



Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS - UNCa

Revista N° 65

ISSN: 1852 - 7086

Año: 2016

ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE DIFERENTES ESPECIES DE HONGOS AISLADOS DE SEMILLAS DE PLANTAS DE CEBADA (*Hordeum vulgare*)

Teresa Romero Cortes - Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Apan-Calpulalpan, Km. 8., Chimalpa Tlalayote s/n Colonia Chimalpa, Apan, 43900 - México.

Pablo A. López Pérez - Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Mario Ramírez-Lepe - UNIDA-Instituto Tecnológico de Veracruz, M. A. de Quevedo No. 2779, Colonia Formando Hogar, Veracruz, 91897 - México.

Jaime Alioscha Cuervo-Parra - Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Mail de referencia: jalioscha@gmail.com

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la cebada (*Hordeum vulgare*) es el cuarto cereal más importante, seguido del trigo, maíz y arroz. Tanto la semilla como la planta se utiliza en la industria ganadera, alimenticia y cervecera (Sánchez, 2011). El país con mayor producción de este cereal, es Rusia con una producción de 17,500,000 toneladas anuales, en el Continente Americano es Argentina con 3,400,000 toneladas por año (PMC, 2015). En México la cebada se siembra en una superficie aproximada de 283, 386 ha; donde el 90% de ésta superficie se localiza entre los Estados de Guanajuato, Hidalgo, México, Puebla y Tlaxcala (Zamora *et al.*, 2008). El cultivo se produce en condiciones de secano o temporal en el ciclo de verano, al depender de la lluvia como fuente única de riego (SAGARPA, 2009). En el estado de Hidalgo, el cultivo de cebada es el segundo en importancia socioeconómica después del maíz, en cuanto a la superficie sembrada, volúmenes de producción obtenidos y número de productores (Gómez *et al.*, 1997). Sin embargo, este cultivo se ve afectado por varios hongos fitopatógenos responsables de enfermedades como las royas, manchas foliares, pudrición de raíces y fusariosis. Ésta última, es de gran importancia ya que afecta el rendimiento y en los granos contaminados produce toxinas que son nocivas para la salud animal y humana (Gilchrist-Saavedra, 2000).

Usos de la planta de cebada

En México, 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), ya que los agricultores lo prefieren debido a que su ciclo vegetativo es corto, tiene resistencia a la sequía, a las bajas temperaturas y a la salinidad del

suelo. Los estados de Hidalgo y Tlaxcala son los dos principales productores de cebada en grano de temporal en México (López *et al.*, 2005).

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 la producción de malta. Particularmente en México, aproximadamente el 70% de la cebada que se produce es específica para ser utilizada por la industria maltera y el 30% restante corresponde a variedades que se utilizan fundamentalmente para alimentación de ganado.

La consolidación en el mercado nacional y de exportación de las dos grandes compañías cerveceras en México y el buen posicionamiento de sus productos en los mercados mundiales, han propiciado el desarrollo de una industria de producción de malta en México, integrada verticalmente con los fabricantes de cerveza. Esta industria a su vez ha 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 (Espinosa *et al.*, 2003). Sin embargo, las numerosas enfermedades que se presentan son una fuerte limitante de la producción, especialmente por el alto costo de los fungicidas y su aplicación (Gilchrist-Saavedra, 2000).

Hongos fitopatógenos que atacan a la planta de cebada

Las plantaciones de cebada son afectadas por hongos fitopatógenos que causan pérdidas a nivel mundial, se pueden mencionar a *Puccinia striiformis* que causa la roya amarilla o lineal (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005), *Puccinia hordei* que causa la roya de la hoja o roya parda (Sánchez, 2011), *Drechslera teres* que causa la mancha en red, ocasionando pérdidas de hasta el 50% (Gilchrist-Saavedra, 2000), *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Epicoccum* sp., que causan la punta negra (Carmona *et al.*, 2011), *Fusarium* spp., que causan la fusariosis (Zúñiga *et al.*, 2010), *F. graminearum*/*Gibberella zea* que provoca el tizón de plántulas, *Bipolaris sorokiniana*/*Cochliobolus sativus* que causa el tizón de plántulas o mancha borrosa, *Ustilago nuda* que causa el carbón volador (Carmona *et al.*, 2011), y *Ustilago hordei* que causa la enfermedad del carbón vestido (Zúñiga *et al.*, 2010). De estas enfermedades las que causan más daño a las plantaciones de cebada son la roya amarilla y la mancha en red (Carmona *et al.*, 2011; Sánchez, 2011).

En el caso de las semillas, es importante conocer que el grano infectado constituye el inóculo primario de la gran mayoría de las enfermedades. En general, el cultivo está frecuentemente afectado por las manchas foliares y de las diferentes especies de hongos patógenos del género *Fusarium* favorecidos por los métodos culturales utilizados para la labranza y la retención de los residuos de cosecha, lo que ha favorecido el incremento del inóculo de las manchas foliares (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005).

Se analizaron 10 muestras de 500 gramos de semillas utilizadas por lote procedentes de 10 localidades distintas, variedades y años de cultivo de la zona de los Valles Altos para los estados de Guanajuato, Hidalgo y Puebla. Los datos generales se especifican en el Cuadro 1.

No. de Lote	Edad	Localidad de procedencia	Fecha de cosecha
M1	Esmeralda	Apan, Hidalgo	2010
M2	Esmeralda	Puebla	2008
M3	Gaviota	Puebla	2008
M4	Forrajera	Apan, Hidalgo	2011
M5	Adabella	Almoloya, Hidalgo	2012
M6	Alina	Mijapa, Hidalgo	2012
M7	Esmeralda	San Felipe, Hidalgo	2009
M8	Esmeralda	Leon, Guanajuato	2013
M9	Adabella	Guanajuato	2013
M10	Esmeralda	Tepeapulco, Hidalgo	2013

Cuadro 1. Procedencia de las muestras de granos de cebada

Métodos de cultivo y aislamiento de hongos

Las semillas (10 g) se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% durante un minuto. Posteriormente, las semillas se secaron a temperatura ambiente y se sembraron en medios de cultivo seleccionados para el desarrollo de las especies fúngicas como son; harina de maíz agra más 2% de dextrosa (CMD), agar papa dextrosa (PDA) y agar sabouraud dextrosa (SDA). Las muestras se incubaron durante 7 días a 25°C. Posteriormente, se analizaron con un microscopio óptico y en aquellas en donde se observaron colonias fúngicas, se cortaron discos de 5 mm de diámetro con ayuda de un saca bocado y se colocaron en otras cajas Petri con medio PDA para su crecimiento, aislamiento y posterior caracterización morfológica. Las cepas aisladas se incubaron durante 5 días a 25°C o hasta que se llenó la totalidad del medio de cultivo.

Mantenimiento y propagación de las cepas

Para el mantenimiento y propagación de las cepas se realizó un lavado de esporas con una solución estéril de Tween 20 al 0.01% (Arévalo *et al.*, 2005), a una concentración de 1×10^6 esporas/ml para cada hongo fitopatológico aislado. La concentración de esporas se realizó mediante la cuenta directa total por el método de la cámara de Thoma. Una parte de esta suspensión se transfirió a otra caja Petri, distribuyéndola homogéneamente, se incubó a 25°C por 7 días y se conservó en refrigeración a 4°C en condiciones estériles hasta su uso. Para mantener el cultivo viable las resiembras se realizaron cada 30 días (Alvarez, 2007). Una vez crecido cada microorganismo en la placa, se le adicionó 5 ml de una solución de Tween 20 al 0.01% y se recuperó la suspensión de esporas en frascos estériles a los cuales se les agregó 5 ml de una solución de glicerol al 40% y por último, se conservaron en congelación a -74°C hasta su uso.

Microorganismos empleados

Los microorganismos utilizados fueron cepas de hongos fitopatógenos: *Drechslera teres*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium austroamericanum*, *Fusarium pseudograminearum*, *Rhizopus oryzae*, *Puccinia triticina*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia recondita*, *Puccinia hordei*, *Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium citrinum* y *Penicillium oxalicum*. Las cepas fúngicas fueron aisladas de semillas de plantas de cebada con síntomas de enfermedad causadas por la roya amarilla y la roya parda, de la zona de los Valles Altos de los estados de Guanajuato, Hidalgo y Puebla.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos causantes de enfermedades son un factor importante en la baja productividad de un cultivo. Al respecto, los granos de los cereales como la cebada, fácilmente pueden ser colonizados por especies de hongos, que causan su deterioro (Soldevilla *et al.*, 2005). En todas las variedades de cebada de la zona de los Valles Altos de los estados de Guanajuato, Hidalgo y Puebla que fueron muestreadas, se encontraron cepas fúngicas. De un total de 10 lotes de muestras de semillas de cebada con síntomas de roya amarilla y roya parda, se aislaron 64 cepas de hongos fitopatógenos, de las cuales 27 se recuperaron de la variedad Esmeralda, 13 de la variedad Adabella, 10 de la variedad Alina, 9 de la variedad Forrajera y 7 de la variedad Gaviota (Cuadro 2).

Cuadro 2. Microorganismos aislados de las semillas de cebada

Especies fúngicas	Variedad de cebada					^a % de ocurrencia total en el aislamiento
	Adabella (JCPn)	Esmeralda (JCPn)	Gaviota (JCPn)	Forrajera (JCPn)	Alina (JCPn)	
<i>Drechslera teres</i>	7, 50	2, 10, 19, 51	-	-	16, 57	32.00
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	6	3, 12, 30	-	43, 65	14, 44	32.00
<i>Fusarium graminearum</i>	28, 53	1, 34, 55, 62	59	-	15, 64	36.00
<i>Fusarium austroamericanum</i>	-	-	-	40	-	4.00
<i>Rhizopus oryzae</i>	9, 27	0, 20, 29	22,	24, 41	18, 45	40.00
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	-	-	46, 47	-	-	8.00
<i>Puccinia triticina</i>	8	-	21	-	17	12.00
<i>Puccinia striiformis</i>	26	35	-	-	58	12.00
<i>Puccinia recondita</i>	37	-	-	38	-	8.00
<i>Puccinia hordei</i>	54	48, 61	60	39	-	20.00
<i>Alternaria alternata</i>	-	13, 31, 32, 49, 56	-	25	-	24.00
<i>Penicillium oxalicum</i>	63, 52	11, 4	-	42	-	20.00
<i>Penicillium citrinum</i>	-	5, 33	-	-	-	8.00
<i>Penicillium digitatum</i>	-	36	23	-	-	8.00

^a Porcentaje de ocurrencia para una n = de 25 cajas de Petri con medio PDA (5 repeticiones por variedad de cebada).
n: número de identificación de cada cepa.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a lo reportado por otros autores para otras zonas productoras de cebada del mundo (Soldevilla *et al.*, 2005; Ocampo *et al.*, 2005; Lowe y Ulmer, 2006; Bolton *et al.*, 2008; García *et al.*, 2012). En otros trabajos, con granos de cebada se ha reportado la presencia de los hongos *Penicillium* y *Aspergillus* como géneros fúngicos predominantes (Scudamore y Hetmanski, 1995; Maenetje y Dutton, 2007). Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con lo reportado por esos autores ya que en este trabajo las especies aisladas del género *Penicillium* (Cuadro 2) no son géneros fúngicos predominantes. Este resultado, puede deberse a la presencia de otros géneros de hongos de mayor importancia económica para este cultivo (Figura 1).

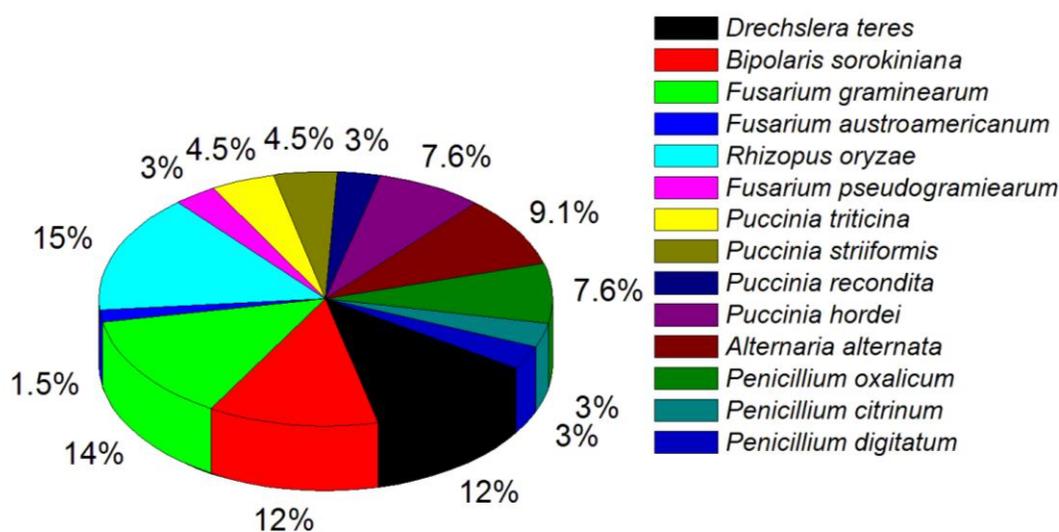


Fig. 1. Porcentaje de géneros más predominantes

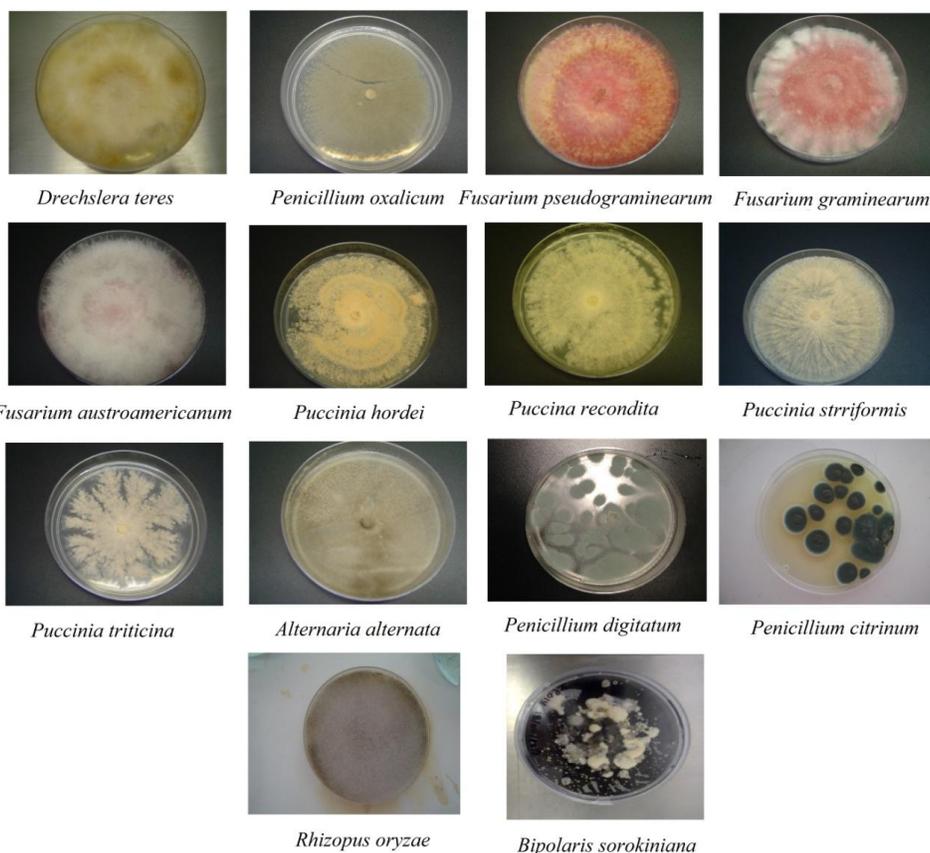
Dentro de estos géneros importantes que se aislaron como predominantes se encuentra el complejo de las royas de los cereales. Las especies de este género han sido reportadas como responsables de ocasionar enfermedades como la roya lineal causada por *P. striiformis* "4.5%" (Wellings, 2010), y la roya parda causada por *P. triticina* "4.5%", *P. hordei* "7.6%" y *P. recondita* "3.0%" (Steffenson *et al.*, 1993; de Vallavieille-Pope *et al.*, 1995; De Wolf *et al.*, 2010; Bolton *et al.*, 2008; Sánchez, 2011). Los otros géneros fúngicos predominantes en este trabajo fueron *Fusarium* y *Rhizopus* con 18.5 y 15%, respectivamente. El género *Fusarium* es responsable de causar la Fusariosis de la espiga, enfermedad cuya importancia radica en la baja en el rendimiento que ocasiona en el cultivo y por las toxinas que generan en los granos afectados (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005).

Todas las áreas geográficas donde se cultivan cereales en México, presentan problemas de Fusariosis de la espiga, variando la especie que la causa en cada localidad y en diferentes épocas (Ireta y Gilchrist, 1994). Las pérdidas pueden variar considerablemente, muchas veces no estando relacionadas con

el rendimiento, pero sí con el contenido de toxinas contenido en los granos. Por eso, las grandes empresas que usan el grano para elaborar alimentos concentrados para animales o cereales en hojuelas, controlan el contenido de las toxinas, imponiendo límites en su concentración. Sin embargo, cuando no hay forma de controlar el contenido de toxinas, los granos infectados se convierten en un problema de salud (Gilchrist-Saavedra, 2000).

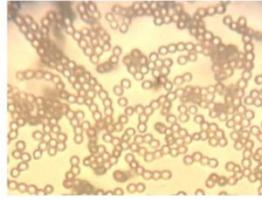
En relación con los aislamientos de *R. oryzae* de las muestras colectadas, éste género ha sido reportado como causante de enfermedades de los frutos de varias especies, como la fresa (Farrera *et al.*, 2007), tulipán (Hisaki *et al.*, 2006) y el cacao (Cuervo-Parra *et al.*, 2011). Aunque, esta especie no se reporta como patógena de la cebada, el rápido crecimiento que se observó durante su aislamiento le permitiría colonizar y destruir las semillas y las plantas en un tiempo muy corto, siendo este el primer reporte de este hongo como patógeno para este cultivo en México.

Las características morfológicas de las especies fúngicas aisladas de granos de cebada se muestran en las Figuras 2 y 3.





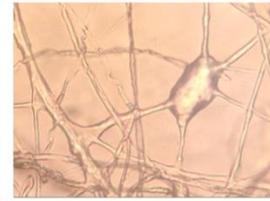
Drechslera teres



Penicillium oxalicum



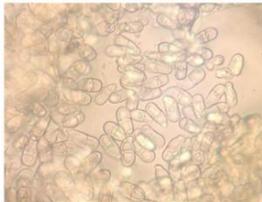
Fusarium pseudograminearum



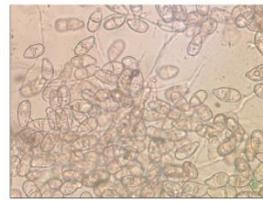
Fusarium graminearum



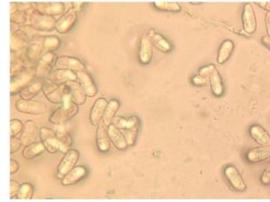
Fusarium austroamericanum



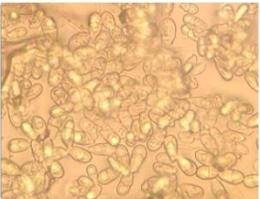
Puccinia hordei



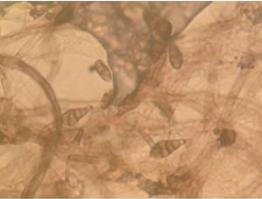
Puccinia recondita



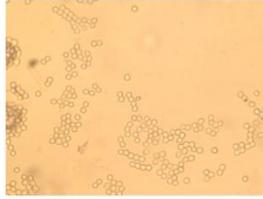
Puccinia striiformis



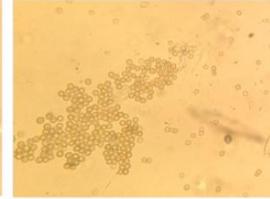
Puccinia triticina



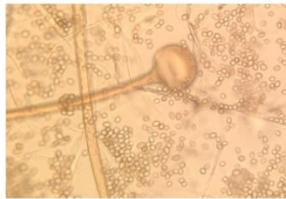
Alternaria alternata



Penicillium digitatum



Penicillium citrinum



Rhizopus oryzae



Bipolaris sorokiniana

CONCLUSIÓN

El conocimiento de las especies de hongos que se encuentran presentes en un cultivo en particular es de suma importancia para poder implementar estrategias encaminadas hacia la prevención y control de las enfermedades que estos agentes fúngicos pueden causar en el cultivo de la cebada. De igual forma, la utilización de técnicas confiables para la identificación de cepas de hongos fitopatógenas son de igual importancia para evitar su dispersión dentro de una zona.

REFERENCIAS

Alvarez, N. M. 2007. Purificación y caracterización parcial de dos celulasas de *Trichoderma harzianum* CINV17. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, Veracruz.

Arévalo, G. E., Ortiz, B. C., Zúñiga, C. L., y Gonzáles, V. J. 2005. Hoja Técnica No. 51. Selección de plantas de cacao resistentes a la Moniliasis usando savia del floema y fluidos embrionicos de frutos jóvenes. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 76: 86-88.

Bolton, M. D., Kolmer, J. A., y Garvin, D. F. 2008. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology*. 9: 563-575.

Carmona, M., Barreto, D. y Romero, A. 2011. Enfermedades del cultivo de cebada. Importancia, síntomas y manejo. En: CEBADA CERVECERA: Bases funcionales para un mejor manejo del cultivo. Miralles, D. J., Benech-Arnold, R. L., y Abeledo L: G. (Eds). pp. 133-169.

Cuervo-Parra, J. A., Ramírez-Suero, M., Sánchez-López, V., y Ramírez-Lepe, M. 2011. Antagonistic Effect of *Trichoderma harzianum* VSL 291 on Phytopathogenic Fungi Isolated from Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Fruits. *African Journal of Biotechnology*. 10: 10657-10663.

De Wolf, E., Paul, P., Osborne, L., y Tenuta, A. 2010. Identificando a las Royas del Trigo y Cebada. USDA-CREES Extension Integrated Pest Management program award 2009-41533-05331. 1: 1-4.

de Vallavieille-Pope, C., Huber, L., Leconte, M., y Goyeau H. 1995. Comparative Effects of Temperature and Interrupted Wet Periods on Germination, Penetration, and Infection of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* and *P. striiformis* on Wheat Seedlings. *Phytopathology*. 85: 409-415.

Espinosa, M., Nieto, B. J., Cervantes M. A., González, C. M. 2003. Plan Estratégico de Investigación y Transferencia de Tecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Cadena Agroalimentaria de Cebada. Etapa II: Identificación de Demandas Tecnológicas en la Cadena Agroalimentaria de Cebada. Plan Estratégico de Necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología. Fundación Guanajuato Produce, Querétaro, México. 20 p.

Farrera, P. R.E., Zambrano, V. A. E., y Ortiz, M. F. A. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 24: 269-281.

García, C., Palmero, D., De Cara, M., Cruz, A., y González J. M. 2012. Microbiota asociada a la enfermedad de la punta negra del trigo duro. Efectos del riego, el abonado nitrogenado y la variedad cultivada en la incidencia de la enfermedad. *ITEA. Información Técnica Económica Agraria*. 108: 343-356.

Gilchrist-Saavedra, L. I. 2000. Problemas Fitosanitarios de los Cereales de Grano Pequeño en los Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18:132-137.

Gilchrist-Saavedra, L., Fuentes-Dávila, G., Martínez-Cano, C., López-Atilano, R. M., Duveiller, E., Singh, R. P., Henry, M., y García, A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda Edición. México, D. F., Centro Internac. de mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 68 p.

Gómez, M. R., García, S. R., Pérez, C. J, P.1997. Guía para cultivar cebada maltera de temporal en el estado de Hidalgo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación de la Región Centro, Campo Experimental Pachuca. Folleto para Productores. Núm. 8. 23 p.

- Hisaki, V., Benva, M., Wright, E. R., y Morisigue, D.** 2006. Podredumbre húmeda poscosecha de bulbos de tulipán ocasionada por *Rhizopus stolonifer*. Jornadas de Enfermedades en Cultivos Bajo Cubierta. Actualización Fitosanitaria en cultivos Protegidos. La Plata. Libro de Resúmenes. 69 p.
- Ireta, J., y Gilchrist, L.** 1994. La roña de la espiga del trigo. Reporte espec. de trigo. No. 21a. CIMMYT. 25 pp.
- López, P. P., Guzmán, O. F. A., Román, G. A. D.** 2005. Calidad física de diferentes variedades de cebada (*Hordeum sativum* Jess) cultivadas en los Estados de Hidalgo y Tlaxcala. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1-3 de junio, Guanajuato, México. 8-15 pp.
- Lowe, D., y Ulmer, H.** 2006. The influence of starter culture on barley contaminated with *Fusarium culmorum* TMW 4.0754. J. Am. Soc. Brew. Chem. 64: 158-165.
- Maenetje, P. W., y Dotton, M. F.** 2007. The incidence of fungi and mycotoxins in South African barley and barley products. Journal of Environmental Science and Health. 42: 229-236.
- Ocampo, S. I. O., Jaimez, O. J., Contreras L. E., y Carrazana G. J.** 2005. Estudio de la Microflora y Contenido de Aflatoxinas Presentes en cebadas Cultivadas y Almacenadas en el Estado de Hidalgo. En: VII Congreso Nacional de Ciencias de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1-3 de junio, Guanajuato, Gto. México. 245-253 pp.
- Producción Mundial Cebada (PMC).** 2015. Cebada Producción Mundial 2015/2016. Consultado [12/10/2015]. En línea: <https://www.produccionmundialcebada.com>
- SAGARPA.** 2009. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consulta de datos estadísticos para el año 2009. Consultado [10/10/2015]. En línea: <http://www.sagarpa.gob.mx>
- Sánchez, F. C. F.** 2011. Evaluación participativa de cuatro líneas y tres variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.), resistentes a sequía, en dos épocas de siembra y en invernadero, en la Espoch, Riobamba, provincia de Chimborazo. Tesis de Licenciatura. Esc. de Ingeniería Agronómica, Riobamba-Ecuador. 145 pp.
- Scudamore, K. A., y Hetmanski, M. T.** 1995. Nature occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in cereals in the United Kingdom. Food Addt. Contam. 12: 377-382.
- Soldevilla, C., Vázquez, C., Patiño, B., Jurado, M., y González-Jaén, M. T.** 2005. Hongos toxicogénicos asociados a trigo y cebadas de Castilla y León. Bol. San. Veg. Plagas. 31: 519-529.
- Steffenson, B. J., Jin, Y., y Griffey, C. A.** 1993. Pathotypes of *Puccinia hordei* with Virulence for the Barley Leaf Rust Resistance Gene *Rph7* in the United States. Plant Dis. 77: 867-869.
- Wellings, C.** 2010. Threat specific contingency plan, Barley stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*). Plant Health Australia. Australia. 32 p.

Zamora, D. M., Solano, H. S., Gómez, M. R., Rojas, M. I., Ireta, M. J., Garza G. R. y Ortiz, T. C. 2008. Adabella: Variedad de cebada maltera para Valles Altos de la mesa central de México. Agric. Téc. Méx. 34: 491-493.

Zúñiga, J., Lezáun, J. A., Esparza, M., y Garnica, I. 2010. Enfermedades transmitidas por semilla en Trigos y cebadas. Navarra Agraria. 6: 29-32.



Secretaría de Investigación y Vinculación Tecnológica

Av. Belgrano y Mtro. Quiroga s/n - Campus Universitario
San Fernando del V. de Catamarca - Argentina
TE: 03834 – 430504 /03834 – 435955- int 101
Editor responsable: Ing. Juan Ramón SEQUI
Email: sivitecfca@gmail.com