

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



RESISTENCIA AL CARBÓN PARCIAL (*Tilletia indica* MITRA) EN  
GERMOPLASMA EXPERIMENTAL DE TRIGO HARINERO

**Tesis**

Que presenta YURIA MEDINA URIARTE

Como requisito parcial para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2017

RESISTENCIA AL CARBÓN PARCIAL (*Tilletia indica* MITRA) EN  
GERMOPLASMA EXPERIMENTAL DE TRIGO HARINERO

Tesis

Elaborada por YURIA MEDINA URIARTE como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.

  
Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor Principal

  
Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Asesor

  
Dr. Guillermo Fuentes Dávila

Asesor

  
Dr. Sukhwinder Singh

Asesor

  
Dr. Alberto Sandoval Rangel

Subdirector de Postgrado

UAAAN

## *AGRADECIMIENTOS*

**A mis asesores:** Dr. Guillermo Fuentes Dávila, Dr. Sunkhwinder Singh, Dra. Yisa María Ochoa Fuentes, y Dr. Alberto Flores Olivas, por brindarme su tiempo en la realización de este proyecto, brindarme su sabiduría y apoyarme en este trabajo.

A las personas que me permitieron aprender de ellos y me ayudaron en la realización de este proyecto: Carlos Antonio Ayón Ibarra, Roberto Alamilla Chávez, Alan Ismael Apodaca Navarro, Cynthia Ortiz y muy especialmente al Dr. Gilberto Eduardo Salinas García quien fue un apoyo muy importante brindándome su sabiduría y sus consejos.

Al **Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo** por su apoyo económico y moral, al **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias** por brindarme un espacio para trabajar, a la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO** por cobijarme desde el día que llegué y permitir aprender de ella y en ella durante este tiempo.

A mis maestros que me brindaron su tiempo, sabiduría y me permitieron aprender de ellos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría y el presente trabajo de investigación.

## *DEDICATORIA*

A **mis padres** Genovevo Medina Villa e Hilda Uriarte Santiesteban, **a mis hermanos** Oscar Alberto Medina Uriarte, Yohanee Medina Uriarte y Ana Verenice Medina Uriarte, por su apoyo incondicional, enseñanzas, confianza y amor que me han brindado a lo largo de toda mi vida.

A **Cesar Enrique Ruiz Reyes** que me ha brindado su apoyo en las buenas y en las malas, por su cariño y amor incondicional durante este proceso.

Al **Dr. Guillermo Fuentes Dávila**, a quien le agradezco de manera muy especial su ayuda incondicional para que este trabajo se llevara a cabo, sus consejos y sus palabras de aliento.

A **mis amigos**: Aidée González Ruiz, Agustín Hernández Juárez, Juan Mayo Hernández, Lidia Flores Torres, Héctor Quiñones Dena y José Aguilar Hernández, por darme su apoyo incondicional, brindarme sus consejos, darme una palabra de aliento, por brindarme su sabiduría y amistad.

## INDICE GENERAL

### Contenido

LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
ABSTRACT .....	iii
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos .....	2
General: .....	2
Específicos: .....	2
Hipótesis: .....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
El trigo .....	3
El trigo en el mundo .....	3
El trigo en México.....	3
El carbón parcial y el agente causal ( <i>Tilletia indica</i> ).....	5
Ubicación mundial de la enfermedad .....	5
Presencia de la enfermedad en México.....	5
Importancia económica del carbón parcial .....	6
El patógeno .....	7
Ciclo de vida .....	7
Descripción morfológica de las teliosporas .....	9
Síntomas de la enfermedad.....	10
Epidemiología de la enfermedad .....	10
Manejo integrado de la enfermedad.....	11
Control legal.....	11
Control cultural .....	12
Control químico .....	12
Control genético .....	15
Mecanismos de resistencia .....	17
Compuestos relacionados a la resistencia.....	19

Fenilalanina amonio liasa (PAL) .....	19
Peroxidasas.....	19
Compuestos fenólicos .....	20
Marcadores moleculares.....	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
Ubicación del experimento.....	23
Germoplasma experimental de trigo harinero.....	23
Incidencia y severidad del carbón parcial en Germoplasma experimental de trigo harinero .....	25
Siembra.....	25
Preparación de inóculo e inoculación .....	25
Cosecha y evaluación .....	27
Caracterización fenotípica del germoplasma experimental de trigo harinero .....	27
Porte de la planta .....	28
Pigmentación antociánica del coleóptilo .....	28
Largo del coleóptilo.....	28
Color de la hoja .....	28
Frecuencia de hoja bandera recurvada.....	28
Glauscencia .....	29
Largo y ancho de la hoja bandera.....	29
Ciclo.....	29
Altura de la planta .....	29
Sección del tallo .....	29
Forma de la espiga vista de perfil .....	30
Color de la espiga .....	30
Largo de la espiga .....	30
Densidad de la espiga.....	30
Presencia de aristas .....	30
Longitud del pico de la gluma .....	30
Forma del pico de la gluma .....	31
Forma del hombro de la gluma.....	31

Ancho del hombro de la gluma .....	31
Forma del pico de la lemma .....	31
Forma del grano .....	32
Largo y ancho del grano .....	32
Estrechamiento del grano hacia el ápice .....	32
Profundidad del surco ventral .....	32
Forma del germen.....	32
Longitud de los pelos del cepillo.....	32
Peso de mil semillas .....	32
Coloración al fenol .....	32
Detección de compuestos asociados a la resistencia en germoplasma experimental de trigo harinero. ....	33
Determinación de la actividad Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) .....	33
Actividad peroxidasa .....	33
Cuantificación de proteínas.....	34
Determinación de compuesto fenólicos .....	34
Detección de variabilidad genética de líneas susceptibles y resistentes de trigo harinero a carbón parcial. ....	35
Extracción de ADN .....	35
Análisis de SSR´s o microsatélites para la detección de variabilidad genética .....	37
Amplificación .....	38
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
Incidencia y severidad del carbón parcial en germoplasma experimental de trigo harinero.....	40
Caracterización fenotípica del germoplasma de trigo harinero .....	40
Detección de compuestos asociados a la resistencia en germoplasma experimental de trigo harinero. ....	44
Determinación de la actividad Fenilalanina Amonio Liasa.....	44
Actividad peroxidasa .....	45
Determinación de compuestos fenólicos .....	46
Cuantificación de proteínas.....	48

Detección de variabilidad genética de líneas susceptibles y resistentes de trigo harinero a carbón parcial. ....	49
CONCLUSIONES.....	51
LITERATURA CITADA.....	52

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b> . Pedigrí e historial de selección de líneas experimentales de trigo harinero resistentes (R) y susceptibles (S) al carbón parcial. ....	24
<b>Cuadro 2</b> . Escala arbitraria de severidad para carbón parcial ( <i>T. indica</i> Mitra).27	
<b>Cuadro 3</b> . Solución amortiguadora con CTAB para extracción de ADN de tejido de trigo.....	35
<b>Cuadro 4</b> . SSR´S utilizados en las líneas de trigo harinero para resistencia a <i>Tilletia indica</i> . ....	37
<b>Cuadro 5</b> . Mezcla para la reacción de PCR y amplificación de los microsatélites. ....	39
<b>Cuadro 6</b> . Incidencia y severidad de carbón parcial ( <i>Tilletia indica</i> ) en 10 trigos harineros resistentes y 10 susceptibles, después de inocularse artificialmente en campo, durante el ciclo agrícola 2014-2015 en el Campo Experimental Norman E. Bourlaug, Valle del Yaqui, Sonora.....	40
<b>Cuadro 7</b> . Características fenotípicas de 10 líneas experimentales de trigo harinero susceptibles a <i>Tilletia indica</i> . ....	42
<b>Cuadro 8</b> . Características fenotípicas de 10 líneas experimentales de trigo harinero resistentes a <i>Tilletia indica</i> .....	43
<b>Cuadro 9</b> . Concentración de Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) antes y después de la inoculación con <i>Tilletia indica</i> , de las líneas resistentes de trigo harinero R2, R8 y R11, y la línea susceptible KBSUS. ....	44

<b>Cuadro 10.</b> Concentración de peroxidasa antes y después de la inoculación con <i>Tilletia indica</i> , de las líneas resistentes R2, R8 y R11, y de la línea susceptible KBSUS.....	45
<b>Cuadro 11.</b> Concentración de fenoles totales antes y después de la inoculación con <i>Tilletia indica</i> , en las líneas resistentes R2, R8 y R11, y de la línea susceptible KBSUS.....	47
<b>Cuadro 12.</b> Cuantificación de proteínas totales antes y después de la inoculación con <i>Tilletia indica</i> , de las líneas resistentes R2, R8 y R11, y de la línea susceptible KBSUS. ....	48

### LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Escala para medir el porte de la planta.....	28
<b>Figura 2.</b> Pigmentación antocianica del coleoptilo. Izquierda (ausente; derecha (fuerte). ....	28
<b>Figura 3.</b> Sección del tallo.....	30
<b>Figura 4.</b> Forma de la espiga vista de perfil. ....	30
<b>Figura 5.</b> Forma del pico de la gluma vista de perfil.....	31
<b>Figura 6.</b> Forma del hombro de la gluma vista de perfil. ....	31
<b>Figura 7.</b> Ancho del hombro de la gluma. ....	31
<b>Figura 8.</b> Forma del pico de la lemma vista de perfil.....	31
<b>Figura 9.</b> Profundidad del surco ventral del grano.....	32
<b>Figura 10.</b> Dendograma con el coeficiente de Jaccard, de 10 trigos harineros resistentes y 10 susceptibles a <i>Tilletia indica</i> y los 19 pares de microsatélites. 50	

Resumen

RESISTENCIA AL CARBÓN PARCIAL (*Tilletia indica* MITRA) EN  
GERMOPLASMA EXPERIMENTAL DE TRIGO HARINERO.

POR

YURIA MEDINA URIARTE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRICOLA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ALBERTO FLORES OLIVAS- ASESOR

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2017.

## RESUMEN

El carbón parcial (*Tilletia indica* Mitra), enfermedad de nivel cuarentenario, es endémica en algunas regiones del noroeste de México, la cual causa pérdidas a los productores de trigo por sus efectos negativos en la calidad así como por la restricción en la exportación del grano y semilla. Esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de corroborar la resistencia y susceptibilidad de germoplasma experimental de trigo harinero, para tratar de asociarla con sus respuestas fenotípicas, bioquímicas y moleculares de resistencia hacia *T. indica*. Se sembró en campo para su posterior inoculación y se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad, así como las características fenotípicas de cada línea. La incidencia fluctuó de 0 al 100% y la severidad de 0 a 95%. Se determinó la actividad de compuestos relacionados a la resistencia como la Fenilalanina Amonio Liasa (PAL), los fenoles totales, la peroxidasa, y se cuantificaron las proteínas totales mediante pruebas colorimétricas. La línea R2 obtuvo la mayor concentración (49  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) de PAL a las 48 horas posteriores a la inoculación. En cuanto a fenoles totales, todas las líneas evaluadas disminuyeron su concentración, excepto por KBSUS que aumentó su concentración a las 48 horas. La concentración de peroxidasa (122  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) fue notoriamente superior en la línea KBSUS antes de la inoculación, pero después disminuyó considerablemente en las evaluaciones post-inoculación. En cuanto al contenido de proteínas totales, todas las líneas presentaron una disminución, con excepción de la línea R11, la cual se mantuvo antes y después de la inoculación con un contenido de 5.4 mg proteína/mg de tejido. Para detección de variabilidad genética se utilizaron 19 pares de SSR'S o microsatélites específicos para carbón parcial, y el análisis se llevó a cabo con el coeficiente de Jaccard; los resultados indicaron dos grandes grupos los cuales mostraron una gran diferencia en distancia, ya que uno es de 0.0% y el otro grupo de 0.33% de similitud.

**Palabras clave:** Carbón parcial, Microsatélites, Trigo.

**Abstract**

RESISTANCE TO KARNAL BUNT (*Tilletia indica* MITRA) IN EXPERIMENTAL  
GERMPLASM OF BREAD WHEAT

BY

YURIA MEDINA URIARTE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRICOLA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ALBERTO FLORES OLIVAS- Adviser-

Saltillo, Coahuila, México

May, 2017.

## ABSTRACT

Karnal bunt (*Tilletia indica* Mitra), disease quarantine level, is endemic in some regions of the Northwest of México, which causes losses to wheat producers for their negative effects on the quality as well as the restriction on the export of grain and seed. This research was conducted in order to corroborate the resistance and susceptibility of experimental germplasm of wheat, to try to associate with their phenotypic, biochemical and molecular responses of resistance to *T. indica*. He sowed in field for their subsequent inoculation and was determined the incidence and severity of disease, as well as the phenotypic characteristics of each line. The incidence ranged from 0 to 100% and severity from 0 to 95%. It was determined the activity of compounds related to the resistance as the phenylalanine ammonia lyase (PAL), total phenol, peroxidase, and the total protein colorimetric tests were quantified. The lines R2 obtained the higher concentration (49  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) of PAL to them 48 hours later to the inoculation. In terms of total phenols, all the lines evaluated decreased concentration, except for KBSUS which increased its concentration at 48 hours. The concentration of peroxidase (122  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) was notoriously top in the line KBSUS before the inoculation, but then decreased considerably in them evaluations post-inoculation. In terms of the contents of total protein, all lines showed a decline, with the exception of the R11 line, which remained before and after inoculation with a content of 5.4 mg protein/mg of tissue, 19 pairs of SSR'S or specific microsatellite for karnal bunt were used for detection of genetic variability, and the analysis was conducted with the Jaccard coefficient; the results indicated two large groups which showed a large difference in distance, since one is 0.0% and the other group of 0.33% of similarity.

**Key words:** Karnal bunt, Microsatellites, Wheat.

## Introducción

El cultivo del trigo ocupa el segundo lugar de producción a nivel mundial, lo que lo convierte en un alimento de primera necesidad; la producción de trigo en México se concentra en los estados de Sonora (35%), Guanajuato (17.5%), Baja California (11.5%), Sinaloa (9.2%) Michoacán (6.4%) y Jalisco (4.4%) (OEIDRUS, 2002). Este cereal requiere para su consumo humano un proceso previo de transformación que da como resultado la producción de harina, la cual se utiliza como materia prima en algunas industrias, que la transforman cocinada a productos terminados. La mayor demanda de este cereal en nuestro país la tiene la industria harinera, la que provee de materia prima a los fabricantes de pan, en donde la calidad del producto se determina por la cantidad y la calidad de la proteína del grano (OEIDRUS, 2002). El trigo es afectado por diversas enfermedades causadas por bacterias, micoplasmas, hongos, nematodos, virus y viroides, que pueden ocasionar daños en el follaje, la raíz, tallos, espigas y granos (Wiese, 1977). El carbón parcial causado por el hongo *Tilletia Indica* Mitra afecta las características organolépticas de este cereal (Peña *et al.*, 1992; Sekhon *et al.*, 1980, 1981), las cuales son de suma importancia en la industria. La presencia de esta enfermedad ha ocasionado en diversos períodos pérdidas económicas para los productores, pérdida del área de siembra por las regulaciones y medidas cuarentenarias, así como la pérdida de exportación de semilla (Brennan *et al.*, 1990).

## Objetivos

### General:

Determinar la variabilidad genética de germoplasma experimental de trigo harinero resistente y susceptible al carbón parcial (*T. indica*).

### Específicos:

Caracterizar fenotípicamente el germoplasma experimental de trigo harinero resistente y susceptible al carbón parcial.

Detectar compuestos asociados a la resistencia al carbón parcial en germoplasma experimental de trigo harinero.

Corroborar la resistencia y susceptibilidad al carbón parcial en el germoplasma experimental de trigo harinero seleccionado para este estudio.

### Hipótesis:

Se espera encontrar variabilidad genética en el germoplasma experimental de trigo harinero seleccionado para este estudio, en su respuesta a la enfermedad.

Se espera encontrar metabolitos producidos por la planta relacionados a la resistencia al carbón parcial en el germoplasma experimental de trigo harinero seleccionado para este estudio.

Se espera que el germoplasma experimental seleccionado como resistente y/o como susceptible, presente una reacción similar a la inoculación con carbón parcial.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### El trigo

#### El trigo en el mundo

De acuerdo con su volumen de producción, el trigo ocupa el segundo lugar en el mundo, después del maíz, aunque para consumo humano el grano es el que tiene mayor relevancia (OEIDRUS, 2002); alrededor del 75% se consume de manera directa, a través de productos finales como pan, harina y pastas alimenticias; el 15% de forma indirecta a través de productos animales y el resto se emplea como semilla (Galarda *et al.*, 2005). En el período de 2000-2005, la producción promedio de trigo a nivel mundial se ubicó en 590.4 millones de toneladas (MMt), observándose que en dichos años, el que mayor producción registró fue 2004, con una oferta mundial de 627.6 MMt (SAGARPA, 2008). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) estima que la producción mundial de trigo 2016-2017 será de 751.26 MMt. La producción mundial de trigo del 2015 fue de 735.49 MMt. Los 751.26 MMt estimados este año podrían significar un incremento de 15.77 MMt o un 2.14% en la producción de trigo alrededor del mundo (Producción Mundial del Trigo, 2016).

#### El trigo en México

La producción de trigo en México durante la última década del siglo XX fue de 35.7 millones de toneladas (MMt), concentrándose en los estados de Sonora (35%), Guanajuato (17.5%), Baja California (11.5%), Sinaloa (9.2%), Michoacán (6.4%) y Jalisco (4.4%) (SHCP, 2014). Entre 2011 y 2013 la superficie promedio dedicada al cereal alcanzó 660 mil hectáreas, con un volumen de producción de 3.4 MMt anuales (SHCP, 2014). En el 2015, la producción nacional fue de 3,710,706 ton, concentrándose en los estados de Sonora (1,605,960 ton), Baja California (538,185), Guanajuato (357,875), Sinaloa (322,706), Chihuahua (231,008), Jalisco (182,805), Michoacán (181,045), Tlaxcala (80,185), Nuevo León (57,415), Durango (24,241) y el resto con 129,282. El estado de Sonora aportó el 43% de la producción nacional en 2015 (SIAP, 2016).

En México se cultivan principalmente las variedades de trigo cristalino (60%), suave (25%) y fuerte (14%) (SHCP, 2014), variedades que se siembran y cosechan casi en su totalidad en la modalidad de riego (95%), en el ciclo Otoño-Invierno. El rendimiento promedio oscila entre 5.0 y 5.7 ton/ha (SHCP, 2014).

Este cereal requiere para su consumo humano un proceso previo de transformación que da como resultado la producción de harina, la cual se utiliza como materia prima en algunas industrias, que la transforman cocinada a productos masivos terminados (OEIDRUS, 2002). La mayor demanda del cereal en México la tiene la industria harinera, la que a su vez provee de materia prima a los fabricantes de pan, en donde la calidad del producto se determina por la cantidad y la calidad de la proteína del grano (OEIDRUS, 2002). Entre los componentes del grano están el agua (humedad), las proteínas, la fibra y los carbohidratos. La calidad de la proteína le indica al industrial el tipo de proceso a realizar. Su aceptación o rechazo se rige por medio de la certificación de laboratorio con base en la Norma Oficial Mexicana y en el análisis de la proteína (OEIDRUS, 2002).

En el territorio nacional se distinguen las regiones Noroeste y Bajío por su preponderancia en la producción de trigo. La Región Noroeste aporta en promedio el 55% de la producción y el Bajío el 28%, lo que conjuntamente representa más de las tres cuartas partes del total nacional. La superficie cultivada promedio de trigo en México en la década de los noventa fue de 898 mil hectáreas. El área sembrada disminuyó a un ritmo anual de 3.6% debido a los comportamientos negativos de los ciclos Otoño-Invierno y al Primavera-Verano. De la superficie promedio de 898 mil hectáreas, el 73% correspondió a la cultivada con sistemas de riego. La superficie sembrada en temporal disminuyó en más de 51 mil hectáreas durante el período en cuestión, lo que se traduce en un decremento promedio anual de 2.8% debido a problemas climáticos (SAGARPA, 2008).

El precio en México aumentó en cerca de 40% entre julio de 2011 y noviembre de 2012. Los precios internacionales del trigo se incrementaron en 2012 debido a las sequías en Australia y los Estados Unidos, así como al peor invierno que se vivió en Rusia en dos décadas, que provocaron una caída en la oferta mundial. México es un importador neto de trigo, en 2013 importó poco más de 4 millones de ton, el 60% del consumo nacional (SIAP, 2014; GCMA, 2014).

## **El carbón parcial y el agente causal (*Tilletia indica*)**

### **Ubicación mundial de la enfermedad**

El carbón parcial causado por el hongo *Tilletia indica* Mitra [sin. *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur] se reportó por primera vez en la India (Mitra, 1931), después se reportó en México (Duran, 1972), Paquistán (Munjal, 1975), Nepal (Singh *et al.*, 1989), Brasil, (Da Luz *et al.*, 1993), Los Estados Unidos (APHIS, 1996), Irán (Torarbi *et al.*, 1996) y África del Sur (Crous *et al.*, 2001). Esta enfermedad ha causado epifitias en algunas partes del mundo como el noroeste de India, Pakistán y noroeste de México (Brennan *et al.*, 1990).

### **Presencia de la enfermedad en México**

El noroeste de México fue la primera región del Continente Americano donde se reportó la presencia de esta enfermedad en el Estado de Sonora, en la región agrícola del Valle del Yaqui a finales del ciclo agrícola 1969-1970 (Duran, 1972). En México, a partir de 1980-81 la incidencia en general se ha incrementado, presentándose epifitias en algunos años (García Valle, 1991). Inicialmente la enfermedad se encontraba limitada en los valles del Yaqui y Mayo en el sur de Sonora, pero posteriormente se extendió a los estados vecinos de Sinaloa y Baja California Sur. A partir del ciclo 1991-92, la enfermedad se encontró en la Costa de Hermosillo y en Caborca. En 1983, el gobierno Mexicano impuso medidas legales para contener la diseminación de la enfermedad, mediante restricciones en la siembra de trigo en campos afectados (Delgado, 1984). En 1987 (SARH), se decretó la cuarentena interior número 16 contra el carbón

parcial del trigo, con el fin de llevar a cabo un control fitosanitario de este cultivo y de evitar la diseminación de la enfermedad. Los artículos de este decreto determinan las áreas cuarentenadas, el carácter de la cuarentena, los requisitos para la producción de semilla, grano, industrialización, medios de transporte, puntos de control cuarentenario, envíos a otros países, tratamiento químico, germoplasma experimental, uso de inóculo para propósitos de investigación, y sanciones. Dicha cuarentena se convirtió en la Norma Oficial Mexicana 001-FITO-1995. Estas medidas cuarentenarias afectan, la producción de este cereal, el mercado internacional (Brennan *et al.*, 1990) y limitan el movimiento de germoplasma (Fuentes-Dávila, 1997).

### **Importancia económica del carbón parcial**

Se ha estimado que en el noroeste de México, se presentan dos formas principales de pérdidas económicas debidas al carbón parcial (Brennan *et al.*, 1990): costos directos debidos a la pérdida en rendimiento (6%), pérdida en la calidad de granos infectados (37%), pérdidas por la falta de exportación de semilla (16%); y costos indirectos debidos a las pérdidas por las restricciones en la siembra (29%), costos adicionales por el transporte de semilla de áreas libres de carbón parcial (8%), y pérdidas debidas a los rechazos de grano infectado por la industria, tratamiento a la semilla y fumigación de grano. El costo total anual asciende a 7.02 millones de dólares (EUA), representando el 2% del valor promedio del cultivo en las áreas afectadas. Estas estimaciones no toman en consideración los costos relacionados con las medidas cuarentenarias aplicadas a los medios de transporte que se les encuentra algún grano de trigo al entrar a los EUA. En la India existen reportes de pérdidas causadas por el carbón parcial, aunque éstos carecen de información precisa sobre los diferentes factores que causan dichas pérdidas. En 1934, McRae indicó un daño del 20% en algunas variedades; por otro lado, Munjal (1975) reportó pérdidas del 0.2% equivalentes a 40,000 toneladas de grano/año en 7 estados productores de trigo del noroeste de la India. Joshi *et al.* (1983)

reportaron pérdidas del 0.3-0.5% del total de la producción, aun cuando algunas variedades mostraron un 89% de granos infectados. El daño de esta enfermedad es directamente sobre la calidad de la harina, la cual es afectada en su olor, sabor y color, ya que el hongo libera trimetilamina, sustancia que le da a la harina un olor desagradable como a “pescado en descomposición” (Peña *et al.*, 1992).

La erradicación total de la enfermedad muy probablemente sea imposible, pero los costos y riesgos se pueden reducir considerablemente mediante esfuerzos continuos para desarrollar germoplasma con mayor nivel de resistencia a la enfermedad.

### **El patógeno**

Clasificación taxonómica:

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Ustilaginomycotina

Subclase: Exobasidiomycetes

Orden: Tilletiales

Familia: Tilletiaceae

Género: *Tilletia*

Especie: *indica*

Fuente: Fuentes-Dávila, 1984.

### **Ciclo de vida**

Las teliosporas pueden permanecer viables en el laboratorio de 5 a 7 años (Mathur y Ram 1963; Kiryukhina y Shcherbakova 1976; Zhang *et al.*, 1984; Krishna y Singh 1983). Las teliosporas en soros intactos y enterrados a profundidades de 3 a 6 pulgadas o conservadas en la superficie del suelo, pueden permanecer viables durante 27 a 45 meses (Krishna y Singh 1982b).

Babadoost *et al.* (2004) reportaron que las teliosporas pueden permanecer viables después 32 meses enterradas en el suelo. Las teliosporas recién formadas generalmente presentan muy bajos porcentajes de germinación (Bansal *et al.*, 1983; Smilanick *et al.*, 1985), y se considera que tienen un período de dormancia de varios meses. Aún después de este período, el porcentaje de germinación varía generalmente en un rango de 10 a 60%.

Las teliosporas que se encuentran en la superficie del suelo y cuando hay condiciones de humedad en forma de agua libre, generalmente germinan produciendo un promicelio (Mitra 1931), sin embargo, varios promicelios se pueden producir de una teliospora (Krishna y Singh 1981; Warham 1988). El promicelio varía en longitud y puede llegar a medir hasta 1500 micras (Mitra 1931; Holton 1949). Sobre su ápice se produce un penacho de 32 a 128 o más esporidios primarios (Mitra 1931; Holton 1949), estos esporidios primarios son filiformes con 64.4 a 78.8 micras de longitud y 1.6 a 1.8 micras de ancho (Peterson *et al.*, 1984). El promicelio también puede presentar ramificaciones (Mitra 1931; Krishna y Singh 1981; Rivera-Sánchez y Fuentes-Dávila, 2001). Los esporidios primarios germinan terminal o lateralmente para producir hifas o esterigmas de las cuales se forman esporidios secundarios (Fuentes-Dávila, 1984) que miden 11.9 a 13 micras de largo y 2.2 a 3.3 micras de ancho (Peterson *et al.*, 1984), éstos tienen una forma alantoides o falcada, como una hoz, y pueden ser proyectados como catapulta (Fuentes-Dávila, 1984). Los esporidios secundarios pueden producir más hifas o esporidios alantoides por repetición (Fuentes-Dávila, 1984).

Según Dhaliwal (1989), la multiplicación del hongo en suelo esterilizado, sobre hojas y espigas superficialmente desinfectadas, sugiere que bajo condiciones naturales, el inóculo producido a partir de las teliosporas en el suelo, constituyen el inicio de las epifitias. Se desconoce el momento y lugar donde el proceso de dicarionización se lleva a cabo. El hongo penetra a través de los estomas de las glumas, lemas y/o paleas (Goates, 1988; Salazar *et al.*, 1990). La infección se inicia cerca del embrión, extendiéndose por la sutura del grano,

dejando el pericarpio parcialmente intacto. La porción afectada es cubierta por teliosporas de color café oscuro a negras, acompañadas de células estériles (teliosporas inmaduras), las cuales son subhialinas o amarillentas y de menor tamaño (Mittra, 1931). En general, los granos infectados son destruidos parcialmente y en pocas ocasiones ocurre una destrucción total; aunque el hongo puede penetrar al embrión, no necesariamente causa daño (Mittra, 1935; Chona *et al.*, 1961). De acuerdo a Rai y Singh (1978) los granos parcialmente infectados pueden producir plantas sanas, pero los que están severamente afectados pierden su viabilidad, o presentan una germinación anormal; sin embargo, Fuentes-Dávila *et al.* (2013) reportaron que granos con un alto grado de infección pero con el embrión intacto, presentaron una germinación similar a granos con grados menores de infección, y que el número de macollos producidos fue también muy similar.

Las teliosporas de *Tilletia indica* que se encuentran confinadas en la semilla, se liberan durante el proceso de la cosecha y trilla, pudiendo ser depositadas en el suelo, o adheridas a los granos sanos como contaminante externo.

### **Descripción morfológica de las teliosporas**

Las teliosporas son de color rojizo oscuro a cobrizo, marrón opaco y oscuro, algunas son negro opaco, globosas a subglobosas, 22-42 x 25-40  $\mu\text{m}$  en diámetro, promedio de 35.5  $\mu\text{m}$ ; algunas pueden medir 55  $\mu\text{m}$ ; ocasionalmente traen consigo un fragmento de micelio (apículo) (Roberson y Lutrell 1987); papila (Mittra 1931) o un vestigio adherido al micelio (Durán y Fischer 1961). Las teliosporas tienen tres capas en su pared (Khanna *et al.*, 1966; Khanna y Payak 1968; Roberson y Lutrell 1987; Gardner *et al.*, 1983a, b). La primera es una continuación de la pared del apículo (Roberson y Lutrell 1987). Las teliosporas inmaduras son estériles, numerosas, de color amarillento a subhialino, redondas, angulares o lacrimiformes, 10-28  $\mu\text{m}$  en diámetro, y presentan paredes delgadas y laminadas (Mittra 1931; Durán y Fischer 1961).

## **Síntomas de la enfermedad**

Los síntomas son visibles después del estado masoso del grano. No todas las espigas de una planta, ni todos los granos en una espiga son infectados (Mitra 1935; Bedi *et al.*, 1949), encontrándose ambos distribuidos al azar. El grado de infección en granos individuales varía desde punto pequeños de infección hasta granos completamente afectados; los granos afectados generalmente son parcialmente infectados y es raro encontrar granos totalmente afectados (Mitra 1935; Bedi *et al.*, 1949; Chona *et al.*, 1961). Los granos infectados emiten un mal olor parecido al de pescado podrido debido a la producción de trimetilamina (Mitra, 1935). En casos leves de infección, la enfermedad puede ser fácilmente confundida con punta negra.

Existe una relación inversamente proporcional, entre el aumento en la severidad de la infección, y la reducción de peso de 1000 granos (Bansal *et al.*, 1984).

Las espigas infectadas pueden disminuir en longitud y número de espiguillas (Mitra, 1937).

## **Epidemiología de la enfermedad**

El rango óptimo de germinación de las teliosporas es de 15-25°C, disminuyendo considerablemente abajo de 5 y arriba de 30°C (Mitra, 1935; Krishna y Singh, 1982a; Zhang *et al.*, 1984; Smilanick *et al.*, 1985). La germinación ocurre sobre un rango de pH 4.0-10, siendo la óptima entre 5-9 (Krishna y Singh, 1982a; Smilanick *et al.*, 1985).

Alta humedad relativa, temperaturas moderadas, nublados y lluvia durante la floración de la planta de trigo, favorecen el desarrollo de la enfermedad (Mundkur, 1943; Aujla *et al.*, 1977; Singh y Prasad, 1978). En la región Tarai del estado de Uttar Pradesh, la enfermedad es favorecida por temperaturas máximas de 23-26°C y mínimas de 10-12°C, con una humedad relativa máxima de 89 y mínima de 54%. Aunque la lluvia durante la floración del trigo propicia

una mayor incidencia de la enfermedad, tal y como se dio en los ciclos agrícolas 1982-1983, 1984-1985 y 1985-1986 en sur de Sonora (Lira, 1984), así como en el ciclo 2014-2015 (Dr. Guillermo Fuentes-Dávila, comunicación personal) ésta por sí sola no siempre es un factor para que ocurra (Singh y Prasad, 1978).

Antes de que se lleve a cabo la cosecha del trigo, la diseminación de las teliosporas es muy limitada a menos que los soros se rompan, lo cual no ocurre con frecuencia (Fuentes-Dávila, 1996). Sin embargo, durante la cosecha los soros se rompen y las teliosporas pueden contaminar el grano sano, el suelo, la maquinaria o los vehículos utilizados para la transportación del grano, así como ser acarreadas por el viento a muchos kilómetros de distancia. Bonde *et al.* (1987) detectaron teliosporas a 3000 m sobre campos de trigo que se habían cosechado y en donde se estaban quemando los residuos. El ganado e insectos como chapulines son medios de diseminación de las teliosporas, ya que son viables aún después de ser ingeridos por este tipo de animales e insectos (Smilanick *et al.*, 1986). Así mismo, Castro-Duarte y Fuentes-Dávila (2005) demostraron la viabilidad de las teliosporas después de ser ingeridas por diversos tipos de aves.

## **Manejo integrado de la enfermedad**

### **Control legal**

En 1983, el gobierno Mexicano impuso medidas legales para contener la diseminación de la enfermedad, mediante restricciones en la siembra de trigo en campos afectados (Delgado, 1984). En 1987 (SARH), se decretó la cuarentena interior número 16 contra el carbón parcial del trigo, con el fin de llevar a cabo un control fitosanitario de este cultivo y de evitar la diseminación de la enfermedad. Los artículos de este decreto determinan las áreas cuarentenadas, el carácter de la cuarentena, los requisitos para la producción de semilla, grano, industrialización, medios de transporte, puntos de control cuarentenario, envíos a otros países, tratamiento químico, germoplasma experimental, uso de inóculo para propósitos de investigación, y sanciones.

Dicha cuarentena se convirtió en la Norma Oficial Mexicana 001-FITO-1995 (SARH, 1995) y posteriormente en la NOM-001-FITO-2001 (SAGARPA, 2002).

### **Control cultural**

La incidencia de carbón parcial (CP) es afectada por algunos aspectos del manejo agronómico del cultivo del trigo, tales como: la aplicación de nitrógeno, densidad de población y distancia entre surcos bajo condiciones de infección natural. Se ha observado una respuesta lineal en algunos casos y cuadrática en otros entre porcentaje de granos infectados y dosis de nitrógeno aplicado como urea a la siembra (Ortiz-Monasterio *et al.*, 1993). Al aumentar de 0 a 75 kg/ha de N la incidencia de CP se incrementó de 0.06 a 0.19% y luego a 0.39, 0.58 y 0.62 con 150, 225 y 300 kg/ha de N, respectivamente. Esto se puede deber a que a) a mayores niveles de nitrógeno, mayor es el área foliar expuesta al patógeno el cual teóricamente llega a las espigas después de multiplicarse en las hojas; b) a mayores niveles de N los estomas están más abiertos facilitando la entrada del patógeno a la planta; y c) también el follaje está transpirando más provocando un microambiente más favorable para el desarrollo del hongo. En la variedad Oasis, se ha encontrado que a mayor número de plantas por metro cuadrado, mayor es el nivel de CP. El porcentaje de granos infectados en 100 plantas/m<sup>2</sup> (40 kg/ha de semilla) fue de aproximadamente 0.53%, mientras que con 250 plantas (100 kg/ha) fue de 1.53%. Sin embargo, en la variedad Rayón no se observó efecto de la densidad de población, manteniéndose un nivel bajo de granos infectados (alrededor de 0.1%). Utilizando variedades de trigo harinero en siembras de melgas y surcos (camas), se observó que el porcentaje de infección con carbón parcial para Rayón F89 fue 1.9% de granos infectados en melgas y 0.9% en surcos, para Oasis F86 fue 5.4 y 2.5%, para Baviácora M92 6.8 y 3.9%, para Bacanora T88 6.1 y 2.6% y para Tepoca M89 1.9 y 0.9%.

### **Control químico**

Ya que no existen variedades de trigo inmunes al carbón parcial, se considera al control químico como una medida importante dentro de un manejo integrado

de la enfermedad. Dada la particularidad del ciclo de vida de *Tilletia indica*, la aplicación de agroquímicos durante el período del espigamiento-floración-antes de la planta de trigo, es la actividad mediante la cual se obtiene un mayor control de la enfermedad y más margen de rentabilidad económica (Fuentes-Dávila *et al.*, 2016). A través de los años, se ha llevado a cabo investigación sobre la aplicación foliar para el control de la enfermedad: Singh y Prasad (1980) reportaron una reducción significativa en el nivel de infección en campo, con una sola aplicación de benomyl (Benlate) durante el embuche de la planta de trigo, así como con carbendazim (Bavistin), mancozeb (Dithane-M45), e hidróxido trifeniltin (Duter). Singh y Singh (1985) reportaron que de los fungicidas Bavistin, Baycor, Baytan, Bayleton, Benlate, Blitox, Ceresan, Dithane M-45, Topsin y Vitavax, solo Baytan y Bayleton fueron efectivos en reducir la severidad de la enfermedad. Smilanick *et al.* (1987) reportaron que en parcelas experimentales de trigo inoculado artificialmente, el control de la enfermedad fue mayor al 80% con dos aplicaciones de propiconazole o etaconazole, y con cuatro aplicaciones de mancozeb o hidróxido de cobre; los mejores resultados se obtuvieron cuando los productos se aplicaron 72 h después de las inoculaciones con el hongo. Figueroa y Valdés (1991) reportaron sobre la superioridad de propiconazole para el control del carbón parcial en aplicaciones foliares, en comparación con los fungicidas diniconazole, tebuconazole, flutriafol, fluzilazol, triadimenol y procloraz. Salazar-Huerta *et al.* (1997) reportaron que en experimentos realizados durante 1986-1989, tanto en parcelas experimentales como en campos comerciales, el propiconazole (Tilt) presentó la mayor eficiencia biológica para controlar la enfermedad, con dos aplicaciones en dosis de 0.5 L/ha de producto comercial; la primera aplicación se realizó cuando el 25% del cultivo estaba espigado y la segunda 10 días después. Figueroa-López y Álvarez-Zamorano (2000) reportaron que el epoxyconazole (Opus) mostró niveles de eficiencia similares al propiconazole, en ensayos de campo bajo inoculación artificial. Fuentes-Dávila *et al.* (2005) reportaron que el tebuconazole (Folicur) y el propiconazole (Tilt) mostraron una eficacia biológica mayor a 89% en el control del carbón parcial en evaluaciones

en campo bajo inoculación artificial, y Fuentes-Dávila (2007) reportó que la eficacia biológica del tebuconazole (Folicur), epoxyconazole (Opus) y el propiconazole (Tilt) fue de 99.8, 99.6, y 99.9, respectivamente.

La semilla constituye uno de los principales medios de diseminación de muchos fitopatógenos, incluyendo a muchos carbores; el desarrollo de tratamientos químicos y físicos que garanticen la viabilidad y sanidad de la semilla es imperativo con el fin de generar semilla sana que contribuya a la fitosanidad de las zonas agrícolas.

Los tratamientos con agua caliente y exposiciones al sol se han aplicado a semilla afectada con carbón parcial; sin embargo, han tenido un uso limitado. Estos tratamientos inhiben la germinación de las teliosporas, pero no tienen un gran efecto fungicida (Mittra 1937). Tratamientos con fungicidas a la semilla para controlar el carbón parcial se han investigado desde 1933-34 (Mittra 1935). Aunque muchos fungicidas han sido evaluados, los resultados no han sido satisfactorios.

Smilanick *et al.* (1987) aplicaron fungicidas sistémicos a la semilla (Benomyl, Bitertanol, Campogran, Trimidol, Propiconazole, Thiabendazole LSP y Triadimefon), la sembraron y además inocularon espigas en algunos macollos, sin embargo, ninguno de los fungicidas controlaron el desarrollo de la enfermedad, tanto en espigas inoculadas como infectadas en forma natural.

La eficacia de los fungicidas aplicados a la semilla infectada con *Tilletia indica*, se ha evaluado a través de la capacidad de germinación de las teliosporas después del tratamiento. Una gran cantidad de productos químicos han sido probados por diferentes investigadores, obteniendo por lo general, un control parcial (Mittra, 1935, 1937; Rai y Singh, 1979). Aujla *et al.* (1979) y Singh y Krishna (1980), informaron que Agallol, Carboxina, Benomil, Carbendazim, Metil-tiofanato, Oxicarboxin y fetin hidroxida inhiben la germinación de las

teliosporas. Los fungicidas sistémicos aplicados como tratamiento a semilla no pueden persistir el tiempo suficiente en las plantas para prevenir la infección en el momento de la floración (Aujla *et al.*, 1979). Fuentes *et al.* (1983) encontraron que Panogén 15 L y Terrazán 75 PH (pentacloronitrobenzeno) controlaron la germinación de las teliosporas durante dos meses; por otro lado, Warham y Prescott (1989) reportaron un control completo hasta por 18 meses con Panogén 15 L y Ceresán 15.4 D. Figueroa y Espinoza (1988) demostraron la alta eficiencia de clorotalonil para inhibir la germinación de las teliosporas. Sin embargo, este producto como muchos otros, principalmente inhibe la germinación y se desconoce qué proporción de teliosporas es la que muere (si es que el producto tiene la capacidad de matarlas). Warham y Prescott (1989), reportaron que el Hidróxido Trifeniltin, acetato metoxietilmercúrico y el cloruro etilmercúrico inhibieron la germinación de las teliosporas durante 18 meses. El Clorotalonil (en polvo), Mancozeb y Carbendazim + Mancozeb aplicado a semilla infectada durante 10 meses, resultó en alrededor de 97% de inhibición de la germinación de las teliosporas (Salazar-Huerta *et al.*, 1986a, b). Robles-Sosa y Fuentes-Dávila (1996) reportaron los efectos del clorotalonil, carboxin y el producto Dividend, en donde el primero tuvo en general una mejor inhibición de la germinación de las teliosporas. Por otro lado, Aujla *et al.* (1986) trataron semilla infectada con 17 fungicidas sistémicos y de contacto, enterraron la semilla durante 16 días, pero ninguno inhibió la germinación de las teliosporas que se recuperaron de las semillas enterradas.

### **Control genético**

El uso de variedades de trigo resistentes a la enfermedad es la medida de control más adecuada; además, el uso de tales variedades reduciría las posibilidades de introducir la enfermedad a áreas libres. Desde 1940's varias especies de *Triticum* han sido evaluadas para resistencia al carbón parcial (Bedi *et al.*, 1949; Singh *et al.*, 1986; 1988). El trigo harinero es la especie más afectada por esta enfermedad (Fuentes-Dávila *et al.*, 1993), algunos genotipos alcanzan niveles de infección por arriba del 50% en inoculaciones artificiales,

por lo que es importante la evaluación de las nuevas líneas avanzadas y variedades de este cultivo. El nivel de tolerancia/resistencia al carbón parcial en líneas avanzadas de trigos harineros, es un factor importante para reducir el riesgo de liberar alguna variedad altamente susceptible y evitar problemas económicos para los agricultores.

El mejoramiento para resistencia a *Tilletia indica* en México, se inició en la década de 1980's basado en la identificación de fuentes de resistencia (Metzger, 1984; Warham, 1984), hibridaciones con genotipos de características agronómicas deseables y la selección de progenies (Fuentes-Dávila y Rajaram, 1992). Las fuentes de resistencia se han explorado en las especies: *Triticum aestivum*, *T. turgidum*, *Triticosecale* (Fuentes-Dávila *et al.*, 1993) y *Triticum tauchii* X *T. turgidum* synthetics (Villareal *et al.*, 1994). Las inoculaciones se hacen necesarias debido al comportamiento errático de la enfermedad bajo condiciones naturales (Lira, 1984); este proceso hace más confiable la selección de germoplasma con resistencia (Fuentes-Dávila *et al.*, 2001). El inóculo se prepara mediante la utilización de teliosporas de un año de edad aisladas en agar-agua y cultivada en medio a base de papa-dextrosa-agar; se realiza el conteo de los esporidios alantoides, se ajusta a 10,000/mL y se inyecta un mL de la suspensión por espiga, durante el embuche de la planta de trigo (Fuentes-Dávila *et al.*, 1993). El porcentaje de infección se calcula mediante el conteo de los granos sanos e infectados, y aunque el método de inoculación es severo, hay trigos que consistentemente muestran bajos porcentajes de infección, destacando germoplasma originado en China, India y Brasil (Fuentes-Dávila y Rajaram, 1994). El progreso en el mejoramiento para resistencia a *Tilletia indica*, se puede medir mediante la comparación de los niveles de infección entre grupos de líneas avanzadas de trigo harinero del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, desarrolladas para ambientes óptimos (AO) para el cultivo del año 1989 o denominado también como mega-ambiente 1 (M1) correspondiente al año 1999. El AO presentó 2.8% de sus líneas dentro de la categoría de infección 0-5%, mientras que el

M1 tuvo 37%; el 87.5% de las líneas del AO mostraron un porcentaje de infección superior al 10%, mientras que del M1 fue el 40%; 35.8% de las líneas de AO mostraron un porcentaje superior al 30%, mientras que el M1 tuvo solo el 4% (Fuentes-Dávila *et al.*, 2001). Por otro lado, variedades de trigo harinero con resistencia al carbón parcial se han liberado para su explotación comercial en el noroeste de México (Camacho-Casas *et al.*, 1993; Valenzuela-Herrera *et al.*, 2011).

### **Mecanismos de resistencia**

Las plantas han generado con la evolución una serie de sistemas de defensa contra el ataque de insectos y patógenos basados en barreras estructurales o químicas o generando una respuesta metabólica activa. La defensa de las plantas está dividida en defensa constitutiva, la cual actúa deteniendo la entrada de los patógenos en los tejidos de la planta; es una característica normal del desarrollo de la planta o defensa inducible, la cual se activa al contacto con un organismo invasor. La defensa inducible requiere un sistema de vigilancia, el cual le permite a la planta el reconocimiento de la amenaza, lo cual genera un sistema de transducción de señales y una ruta de respuesta; usualmente es regulada a nivel transcripcional por medio de la expresión de genes relacionados con la defensa (Lamb *et al.*, 1989).

La defensa estructural se basa en características anatómicas de la pared celular y la defensa química en compuestos biológicamente activos de altos o bajos pesos moleculares. Cuando ocurre una penetración del patógeno los sistemas inducibles se activan, esto incluye una rápida generación de especies activas de oxígeno (Levine *et al.*, 1994), cambios en los polímeros de pared celular, síntesis de compuestos de bajo peso molecular como las fitoalexinas (Dixon, 1986), producción de proteínas relacionadas con la defensa y muerte celular hipersensitiva.

Para librar las defensas de las plantas, algunos patógenos utilizan los estomas u otros órganos de comunicación natural entre la planta y el medio ambiente; por otra parte, otros utilizan presión mecánica o segregan algunas enzimas específicas para romper los tejidos de la planta. Sin embargo, la mayoría de los organismos patógenos invaden a los tejidos que se encuentran dañados o enfermos (Fraser, 1987).

Hay un gran número de proteínas que se han descrito como parte de los mecanismos de defensa de las plantas. Además de que estas proteínas desempeñan funciones claves en muchos de los aspectos de defensa, ya sea como factores constitutivos de resistencia o formando parte de la compleja cascada de respuesta de resistencia.

El sistema de inmunidad natural desarrollado por las plantas está organizado en dos niveles. De acuerdo al modelo zigzag propuesto por Jones y Dangl (2006), la inmunidad natural primaria se alcanza a través de la interacción entre determinados receptores de reconocimiento de patógenos (Pathogen recognition receptors, PRR) y una serie de patrones moleculares conservados asociados a patógenos (pathogen associated molecular patterns, PAMP). Los PAMP tienen una función muy importante en la percepción del daño y en la activación de las respuestas de defensa, destacando entre ellos los fragmentos de quitina y glucanos procedentes de la pared celular de hongos, glicoproteínas/péptidos fúngicos o los lipopolisacáridos bacterianos (Zipfel y Félix, 2005).

Aunque las características estructurales participen en la defensa de las plantas contra el ataque de los organismos patógenos, cada vez es más evidente que la resistencia radica en las sustancias que produce la planta antes o después de haberse producido el ataque. Esto apoya el hecho que un determinado patógeno afecte o no a ciertas variedades de planta (Agrios, 2005).

## Compuestos relacionados a la resistencia

### Fenilalanina amonio liasa (PAL)

Los patógenos inducen alteraciones en la síntesis de enzimas por parte de las plantas. La capacidad de resistencia de una planta va a depender de la velocidad y el grado de síntesis de varios compuestos, uno de ellos es la fenilalanina-amonio-liasa (PAL), enzima que está involucrada en la vía fenilpropanoide, la cual participa de manera determinante en la generación de compuestos fenólicos y estructuras de defensa, al catalizar la primera reacción de la ruta fenilpropanoide. Se ha visto que puede ser capaz de regular la generación de los diferentes metabolitos obtenidos por esta vía biosintética y ha sido relacionada con mecanismos de defensa que se activan cuando un patógeno ataca a la planta (Heather *et al.*, 2002).

### Peroxidasas

La enzima oxidante de fenol Peroxidasa se ha estudiado en muchas plantas ya que tiene una función muy importante en la biosíntesis de componentes de la pared celular de los vegetales (Lamport, 1986). También participa en la lignificación y engrosamiento de la pared, las cuales son las que ofrecen respuestas de defensa en las plantas en contra de los patógenos; en particular, en contra de los hongos fitopatógenos (Vance *et al.*, 1980).

Las peroxidasas están distribuidas ampliamente entre las plantas superiores; su importancia radica en que catalizan la oxidación de varios fenoles en presencia de peróxido de hidrógeno, lo cual genera radicales libres que reaccionan entre sí y se producen dímeros. Algunas de las funciones fisiológicas de las peroxidasas en las plantas son: su participación en la biosíntesis del etileno, la defensa contra infecciones, curación de heridas y en la lignificación de la pared celular (Rivas *et al.*, 2007). Además, pueden oxidar los fenoles para así formar productos más tóxicos como las quinonas, las cuales también desempeñan una función integral en la resistencia a enfermedades en trigo. La naturaleza de la

peroxidasas en el trigo es un carácter genético donde los diferentes genomas controlan la síntesis de las mismas (Kobrehel y Gautier, 1974).

### **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son compuestos conocidos por su actividad como antifúngicos, antibacterianos y antivirales en las plantas (Sivaprakasan y Vidhyasekaran, 1993). Se ha observado que ciertos compuestos fenólicos comunes que son tóxicos para los patógenos, se producen y acumulan a un ritmo mayor después de que la planta es atacada por el patógeno, y estos compuestos se han encontrado en mayor proporción en variedades resistentes que en variedades susceptibles (Agrios, 2005).

El primer paso del mecanismo de defensa en las plantas implica una rápida acumulación de fenoles en el sitio de la infección, lo cual restringe y desacelera el crecimiento del patógeno, por lo cual ha sido relacionado con la resistencia en trigo de algunas enfermedades como la roya del tallo (Kiraly y Farkas, 1992) y carbón parcial (Gill *et al.*, 1993).

### **Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997).

Los sistemas de marcadores más comunes que están basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa son los Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (RAPDs), Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Amplificados (AFLPs) y más recientemente las Secuencias Simples Repetidas (SSRs) o microsatélites. Los microsatélites o secuencias simples repetidas son

secuencias de ADN formadas de 1 a 4 pares de bases, por ejemplo mononucleótidos (TT) $_n$ , dinucleótidos (AT) $_n$ , o tetranucleótidos (AAGG) $_n$ .

Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90%. Los microsatélites de ADN nuclear han sido detectados en múltiples grupos de plantas y animales, y han sido utilizados fundamentalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica, análisis de linajes y de sistemas reproductivos. Recientemente se han encontrado microsatélites en algunos organelos citoplasmáticos, como el cloroplasto y la mitocondria lo que ha enriquecido la fuente de estudios evolutivos, ya que estos organelos son heredados uniparentalmente y no están sujetos a recombinación, por lo que los cambios acumulados que observamos en las poblaciones se deben sólo a los procesos de mutación y demográficos (Golstein *et al.*, 1996).

La resistencia de las plantas a las enfermedades frecuentemente resulta de la interacción específica de genes de resistencia (R) de las plantas con los correspondientes genes de avirulencia (Avr) de los patógenos. La facilidad en la detección y la repetitividad entre diferentes laboratorios, han convertido a los SSRs en los marcadores más ampliamente utilizados en la diferenciación de líneas de sustitución cromosómica intervarietal, en la identificación de genes de resistencia, etc. (Korzun *et al.*, 1997).

Los microsatélites son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí, lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo. Por otra parte, se han realizado estimaciones de las tasas de mutación de estas regiones y se ha llegado a la conclusión de que los microsatélite del ADN nuclear tienen tasas de mutación de  $1 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-6}$ , más altas que las que se presentan en el ADN de cloroplasto. Conocer las tasas de mutación brinda una base importante para realizar análisis robustos de

la genealogía de las poblaciones lo cual provee información sobre la historia evolutiva de las especies, ventaja muy importante sobre otros marcadores genéticos (Golstein *et al.*, 1996).

La capacidad de los microsatélites como marcadores genéticos, fue investigado por Röder *et al.* (1995), quienes observaron que en el trigo, las secuencias (GA)<sub>n</sub> y (GT)<sub>n</sub> aparecen cada 270Kb aproximadamente, la repetición (AC)<sub>n</sub>, cada 292Kb y la secuencia (AG)<sub>n</sub> cada 212Kb. Por otro lado en trigo, los microsatélites cuyas secuencias son dinucleótidos son diez veces más frecuentes que aquellos en los que la repetición son trinucleótidos, mientras que los tetranucleótidos son poco frecuentes (Gupta *et al.*, 1999).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Ubicación del experimento**

El experimento se realizó en tres lugares: a) la caracterización fenotípica del germoplasma experimental de trigo harinero, se realizó en el Campo Experimental Norman E. Bourlaug (CENEB) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en la manzana 910 del Valle del Yaqui, Sonora a 27°22'3.01" N y 109°55'40.22" W en un suelo de textura arcillosa y pH de 7.8, durante el ciclo de cultivo otoño-invierno 2014-2015; b) la detección de compuestos asociados a la resistencia en el germoplasma experimental de trigo harinero, en el laboratorio de Biología Molecular, en el Departamento de Parasitología perteneciente a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) Unidad Saltillo; y c) la detección de variabilidad genética de las líneas susceptibles y resistentes de trigo harinero a carbón parcial, se realizó en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), en el Campo Experimental el Batán, Texcoco, Estado de México.

### **Germoplasma experimental de trigo harinero**

La semilla del germoplasma experimental de trigo harinero se obtuvo de líneas pertenecientes a viveros evaluados en trabajo colaborativo sobre carbón parcial entre el CIMMYT y el INIFAP-CENEB. Se trabajó con 20 líneas, de las cuales con anterioridad, 10 se detectaron como susceptible y 10 como resistentes (Cuadro 1) (comunicación personal, Dr. Guillermo Fuentes Dávila, Jefe del Programa de Investigación sobre Carbón Parcial, INIFAP).

**Cuadro 1 . Pedigrí e historial de selección de líneas experimentales de trigo harinero resistentes (R) y susceptibles (S) al carbón parcial.**

<b>PEDIGRÍ DE LAS LINEAS E HISTORIA DE SELECCIÓN</b>	
<b>LINEAS RESISTENTES</b>	
<b>R2</b>	Kiritati//Attila*2/Pastor/3/Akuri
	CMSS07Y00143S-0B-099Y-099M-099NJ-099NJ-10WGY-0B
<b>R3</b>	BAJ #1/3/Kiritati//Attila*2/Pastor
	CMSS07Y00288S-0B-099Y-099M-099Y-3M-0WGY
<b>R4</b>	Chibia//PRLII/CM65531/3/SKAUZ/BAV92/4/MUNAL #1 CMSS07Y00066S-0B-099Y-099M-099Y-36M-0WGY
<b>R5</b>	BAJ #1/3/Kiritati//Attila*2/Pastor
	CMSS07Y00288S-0B-099Y-099M-099NJ-099NJ-10WGY-0B
<b>R7</b>	TAM200/Pastor//TOBA97/3/Heilo CMSS07B00465S-099M-099Y-099M-10RGY-0B
<b>R8</b>	Munal #1/Francolin #1
	CMSS06B00001S-0Y-099ZTM-099Y-099M-13WGY-0B
<b>R11</b>	Saua/Kiritati//Saua
	CMSS06Y00785T-099TOPM-099Y-099ZTM-099Y-099M-5WGY-0B
<b>R12</b>	Saua/4/CROC_1/Ae. tauschii (205)//KAUZ/3/Attila/5/Saua CMSS06Y01021T-099TOPM-099Y-099ZTM-099Y-099M-13WGY-0B
<b>R16</b>	ROLF07/Saua
	CMSS05B00498S-099Y-099M-099Y-099ZTM-9WGY-0B
<b>R19</b>	SWSR22T.B./5/KAUZ//Altar 84/AOS/3/KAUZ/4/SW94.15464/6/2*PRL/2*Pastor
	CMSS08Y01067T-099M-099Y-099M-099Y-5M-0WGY
<b>LINEAS SUSCEPTIBLES</b>	
<b>S3</b>	ND643/2*WBLL1//Villa Juarez F2009 CMSS08Y00233S-099Y-099M-099NJ-7WGY-0B
<b>S6</b>	Chewink #1/FRNCLN
	CMSS08Y00486S-099Y-099M-099NJ-18WGY-0B
<b>S9</b>	TAM200/Pastor//TOBA97*2/3/Munal
	CMSS08Y00750T-099TOPM-099Y-099M-099Y-21M-0WGY

<b>S11</b>	Danphe #1*2/CHYAK
	CMSS08Y00869T-099TOPM-099Y-099M-099Y-12M-0WGY
<b>S12</b>	Danphe #1*2/CHYAK
	CMSS08Y00869T-099TOPM-099Y-099M-099NJ-8WGY-0B
<b>S14</b>	Mutus*2/Haril #1
	CMSS08Y00871T-099TOPM-099Y-099M-099NJ-099NJ-30WGY-0B
<b>S17</b>	Tacupeto F2001*2/Brambling//Whear/Sokoll CMSS08B00429S-099M-099NJ-6WGY-0B
<b>S24</b>	MEX94.2.19//Sokoll/WBLL1/3/Whear/Sokoll CMSA09M00506S-050ZTM-0NJ-099NJ-3RGY-0B
<b>S26</b>	PSN/BOW//SERI/3/Milan/4/Attila/5/KAUZ*2/CHEN//BCN/3/Milan/6/WBLL1*2
	/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ/7/IWA 8600211//2*PBW343*2/Kukuna CMSS10Y00731S-099Y-14M-3Y-0B
<b>KBSUS</b>	KBSUS

### **Incidencia y severidad del carbón parcial en Germoplasma experimental de trigo harinero**

**Siembra.-** La siembra se realizó en las instalaciones del CENEB en dos fechas de siembra las cuales fueron noviembre 26 y diciembre 3, 2014, usando aproximadamente 8 g de semilla para un surco de 0.7 m de largo, en cama de doble hilera.

**Preparación de inóculo e inoculación.-** Para preparar el inóculo de *Tilletia indica* con el fin de evaluar el germoplasma experimental de trigo harinero para resistencia a la enfermedad causada por este hongo, se utilizaron teliosporas de 1 año de edad. Granos de trigo infectados se agitaron en una solución de tween 20 + agua en tubos de ensaye, luego se cribaron en malla de 60 µm y se dejaron reposar en agua durante 24 horas. Luego, las teliosporas se colocaron en hipoclorito de sodio al 0.6% durante aproximadamente 2 min mientras se

centrifugaban a 3,000 rpm, se decantaron y se agregó agua destilada estéril para remover el exceso de cloro mientras se centrifugaba nuevamente a 3,000 rpm, repitiendo esta última operación. Las teliosporas se sembraron en agar-agua al 2% bajo condiciones asépticas, utilizando una jeringa estéril, y se incubaron a 18-22°C hasta detectar germinación. Pedazos de agar-agua donde se detectaron teliosporas germinando, se colocaron invertidos en tapas de cajas Petri con papa-dextrosa-agar con el fin de estimular la producción de esporidios secundarios. Después de 9 días de crecimiento, se agregó agua esterilizada a las cajas Petri con colonias del hongo en desarrollo, se rasparon con una espátula esterilizada a la llama y la suspensión se transfirió a otras cajas Petri con PDA para incrementar el inóculo. Una vez que las cajas Petri estuvieron cubiertas con el hongo, cuadros de agar-agua-hongo se colocaron invertidas en tapas de cajas Petri de vidrio esterilizadas, en el fondo de las cuales se colocó agua esterilizada y la colecta de esporidios secundarios se realizó diariamente con el fin de cuantificar usando un hematocímetro y ajustar la concentración a 10,000 por mL, y de esta suspensión se utilizó 1 mL para inyectarlo con una jeringa hipodérmica en una espiga en estado de embuche (estado 49 de acuerdo a la escala de Zadoks *et al.* 1974) siguiendo el método de Chona *et al.* (1961), modificado por Fuentes-Dávila *et al.* (2001). Se inocularon 5 espigas por línea experimental. Para proveer de mayor humedad en el área de inoculación, se utilizó un sistema automatizado de microaspersión durante 20 min, cinco veces por día. Para proteger las espigas inoculadas del daño de pájaro, se colocó malla protectora sostenida mediante una armazón a base de postes de metal y alambre recocido.

Las inoculaciones se realizaron durante los meses de enero, febrero y marzo de 2015, conforme las líneas alcanzaban su etapa de embuche. Las espigas que fueron seleccionadas se marcaron con una etiqueta roja para su posterior identificación y así registrar su fecha de inoculación.

**Cosecha y evaluación.-** La cosecha y trilla se realizaron de forma manual en cada línea; se cortaron las 5 espigas previamente marcadas e inoculadas y se colocaron dentro de bolsas de papel previamente rotuladas. Posteriormente, la incidencia se determinó como la presencia de granos infectados en cada espiga y la severidad (Cuadro 2) se calculó mediante el porcentaje de infección de cada línea contando el número de semillas sanas e infectadas de forma visual (Fuentes-Dávila *et al.*, 1995).

**Cuadro 2.** Escala arbitraria de severidad para carbón parcial (*T. indica* Mitra).

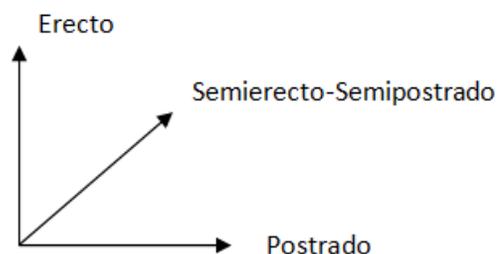
<b>0 sin carbón</b>
<b>0.1 a 5.0% resistente</b>
<b>5.1-10.0% moderadamente resistente</b>
<b>10.1-30.0% moderadamente susceptible</b>
<b>&gt;30% susceptible</b>

### **Caracterización fenotípica del germoplasma experimental de trigo harinero**

La evaluación de parámetros agronómicos se llevó a cabo bajo el método de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) (1994), aplicando las directrices del examen de distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE) para cultivares, el cual incluye 26 características, y de las cuales 12 son de suma importancia para la diferenciación de variedades.

Cuando el germoplasma experimental estuvo establecido en el campo se evaluaron ocho parámetros, mientras que el resto se evaluó cuando las espigas maduraron. Además de estos parámetros, se evaluaron otras características las cuales pueden ser útiles para complementar las descripciones de las líneas experimentales (DEFRA, 2011).

**Porte de la planta.-** Se observó el ángulo que forman las hojas y el tallo (Fig. 1) tomando en cuenta un eje vertical imaginario. Esta característica se evaluó en el estado fenológico desde mitad a final del amacollamiento.



**Figura 1.** Escala para medir el porte de la planta.

**Pigmentación antocianica del coleóptilo.-** Se colocaron 20 semillas de cada línea en cajas Petri, a las cuales se les colocó papel filtro humedecido para favorecer la germinación de las semillas y observar el color, el cual se registró como ausente, medio y fuerte (Fig. 2).



**Figura 2.** Pigmentación antocianica del coleóptilo. Izquierda (ausente; derecha (fuerte).

**Largo del coleóptilo.-** Se tomaron 10 de los coleóptilos en los que se observó el color y se midieron con una regla milimetrada.

**Color de la hoja.-** Esta característica se midió en la etapa de amacollamiento, la cual varió de un color verde oscuro a amarillo verdoso.

**Frecuencia de hoja bandera recurvada.-** Esta característica se observó desde que se abrió la vaina de la hoja bandera hasta que estuvo visible la primera

espiguilla. La característica comprende a todas las hojas banderas rectas, el 25% recurvada, 50%, 75% o todas las hojas recurvadas.

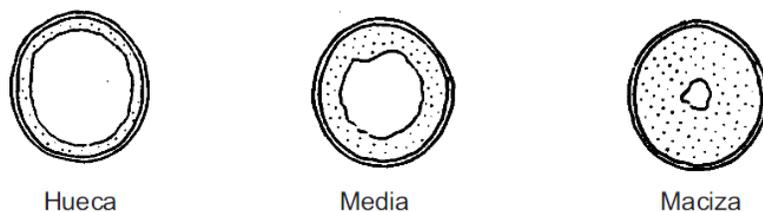
**Glauscencia.-** La glaucencia es la serosidad que recubre ciertas partes de las plantas tales como espigas, nudo de la espiga o la vaina de la hoja bandera; cuando se pasan los dedos por una de estas partes de las plantas se pierde esta serosidad (DEFRA, 2011). Esta característica se registró a comienzos del espigamiento, mientras que la glaucencia de la vaina de la hoja bandera, del pedúnculo de la espiga y de la misma espiga se registraron en la antesis; este parámetro varía desde nulo, medio a muy fuerte.

**Largo y ancho de la hoja bandera.-** Se evaluaron a comienzos del espigamiento y de manera general en la parcela. La expresión varía desde muy angosta a muy ancha, y desde muy corta a muy larga.

**Ciclo.-** El ciclo se define como los días desde la emergencia del cultivo hasta que el 50% de la parcela está espigada. El ciclo varía desde muy corto a muy largo, y se puede expresar en días desde emergencia a espigamiento (Hanft y Wych, 1982).

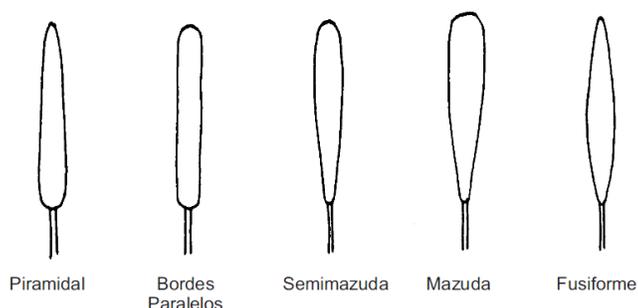
**Altura de la planta.-** La altura se evaluó en la madurez en la parcela, y se midió desde el suelo hasta las aristas. Se hicieron dos medidas de la altura de cada repetición.

**Sección del tallo.-** Se evaluó en la madurez, realizando un corte entre el nudo de la espiga y el anterior (Fig. 3).



**Figura 3.** Sección del tallo.

**Forma de la espiga vista de perfil.-** Se evaluó en la espiga ya madura y cosechada (Fig. 4).



**Figura 4.** Forma de la espiga vista de perfil.

**Color de la espiga.-** Se observó en la madurez en conjunto en la parcela.

**Largo de la espiga.-** Esta característica se registró midiendo con una regla milimetrada en 10 espigas de cada parcela.

**Densidad de la espiga.-** Para este parámetro se realizó una observación visual y varía desde muy laxa a muy densa.

**Presencia de aristas.-** Se observó en espigas maduras y se determinó su presencia o ausencia.

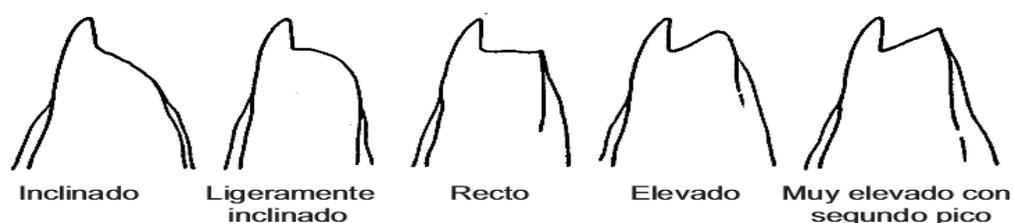
**Longitud del pico de la gluma.-** Se observó el largo del pico de la gluma y se evaluó de forma visual. Varía desde muy corto, cortó, medio, largo a muy largo.

**Forma del pico de la gluma.-** Se observó y se comparó con la siguiente escala (Fig. 5):



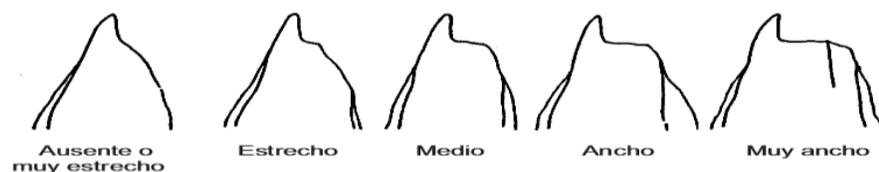
**Figura 5.** Forma del pico de la gluma vista de perfil.

**Forma del hombro de la gluma.-** Se observó y se comparó con la siguiente escala (Fig. 6)



**Figura 6.** Forma del hombro de la gluma vista de perfil.

**Ancho del hombro de la gluma.-** Se observó y se comparó con la siguiente escala (Fig. 7):



**Figura 7.** Ancho del hombro de la gluma.

**Forma del pico de la lemma.-** Se observó y se comparó con la siguiente escala (Fig. 8):



**Figura 8.** Forma del pico de la lemma vista de perfil.

**Forma del grano.-** Se evaluó de forma visual y varía de oval a elongada.

**Largo y ancho del grano.-** Se midieron los granos con una regla milimetrada.

**Estrechamiento del grano hacia el ápice.-** Se evaluó de forma visual y varía desde ausente a muy débil hasta muy pronunciado.

**Profundidad del surco ventral.-** Este parámetro se evaluó de forma visual y se comparó con la siguiente escala (Fig. 9):



**Figura 9.** Profundidad del surco ventral del grano.

**Forma del germen.-** Se realizó de forma visual y varía desde elongado a ovalado.

**Longitud de los pelos del cepillo.-** Se observaron en el ápice del grano y varían desde cortos, medios o muy largos.

**Peso de mil semillas.-** Se trillaron manualmente las espigas y se contaron mil granos de cada línea y posteriormente se pesaron.

**Coloración al fenol.-** Se siguió la metodología de Korpinnen (1963); se examinaron 100 granos de cada línea experimental los cuales se pusieron a remojar por 24 horas en agua destilada, después se sacaron, se colocaron en papel filtro y se evaluaron 24 horas más tarde. La coloración varía desde nula o muy clara hasta muy oscura.

### **Detección de compuestos asociados a la resistencia en germoplasma experimental de trigo harinero.**

Dada la consistencia en la reacción de las líneas a la inoculación artificial en campo con *Tilletia indica*, se determinó solo evaluar las líneas R2, R8 y R11, resistentes, y el KBSUS, susceptible, para la determinación de compuestos asociados a la resistencia.

#### **Determinación de la actividad Fenilalanina Amonio Liasa (PAL)**

Para la determinación de la enzima se realizó la extracción utilizando la metodología usada por Yedidia *et al.* (1999). Se pesaron 500 mg de la muestra macerada, la cual previamente se liofilizó, se le adicionó 1 mL de buffer de fosfatos 0.1 M con un pH de 7.3, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante se recuperó para realizar las pruebas pertinentes.

Para la determinación de la actividad PAL, se tomaron 0.9 mL de L-fenilalanina (1mg/mL), se le adicionó 0.1 mL del extracto enzimático y se incubó a 40°C durante 30 min. Posteriormente, la reacción se detuvo con 0.25 mL de ácido clorhídrico 5 N, las muestras se pusieron en un baño de hielo y se le adicionaron 5 mL de agua destilada. Después se procedió a determinar la absorbancia con una longitud de onda de 290 nm. Se definió como una unidad de actividad enzimática equivalente a la producción de 1 mmol de ácido transcinámico producido por minuto por mg de proteínas (Paz-Lago *et al.*, 1998).

#### **Actividad peroxidasa**

Para la determinación de esta enzima se siguió la técnica de Yedidia *et al.* (1999). Para obtener el extracto enzimático se utilizaron 250 mg de tejido macerado los cuales habían sido liofilizados, se le adicionó 1 mL de buffer de fosfatos 0.1 M con un pH de 7.3, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a

4°C, y después se recuperó el sobrenadante para iniciar con la reacción enzimática.

Para la cuantificación de la actividad de esta enzima se procedió a tomar 200  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático, se le adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de rojo de fenol al 0.2%, y se le agregaron 930  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio 50 mM a pH 4.2. La reacción se inició al agregarle 10  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno, tres minutos después esta reacción se detuvo con 40  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio 2 N. La lectura se realizó a una longitud de onda de 610 nm. La concentración de peroxidasa se calculó con el coeficiente de extinción molar de 22 000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para el producto oxidado, y la actividad peroxidasa se expresó como milimoles de rojo de fenol oxidado por gramo de peso seco por min (Yedidia *et al.*, 1999).

### **Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de proteínas se siguió la técnica de Yedidia *et al.* (1999). Para obtener el extracto enzimático se utilizaron 250 mg de tejido macerado el cual había sido liofilizado, se le adicionó 1 mL de buffer de fosfatos 0.1 M con un pH de 7.3, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C, después se recuperó el sobrenadante para iniciar con la reacción enzimática.

La concentración de proteínas se realizó siguiendo el método de Bradford (1976). La curva patrón que se utilizó fue hecha a base de albúmina de suero bovino (BSA), y la absorbancia se determinó a una longitud de onda de 595 nm. El contenido de proteínas se expresó en mg de proteínas por g de masa fresca de tejido.

### **Determinación de compuesto fenólicos**

Para realizar el análisis de compuestos fenólicos se siguió la metodología descrita por Leighton y Urquiaga (2001). El extracto metanólico se obtuvo pesando 250 mg de muestra macerada y previamente liofilizada, se le adiciono 1 mL de metanol al 80%, se agitó en el vortex durante 1 min, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. Al precipitado se le

agregaron 500  $\mu\text{L}$  de metanol al 100%, se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió al tubo que contenía el primer sobrenadante obtenido en la primera parte, se ajustó el volumen a 2 mL con agua destilada, el tubo se protegió de la luz y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

Para la determinación de fenoles, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, se le agregaron 1500  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 100  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu, 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se agitó durante 1 minuto en vortex, Se dejó reposar 30 min en obscuridad, y se leyó a una longitud de onda de 765 nm. La concentración de fenoles se calculó mediante la ecuación de la recta de una curva de calibración, realizada con ácido gálico en diferentes concentraciones, y se expresó como mg/mL de la reacción final.

### **Detección de variabilidad genética de líneas susceptibles y resistentes de trigo harinero a carbón parcial.**

#### **Extracción de ADN**

Se tomaron aproximadamente 10 semillas de cada línea y se colocaron en cajas Petri, a las cuales se les colocó un papel filtro humedecido y luz para facilitar la germinación. Para realizar la extracción de ADN se siguió el método de CIMMYT (CIMMYT, 2006), pero utilizando tejido fresco en lugar de liofilizado, el cual se maceró con nitrógeno líquido.

Con este método se obtienen de 50 a 100  $\mu\text{g}$  de ADN por cada 100 mg de tejido, con una solución que está constituida como se muestra en la cuadro 3.

**Cuadro 3.** Solución amortiguadora con CTAB para extracción de ADN de tejido de trigo.

<b>Solución concentrada</b>	<b>Concentración final</b>
dH <sub>2</sub> O	
1 M Tris-7.5	100 mM

5 M NaCl	700 mM
0.5 M EDTA-8.0	50 mM
CTAB	1%
14M BME	140 mM

Procedimiento:

1. Se calentó la solución amortiguadora de extracción (CTAB) a 65°C.
2. Se colocaron 50 mg de tejido macerado con nitrógeno líquido en un tubo de 2 mL.
3. Se le agrego 1 mL de solución amortiguadora CTAB. Se mezcló por inversión, para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora.
4. Se incubaron los tubos y se movieron con suavidad en un agitador de balance en un horno a 65°C durante 90 min.
5. Se retiraron los tubos del horno y se dejaron enfriar durante 5 a 10 min.
6. Se les agregaron 500 µL de cloroformo: octanol (24:1) y posteriormente se agitaron por inversión durante 10 min a temperatura ambiente.
7. Se centrifugaron a 3,500 rpm a temperatura ambiente durante 10 min para formar la fase acuosa (líquido claro de color amarillo) y la fase orgánica (de color verde oscuro).
8. Se recuperaron aproximadamente 750 µL de la fase superior acuosa y se pasó en un tubo nuevo de 1.5 ó 2.0 mL.
9. se le agregaron 1/2 volumen de isopropanol (2-propanol) al 100% previamente enfriado en un refrigerador a -20°C. Se mezcló por inversión para favorecer la precipitación del ADN, y los tubos se colocaron en un refrigerador a -20°C durante 30 min.
10. Se centrifugaron a 3,500 rpm a temperatura ambiente durante 30 min para precipitar y formar la pastilla de ADN en el fondo del tubo. Se desechó el isopropanol por decantación.
11. A cada tubo se le agregó 1 mL de alcohol al 75%. Se lavó suavemente la pastilla de ADN y se desechó el alcohol por decantación y se repitió el lavado.

Se dejó el alcohol a que se evaporara a temperatura ambiente hasta que la pastilla se secó.

12. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 1 mL de TE o agua doble destilada, y las muestras se guardaron a 4°C hasta que se utilizaron.

La cuantificación del ADN se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Para ajustar la cantidad de ADN requerida para los análisis correspondientes, la cual es de 50 ng de ADN, se utilizó el marcador de peso molecular øx174/HaeIII.

### **Análisis de SSR´s o microsatélites para la detección de variabilidad genética**

Se utilizaron 19 pares de microsatélites (Cuadro 4), en las 20 líneas con las que se trabajó.

**Cuadro 4.** SSR´S utilizados en las líneas de trigo harinero para resistencia a *Tilletia indica*.

<b>INICIADO R</b>	<b>SECUENCIA</b>	<b>REGION</b>	<b>TAMAÑO</b>
<b>BARC232</b>	F= CGCATCCAACCATCCCCACCCAACA R= CGCAGTAGATCCACCACCCCGCCAGA	5B	368 PB
<b>WMC47</b>	F= GAAACAGGGTTAACCATGCCAA R= ATGGTGCTGCCAACAACATACA	4B	141 PB
<b>WMC398</b>	F= GGAGATTGACCGAGTGGAT R= CGTGAGAGCGGTTCTTTG	6B	152 PB
<b>WMC235</b>	F= ACTGTTCCCTATCCGTGCACTGG R= GAGGCAAAGTTCTGGAGGTCTG	5B	235 PB
<b>WMC349</b>	F= ACACACACTCGATCGCAC R= GCAGTTGATCATCAAAACACA	4B	94 PB
<b>WMC415</b>	F= AATTCGATACCTCTCACTCACG R= TCAACTGCTACAACCTAGACCC	5B	161 PB
<b>WMS371</b>	F= GAC CAA GAT ATT CAA ACT GGC C	5B	170 PB

	R= AGC TCA GCT TGC TTG GTA CC		
<b>WMS271</b>	F= CAA GAT CGT GGA GCC AGC	5B	162 PB
	R= AGC TGC TAG CTT TTG GGA CA		
<b>WMS88</b>	F= CAC TAC AAC TAT GCG CTC GC	6B	121 PB
	R= TCC ATT GGC TTC TCT CTC AA		
<b>WMS200</b>	F= TCA ACG GAA CAG ATG AGC G	6A	250 PB
	R= GAC CTG ATG AGA GCA AGC AC		
<b>WMS169</b>	F= ACC ACT GCA GAG AAC ACA TAC G	6A	196 PB
	R= GTG CTC TGC TCT AAG TGT GGG		
<b>WMS135</b>	F= TGT CAA CAT CGT TTT GAA AAG G	1A	143 PB
	R= ACA CTG TCA ACC TGG CAA TG		
<b>WMS369</b>	F= CTG CAG GCC ATG ATG ATG	3A	188 PB
	R= ACC GTG GGT GTT GTG AGC		
<b>WMS52</b>	F= CTA TGA GGC GGA GGT TGA AG	3D	150 PB
	R= TGC GGT GCT CTT CCA TTT		
<b>BARC340</b>	F= GCA ACC AAG GCA GCG TAA ATG	7B Y 5B	221 PB
	R= GCG TGT AGC CGT CCA TAA GCA TCA T		
<b>BARC 349</b>	F= CGA ATA GCC GCT GCA CAA G	2B	105 PB
	R= TAT GCA TGC CTT TCT TTA CAA T		
<b>WMS299</b>	F= ACT ACT TAG GCC TCC CGC C	3B	208 PB
	R= TGA CCC ACT TGC AAT TCA TC		
<b>WMS383</b>	F= ACG CCA GTT GAT CCG TAA AC	3A, B Y D	195 PB
	R= GAC ATC AAT AAC CGT GGA TGG		
<b>WMC89</b>	F=ATGTCCACGTGCTAGGGAGGTA	4B	176 PB
	R= TTGCCTCCCAAGACGAAATAAC		

### Amplificación

1. Se preparó una mezcla de reacción con todos los componentes (Cuadro 5), excepto el ADN.

**Cuadro 5.** Mezcla para la reacción de PCR y amplificación de los microsatélites.

<b>Solución Concentrada</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Concentración 25 RXN</b>
<b>Amortiguador Taq (5x)</b>	1 X	40 $\mu$ l
<b>MgCl<sub>2</sub> (50 mM)</b>	2.5 mM	18.5 $\mu$ l
<b>Mezcla dNTP (2.5 mM de cada uno)</b>	200 $\mu$ M de cada uno	15 $\mu$ l
<b>Enzima taq (5U/<math>\mu</math>l)</b>	1 U	1.9 $\mu$ l
<b>Iniciadores F+R (1<math>\mu</math>M de cada uno)</b>	0.25 $\mu$ M de cada uno	50 $\mu$ l
<b>ADN (10 ng/<math>\mu</math>l)</b>	50 ng	4 $\mu$ l

2. Se agregó la muestra de ADN a cada pozo rotulado de la placa de micro titulación.
3. Se agregaron 5  $\mu$ L de la mezcla de reacción en cada pozo de la placa de micro titulación.
4. Se cubrió la placa con una tapa de silicón para evitar evaporación.
5. Las placas se colocaron en la máquina de PCR.
6. Se utilizó el siguiente programa: un ciclo a 94°C por un min; 30 ciclos de 94°C por un min, x °C por dos min (x está entre 50 y 68°C) y 72°C por dos min, y por último un ciclo a 72°C por 5 min.
7. Se agregaron 4  $\mu$ L de 5X SGB a cada pozo para cargar el gel y correr la electroforesis. El gel de agarosa que se preparó fue a una concentración de 3.5%, y se corrió con un amortiguador 1X TBE, se cargaron 5.5  $\mu$ L de producto de PCR en cada pocillo del gel y se corrieron a 120 voltios durante 1 hora y media. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 20 min, se lavaron con agua destilada, se colocaron en el transluminador de UV y se fotografiaron.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Incidencia y severidad del carbón parcial en germoplasma experimental de trigo harinero

#### Caracterización fenotípica del germoplasma de trigo harinero

Los resultados de incidencia y severidad se muestran en el cuadro 6. Las líneas presentaron un rango de incidencia de 0 a un 100%. Tres líneas no presentaron incidencia de la enfermedad (R3, BAJ #1/3/Kiritati//Attila\*2/Pastor; R8, Munal #1/Francolin #1; y R19, SWSR22T.B./5/KAUZ//Altar84/AOS/3/KAUZ/4/SW94.15464/6/2\*PRL/2\*Pastor). Las demás líneas presentaron un rango del 20 a un 100% de incidencia de la enfermedad; sin embargo, las líneas identificadas previamente como resistentes se mantuvieron como tales.

**Cuadro 6.** Incidencia y severidad de carbón parcial (*Tilletia indica*) en 10 trigos harineros resistentes y 10 susceptibles, después de inocularse artificialmente en campo, durante el ciclo agrícola 2014-2015 en el Campo Experimental Norman E. Bourlaug, Valle del Yaqui, Sonora.

Línea	Pedigrí	Incidencia (%)	Severidad (%)
R2	Kiritati//Attila*2/Pastor/3/Akuri	100	5.24
R3	BAJ#1/3/Kiritati//Attila*2/Pastor	0	0
R4	Chibia//PRLII/CM65531/3/SKAUZ/BAV92/4/MUNAL #1	40	0.93
R5	BAJ #1/3/Kiritati//Attila*2/Pastor	20	0.66
R7	TAM200/Pastor//TOBA97/3/Heilo C	60	3.3
R8	Munal #1/Francolin #1	0	0
R11	Saual/Kiritati//Saual	40	2.22
R12	Saual/4/CROC_1/Ae. tauschii	40	3.82

	(205)//KAUZ/3/Attila/5/Saual		
<b>R16</b>	ROLF07/Saual	80	8.12
<b>R19</b>	SWSR22T.B./5//KAUZ//Altar84/AOS/3//KAUZ/4/SW9 4.15464/6/2*PRL/2*Pastor	0	0
<b>S3</b>	ND643/2*WBLL1//Villa Juarez F2009	100	42.04
<b>S6</b>	Chewink #1/FRNCLN	100	62.39
<b>S9</b>	TAM200/Pastor//TOBA97*2/3/Munal	80	27.92
<b>S11</b>	Danphe #1*2/CHYAK	80	29.95
<b>S12</b>	Danphe #1*2/CHYAK	100	33.17
<b>S14</b>	Mutus*2/Haril #1	100	53.92
<b>S17</b>	Tacupeto F2001*2/Brambling//Whear/Sokoll	100	61.04
<b>S24</b>	MEX94.2.19//Sokoll/WBLL1/3/Whear/Sokoll	100	52.66
<b>S26</b>	PSN/BOW//SERI/3/Milan/4/Attila/5//KAUZ*2/CHEN// BCN/3/Milan/6/WBLL1*2	100	23.13
<b>KBSUS</b>	KBSUS	100	70.02

En cuanto a severidad las líneas; R3, R8 y R19, tuvieron un 0% posicionándose según la escala utilizada como sin carbón. Las líneas con mayor severidad fueron: KBSUS con un 79%, S6 con un 62.3% y S17 con un 61%, considerándose en la escala como susceptible, con lo cual se siguen manteniendo en líneas susceptibles. La resistencia genética es la herramienta más importante para el control de enfermedades y para disminuir los costos del cultivo al aplicar menos fungicidas al cultivo (Huerta-Espino y Singh, 1996). Estudios genéticos indican que ocho genes confieren resistencia al hongo (Fuentes- Dávila *et al.*, 1995), pero aún se desconocen cuáles son los mecanismos de resistencia que pudieran estar actuando en esta interacción.

Las líneas con mayor altura fueron S17 con 100 cm, S24 con 95 y S6 con 90, y la de menor altura fue KBSUS con 46.6 cm (Cuadro 7). Sin embargo estas líneas se encuentran dentro de las variedades enanas y semi-enanas según la escala de Paquet (1968), mientras que Huerta y González (2000) difieren de la escala y manejan que la altura de planta en siembras de riego puede ser doble

enana (menos de 70 cm), enana (70 a 80 cm), semi-enana (90 a 95 cm) y altas. La línea S26 mostró acame, KBSUS presentó un crecimiento erecto y el resto semi-postrado.

En cuanto a los días de floración las líneas se diferenciaron en dos grupos, uno con una media de 82 días que fueron las más precoces y otro con una media de 89 días a floración que fueron las más tardías.

En relación al peso de 1000 granos, las líneas con mayor peso fueron: S6 con 44.34 g y R12 con 44.41 g; las de menor peso fueron: R19 con 27.63 g y R8 con 27.75 g (Cuadro 8).

**Cuadro 7.** Características fenotípicas de 10 líneas experimentales de trigo harinero susceptibles a *Tilletia indica*.

Característica	S3	S6	S9	S11	S12	S14	S17	S24	S26	KBSUS
Días a emergencia	7	7	6	6	6	6	7	6	6	6
Porte de la planta	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °	0°	90°
Color de la hoja	VO	VO	VO	VO	VO	VC	VO	VO	VO	VO
Frecuencia de la hoja bandera recurvada	50	50	50	75	75	75	75	75	50	0
Glauscencia de la hoja bandera	AMD	D	D	D	D	D	D	AMD	AMD	AMD
Glauscencia de la vaina de la hoja bandera	AMD	D	D	D	D	D	D	AMD	AMD	AMD
Glauscencia del pedúnculo de la espiga	AMD	D	D	D	D	D	D	D	AMD	AMD
Glauscencia de la espiga	AMD	D	D	D	D	D	D	AMD	D	AMD
Largo de la hoja bandera	A	MA	MA	MA	MA	A	MA	AM	MA	MA
Ancho de la hoja bandera	MA	AN	MA	MA	MA	A	MA	AN	MA	MA
Días a espigamiento	82	82	82	82	82	82	89	89	82	
Altura de la planta	89	90	85	85	79.6	85	100	95	85	46.6
Sección del tallo	Medio	Medio	Medio	Hueco	Medio	Hueco	Medio	Hueco	Hueco	Medio
Color de la espiga	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla
Forma de la espiga vista de perfil	Piramidal	Piramidal	Piramidal	Bor. paralelos	Piramidal	Piramidal	Piramidal	Bor. paralelos	Piramidal	Piramidal
Largo de la espiga	10.24	10.1	11.22	9.6	11.18	9.78	10.48	10.46	10	5.28
Presencia de aristas	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Ausencia
Longitud del pico de la gluma	0.5	0.3	0.3	0.7	0.82	0.52	0.44	0.44	0.9	0.2
Forma del pico de la gluma	Recto	Recto	Recto	Lig. curvado	Recto	Recto	Lig. curvado	Lig. curvado	Lig. curvado	Lig. curvado
Forma del hombro de la gluma	Inclinado	Inclinado	Inclinado	Lig. inclinado	Inclinado	Inclinado	Lig. inclinado	Recto	Recto	Inclinado
Ancho del hombro de la gluma	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Estrecho	Ancho	Medio	Estrecho
Forma del pico de la lemma	Recto	Recto	Recto	Recto	Recto	Recto	Recto	Recto	Lig. curvado	Med. curvado
Forma del grano	Oval	Elongado	Elongado	Oval	Elongado	Oval	Elongado	Oval	Oval	Oval
Largo del grano	0.6	0.74	0.76	0.64	0.68	0.66	0.68	0.76	0.74	0.58
Ancho del grano	0.36	0.4	0.36	0.34	0.36	0.34	0.38	0.38	0.38	0.34
Profundidad del surco ventral	Profundo	Medio	Medio	Medio	Medio	Profundo	Medio	Medio	Medio	Medio
Forma del germen	Elongado	Elongado	Elongado	Oval	Oval	Oval	Elongado	Oval	Oval	Oval
Pigmentación antocianica del coleótilo	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Longitud de los pelos del cepillo	Medio	Medio	Medio	Corto	Corto	Medio	Medio	Medio	Medio	Corto
Coloración al fenol de los granos	Media	Media	Media	Clara	Media	Media	Nula	Oscura	Nula	Clara
Peso de mil semillas	33.339	44.432	38.957	40.718	32.239	36.676	34.392	41.3	40.902	33.68

VO: verde oscuro; VC: verde claro; AMD: ausente o muy débil; M: medio; D: débil; MA: media angosta; L: larga; A: angosta; ML: media larga.

**Cuadro 8.** Características fenotípicas de 10 líneas experimentales de trigo harinero resistentes a *Tilletia indica*.

Característica	R2	R3	R4	R5	R7	R8	R11	R12	R16	R19
Días a emergencia	8	8	7	7	8	8	8	8	8	7
Porte de la planta	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °	45 °
Color de la hoja	VO	VC	VO	VO	VO	VO	VO	VO	VO	VO
Frecuencia de la hoja bandera recurvada	25	25	25	75	75	25	50	75	25	75
Glaucencia de la hoja bandera	AMD	D	AMD	D	D	D	AMD	AMD	AMD	AMD
Glaucencia de la vaina de la hoja bandera	AMD	D	AMD	D	D	AMD	D	D	D	AMD
Glaucencia del pedúnculo de la espiga	AMD	D	AMD	D	D	AMD	AMD	AMD	AMD	AMD
Glaucencia de la espiga	AMD	D	AMD	D	D	AMD	AMD	AMD	AMD	AMD
Largo de la hoja bandera	M	M	M	L	M	L	ML	M	L	L
Ancho de la hoja bandera	MA	MA	MA	MA	A	MA	MA	A	MA	MA
Días a espigamiento	89	89	82	82	89	89	89	89	89	89
Altura de la planta	85.8	88.4	86.4	89.2	89.4	75.2	74.4	85	89.4	86.6
Sección del tallo	Hueco	Hueco	Medio	Hueco	Medio	Hueco	Hueco	Medio	Medio	Hueco
Color de la espiga	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla	Amarilla
Forma de la espiga vista de perfil	Piramidal	Piramidal	Bor. paralelos	Piramidal	Bor. paralelos	Bor. paralelos	Bor. paralelos	Bor. paralelos	Piramidal	Piramidal
Largo de la espiga	9.6	10.06	8.64	10.24	9.8	9.9	8.34	10.6	9.14	9.24
Presencia de aristas	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
Longitud del pico de la gluma	0.8	0.2	1	0.5	0.44	0.48	0.8	0.68	0.9	0.98
Forma del pico de la gluma	Recto	Recto	Recto	Recto	Recto	Lig. curvado	Lig. curvado	Recto	Recto	Lig. curvado
Forma del hombro de la gluma	Recto	Inclinado	Lig. inclinado	Inclinado	Inclinado	Lig. inclinado	Lig. inclinado	Inclinado	Inclinado	Lig. inclinado
Ancho del hombro de la gluma	Medio	Ausente	Estrecho	Ausente	Ausente	Estrecho	Medio	Ausente	Ausente	Ausente
Forma del pico de la lemma	Recto	Recto	Recto	Recto	Recto	Lig. curvado	Recto	Recto	Recto	Recto
Forma del grano	Elongado	Elongado	Oval	Oval	Elongado	Elongado	Elongado	Oval	Oval	Oval
Largo del grano	0.64	0.72	0.64	0.68	0.72	0.7	0.7	0.72	0.7	0.68
Ancho del grano	0.34	0.38	0.34	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.34	0.32
Profundidad del surco ventral	Medio	Superficial	Profundo	Medio	Profundo	Medio	Profundo	Medio	Medio	Medio
Forma del germen	Oval	Elongado	Oval	Oval	Oval	Oval	Elongado	Elongado	Oval	Oval
Pigmentación antociánica del coleóptilo	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Longitud de los pelos del cepillo	Corto	Medio	Medio	Medio	Corto	Corto	Medio	Medio	Medio	Medio
Coloración al fenol de los granos	Clara	Clara	Clara	Clara	Media	Clara	Media	Media	Clara	Clara
Peso de mil semillas	31.3694	35.3834	32.879	33.144	34.734	27.7564	35.06	44.41	38.03	27.63

VO: verde oscuro; VC: verde claro; AMD: ausente o muy débil; M: medio; D: débil; MA: media angosta; L: larga; A: angosta; ML: media larga.

Las líneas fueron homogéneas en la pigmentación antociánica del coleóptilo, en el color de la hoja solo dos líneas presentaron una coloración verde claro, mientras las demás líneas presentaron un color verde oscuro.

En el color de la espiga todas las líneas presentaron el mismo color amarillo, la forma del grano vario entre oval y elongado.

## Detección de compuestos asociados a la resistencia en germoplasma experimental de trigo harinero.

### Determinación de la actividad Fenilalanina Amonio Liasa

Los resultados de actividad Fenilalanina Amonio Liasa se muestran en el cuadro 9. Antes de la inoculación del germoplasma experimental con *Tilletia indica* la línea KBSUS tenía una concentración de 27.05  $\mu\text{L/mL}$ , y las líneas R2, R8 y R11 tenían una concentración de 26.42, 12.77 y 21.11  $\mu\text{L/mL}$ , respectivamente.

**Cuadro 9.** Concentración de Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) antes y después de la inoculación con *Tilletia indica*, de las líneas resistentes de trigo harinero R2, R8 y R11, y la línea susceptible KBSUS.

PAL (UL/ML)				
LINEA	ANTES DE LA INOCULACION	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
<b>KBSUS</b>	27.05938697	14.4077267	18.5584291	25.063857
<b>R2</b>	26.42081737	39.5514049	49.8084291	23.5871648
<b>R8</b>	12.77139208	34.8020434	29.6136654	19.1570881
<b>R11</b>	21.11270754	30.9307152	39.7908685	25.7822478

Después de la inoculación se observó una disminución de la cantidad de PAL (Cuadro 9) en las primeras 24 horas en la línea KBSUS (14.40  $\mu\text{L/mL}$ ), mientras que en las líneas R2, R8 y R11 la concentración de PAL aumentó (39.55, 34.80 y 30.93  $\mu\text{L/mL}$ , respectivamente).

A las 48 horas la concentración aumentó en KBSUS (18.55) y en las líneas R2 y R11 (49.80 y 39.79), mientras que en la línea R8 bajó (29.61).

A las 72 horas, nuevamente KBSUS tuvo un aumento (25.06), mientras que R2, R8 y R11 mostraron una reducción (25.58, 19.15 y 25.78, respectivamente).

Los niveles de esta enzima pueden fluctuar significativamente en intervalos de tiempo relativamente cortos en respuesta a una amplia variedad de estímulos y bajo ciertas condiciones (Hammerschmidt, 1999). Se puede inferir que las líneas resistentes se comportaron como tales, ya que posterior a la inoculación del patógeno estas líneas aumentaron la concentración de esta enzima la cual está ligada a la vía fenilpropanoide, la cual a su vez participa en la generación de compuestos fenólicos y algunas estructuras de defensa que la planta utiliza para defenderse del ataque de patógenos. Mientras que la línea susceptible baja su concentración y después tiene un ligero aumento.

### Actividad peroxidasa

Los resultados de la actividad peroxidasa se muestran a continuación en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Concentración de peroxidasa antes y después de la inoculación con *Tilletia indica*, de las líneas resistentes R2, R8 y R11, y de la línea susceptible KBSUS.

PEROXIDASA (UL/ML)				
LÍNEA	ANTES DE LA INOCULACION	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
KBSUS	122.3656566	8.23383838	20.5545455	11.2388889
R2	39.18585859	35.820202	58.8989899	10.4575758
R8	52.10757576	40.6883838	41.2893939	17.789899
R11	34.43787879	35.3994949	32.8752525	0.19953535

Antes de la inoculación, la línea KBSUS presentó una concentración (Cuadro 10) de 122.36  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , la línea R2 39.18, R8 52.10 y R11 34.43. A las 24 horas posteriores a la inoculación, KBSUS bajó la concentración a 8.23  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , R2 a 35.82, R8 a 40.68 y R11 subió a 35.39. A las 48 horas, KBSUS incrementó la

concentración a 20.55, R2 a 58.89, R8 a 4.281 y R11 bajó a 32.87. A las 72 horas KBSUS bajó a 11.23, R2 a 10.45, R8 a 17.78 y R11 a 0.19.

En el estudio realizado por Gogoi *et al.* (2001), la actividad de POX aumentó en todas las líneas de trigo después de la inoculación con *Tilletia indica*. Pero antes de la inoculación la actividad peroxidasa fue mayor en la línea susceptible, mientras que en las líneas resistentes la mayor actividad se registró a las 48 horas. En nuestro estudio, la línea susceptible tuvo una mayor concentración a las cero horas y fue disminuyendo conforme avanzó la infección del patógeno, mientras que la línea R8 tuvo una ligera disminución durante las primeras 48 horas, y luego tuvo otra disminución a las 72 horas; la línea R2 tuvo un aumento en la concentración a las 48 horas después de la inoculación, mientras que la línea R11 se mantuvo de manera constante desde las cero horas hasta las 48 horas, pero a las 72 horas hubo una fuerte reducción.

Estos resultados concuerdan con los encontrados en el estudio realizado por Gogoi *et al.* en 2001, ya que la línea susceptible fue la que tuvo mayor concentración a las cero horas, y la R2 tuvo una mayor concentración a las 48 horas posteriores a la inoculación del patógeno.

### **Determinación de compuestos fenólicos**

La concentración de fenoles totales de las líneas KBSUS, R2, R8 y R11, antes y después se muestran en la cuadro 11.

**Cuadro 11.** Concentración de fenoles totales antes y después de la inoculación con *Tilletia indica*, en las líneas resistentes R2, R8 y R11, y de la línea susceptible KBSUS.

FENOLES TOTALES (MG/ML)				
LINEA	ANTES DE LA INOCULACION	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
KBSUS	15.04067618	8.91811939	11.078711	8.47437929
R2	13.29741152	5.68515584	7.95668251	5.59535129
R8	14.52826202	9.43581616	7.91442155	6.65187533
R11	13.54569466	7.40729002	10.3391442	6.59904913

Antes de la inoculación, la línea KBSUS tuvo una concentración de 15.04 mg/mL, R2 de 13.29, R8 de 14.52, y R11 13.54 (Cuadro 11). Pasando las 24 horas después de la inoculación, KBSUS bajó su concentración a 8.91 mg/mL, R2 a 5.68, R8 a 9.43 y R11 a 7.40. A las 48 horas KBSUS subió su concentración a 11.07 mg/mL, R2 a 7.95, R8 bajó a 7.91, y R11 subió a 10.33. A las 72 horas, la línea KBSUS bajó a 8.47 mg/mL, R2 a 5.59, R8 a 6.65 y R11 a 6.59.

Según Matern y Kneusel (1988), el primer paso del mecanismo de defensa en las plantas implica una rápida acumulación de fenoles en el sitio de la infección, lo que restringe o desacelera el crecimiento del patógeno. Por lo tanto, el estado de fenoles totales en el trigo se ha correlacionado con la resistencia a enfermedades como la roya del tallo (Moerschbacher *et al.*, 1990), y el carbón parcial (Gill *et al.*, 1993).

En un estudio realizado por Gogoi *et al.* (2001), se determinó que la línea HD29, la cual es considerada resistente, obtuvo un nivel de fenoles más alto a las 48 horas después de la inoculación, mientras que en la línea susceptible WL 711 las concentraciones más altas se registraron a las cero horas y se redujo conforme avanzó el tiempo.

La cantidad de fenoles tiene una función importante en la resistencia de enfermedades en muchos de los cultivos, incluyendo al trigo (Onyeneho y Hettiarachchy, 1992). En este estudio realizado todas las líneas tuvieron presencia de fenoles, sin embargo las líneas tuvieron mayor concentración a las cero horas, ya que cuando el patógeno fue inoculado hubo una disminución en la concentración de fenoles; caso contrario al estudio que fue realizado por Gill *et al.* (1993), quienes encontraron que la línea resistente tenía una mayor concentración de fenoles a los 6 días posteriores a la inoculación. Se puede inferir que las líneas evaluadas fueron afectadas por el patógeno; esto se presentó por la baja concentración que tuvieron posteriores a la inoculación.

### **Cuantificación de proteínas**

Los resultados de cuantificación de proteínas totales se muestran en el cuadro 12.

**Cuadro 12.** Cuantificación de proteínas totales antes y después de la inoculación con *Tilletia indica*, de las líneas resistentes R2, R8 y R11, y de la línea susceptible KBSUS.

<b>PROTEINAS TOTALES (MG PROTEINA/MG TEJIDO)</b>				
<b>LINEA</b>	<b>ANTES DE LA INOCULACION</b>	<b>24 HORAS</b>	<b>48 HORAS</b>	<b>72 HORAS</b>
<b>KBSUS</b>	5.687931951	5.2333865	5.19351409	4.93301435
<b>R2</b>	5.438064859	5.6241361	5.5497076	5.11908559
<b>R8</b>	5.73312068	5.46996279	5.60021265	5.2333865
<b>R11</b>	5.467304625	5.4619883	5.46730463	5.42477406

En lo que respecta a la cuantificación de proteínas, antes de la inoculación la línea KBSUS presentó una concentración de 5.68 mg proteínas/mg de tejido, R2 5.43, R8 5.73 y R11 5.46 (cuadro 12). A las 24 horas posteriores a la inoculación, la línea KBSUS bajo su concentración a 5.23, R2 subió a 5.62, R8 bajó a 5.46 y R11 mantuvo su concentración en 5.46. A las 48 horas, la línea

KBSUS bajó concentración a 5.19, R2 bajó a 5.54, R8 subió a 5.60 y R11 mantuvo su concentración en 5.46.

A las 72 horas, la línea KBSUS bajó su concentración a 4.93, R2 bajó a 5.11, R8 bajó a 5.23 y R11 bajó un poco a 5.42.

La cantidad de proteínas difieren según las especies vegetales, mismas que forman el material básico de las células y de las enzimas, así como numerosos compuestos y hormonas (Navarro y Navarro, 2003).

### **Detección de variabilidad genética de líneas susceptibles y resistentes de trigo harinero a carbón parcial.**

Con el análisis de las 20 líneas de trigo harinero (10 resistentes y 10 susceptibles al carbón parcial), se generó una matriz binaria mediante el registro de presencia (1) o ausencia (0) de bandas de ADN de tamaño similar. Se determinó el grado de similitud entre los aislamientos utilizando el coeficiente de Jaccard, y se construyó un dendograma mediante el algoritmo UPGMA. La diversidad genética se calculó de acuerdo al programa taxonomía numérica y sistema de análisis multivariante NTSYSpc versión 2.10.

El coeficiente de Jaccard (Figura 14); dio los siguientes resultados en los cuales se originaron dos grandes grupos, dentro de los cuales hay cuatro subgrupos. Las distancias genéticas varían de 0.0 a 0.88% de similitud.

En el primero de los grupos, la línea KBSUS presentó 0.0 % de similitud, y está separada de todas las demás líneas. El segundo grupo se encuentra a una distancia de 0.33 % de similitud, dentro del cual se encuentran cuatro subgrupos; el primero se encuentra a 0.33% de similitud en el cual está la línea S6, el siguiente subgrupo se encuentra a 0.374% de similitud y dentro del cual se encuentran las líneas resistentes R19, R8, R7, R5, R4 y R3.



## CONCLUSIONES

- Las líneas resistentes y susceptibles se mantuvieron como tales en cuanto a incidencia y severidad de la enfermedad, luego de inocularse artificialmente con el hongo en campo.
- Las líneas R3, R8 y R19 no presentaron granos infectados.
- Se detectó variabilidad genética entre el germoplasma experimental utilizado en este estudio. La línea KBSUS presentó una similitud de 0.0%, lo que indicó una peculiar diferencia al resto, y quizás debido a su generación y base genética.
- En respuesta a la inoculación con el hongo, la producción de Fenilalanina amonio Liasa se incrementó significativamente a las 24 horas en las líneas resistentes, mientras que la producción de fenoles disminuyó; la producción de peroxidasa en las mismas líneas presentó variaciones; y la cantidad de proteínas totales se mantuvo uniforme.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press. Burlington. Massachusetts. USA. 922 p.
- APHIS. 1996. Karnal bunt: situation report updates (March 29). USDA-APHIS, Plant Protection and Quarantine (<http://www.aphis.usda.gov/oa/bunt>).
- Aujla, S.S., Sharma, Y. R., Chand, K., and Sawney, S. S. 1977. Influence of weather factors on the incidence and epidemiology of Karnal bunt disease of wheat in the Punjab. *Indian Journal Ecology*. 4:71-74.
- Aujla, S.S., Sharma, Y.R., and Grewal, A.S. 1979. Studies on Karnal bunt with particular reference to standardization of technique for screening of wheat varieties. In Proceedings 18th wheat research worker's workshop, all India coordinated wheat improvement programme. Indian Agricultural Research Institute. New Delhi. Ranchi. Bihar.
- Aujla, S.S., Sharma, I., and Singh, B.B. 1986. Effect of various fungicides on teliospore germination of *Neovossia indica*. *Journal of Research Punjab Agricultural University*. 23:442-443.
- Babadoost, M., Mathre, D.E., Johnston, R.H., and Bonde, M.R. 2004. Survival of Teliospores of *Tilletia indica* in Soil. *Plant Disease* 88(1):56-62.
- Bansal, R., D.V. Singh, and L.M. Joshi. 1983. Germination of teliospores of Karnal bunt of wheat. *Seed Res*. 11:258-261.
- Bansal, R., Singh, D. V., and Joshi, L. M. 1984. Effect of karnal-bunt pathogen (*Neovossia indica* (Mitra) Mundkur) on weight and viability of wheat seed. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 54(8):663-666.
- Bedi, K.S., Sikka, M.R. and Mundkur, B.B. 1949. Transmission of wheat bunt-*Neovossia indica* (Mitra) Mundkur. *Indian Phytopathology*. 2:20-26.
- Bonde, M.R., J.M. Prescott, T.T. Matsumoto, G.L. Peterson. 1987. Possible dissemination of teliospores of *Tilletia indica* by the practice of burning wheat stubble. *Phytopathology* 77:639 (Abstr.).

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Brennan, J.P., Warham, E.J., Hernandez, J., Byerlee, D., and Coronel, F. 1990. Economic Losses from Karnal bunt of wheat in Mexico. CIMMYT Economic Working Paper 90/02.
- Camacho-Casas, M.A., Félix-Valencia, P., Huerta-Espino, J., Salazar-Gómez, J.M. y Salazar-Huerta. F.J. 1993. Baviácora M92 y Arivechi M92: nuevas variedades de trigo harinero. Folleto Técnico Número 20. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Centro de Investigación Regional del Noroeste, Campo Experimental Valle del Yaqui. Ciudad Obregón, Sonora, México. 24 p.
- Castro-Duarte, A., Fuentes-Dávila, G. y Figueroa-López, P. 2005. Viabilidad de teliosporas de *Tilletia indica* Mitra después de ser ingeridas por diferentes tipos de aves comunes en el sur de Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23:19-23.
- Chona, B.L., Munjal, R.L., and Adlhaka, K.L. 1961. A method for screening wheat plants for resistance to *Neovossia indica*. *Indian Phytopathology*. 14:99-101.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F. pp. 100.
- Crous, P.W., Van Jaarsveld, A.B., Castlebury, L.A., Carris, L.M., Frederick, R.D., and Pretorius, Z.A. 2001. Karnal bunt of wheat newly reported from the African continent. *Plant Disease* 85:561.
- Da Luz, W.C., Mendes, M.A.S., Ferreira, M.A.S.V., and Urben, A.F. 1993. *Tilletia indica* on wheat in the south of the state of Rio Grande do Sul, Brazil and measures for eradication. *Fitopatologia Brasileira*. 18:S329.
- Delgado, S. 1984. Mexican phytosanitary policy in relation to Karnal bunt. In: *Karnal Bunt Disease of Wheat Proceedings of a Conference, April 16-18, 1984*. CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). Ciudad Obregón, Sonora, México. p. 27.

- Dhaliwal, H. S. 1989. Multiplication of secondary sporidia of *Tilletia indica* on soil and wheat leaves and spikes and incidence of Karnal bunt. Canadian Journal of Botany. 67:2387-2390.
- Dixon R. A. 1986. The phytoalexin response. Elicitation, signalling and control of host gene expression. Biological Reviews. 61:239-291.
- Durán, R., and G.W. Fischer.1961. The genus *Tilletia*. Washington State University Press. Pullman, WA, USA. 138 p.
- Duran, R. 1972. Further aspects of teliospore germination in North American smut fungi. II. Canadian Journal of Botany. 50:2569-2573.
- Figueroa-López, P., and Espinoza-Salazar, T. 1988. Tratamiento químico con fungicidas a la semilla de trigo para el control del carbón parcial *Tilletia indica* Mitra en laboratorio. Informe técnico del campo agrícola experimental valle del Yaqui. CAEVY-CIANO-INIFAP. pp. 22.
- Figueroa, L.P. y Valdés, A.J.C. 1991. Evaluación de fungicidas sistemáticos para el control del Carbón Parcial *Tilletia indica* (Mitra) en trigo en el Valle del Yaqui. Memorias XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, del 24 al 26 de julio de 1991. Puebla, Puebla, México. (Resumen). p 209.
- Figueroa-López P, y Álvarez-Zamorano R. 2000. Opus (epoxiconazole): una nueva opción para controlar al Carbón Parcial del trigo (*Tilletia indica* Mitra) en aplicación foliar. pp. 31-34. En: G. Fuentes-Dávila (ed.). XIIth Biennial Workshop on the Smut Fungi. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. 65 p.
- Fraser, B.P.1987. The diffusion of innovations: a comparison of a sense-making and traditional approach in a study of cannel use and homophily. Doctoral dissertation, University of Washington. Washington. D.C.
- Fuentes-Davila, G. 1984. Biology of *Tilletia indica* Mitra. M.S. Thesis. Department of Plant Pathology, Washington State University. Pullman, WA, USA. 66 pp.
- Fuentes-Davila, G., and S. Rajaram. 1992. Sources of resistance and breeding for resistance to *Tilletia indica* Mitra, the causal agent of the Karnal bunt disease of wheat. In: Proceedings of the VIIIth Biennial Workshop on the

Smut Fungi, June 6-8, 1992, Department of Plant Pathology, University of Georgia, USA. Page 4.

Fuentes-Dávila, G., Rajaram, S., Pfeiffer, W.H., Abdalla, O., Van-Ginkel, M., Mujeeb-Kazi, A., y Rodríguez-Ramos, R. 1993. Resultados de inoculaciones artificiales del 5o. vivero de selección para resistencia a *Tilletia indica* Mitra. Revista Mexicana de Micología 9:57-65.

Fuentes-Dávila, G. and S. Rajaram. 1994. Sources of resistance to *Tilletia indica* in wheat (*Triticum aestivum*). Crop Protection 13(1):20-24.

Fuentes-Dávila, G., Rajaram, S., and Singh, G. 1995. Inheritance of resistance to karnal bunt (*Tilletia indica* Mitra) in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Breeding. 114:250-252.

Fuentes-Dávila, G. 1996. Karnal bunt. pp. 26-32. In: R.D. Wilcoxson, and E.E. Saari (eds.). Bunt and smut diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, México, D.F. 66 p.

Fuentes-Dávila, G. 1997. Carbón parcial del trigo: situación actual y perspectivas. En: Memorias del primer simposio internacional de trigo. Cd. Obregón, Sonora, México. p.105

Fuentes-Dávila, G., Rajaram, S. y Van-Ginkel, M. 2001. La inoculación artificial: una herramienta eficiente para la selección de germoplasma resistente a carbón parcial. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Querétaro, Querétaro, México. Resumen, F-2.

Fuentes-Dávila, G., Rajaram, S. y van-Ginkel, M. 2001. Artificial Inoculation: An Efficient Tool in Breeding for Resistance. Ivth International Scientific Seminar of Plant Health-41st Annual Meeting of the American Phytopathological Society-Caribbean Division. Varadero, Cuba, June 11-15, 2001.

Fuentes-Dávila G, Tapia-Ramos E, Toledo-Martínez JA, y Figueroa-López P. 2005. Evaluación de efectividad biológica de folicur 250 EW (Tebuconazol) para el control del carbón parcial (*Tilletia indica*) del trigo (*Triticum aestivum*), en el valle del Yaqui, Sonora, México, durante el ciclo de cultivo 2003-2004. Libro de Resúmenes, XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos. 19-22 de Abril, 2005. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. Resumen HC-29, página 271. 640 p.

- Fuentes-Dávila G. 2007. Chemical control of karnal bunt by foliar applications. *Phytopathology* 97(7):S37. Supplement.
- Fuentes-Dávila, G., Figueroa-López, P., Cortés-Jiménez, J.M., Félix-Valencia, P., Camacho-Casas, M.A., Chávez-Villalba, G., Félix-Fuentes, J.L., and Ortiz-Ávalos, A.A. 2013. Effect of the level of wheat seed infection with karnal bunt, on germination and tiller production. *Annual Wheat Newsletter*. 59:45-48.
- Fuentes-Dávila, G., Félix-Valencia, P., Ayón-Ibarra, C.A., Figueroa-López, P., Camacho-Casas, M.A., Félix-Fuentes, J.L., Chávez-Villalba, G., and Rosas-Jáuregui, I.A. 2016. Biological effectiveness of several fungicides for control of karnal bunt (*Tilletia indica*) of wheat, in the field. *Annual Wheat Newsletter*. 62:28-31.
- Fuentes, S., James, W.C., Torres, E., Garcia, C., Delgado, S., and Elias-Calles, A. 1983. Karnal bunt of wheat: risk appraisal and evaluation of the efficacy of seed dressings to control seedborne inoculum. CIMMYT Report. 49 pp.
- Galarda, M.J.M., Miramontes, P.U., Muñoz, P.D., Hernández, R.G. y Montiel, S.F. 2005. Situación actual y perspectivas del trigo 1990-2006. En línea: [http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/trigo90-06.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/trigo90-06.pdf). Consultado el 16 de septiembre de 2016.
- García Valle, R. 1991. Diez Años de Carbón Parcial del trigo *Tilletia indica* Mitra, en el valle del Yaqui, Sonora. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Distrito de Desarrollo Rural 148-Cajeme, Coordinación Fitosanitaria.
- Gardner, J.S., J.V. Allen, W.M. Hess, and R.K. Tripathi. 1983a. Sheath structure of *Tilletia indica* teliospores. *Mycologia* 75:333-336.
- Gardner, J.S., W.M. Hess, and R.K. Tripathi. 1983b. Surface rodlets of *Tilletia indica* teliospores. *Journal of Bacteriology*. 154:502-504.
- Gill K.S., Sharma I., Aujla S.S. 1993. Karnal Bunt and Wheat Production. Punjab Agricultural University. Ludhiana, India. 153 pp.
- Goates, B.J. 1988. Histology of infection of wheat by *Tilletia indica*, the Karnal bunt pathogen. *Phytopathology*. 78:1434-1441.

- Gogoi, R., Singh, D.V., and Srivastava K.D. 2001. Phenol as a biochemical basis of resistance in wheat against Karnal bunt. Division of plant pathology, Indian Agricultural Research Institute (IARI), New Delhi, India. 470-476.
- Golstein D.B., Zhivotovsky L.A., Nayar K., Ruíz L.A., Cavalli-Sforza L.L. y Feltman M.W. 1996. Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y-chromosome. *Molecular Biology and Evolution*. 13:1213-1218.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C. y Ramesh, B. 1999. Review. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding*. 118:369-390.
- Grupo Consultor de Mercados Agrícolas (GCMA). 2014. México. D.F. <http://www.gcma.com.mx/>.
- Hanft, J.M. and Wych, R.D. 1982. Visual indicators of physiological maturity of hard red spring wheat. *Crop Science*. 22:584-587.
- Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Annual Review of Phytopathology*. 37:285-306.
- Heather M. Way, Kemal Kazan, Neena Mitter, Kenneth C. Goulter, Robert G. Birch and John M. Manners. 2002. Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60:275-282.
- Holton, C.S. 1949. Observations on *Neovossia indica*. *Indian Phytopathology*. 2:1-5.
- Huerta, E.J. y González, I.R.M. 2000. Tipos y grupos de trigo. In: el trigo de temporal en México. Villaseñor, MHE y Espitia, RE (eds.). SAGAR, INIFAP, CEVAMEX. Chapingo, Estado de México, 39-52 pp.
- Huerta-Espino, J. and Singh, R. P. 1996. Misconceptions on the durability of some adult leaf rust resistance genes in wheat. In: Proc. 9th European and Mediterranean Cereal Rust and Powdery Mildews Conference. Kema, G. H. J.; Niks, R. E. and Damen, R. A. (Eds.). Lunteren, the Netherlands. 109-111 pp.
- Jones, J.D y Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444: 323-329

- Joshi, L.M., Singh, D.V., Srivastava, K.D., and Wilcoxson, R.D. 1983. Karnal bunt: A minor disease that is now a threat to wheat. *The Botanical Review*. 49:309-330.
- Khanna, A., M. M. Payak, and S.C. Mehta. 1966. Teliospore morphology of some smut fungi. I. Electron microscopy. *Mycologia*. 58(4):562-569.
- Khanna, A., and M.M. Payak. 1968. Teliospore morphology of some smut fungi. II. Light microscopy. *Mycologia*. 60(3):655-662.
- Kiraly, Z., Farkas, G.L. 1962. Relation between phenol metabolism and stem rust resistance in wheat. *Phytopathology*. 52:657-64.
- Kiryukhina, R.I., y L.I. Shcherbakova. 1976. On the viability of the pathogen of Indian smut of wheat. *Zashchita Rastenii*. 7:50. (Abstr.).
- Kobrehel, K., Gautier, M. 1974. Variability in peroxidase isoenzymes in wheat and related species. *Canadian Journal of Botany*. 52:755-9.
- Korpinnen, E. 1963. Varietal purity examination. *Asociaton Internationale d'Éssais de Sementces*. Wageningen Hollande. 795 p.
- Korzun V., Börner A., Worland A.J., Lav C.N. and Röder M. 1997. Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.em.Thell) based on RFLPs and coefficient of parentage. *Theoretical and Applied Genetics*. 94:472–479.
- Krishna, A., and R.A. Singh. 1981. Aberrations in the teliospore germination of *Neovossia indica*. *Indian Phytopathology*. 34:260-262.
- Krishna, A., and Singh, R.A. 1982a. Effect of physical factors and chemicals on the teliospore germination of *Neovossia indica*. *Indian Phytopathology*. 35:448-455.
- Krishna, A., and R.A. Singh. 1982b. Investigation on the disease cycle of Karnal bunt of wheat. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*. 12:124.
- Krishna, A., and R.A. Singh. 1983. Longevity of teliospores of *Neovossia indica* causing Karnal bunt of wheat. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*. 13:97-98.

- Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M., and Dixon, R.A. 1989. Signals and transduction mechanism for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*. 56:215-224.
- Lampart, D.T.A. 1986. Roles of peroxidases in cell wall genesis. In: Greppin, H., Penel, C. and Gasper, T. (eds). *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University of Geneva Press. Geneva, Switzerland. 15-96 pp.
- Leighton, F. y Urquiaga, I. 2001. Polifenoles del vino y Salud Humana, Antioxidantes y Calidad de Vida. *Revista Antioxidantes y Calidad de Vida*. Pontificia Universidad Católica de Chile. En [www.antioxidantes.com.ar/home2.htm](http://www.antioxidantes.com.ar/home2.htm).
- Levine, A., Tanhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79:583-593.
- Lira, M. 1984. The Karnal bunt situation in north-west México. In: *Karnal Bunt Disease of Wheat Proceedings of a Conference, April 16-18, 1984, Cd. Obregon, Sonora, Mexico, CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo)*. 24-26 pp.
- Matern, U., Kneusel, R.E. 1988. Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica*. 16:15-70.
- Mathur, S. C., and S. Ram. 1963. Longevity of chlamydospores of *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur. *Science and Culture*. 29(8):411-412.
- McRae, W. 1934. Report of the imperial mycologist. *Scientific Reports of the Imperial Institute of Agricultural Research*. Pusa. India. 1932-1933. 134-160 pp.
- Metzger, R.J. 1984. Screening for genetic resistance in the field. In: *Karnal Bunt (Neovossia indica) Disease of Wheat. Proceedings of a Conference*. CIMMYT. Ciudad Obregon, Sonora, Mexico. 15-17 pp.
- Mitra, M. 1931. A new bunt of wheat in India. *Annals of Applied Biology*. 18:178-179.
- Mitra, M. 1935. Stinking smut (bunt) of wheat with special reference to *Tilletia indica* Mitra. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 5:51-74.

- Mitra, M. 1937. Studies on the stinking smut or bunt of wheat in India. *Indian Journal Agricultural Sciences*. 7:459-478.
- Moerschbacher, B.M., Noll, U.M., Gorrichon, L., Reisener, H.J. 1990. Specific inhibition of lignification breaks hyper-sensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiology*. 93:46-70.
- Mundkur, B.B. 1943. Karnal bunt, an air-borne disease. *Current Science*. 12:230-231.
- Munjal, R.L. 1975. Status of Karnal bunt (*Neovossia indica*) of wheat in Northern India during 1968-1969 and 1969-1970. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*. 5(2):185-187.
- Navarro, G.S. y Navarro, G.G. 2003. *Química Agrícola: química del suelo y de los nutrientes esenciales para las plantas*. Madrid. España. Editorial Mundi prensa, 2da edición, 438 pp.
- Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS). GOBBC. SAGARPA, 2002. B.C EN LINEA <http://www.oeidrusic.gob.mx/sispro/trigobc/Produccion/Mundial/Nacional2.pdf>. Consultado en Noviembre 2016.
- Onyeneho, S.N., Hettiarachchy, N.S. 1992. Antioxidant activity of durum wheat bran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 40:1496-1500. DOI: 10.1021 / jf00021a005.
- Ortiz-Monasterio, I., Sayre, K.D., Fuentes-Davila, G., Camacho C.M. y Moreno, O. 1993. Algunas prácticas agronómicas relacionadas con la incidencia de Carbón Parcial. En: Taller sobre las estrategias para el control del Carbón Parcial del trigo (*Neovossia indica*) en el estado de Sonora. Publicación Especial No. 6. Campo Experimental Valle del Yaqui - CIRNO. 47-58 pp.
- Paquet, J.1968. Etude de quelques problemas poses por une sselection pour le nanisme (Type DEMI-NAIN) chez le ble tendre. *Ann. Amell. Plants*. 18:3.
- Paz-Lago, D., Gutiérrez, A. y Luzardo, L.1998. Relevancia biológica de la enzima  $\beta$  1,3 glucanasa en la activación de la resistencia sistémica del tabaco inducida por la pared celular fúngica. *Cultivos Tropicales*. 19(3): 25-27 p.

- Peña, R.J., Amaya, A. y Del Toro, E. 1992. Efecto del almacenamiento y del lavado de grano en las características de calidad de muestras de trigo (variedad Seri M82) con diferentes niveles de carbón parcial (*Tilletia indica*). En: Estado actual de la investigación sobre el carbón parcial en México, G. Fuentes-Dávila y G.P. Hettel (eds.). Reporte Especial de Trigo No. 7, México, D.F. CIMMYT. 24-32 p.
- Peterson, G.L., M.R. Bonde, W.M. Dowler., and M.H. Royer. 1984. Morphological comparisons of *Tilletia indica* (Mitra) from India and Mexico. *Phytopathology*. 74:757 (Abstr.).
- Producción Mundial del Trigo. 2016. Consulta: 19 diciembre de 2016. Disponible en: <https://www.produccionmundialtrigo.com/>.
- Rai, R.C., and Singh, A. 1978. A note on the viability of wheat seeds infected with Karnal bunt. *Seed Research*. 6:188-190.
- Rai, R.C., and Singh, A. 1979. Effect of chemical seed treatment on seed-borne teliospores of Karnal bunt of wheat. *Seed Research*. 7(2):186-189.
- Rivas, M. J., Baltasar, A. M., Moreno, M.V., y Sánchez, G.F.L. 2007. Determinación de actividad peroxidasa en extractos crudos de diferentes vegetales. FES Zaragoza, UNAM. Iztapalapa, Distrito Federal, México.
- Rivera-Sánchez, M.P. y Fuentes-Dávila, G. 2001. Diversidad morfológica en la germinación de las teliosporas de *Tilletia indica*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19:110-115.
- Roberson, R.W., and E.S. Luttrell. 1987. Ultrastructure of teliospore ontogeny in *Tilletia indica*. *Mycologia*. 79:753-763.
- Robles-Sosa, S.D., and Fuentes-Dávila, G. 1996. Fungicide seed treatments for Karnal bunt control. Xth Biennial Workshop on the Smut Fungi. University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada. 51 p.
- Röder M.S., Plaschke J., König S.U., Börner A., Sorrells M.E., and Thanksley S.D. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics*. 246:327–333
- Salazar-Huerta, F.J., Smilanick, J., Prescott, J.M., Zillinsky, F., and Metzger, R. 1986a. Evaluación de 11 fungicidas aplicados al follaje en tres fechas de siembra para el control de carbón parcial *Neovossia indica* (Mitra)

Mundkur en trigo en el Valle del Yaqui, Sonora, Ciclo otoño-invierno 1985-86. CIANO-CAEVY. Cd. Obregón, Sonora, México.

Salazar-Huerta, F.J., Prescott, J.M., Navarro-Soto, A.R., and Espinoza-Salazar, T. 1986b. Tratamiento químico a la semilla de trigo para el control del carbón parcial *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur en laboratorio. Valle del Yaqui, Sonora. Ciclo otoño-invierno 1985-86. CAEVY-CIFAP, Cd. Obregón, Sonora, México.

Salazar-Huerta, F.J., Osada Kawasoe, S., Gilchrist Saavedra, L. y Fuentes-Davila, G. 1990. Evaluación de la resistencia de seis genotipos de trigo (*Triticum vulgare* L.) al Carbón Parcial causado por el hongo *Tilletia indica* Mitra en invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología. 8:145-152.

Salazar-Huerta FJ, Figueroa-López P, Smilanick JL, and Fuentes-Dávila G. 1997. Evaluation of foliar fungicides for control of Karnal bunt of wheat during 1986-1989 in northwestern Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología. 15:73-80.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-001-FITO-2001, por la que se establece la campaña contra el carbón parcial del trigo. Diario Oficial viernes 8 de Febrero, 2002. México, D.F. 1-18 pp.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2008. Anuarios estadísticos de la producción agrícola.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1987. Cuarentena interior No. 16 contra el Carbón Parcial del trigo. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Diario Oficial, (jueves) 12 de Marzo de 1987, México.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1995. Norma Fitosanitaria 001-95. Diario Oficial. 4 de agosto de 1995. México.

Secretaria de Hacienda y Crédito Público (SHCP). 2014. Panorama del trigo 2014. México. D.F.

Sekhon, K.S., Saxena, A.K., Randhawa, S.K., and Gill, K.S. 1980. Effect of Karnal bunt disease quality characteristics of wheat. Bulletin of grain Technology. 18 (3):208-212.

- Sekhon, K.S., Randhawa, S.K., Saxena, A.K., and Gill, K.S. 1981. Effect of washing/steeping on the acceptability of Karnal bunt infected wheat for bread, cookie and chapati making. *Journal of Food Science and Technology*. 18:1-2.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2014. México. D.F. [www.gob.mx/siap](http://www.gob.mx/siap).
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. Primera Edición. Benjamín franklin 146, Colonia Escandón, Delegación Miguel Hidalgo, C.P 11800. México D.F. 236 p. [www.gob.mx/siap](http://www.gob.mx/siap).
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60:73-76.
- Singh, A. and Prasad, R. 1978. Date of sowing and meteorological factors in relation to occurrence of Karnal bunt of wheat in U.P. Tarai. *Indian Journal of Mycology Plant Pathology*. 8:2.
- Singh, A., and R. Prasad. 1980. Control of Karnal bunt of wheat by a spray of fungicides. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*. 10(2):i. (Abstract).
- Singh, R. A. and A. Krishna. 1980. Some studies on Karnal bunt of wheat. In *Proceedings 19th all India wheat research worker's workshop, all India coordinated wheat improvement programme, Indian Agricultural Research Institute. New Delhi*.
- Singh, S.L., and Singh, P.P. 1985. Effect of some fungicide applications against Karnal Bunt (*Neovossia indica*) of wheat. *Indian Phytopathology*. 38:593. (Abstract).
- Singh, D.V., Joshi, L.M., and Srivastava, K.D. 1986. Varietal suceptibility and spread of Karnal Bunt of wheat in India. *Rachis*. 5:40-42.
- Singh, A., Singh, K.P., and Tewari, A.N. 1988. Salient findings of Karnal bunt research at Pantnagar. Department of Plant Pathology, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar.
- Singh, D.V., Agarwal, R., Shrestha, K.J., Thapa, R.B., and Dubin, H.J. 1989. First report of *Tilletia indica* on wheat in Nepal. *Plant Disease*. 73:273.

- Sivaprakasan, K., Vidhyasekaran, P. 1993. Phenylalanine ammonia lyase gene for crop disease management. In: Vidhyasekaran P, ed. Genetic Engineering, Molecular Biology and Tissue Culture for Crop Pest and Disease Management. Delhi, India: Daya Publishing House, 113-22 p.
- Smilanick, J.L., Hoffmann, J.A., and Royer, M.H. 1985. Effect of temperature, pH, light, and desiccation on teliospore germination of *Tilletia indica*. *Phytopathology*. 75:1428-1431.
- Smilanick, J.L., Dupler, M., Wiese, K., Hoffmann, J.A., Clark, D., and Dobson, D. 1986. Germination of teliospores of Karnal-, dwarf- and common-bunt fungi after ingestion by animals. *Plant Disease*. 70(3):242-244.
- Smilanick JL, Hoffman JA, Cashion NL, and Prescott JM. 1987. Evaluation of seed and foliar fungicides for control of Karnal Bunt of wheat. *Plant Disease*. 71:94-96.
- The Food and Environment Research Agency (DEFRA). 2011. United Kingdom national list/plant breeder's rights technical protocol for the official examination of distinctness, uniformity and stability (DUS) Wheat. Consultado el 15 de febrero de 2015. [www.defra.gov.uk/fera](http://www.defra.gov.uk/fera).
- Torarbi, M., Mardoukhi, V., and Jalaiani, N. 1996. First report on the occurrence of partial bunt on wheat in the southern parts of Iran. *Seed and Plant*. 12:8-9.
- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV). 1994. International convention for the protection of new varieties of plants of 2 December 1961, as revised in Geneva on 10 November 1972, 23 October 1978, and 19 March 1991, Publication 221, UPOV, Geneva.
- Valenzuela-Herrera, V., Fuentes-Dávila, G., Figueroa-López, P., Chávez-Villalba, G., Félix-Fuentes, J.L. y Mendoza-Lugo, J.A. 2011. Navojoa M2007, variedad de trigo harinero para el noroeste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34(1):73-76.
- Vance, C.P., Sherwood, R.T., Kirk, T.K. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 18:25-88.
- Villareal, R.L., A. Mujeeb-Kazi, G. Fuentes-Davila, S. Rajaram and E. Del Toro. 1994. Resistance to Karnal bunt (*Tilletia indica* Mitra) in synthetic hexaploid wheats derived from *Triticum turgidum* X *T. tauschii*. *Plant Breeding*. 112:63-69.

- Warham, E.J. 1984. Screening germplasm for genetic resistance in the greenhouse. In: Karnal Bunt (*Neovossia indica*) Disease of Wheat. 14 pp. Proceedings of a Conference, April 16-18, 1984. CIMMYT. Ciudad Obregón, Sonora, México. 35 p.
- Warham, E.J. 1988. Teliospore germination patterns in *Tilletia indica*. Transactions of the British Mycological Society. 90:318-321.
- Warham, E.J., and Prescott, J.M. 1989. Effectiveness of chemical seed treatments in controlling Karnal bunt disease of wheat. Plant Disease. 73:585-588.
- Wiese, M.V. 1977. Compendium of Wheat Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. USA. 112 p.
- Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, I. 1999. Induction of Defense responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology. 65 (3):1061-1070.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., and Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research. 14:415-421.
- Zhang, Z., L. Lange, and S.B. Mathur. 1984. Teliospore survival and plant quarantine significance of *Tilletia indica* (causal agent of Karnal bunt) particularly in relation to China. European Plant Protection. Bulletin. 14:119-128.
- Zipfel C., and Felix, G. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? Current Opinion in Plant Biology. 8:353-360.

