largo plazo también presenta limitaciones debido a la formación de cristales de hielo que pueden romper las células y, a su vez, causar efectos negativos al microorganismo en la etapa de reactivación, por esto se emplean agentes protectores tales como glicerol, dimetilsulfóxido, ácido glutámico, glucosa, sacarosa, lactosa, suero, peptona y leche descremada, que impiden la acción destructiva del congelamiento sobre las células, es decir, protegen de la formación de cristales de hielo disminuyendo su efecto adverso. Estos crioprotectores se utilizan dependiendo del tipo de microorganismo que se va a conservar, el más conveniente para criopreservar estructuras fúngicas es el glicerol, y el más favorable para liofilizarlas es la leche descremada (Pinzón *et al.*, 2009).

2.8.4. Deshidratación

La deshidratación puede llevarse a cabo desde la fase líquida (L-drying) o por sublimación desde el estado congelado (liofilización). La pérdida de viabilidad durante la deshidratación es principalmente atribuida a alteraciones de la membrana celular.

Las células deshidratadas son susceptibles al deterioro causado por oxígeno. El deterioro de las células durante la deshidratación puede ser controlado por el agregado de aditivos. Algunos forman una matriz amorfa que dispersa los componentes tóxicos que la célula puede liberar durante el secado. Otros protectores interactúan con las membranas, estabilizando su estructura en el estado anhidro. Los aditivos más comunes son: leche descremada, aminoácidos (glutamato) y azúcares (sacarosa, trealosa) (Voget, s/f).

Determinar cuál de los métodos de conservación es el más conveniente o adecuado dependerá de los recursos del usuario, los objetivos que se tenga planteados, los equipos y materiales disponibles así como de la especie del hongo a conservar, entre otros aspectos (Pinzón *et al.*, 2009).

En el Cuadro 3 se presentan algunas de las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos de conservación de hongos, descritos anteriormente, así como de algunos otros mencionados por Voget (s/f).

Cuadro 3. Métodos de conservación de hongos y aspectos a considerar (Voget, s/f).

Método	Almacenamiento (años)	Ventajas	Desventajas
Agar	0.5-2	Simple, bajo costo, equipamiento requerido bajo	Secado del agar, baja estabilidad genética, riesgo contaminación
Aceite mineral	2-20	Bajo costo, equipamiento requerido bajo	Trabajo moderado, baja estabilidad genética
Congelamiento	4-5	Equipamiento requerido bajo, buena estabilidad genética	Requiere protectores, un congelador (-80°C). Células pueden ser sensibles al O ₂
N líquido	Infinito	Preparación rápida, buena estabilidad genética	Suministro regular de N líquido
Liofilización	15-20	Bajo riesgo de contaminación, buena a regular estabilidad genética	Alto costo de Equipamiento
Agua	1-5	Simple, bajo costo y equipamiento mínimo requerido	Estabilidad genética Regular
L-drying	3-10	Simple, bajo costo y equipamiento mínimo requerido	Estabilidad genética

III. METODOLOGIA

3.1. Sitio de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología de Semillas, del Posgrado de Fitopatología del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, en Montecillo, Estado de México.

3.2. Material biológico

Se utilizó semilla de 16 líneas élite de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.), procedente de Valles Altos de la mesa central de México, proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). En el Cuadro 4 se indican las localidades así como las condiciones agroclimáticas donde se cultivaron las líneas élite de cebada maltera.

Cuadro 4. Valores promedio de temperatura y humedad relativa* de las zonas donde se desarrollaron las líneas para la obtención de semilla de cebada maltera, registradas en 2014.

Localidad	Condición
Sta. Lucía Texcoco, Edo 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
Cyuaco, Puebla	Altitud: 2900 msnm Clima: templado-subhúmedo Temperatura: 12°C Precipitación: 550-600 mm

*Red de estaciones agroclimáticas del INIFAP.

3.3. Detección y aislamiento de especies de *Fusarium*

Para esta actividad se realizaron los siguientes procedimientos.

3.3.1. Prueba con papel secante y congelación

El establecimiento de la prueba con papel secante fue de acuerdo a lo recomendado por el International Seed Testing Association para gramíneas tomando las indicaciones para la prueba del Manual de Laboratorio “Ensayos para la semilla de maíz y trigo” del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) (Warham *et al.*, 1997).

Por localidad de cada una de las 16 líneas élite se separó un lote de 240 semillas; cada lote se dividió a su vez en tres sublotes (repeticiones) de 80 semillas cada uno (Cuadro 5). Posteriormente, cada sublote de semilla se desinfectó superficialmente con hipoclorito de sodio comercial al 5% por 1 minuto y se enjuagó con agua destilada. La semilla de cada lote se colocó en una caja transparente de 30x23x10 cm con tapa, sobre papel filtro y dos hojas de papel absorbente (secante) humedecidas lo suficiente con una solución al 0.05% de hipoclorito de sodio. La semilla se colocó con un espaciamiento uniforme, de acuerdo a un diseño de columnas (10) e hileras (ocho), con la ayuda de una placa de plástico perforada. Previo a la incubación, las cajas con la semilla se sellaron con PARAFILM M® y se asperjaron con hipoclorito al 12 % para evitar contaminación con ácaros. Enseguida, las cajas se incubaron primero a temperatura ambiente (22 °C) por 24 h, después a 5 °C por 48 h y finalmente a la temperatura ambiente (22 °C) durante 11 días, para favorecer el crecimiento y la esporulación de hongos.

Cuadro 5. Esquema de establecimiento de prueba de papel secante y congelación para la detección de la micoflora asociada a la semilla de líneas élite de cebada por localidad

Localidad	Número de líneas a evaluar	Número de repeticiones por línea	Número de semillas por repetición
Sta. Lucía	16	3	80
Nanacamilpa	16	3	80
Almoloya	16	3	80
Cuyuaco	16	3	80

Transcurrida la incubación, las semillas se examinaron a simple vista para registrar el número de semillas infectadas y a través de un microscopio compuesto (Olympus, modelo CHK) y un microscopio estereoscópico (Velab, modelo VE-S4), para identificar las colonias fúngicas a nivel de género. Los hongos se identificaron por sus características de color y textura de colonia, forma y longitud de conidióforos, forma, color y septación de conidios, y presencia de cuerpos de fructificación de acuerdo al Manual de laboratorio “Ensayos para la semilla de maíz y trigo” del CIMMYT (Warham *et al.*, 1997). En el Cuadro 6 se ilustran las características de colonia de géneros de hongos asociados a semilla y las enfermedades que causan en el cultivo.

Cuadro 6. Características de las colonias de los géneros de hongos asociados a la semilla y las enfermedades que causan en el cultivo (Warham *et al.*, 1997).

	Género	Enfermedad	Características de la colonia
	<i>Fusarium</i>	Roña, pudrición de la raíz y pudrición de la corona del trigo. De importancia en las regiones húmedas por las pérdidas en rendimiento.	Abundante micelio fino y suelto; inicialmente blanca, con masas de esporas pálido o café, que cuando jóvenes son blancuzcas, muy viscosas y de formas irregulares.
	<i>Alternaria</i>	Manchas foliares. La mayoría de las especies son saprofitas y otras patógenas débiles.	Gris oscuro, blanca, café o casi negra. Conidios café, producidos individualmente o en pequeños grupos.
	<i>Helminthosporium</i>	Tizón foliar. De poca importancia en producción pero relevante en maíz.	De crecimiento rápido, color gris. Poco micelio aéreo blanco y gran cantidad de conidióforos que se elevan de la superficie de la semilla o del papel secante.
	<i>Epicoccum</i>	Mancha roja del grano dulce. Saprófito común e invasor secundario. Efectos insignificantes en producción.	De crecimiento rápido, suele mostrar pigmentación amarilla, ámbar a anaranjado o rojo dentro del micelio. Micelio compacto blanco.
	<i>Ulocladium</i>	Ninguna. Sin efecto en producción.	Café negruzca oscura a negro, con forma de cojín. Conidióforos surgen como ramificaciones rectas de micelio, de color café dorado pálido a mediano, en su mayoría simples, lisos, septados.
 <small>Conidióforo y conidios (x1000)</small>	<i>Gonatobotrys</i>	Pudrición de la semilla. No hay pruebas de efecto en producción.	En semilla es blanca y por lo general se encuentra en la superficie de otras especies de hongos, por ejemplo, <i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> y <i>Fusarium</i> . El micelio se ve como una masa de cuerdas con 'ramilletes' de conidios.

3.3.2. Identificación taxonómica de especies de *Fusarium*

Únicamente aquellas colonias desarrolladas en la semilla que presentaron estructuras con las características morfológicas de *Fusarium* como son producción de macroconidios, microconidios y clamidosporas (Cuadro 7) se aislaron y purificaron por cultivo monospórico y punta de hifa. Para el aislamiento se tomó crecimiento micelial de la semilla con una aguja de disección y el micelio se colocó en el centro de un portaobjeto sobre una gota de agua estéril. Una vez verificada la identidad de *Fusarium*, de la suspensión de conidios y micelio obtenido se tomó una muestra la cual se depositó sobre una caja Petri con agua-agar y se dispersó con un asa de cristal estéril.

Después de incubar las cajas a temperatura ambiente (22 °C) por 24 h, con apoyo del microscopio estereoscópico (Velab, modelo VE-S4) se tomó un solo conidio germinado y se resembró en medio papa-dextrosa-agar (PDA); 24 horas después de incubación a temperatura ambiente (22 °C) se hicieron preparaciones del crecimiento fúngico para confirmar la identidad del cultivo al microscopio. Para el método punta de hifa se realizó en caso de observar solo crecimiento micelial a partir de la semilla, tomando una muestra, la cual se depositó sobre una caja Petri con agua-agar y 24 horas después de incubar a temperatura ambiente se observó mediante preparaciones a microscopio, y al presentar estructuras con las características morfológicas de *Fusarium* se resembró en medio papa-dextrosa-agar (PDA).

Por otra parte para inducir la esporulación del hongo se resembró nuevamente en medio de PDA. Previo a la siembra se colocó un trozo de hoja de clavel (PDA-CLA) en el centro de la caja. Tanto las cajas inoculadas con PDA o PDA-CLA se incubaron a temperatura ambiente (22 °C) durante ocho días.

La identificación de *Fusarium* a nivel de especie fue de acuerdo al Manual de Laboratorio del CIMMYT (Warham *et al.*, 1997) y al The *Fusarium* Laboratory Manual (Leslie y Summerell, 2006). Para esto se registraron las características de los macroconidios (tamaño, forma y rasgos de la célula apical y célula pie), de los microconidios (tamaño, forma), de las clamidosporas, si presentes, en preparaciones microscópicas semi-permanentes así como el color de la colonia en cultivo de PDA (Anexo 1).

Cuadro 7. Características morfológicas de especies de *Fusarium* de acuerdo a Warham et al. (1997).

Especie	Macronidios			Microconidios		Clamidosporas	Color colonia en PDA	
	Tamaño (µm)	Forma	Célula apical	Célula pie	Tamaño			Forma
<i>F. avenaceum</i>	8-50 x 3-5 1-3 septas. 40-80 x 3-4 4-7 septas.	Largo, estrecho, uniforme.	Curva puntiaguda.	Desarrollada.	Variable.	Ausentes.	Naranja.	
<i>F. culmorum</i>	26-40 x 3-5 1-3 septas.	Cortos, gruesos, hialinos, un lado recto.	Curva puntiaguda.	Distintiva.	Ausentes.	Ovalada o esférica, sola, en cadena o agrupada.	Rojo-café.	
<i>F. dimerum</i>	10-22 x 3-4 1-2 septas. 6-11 x 2-3 0-2 septas.	Media luna.	Forma de gancho.	Ligeramente mellada.	Ausentes.	En cadena, aisladas, con pared lisa.	Naranja.	
<i>F. equiseti</i>	22-60 x 3-6 4-7 septas.	Hialino, falciforme, curvo (dorso-ventral).	Alargada, curvada hacia adentro.	Distintiva.	Ausentes.	Solitarias en intervalos a lo largo de la hifa o en cadenas o nudos.	Naranja-café.	
<i>F. graminearum</i>	25-50 x 3-4 3-7 septas.	Hialino, recto o ligeramente curvo.	Curva, muy puntiaguda.	Desarrollada.	Ausentes.	Aisladas o en cadena o en grupo.	Rosa-salmón.	
<i>F. oxysporum</i>	27-66 x 3-4 3-7 septas.	Hialino, pared delgada.	Forma de gancho.	Desarrollada.	8-12 x 7-10 10-14 x 6-7	Esférica, pared lisa o rugosa, individual o en pares.	Ovaladas o arriñonadas.	Violeta.
<i>F. poae</i>	20-40 x 3-5 3 septas.	Raro, hialino, estrechado en los extremos.	Estrecha.	Desarrollada.	7-10 x 8-12	Bola y viscosa, hialino esférico. Como pera.	Poco frecuentes en grupos o cadenas.	Café-rojo.
<i>F. sambucinum</i>	35-55 x 4-6 3-5 septas.	Hialino, curvo.	Puntiaguda.	Desarrollada.	Ausentes.	Esféricas individuales, a lo largo de la hifa o terminales.	Café-rojo	
<i>F. solani</i>		Infrecuente, hialino, delicado y pared delgada.	Papilada.	Desarrollada.		Hialino, oval, como garrote aplanado.	Ausentes.	Café.

3.4. Generación de colección de cepas *Fusarium graminearum*

Para el establecimiento de la colección de *F. graminearum*, se establecieron cultivos de 25 cepas en medio de PDA sobre tubo inclinado con aceite mineral (Meyer®). Estas cepas se aislaron de semilla de las líneas élite de cebada maltera y se purificaron por punta de hifa.

De cultivos con crecimiento en caja Petri con PDA, se tomó un fragmento de medio con crecimiento del hongo. El fragmento se depositó en el centro del medio del tubo inclinado y se dejó incubar a temperatura ambiente del laboratorio por 10 días. A cada tubo con crecimiento del hongo se le adicionó aceite mineral previamente esterilizado (Anexo 2), cuidando que el nivel de éste quedara justo al margen del crecimiento de la colonia (Mier *et al.*, 2002).

A cada una de las 25 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 élite y la repetición de la prueba de papel secante de donde fue aislada dicha cepa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Micoflora asociada a la semilla de las líneas élite de cebada maltera

En este estudio se detectaron e identificaron siete géneros de hongos infectando la semilla de las líneas élite de cebada maltera en Valles Altos. Los géneros fueron *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Gonatobotrys*, *Helminthosporium*, *Nigrospora* y *Ulocladium*. Cabe señalar que en una muestra de semilla se encontró un hongo (cepa SL66R1), la cual presentó características morfológicas de *Blastomyces*. Este género se ha reportado como el agente causal de blastomycosis, enfermedad de importancia tanto en el hombre como en los animales (Figura 2) (Barnett y Hunter, 1972).

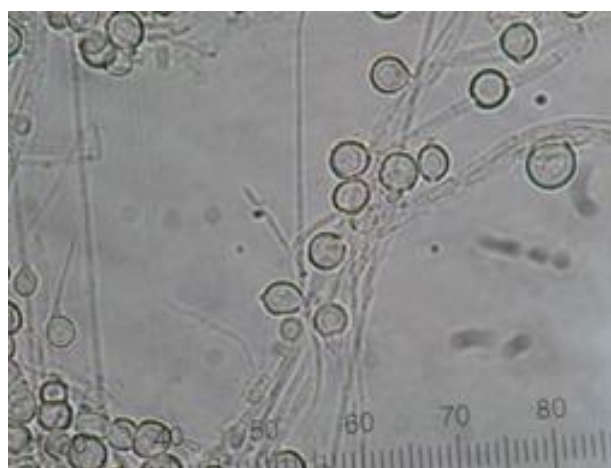


Figura 2. Células de paredes gruesas con gemación similares a las producidas por *Blastomyces*.

En general entre localidades *Alternaria* fue el género que se encontró con mayor incidencia (67.5 % en promedio); y el de *Gonatobotrys* (0.8 % en promedio) entre los de menor incidencia. Por localidad, la semilla de Santa Lucía registró la mayor incidencia de hongos (19.1 %) y las de Cuyuaco la de menor incidencia (14.8 %). Específicamente, *Fusarium* se encontró entre los géneros de hongos con menor porcentaje de incidencia (6.5 %) en la semilla de cebada cultivada en Valles Altos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje promedio de incidencia de géneros de hongos detectados en semillas de las 16 líneas élite de cebada maltera por localidad en Valles Altos.

Género	% por localidad				Promedio
	Almoleya	Nanacamilpa	Cuyuaco	Santa Lucía	
<i>Alternaria</i>	73.5	53.8	69.1	73.5	67.5
<i>Nigrospora</i>	22.2	12.8	9.6	22.3	16.7
<i>Ulocladium</i>	18.0	9.2	8.9	18.8	13.7
<i>Helminthosporium</i>	1.2	9.7	1.4	7.4	4.9
<i>Epicoccum</i>	2.3	8.8	5.3	7.3	5.9
<i>Fusarium</i>	4.3	10.4	8.8	2.5	6.5
<i>Gonatobotrys</i>	0.13	1.0	0.15	2.0	0.8
Promedio	17.4	15.1	14.8	19.1	

Similares resultados en cuanto a los géneros de hongos detectados en semilla los obtuvieron Gutiérrez (2000), Ramírez (2003) y Romero (2004), quienes registraron a *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum* y *Helminthosporium* como los géneros de hongos más abundantes en semillas de cebada. Es importante resaltar que *Alternaria*, *Aspergillus* y *Fusarium* fueron reportados por Carrillo (2003) y Rousseau (2004), como géneros que agrupan especies potencialmente productoras de micotoxinas en el grano de cebada. Por otra parte Rabie y Lubben (1997) aislaron más de treinta géneros de hongos del grano de cebada, mencionando a *Alternaria*, *Aspergillus*, *Epicoccum* y *Fusarium* como los más importantes en función al número de aislamientos.

El tener una detección completa de la micoflora asociada a la semilla de cebada maltera es difícil, considerando que una semilla puede presentar más de un género o especie de hongo; sin embargo, si la prueba se establece con las condiciones de luz y oscuridad recomendadas y la detección se lleva a cabo en los tiempos especificados, se logrará identificar a la mayoría de los hongos presentes en la semilla.

4.2. Especies de *Fusarium* aisladas e identificadas taxonómicamente

En este estudio se identificaron taxonómicamente seis especies de *Fusarium* y una especie de *Fusarium* sin identificar en las semillas de las líneas élite de cebada maltera, cultivadas en Valles Altos. Estas especies se identificaron taxonómicamente como *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. dimerum*, *F. sambucinum* y *F. oxysporum*; la séptima especie, no se logró identificar por carecer de características taxonómicas distintivas.

El número de cepas aisladas por especies de *Fusarium* fue el siguiente: *F. graminearum* 25 cepas; *F. equiseti* 26 cepas; *F. avenaceum* 15 cepas; *F. dimerum* 2 cepas; *F. sambucinum* 2 cepas; *F. oxysporum* 1 cepa; y *Fusarium* sp, 7 cepas. En total se aislaron 78 cepas de especies de *Fusarium* de semilla de cebada maltera (Cuadro 9). Los resultados indican que *F. equiseti*, *F. graminearum* y *F. avenaceum* son las principales especies de *Fusarium* asociadas a las semillas de las líneas élite de cebada maltera en la región.

Aunque no se encontró gran diferencia en el número de especies de *Fusarium* por localidad, si se encontraron diferencias en el número de cepas por especie de *Fusarium* entre localidades. La semilla proveniente de Santa Lucía registró el mayor número de cepas de *F. graminearum*, número que representó el 47.4 % del total de las cepas de *Fusarium*. Mientras que la semilla de Nanacamilpa, el de *F. avenaceum* y *F. graminearum*; en Almoloya, el de *F. avenaceum*; y en Cuyuaco el de *F. equiseti*.

Cuadro 9. Número de cepas de especies de *Fusarium* aisladas por localidad.

Especie	Almoloja	Nanacamilpa	Cuyuaco	Santa Lucía	Total
<i>F. avenaceum</i>	6	7	1	1	15
<i>F. equiseti</i>	5	4	10	7	26
<i>F. graminearum</i>	3	7	6	9	25
<i>F. oxysporum</i>				1	1
<i>F. dimerum</i>	1			1	2
<i>F. sambucinum</i>		1	1		2
<i>Fusarium</i> sp.	3	2	2		7
Total	18	21	20	19	78

En el Cuadro 10 se reporta en porcentaje el número de cepas de *Fusarium* registrado por localidad.

Cuadro 10. Porcentaje del número de cepas por especie de *Fusarium*.

Especie	Almoloja	Nanacamilpa	Cuyuaco	Santa Lucía
<i>F. avenaceum</i>	33.3	33.3	5.0	5.3
<i>F. equiseti</i>	27.8	19.0	50.0	36.8
<i>F. graminearum</i>	16.7	33.3	30.0	47.4
<i>F. oxysporum</i>				5.3
<i>F. dimerum</i>	5.5			5.3
<i>F. sambucinum</i>		4.8	5.0	
<i>Fusarium</i> sp.	16.7	9.5	10.0	

En el Cuadro 11 se indica la incidencia por línea y localidad de *F. graminearum*. Con excepción de las líneas 2, 7, 12, 14 y 15, todas las líneas élite de cebada maltera registraron baja infección de semilla por *F. graminearum*. La línea 3 registró cuatro semillas con crecimiento de *F. graminearum* y la semilla proveniente de Santa Lucía la que presentó el mayor número de semillas infectadas (9 semillas) por esta especie.

Cuadro 11. Incidencia de *F. graminearum* en semilla de líneas élite de cebada maltera, colectada en Valles Altos, estimada por la prueba de papel secante y congelación.

Línea élite	Almoloya	Nanacamilpa	Cuyuaco	Santa Lucía	Total
0		1	1		2
1			1		1
2					
3				4	4
4				1	1
5	1	1		1	3
6	1		1	1	3
7					
8		1	1	1	3
9	1	1	1		3
10				1	1
11		1			1
12					
13			1		1
14					
15					
16		2			2
Total	3	7	6	9	25

Con estos datos se detectó a *F. graminearum* en tan solo 25 semillas de cebada maltera de un total de 15,360 semillas analizadas en este trabajo, es decir, la incidencia registrada de *F. graminearum* en la semilla de las líneas élite de cebada maltera en Valles Altos fue baja.

En general los resultados obtenidos en este estudio indican baja incidencia de *Fusarium* y por ende de *F. graminearum* en las líneas élite de cebada maltera en Valles Altos; esto en comparación con el número de semillas evaluadas por línea (240 semillas) y por localidad (3,840 semillas).

La baja incidencia de *F. graminearum* en la semilla de las líneas élite se puede deber a diferentes factores que intervienen en la infección y desarrollo del hongo. Uno de estos factores puede ser la resistencia de las líneas de cebada a *F. graminearum*; este factor es importante a considerar ya que las líneas élite de cebada maltera forman parte de un programa nacional de mejoramiento genético de cebada a enfermedades fungosas del INIFAP-Valle de México.

Otros factores a considerar en la baja incidencia de *F. graminearum* en la semilla son las condiciones climáticas como la temperatura y la humedad las cuales son relevantes para el desarrollo de la fusariosis en los cereales. Esta enfermedad que ocurre en todas las regiones cerealeras del mundo, se presenta con mayor frecuencia en áreas con inviernos suaves y veranos húmedos y calientes durante el estado de madurez del cultivo (Sutton (1982) y Kohli (1987) citados por Ireta y Gilchrist (1994)).

Ireta y Gilchrist (1994) indicaron que temperaturas entre 16 y 36 °C, con óptimo de 32 °C, son las requeridas para la producción de inóculo y dispersión de *F. graminearum*. Sin embargo, Conner y Kuzyk (1990) (citados por Ireta y Gilchrist, 1994) mencionaron que la incidencia de la fusariosis de la espiga depende, en gran parte, del estado de desarrollo de la planta cuando ocurre la infección. Por otra parte, Luzzardi y Ppierbom (1987) (citados por Barrera, 1994), mencionaron que puede ocurrir escape a la enfermedad, aun en variedades muy susceptibles, cuando se presenta baja precipitación, especialmente durante el periodo de floración, dando por resultado baja infección de semilla.

Las localidades de Valles Altos, de donde se obtuvo la semilla para este estudio, tienen antecedentes de incidencia de fusariosis de la espiga. Las condiciones de temperatura para dichas localidades se reportan con promedio de 13 °C; es decir, 2 °C por debajo del valor mínimo (16 °C) del intervalo reportado por Ireta y Gilchrist (1994). Lo anterior puede, en general, explicar la baja incidencia de *F. graminearum* en la semilla de las líneas élite de cebada maltera; y en particular, ilustrar por que la mayor incidencia del hongo se registró en la semilla proveniente de Santa Lucía, localidad que presenta una temperatura promedio de 15.9 °C.

Ireta y Gilchrist (1994) también indicaron que durante el trillado del trigo se elimina una cantidad importante de semilla infectada por *F. graminearum*, por lo que este factor también puede ser considerado para explicar la baja incidencia de este hongo en la semilla de las líneas élite de cebada maltera.

Independientemente de si las condiciones ambientales fueron o no favorables para la fusariosis en este estudio se encontró baja incidencia de *F. graminearum*. Sin embargo, es importante implementar estrategias de control de la fusariosis de la espiga durante la producción y manejo del cultivo de cebada maltera. Esto por sus implicaciones en la producción y por los efectos de las toxinas producidas por *F. graminearum* en la salud humana y animal por el consumo de grano contaminado. Entre estas estrategias se encuentran los métodos de control genético, cultural y químico. Fernández (1990) (citado por Barrera, 1994), mencionó la importancia de eliminar residuos de cultivo o de plantas hospederas donde puede sobrevivir el hongo. En Canadá, *F. graminearum* es muy frecuente en áreas en donde el maíz se cultiva en rotación con trigo. Considerando que *F. graminearum* también ataca maíz, para que la rotación de cultivos sea eficiente en el control es conveniente rotar con cultivos que no sean hospederos de este patógeno.

Si bien es cierto que los fungicidas pueden reducir las pérdidas de rendimiento por el control de las enfermedades del cultivo, muchas veces estos interactúan con el germoplasma. Si las condiciones ambientales prevalecientes durante el proceso de llenado son favorables, los fungicidas pueden estimular la concentración de toxinas en el grano.

La búsqueda de resistencia genética a la fusariosis en cebada como en otros cultivos, es laboriosa, complicada y cara; sin embargo, es la más viable para el control de la fusariosis por *F. graminearum*, de acuerdo a las investigaciones reportadas con anterioridad (Gilchrist, 2000).

A continuación se da una descripción general de las enfermedades ocasionadas por las especies de *Fusarium* detectadas en este estudio basadas en el Manual de Laboratorio “Ensayos para la semilla de maíz y trigo” del CIMMYT (Warham *et al.*, 1997) así como de los resultados obtenidos en este trabajo sobre las características de la colonia de las cepas desarrolladas en la semilla de las líneas élite de cebada maltera.

a) *Fusarium graminearum* Schwabe: Es el agente causal de la roña, pudrición de la raíz y pudrición de la corona del trigo. Esta enfermedad ocasiona pérdidas importantes de rendimiento en las regiones húmedas. En semilla de cebada las colonias de este hongo se encontraron con abundante micelio fino y disperso, con tonalidad roja, con macroconidios ligeramente curvos o rectos y clamidosporas en cadena (Figura 3). Sin embargo, no se registró la presencia de peritecios, estructuras características de la fase sexual del hongo (*Gibberella zeae* (Schw.) Petch).

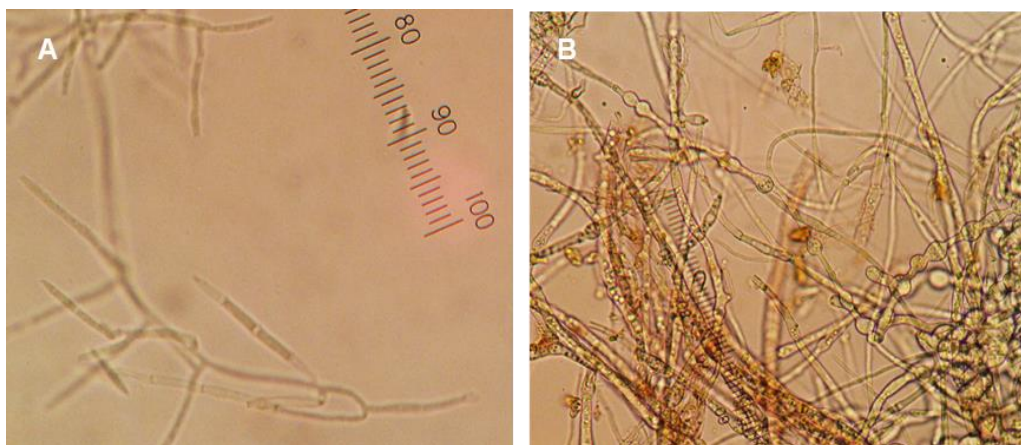


Figura 3. Conidio (A) y Clamidosporas (B) en cadena de *F. graminearum* cepa AL9R32.

b) *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc: Es el agente causal del tizón de la plántula y pudrición de la raíz y tallo. Se le considera como un patógeno de menor importancia en cereales. En semilla la colonia se encontró inicialmente blanca con un tinte durazno y con la edad cambió a amarillo parduzco claro. Los macroconidios se encontraron de distintos tamaños, muy alargados y delgados, con curvatura dorsiventral, con célula apical en forma de látigo y célula pie muy pronunciada (Figura 4 A, B). Las clamidosporas se encontraron solas, y en cadena, en hifas aéreas (Figura 4 C, D). Sin embargo, no se registró la presencia de peritecios, estructuras características de la fase sexual del hongo (*Gibberella intricans* Wollenw).

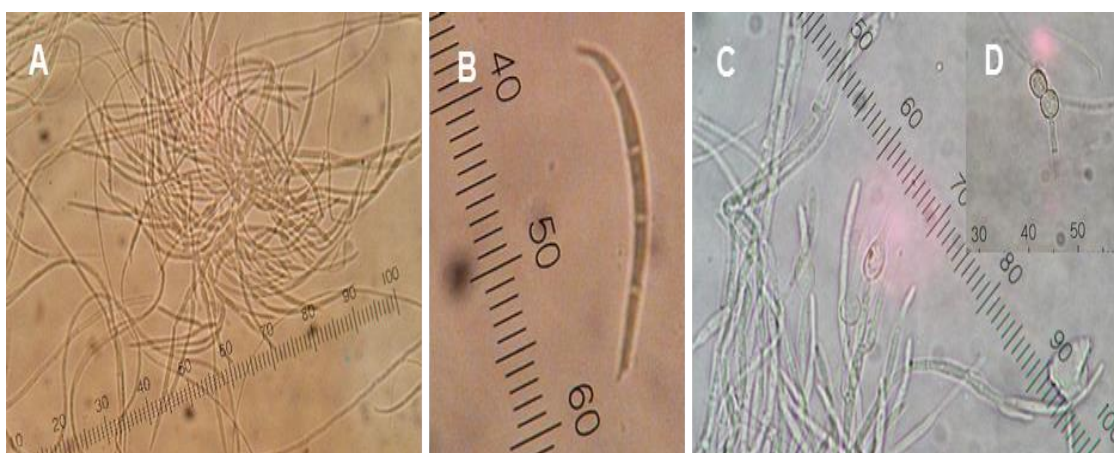


Figura 4. Esporodocio(A) y Conidio (B) de cepa NA8R00 y clamidosporas solas (C) y en cadena (D) de cepas NACR01 (C) y SL5R1 (D) de *F. equiseti*

c) *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc: Es el agente causal del tizón o roña de la espiga, pudrición de la corona o pudrición del pie del trigo. Esta enfermedad que es común en cereales puede causar serias pérdidas en preemergencia o en plántula en climas frescos. La colonia en semilla se encontró blanca, con micelio muy fino, como telaraña con penachos y con un tinte de color durazno. Los macroconidios se observaron, en general, largos, estrechos con 3 a 4 septas (Figura 5 A), algunos también se encontraron con 5 septas. La cepa AL9R31 registró la presencia de microconidios/mesoconidios con una septa (Figura 5 B).

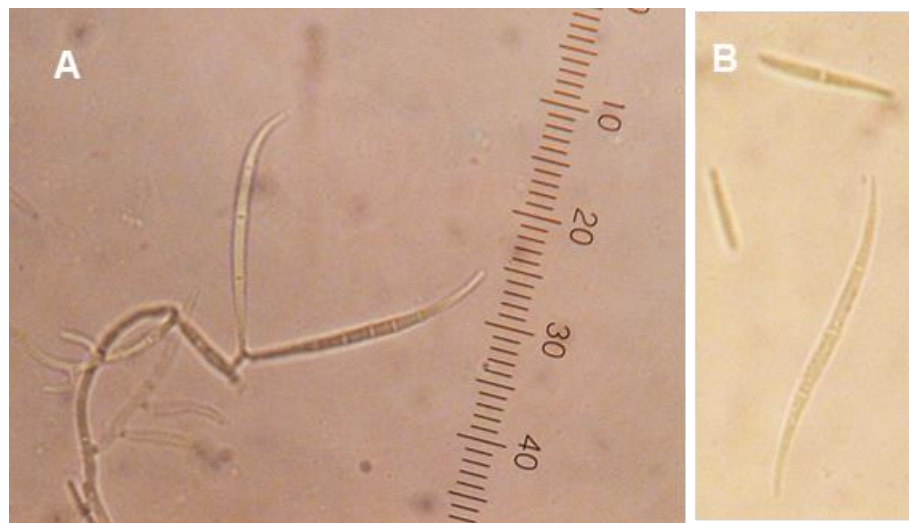


Figura 5. Conidios (A) y microconidios/mesoconidios (B) de *F. avenaceum* cepa AL9R31.

d) *Fusarium dimerum* Penz.: Agente causal de la pudrición de la raíz y de la plántula, de importancia relativamente secundaria en plantas. Sin embargo, esta especie de *Fusarium* se considera de importancia desde el punto de vista de salud humana (Warham *et al.*, 1997). En semilla la colonia del hongo se encontró con poco micelio y sólo en forma de unos cuantos filamentos de hifas. En general, los conidios se encontraron en forma de media luna, y sin septas (Figura 6). Cabe señalar que en el Manual de Laboratorio “Ensayos para la semilla de maíz y trigo” del CIMMYT (Warham *et al.*, 1997) se nombra a esta especie de *Fusarium* como *Microdochium dimerum* (Penz.) v. Arx; sin embargo, Schroers *et al.* (2009) (citados por Hans y O’donnell, 2009) indicaron que aunque *F. dimerum* fue reclasificado como *M. dimerum*, la transferencia no fue ampliamente aceptada.



Figura 6. Conidios de *F. dimerum* cepa SL5R00.

e) *Fusarium sambucinum* Fuckel: Agente causal que ocasiona la pudrición de raíz y de plántula de trigo, de importancia relativamente secundaria. La colonia en semilla se encontró de color durazno, anaranjado o amarillo parduzco claro; en algunos aislamientos, de color vino o café rojizo. Micelio aéreo con grupos algodonosos blancos o penachos teñidos de rosado. Los macroconidios se encontraron con uno de sus extremos con la forma característica de "pico de pájaro" de esta especie (Figura 7). Sin embargo, no se registró la presencia de peritecios, estructuras características de la fase sexual del hongo (*Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc.).

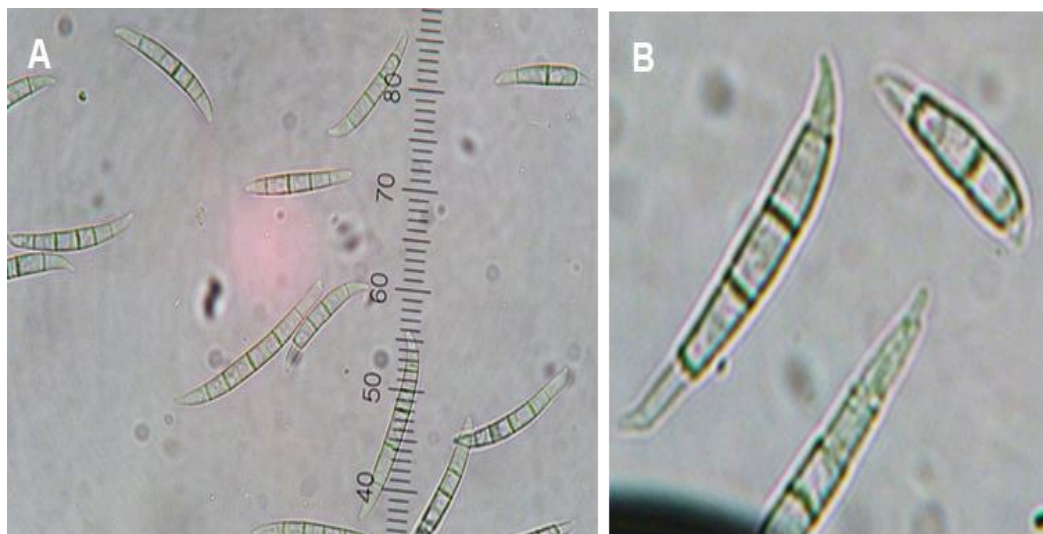


Figura 7. Macroconidios de *F. sambucinum* cepa NA5R2.

f) *Fusarium oxysporum* Schlecht.: Esta especie de *Fusarium* es de poca importancia, se presenta principalmente como saprofito del suelo. La colonia en semilla se encontró con micelio aéreo, enmarañado de color salmón, púrpura y violeta. Se registró la presencia de macro y microconidios, uni y bicelulares (Figura 8 A) así como de clamidosporas en cadenas cortas y en grupo (Figura 8 B).

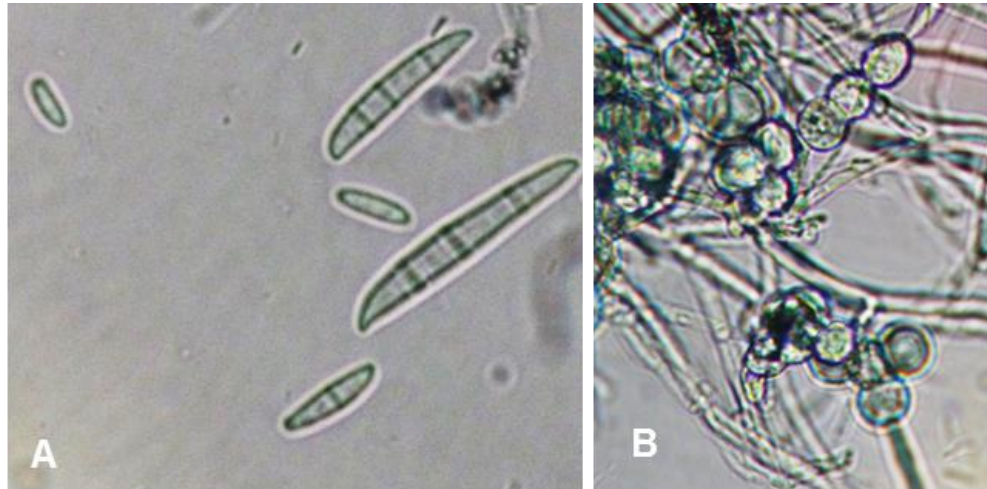


Figura 8. Macro y microconidios(A) y clamidosporas (B) de *F. oxysporum* cepa SL16R00.

g) *Fusarium* sp. Esta especie se encontró en semilla con poco desarrollo de micelio, con microconidios con uno y dos septos (Figura 9 A) y clamidosporas, en grupo, con pared gruesa y lisa (Figura 9 B). Sin embargo, no fue posible identificar la especie por falta de mayor número de estructuras características.

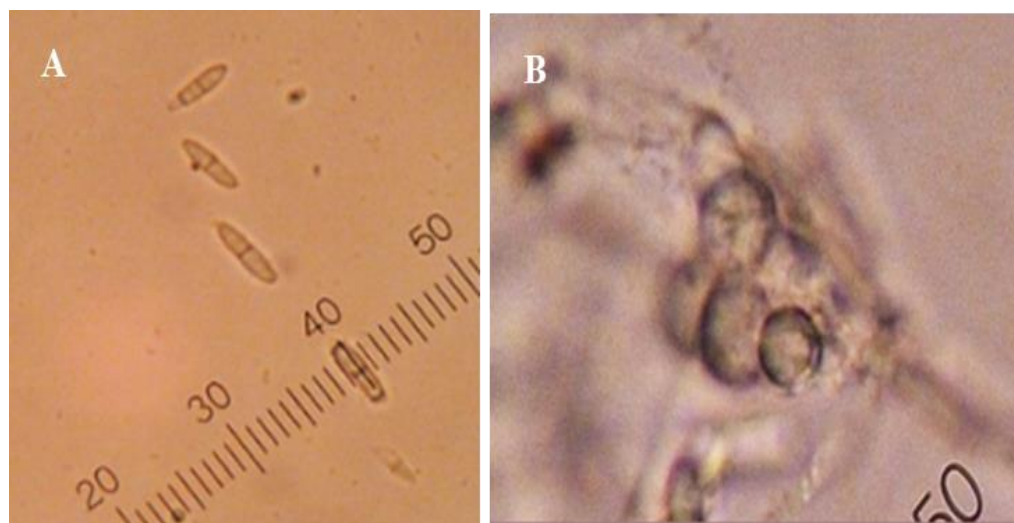


Figura 9. Conidios (A) y Clamidosporas (B) de *Fusarium* sp., cepa AL12R10.

Rabie y Lubben (1997) aisló 10 especies del género *Fusarium* en grano de cebada de las cuales en el presente estudio sólo coincidieron cuatro: *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *F. sambucinum*. Asimismo, Gutiérrez (2000) aisló de cebada nueve especies de *Fusarium*, cuatro de las cuales fueron detectadas en este trabajo: *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. dimerum* y *F. equiseti*.

En la presente investigación se detectaron seis especies de *Fusarium* y una especie de *Fusarium* sin identificar, es decir, se detectó diversidad en las especies de este hongo. El número de especies detectadas es similar al reportado por Rabie y Lubben (1997) y Gutiérrez (2000), por lo que se rechaza la hipótesis planteada en este estudio de que son pocas las especies de *Fusarium* que se encuentran asociadas a la semilla de líneas élite de cebada maltera, cultivadas en Valles Altos.

4.3 Colección de cepas de *F. graminearum*

En total, se generó una colección de 25 cepas de *F. graminearum* en tubo inclinado con medio de PDA con aceite mineral. Estas cepas se aislaron de semillas de 16 líneas élite de cebada maltera cultivadas en Valles Altos. El número de cepas aisladas por localidad fue de: Almoloya 3; Nanacamilpa 7; Cuyuaco 6 y Santa Lucía 9 cepas (Cuadro 12). Estas cepas se conservaron a temperatura ambiente (22 °C) de laboratorio.

Cuadro 12. Clave de cepas de *F. graminearum* aisladas de semilla de líneas élite de cebada maltera, colectadas en Valles Altos, durante el ciclo primavera-verano 2014.

Almoloya, Hidalgo (AL)	Nanacamilpa, Tlaxcala (NA)	Cuyuaco, Puebla (CU)	Santa Lucía, Estado de México (SL)
AL5R10	NA0R20	CU0R10	SL3R21
AL6R32	NA5R20	CU1R30	SL10R10
AL9R32	NA8R20	CU6R30	SL3R22
	NA9R10	CU8R36E	SL3R23
	NA11R30	CU9R11E	SL3R24
	NA16R10	CU13R10	SL4R10
	NA16R20		SL5R30
			SL6R10
			SL8R10

Durante la elección del método de conservación de las 25 cepas de *F. graminearum* se consideraron algunos de los aspectos indicados por Dilia (2006), entre los que destacaron los recursos económicos con los que se contó, el equipo necesario para llevarlo a cabo, la resistencia de las cepas al tratamiento de conservación, si *Fusarium* iba a mantener su viabilidad, pureza, morfología, entre otros así como las condiciones del proceso y el tiempo en que puede preservarse.

Aunque el método de crioconservación y el de liofilización son muy utilizados para la conservación de microorganismos (Pinzón *et al.*, 2009), en este trabajo se encontraron limitaciones para poder implementarlos como fueron la disposición de equipos y materiales, adicional al económico por tratarse de una pequeña colección.

Por lo anteriormente indicado fue más conveniente implementar la conservación en aceite mineral para la pequeña colección de cepas de *F. graminearum*, a un bajo costo sin requerimiento de un equipo sofisticado y asegurando la preservación del material biológico entre 2 y 20 años (Voget, s/f). Sin embargo, se sugiere resembrar dichas cepas después de dos años de almacenamiento para evitar problemas relacionados con la estabilidad genética y viabilidad, ya que como se ha reportado algunos hongos continúan creciendo bajo aceite, además de reducir la posibilidad de infestación por ácaros (Jong y Birmingham (2001) citados por Dilia (2006)).

La colección de *Fusarium graminearum* generada en este estudio es importante ya que será integrada a un proyecto desarrollado entre el INIFAP y el Colegio de Postgraduados para estudios de selección de especies de éste hongo con alta capacidad de producir la toxina DON.

Aquellas cepas que registren la mayor capacidad de producción de DON se utilizarán para establecer pruebas de patogenicidad para identificar líneas de cebada maltera, generadas por un programa del INIFAP, con resistencia a la roña de la espiga.

V. CONCLUSIONES

1. En este estudio se detectaron e identificaron siete géneros de hongos: *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Gonatobotrys*, *Helmintosporium*, *Nigrospora* y *Ulocladium*, asociados a la semilla de las líneas élite de cebada maltera, cultivadas en Valles Altos, región que abarca los estados de Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y México.
2. De los géneros de hongos detectados, *Alternaria* registró la mayor incidencia (67.5 %) y *Gonatobotrys* la más baja (0.8 %), en la semilla proveniente de Valles Altos.
3. *Fusarium* registró una incidencia de 6.5 % en la semilla de las líneas élite de cebada maltera, cultivadas en Valles Altos. De este porcentaje, la semilla proveniente de Tlaxcala presentó la mayor incidencia de *Fusarium* (10.4 %) y la del Estado de México la menor (2.5 %).
4. De siete especies de *Fusarium* aisladas, seis se identificaron taxonómicamente como *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. dimerum*, *F. sambucinum* y *F. oxysporum*. La séptima especie, no se logró identificar por carecer de características taxonómicas distintivas.
5. *Fusarium graminearum*, *F. equiseti* y *F. avenaceum* fueron las principales especies de *Fusarium* asociadas a la semilla de las líneas élite de cebada en la región.
6. Se generó una colección de material biológico de 25 cepas de *Fusarium graminearum* de semilla de líneas élite de cebada maltera proveniente de Valles Altos para estudios futuros. De estas cepas, nueve se aislaron de semilla proveniente del Estado de México; seis de Puebla; siete de Tlaxcala y tres de Hidalgo.

VI. LITERATURA CITADA

1. Agro Inversiones S.A. s/f. Manual de la cebada cervecera. En: <https://es.scribd.com/doc/14229542/Manual-Cebada>. Fecha de consulta el 22 de mayo de 2015.
2. Aguilar, A.J., Schwentesius, R.R. 2004. La producción de cebada maltera en México. (CIESTAM). Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 14-23.
3. Barnett, H.L., Hunter, B.B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. United States of America. pp. 241.
4. Barrera, G.E. 1994. Influencia de las enfermedades foliares en la germinación y vigor de trigo (*Triticum aestivum*). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, México. pp. 8-56.
5. Bello, M. s/f. Aspectos generales del hongo de *Fusarium* y resistencia genética a pudrición de raíz por *Fusarium* en frijol. En: <http://www.pnva.org/files/files/EnfermedadesdeFusariumenfr.pdf>. Fecha de consulta el 15 de marzo de 2016.
6. Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Salta Argentina. pp. 12-68.
7. Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). 2016. Cebada Producción Mundial 2016/2017. En: <https://www.produccionmundialcebada.com>. Fecha de consulta el 22 de julio de 2016.
8. Dilia, I.A. 2006. Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la pontificia. Tesis de Maestría, Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia. pp. 4-10.
9. Espinoza, M. 2003. Plan estratégico de investigación y transferencia de tecnologías. Cadena agroalimentaria de cebada. pp. 4-13.
10. French, R.E., Hebert, T.T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica, Editorial IICA. pp. 289.
11. FND-SHCP, 2014. Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero, Secretaría de Hacienda y Crédito Público. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica. Análisis Sensorial y Tecnológicas de la Información. Panorama de la Cebada. Ficha Cebada. En www.financierarural.gob.mx > Panoramas. Fecha de consulta el 15 de diciembre de 2016.
12. Gilchrist, 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.

13. González, M.P. 2006. Enfermedades del tomate, Marchitamiento vascular del tomate, *Fusarium Oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Facultad de Agronomía. Unidad de Fitopatología. Cátedra de Fitopatología. Montevideo, Uruguay. En: http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html. Fecha de consulta el 8 de agosto de 2016.
14. Gutiérrez, G.R. 2000. Patógenos transmitidos vía semilla en el cultivo de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en los Valles Altos de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. pp. 99.
15. Hans, J., O'donnell, K. 2009 Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. Agricultural Institute of Slovenia. Ljubljana, Slovenia. Mycologia, 101(1): 44-70.
16. Ibarguren, L. 2014. CEBADA (*Hordeum vulgare*), Cátedra de Agricultura Especial. En: <http://studylib.es/doc/5083074/cebada--hordeum-vulgare>. Fecha de consulta el 14 de diciembre de 2016.
17. INIFAP. 2010. Diagnóstico de *Fusarium* en el cultivo de cebada maltera en el estado de Hidalgo. Sistema-Producto Cebada. En: www.sifupro.org.mx > agendas > Diagnóstico de *Fusarium* en el cultivo de cebada maltera en el estado de Hidalgo. Fecha de consulta el 24 de Octubre de 2016. pp. 1-3.
18. Ireta, M.J., Gilchrist, S.L. 1994. Roña o Tizón de la espiga del Trigo. *Fusarium graminearum* Schwabe. Wheat Special Report. 21a. CIMMYT, México, D.F. pp. 1-19.
19. Islas, G.J., Zamora, D.M., Ramírez, F.M. 2003. Costos de producción y rentabilidad de cebada en los valles Altos de la Meseta Central de México. Agricultura Técnica en México. 29(1): 3-10.
20. Kohli, M.M. 1989. Taller sobre la Fusariosis de la espiga en América del Sur. México, D.F. CYMMYT. pp. 85-87.
21. Leslie, F.J., Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual, en Kansas State University, Manhattan. pp. 79-274.
22. López, P.P., Guzmán, O.F., Santos, L.E., Prieto, G.F. 2005. Evaluación de La Calidad Física de Diferentes Variedades de Cebada (*Hordeum sativum* jess) Cultivadas en los Estados de Hidalgo y Tlaxcala, México. Artículo. Revista Chilena de Nutrición. 32(3).
23. Mier, T., Toriello, C., Ulloa, M. 2002. Hongos Microscópicos saprobios y parásitos; Métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. México, D.F. pp. 54-57.
24. Muñoz, M.M. 2008. Determinación de hongos en grano de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.) y presencia natural de micotoxinas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 4-31.

25. Pérez, P.J. 2010. La Cebada. Universidad Privada “San Juan Bautista”. En: http://lacebada10.blogspot.mx/2010/06/inportancia_economica-y-distribucion.html. Fecha de consulta el 25 de mayo de 2015.
26. Pinzón, G.Y.A., Bustamante, S.L., Buitrago, G. 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. 6(2): 8-18.
27. Rabie, C.J., Lubben, A. 1997. Enumeration of fungi in Bailey. International Journal of Food Microbiology. 35: 117-127.
28. Ramírez, M.C. 2003. La fusariosis de la espiga de la cebada: especies, distribución, daos, toxinas y perspectivas de manejo en los Valles Altos de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Parasitología Agrícola. UACH. Texcoco, Estado de México. pp. 138.
29. Romero, B.S. 2004. Hongos transmitidos por semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en la región de Tolcayuca, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo, Estado de México. pp. 73.
30. Rousseau, J. 2004. Ocratoxina A en los vinos: Estado de los conocimientos. Instituto Cooperativo del Vino. Vinidea. Net Wine Internet Technical Journal. pp. 5
31. SAGARPA. s/f. El Sistema Producto Cebada en Michoacán. Bases y Estrategias para Mejorar su Competitividad. Fondo de Fomento Agropecuario del Estado de Michoacán. Comité Técnico Estatal de Evaluación. Proyecto Diagnóstico Sensorial. Michoacán, en http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/michoacan/Lists/Evaluaciones%20Externas1/Attachments/37/comp_cebada.pdf Fecha de consulta el 20 de Agosto de 2016.
32. SIAP-SAGARPA. 2014. Producción Agrícola por Cultivo. En: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Fecha de consulta el 20 de Agosto de 2016.
33. Voget, C. s/f. Conservación de cultivos para la Biotecnología y la Industria. En: <https://google.com.mx/amp/slideplayer.es/amp/1024529/?clientms-android-americanovil-mx>. Fecha de consulta el 16 de Marzo de 2016.
34. Warham, E.J., Butler, L.D., Sutoon, R.C. 1997. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo: Manual de laboratorio. CIMMYT. Texcoco, México. pp. 1-70.
35. 2000Agro. 2007. La cebada y sus alternativas de uso. Revista Industrial del Campo. México. En: www.2000agro.com.mx. Fecha de consulta el 20 de Enero de 2016.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de preparaciones semi-permanentes (French y Hebert, 1980).

Materiales:

- Cepa de hongo
- Sanitas
- Glicerol (50 %)
- Barniz transparente
- Agujas de disección
- Marcador permanente
- Porta y cubreobjetos
- Mechero de alcohol
- Microscopio compuesto

Procedimiento:

1. Se pasa el portaobjeto por la flama del mechero para secar la humedad superficial.
2. Se coloca una gota de glicerol y se pasa por la flama para disolver el glicerol.
3. Se coloca una pequeña porción de micelio y se esparce con las agujas.
4. Se le coloca el cubreobjetos y sobre este un cuadro de sanita para hacer un poco de presión y absorber el exceso de glicerol.
5. Nuevamente se pasa el portaobjetos por la flama para retirar las burbujas de aire; se retira, y se vuelve a presionar con sanita para quitar el exceso de glicerol.
6. Se observa al microscopio para confirmar la preparación; es decir, ver si las estructuras de importancia taxonómica para la especie de *Fusarium* de interés están presentes.
7. Se le aplica barniz en los bordes del cubreobjetos para sellar y se etiqueta la preparación.
8. En caso de no contar con la preparación deseada se repite el procedimiento.

Anexo 2. Esterilización de aceite mineral (French y Hebert, 1980).

Materiales:

- Aceite mineral (Meyer®),
- Olla de presión
- Matraz elermeyer
- Tapón para el Matraz
- Aluminio

Procedimiento:

1. Se calcula la cantidad de aceite a utilizar.
2. Se coloca el aceite mineral dentro del matraz y se cierra con el tapón de vidrio o un trozo de algodón enrollado en gasa y se cubre con aluminio la boquilla del matraz.
3. Se esteriliza a una temperatura de 121°C a 15lb de presión durante una hora, este proceso se repite al día siguiente.
4. Finalmente se deja enfriar el aceite mineral a temperatura ambiente para su posterior uso.