

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO POSTGRADO DE FITOSANIDAD FITOPATOLOGÍA

**SELECCIÓN DE GERMOPLASMA DE MAÍZ RESISTENTE AL
CARBÓN DE LA ESPIGA DEL MAÍZ (*Sporisorium reilianum* f. sp.
zeae), EN LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO**

ANDRÉS QUEZADA SALINAS

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO
2010**

La presente tesis titulada: **SELECCIÓN DE GERMOPLASMA DE MAÍZ RESISTENTE AL CARBÓN DE LA ESPIGA DEL MAÍZ (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zea*)**, EN LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO, realizada por el alumno: **ANDRÉS QUEZADA SALINAS** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

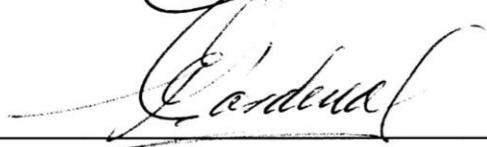
**DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. CARLOS DE LEÓN GARCÍA DE ALBA

ASESOR: 
DRA. ANA MARÍA HERNÁNDEZ ANGUIANO

ASESOR: 
DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

ASESOR: 
DRA. ELIZABETH CÁRDENAS SORIANO

ASESOR: 
DR. GILBERTO RENDÓN SÁNCHEZ

SELECCIÓN DE GERMOPLASMA DE MAÍZ RESISTENTE AL CARBÓN DE LA ESPIGA (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), EN LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO

Andrés Quezada Salinas, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010

El carbón de la espiga del maíz, causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, es una enfermedad de gran importancia en los estados de México e Hidalgo, en donde la mayoría de los genotipos utilizados son muy susceptibles. Durante el período de 2006 a 2009, se evaluaron diferentes técnicas de inoculación de semillas de maíz con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* y se determinó la resistencia a esta enfermedad en materiales procedentes de una población con amplia base genética de grano con endospermo blanco y otra con endospermo amarillo, derivadas de un programa de selección y mejoramiento para *S. reilianum* f. sp. *zeae* en los estados de México e Hidalgo. Se determinó que semillas inoculadas con una suspensión de 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} en 1% de carboximetilcelulosa de sodio, sembradas en macetas con suelo estéril e incubadas a 25 °C con fotoperíodo de 12 h luz, produjeron hasta 96.6% de infección en plántulas de maíz susceptible dando un alto y consistente porcentaje de infección durante la etapa de plántula. Con el uso de esta técnica de inoculación, en 258 líneas S_1 de endospermo blanco y 71 de endospermo amarillo, se registraron incidencias de 0 a 92.3 % y de 0 a 41.7%, respectivamente. En base a incidencia y características agronómicas, en campo se eligieron y autofecundaron las mejores líneas S_1 , generándose 123 y 114 líneas S_2 de endospermo blanco y amarillo, que mostraron una incidencia de la enfermedad de 0 a 42.8% y de 0 a 28.5%, respectivamente. Adicionalmente se evaluó la efectividad de diferentes fungicidas sobre la germinación de teliosporas *in vitro* y el control de la enfermedad en plantas de maíz mediante tratamiento a semilla. Se determinó que carboxín, carboxín+captán, tebuconazole y tebuconazole+thiram, inhibieron completamente la germinación de teliosporas y el desarrollo de colonias *in vitro* después de 96 h de incubación en oscuridad a 25 °C; en tratamiento a semilla, tebuconazole+thiram y tebuconazole resultaron en 0% de incidencia cuando se aplicaron en la dosis comercial recomendada de 300 y 500 mL $100 \text{ kg de semilla}^{-1}$, respectivamente.

Palabras clave: carboximetilcelulosa, teliosporas, inoculación de semilla.

SELECTION OF RESISTANT MAIZE GERMPLASM TO HEAD SMUT (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), IN HIGH VALLEYS OF MEXICO

Andrés Quezada Salinas, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010

Head smut of maize, caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, is a disease of great importance in the states of Mexico and Hidalgo, where the majority of the used genotypes are very susceptible. During the period from 2006 to 2009, different techniques were evaluated to inoculate maize seeds with teliospores of *S. reilianum* f. sp. *zeae* and determine the resistance to this disease in materials coming from wide genetic base populations with endosperm white or yellow, originated from a selection program and improvement for *S. reilianum* f. sp. *zeae* in the states of Mexico and Hidalgo. Results determined that inoculated seeds with a suspension of 1.7×10^7 teliospores mL^{-1} and 1% of sodium carboxymethylcellulose, sown in pots with sterile soil and incubation under 25 °C with photoperiod of 12 h light, produced 96.6% of infected susceptible maize seedlings giving a high and consistent percentage of infection during the seedling stage. With the use of this inoculation technique, in 258 S_1 lines with white endosperm and 71 with yellow endosperm, incidences from 0 to 92.3% and from 0 to 41.7% were registered, respectively. On the basis of incidence and agronomic characteristics, in a breeding nursery in field conditions the best S_1 lines were selected and self-pollinized, and 123 and 114 S_2 lines with white or yellow endosperm, were obtained; the incidence in these lines was from 0 to 42.8% and from 0 to 28.5%, respectively. Additionally, the effectiveness of different fungicides on the teliospore germination and the control of the disease on maize plants by means of seed treatment, were evaluated. Carboxin, carboxin+captan, tebuconazole and tebuconazole+thiram, completely inhibited the teliospore germination and colony development *in vitro* after 96 h of incubation at 25 °C in darkness; on seed treatment tebuconazole+thiram and tebuconazole resulted in 0% of incidence when they were applied at the commercial dose recommended of 300 and 500 mL 100 kg of seed⁻¹, respectively.

Key words: carboxymethylcellulose, teliospores, seed inoculation.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 176171 para realizar mis estudios de postgrado.

Al proyecto PM 0541 y PM 0542 “Desarrollo de cultivares de maíz (*Zea mays*) para el Altiplano de México con alto rendimiento y resistencia al carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), financiado por la Dirección General de Sanidad Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), por el financiamiento parcial de esta investigación.

Al Colegio de Postgraduados por las facilidades y contribución en el proceso de formación académica, profesional y personal

Al Dr. Carlos De León por su amistad y apoyo en la dirección, planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

A la Dra. Ana María Hernández Anguiano por su apoyo, acertadas aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación.

Al Dr. Cristian Nava Díaz por la orientación y aportaciones a este trabajo de investigación.

A la Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano por la orientación y seguimiento en todo momento de este trabajo.

Al Dr. Gilberto Rendón Sánchez por su apoyo en esta investigación.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz por sus consejos y amistad.

Al Dr. José Sergio Sandoval Islas por sus sugerencias y amistad.

A mis compañeros: Patricia Landa, Juan M. Tovar, Lauro Soto, José G. Florencio, Alma R. Solano, que de alguna manera participaron en la realización de esta tesis.

Al personal del Postgrado de Fitopatología que hicieron de mi estancia en el Colegio de Postgraduados una agradable experiencia.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Objetivos.....	3
CAPITULO I. EL CARBÓN DE LA ESPIGA DEL MAÍZ: <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>	4
1.1 Agente causal y síntomas.....	4
1.2 Ciclo de la enfermedad.....	5
1.3 Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad.....	7
1.4 Importancia económica del carbón de la espiga.....	7
1.5 Control.....	8
1.6 Literatura Citada.....	9
CAPITULO II. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE INOCULACIÓN DE SEMILLAS DE MAÍZ CON <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>	14
2.1 Resumen.....	14
2.2 Abstract.....	14
2.3 Introducción.....	15
2.4 Materiales y métodos.....	16
2.4.1 Recolección y almacenaje de teliosporas.....	17
2.4.2 Viabilidad de teliosporas.....	17
2.4.3 Inoculación de semillas de maíz con teliosporas de <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>	17
2.4.4 Evaluación de la infección.....	19
2.4.5 Identificación molecular del micelio infectivo.....	19
2.4.6 Relación entre concentración de inóculo y número de plántulas infectadas.....	20
2.5 Resultados y discusión.....	21
2.5.1 Viabilidad de teliosporas.....	21
2.5.2 Evaluación de los tratamientos de inoculación.....	21

2.5.3 Relación entre concentración de inóculo y número de plántulas infectadas.....	26
2.6 Conclusiones.....	27
2.7 Literatura citada.....	28
CAPITULO III. RESPUESTA DE LÍNEAS S₁ Y S₂ DE MAÍZ A LA INFECCIÓN POR <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>.....	31
3.1 Resumen.....	31
3.2 Abstract.....	32
3.3 Introducción.....	32
3.4 Materiales y métodos.....	34
3.4.1 Respuesta a la infección por <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> en líneas S ₁ de maíz.....	34
3.4.1.1 Material vegetal.....	34
3.4.1.2 Inóculo.....	34
3.4.1.3 Inoculación de semillas.....	35
3.4.1.4 Siembra.....	35
3.4.1.5 Evaluación de la infección.....	35
3.4.2 Respuesta a la infección por <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> en líneas S ₂ de maíz.....	36
3.5 Resultados y discusión.....	36
3.5.1 Respuesta a la infección por <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> en líneas S ₁ de maíz.....	36
3.5.1.1 Síntomas en plantas.....	36
3.5.1.2 Evaluación de la incidencia en líneas S ₁	37
3.5.2 Infección por <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> en líneas S ₂ de endospermo blanco y amarillo.....	40
3.6 Conclusiones.....	43
3.7 Literatura citada.....	43

CAPITULO IV. EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS PARA EL CONTROL DEL CARBÓN DE LA ESPIGA (<i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>) DEL MAÍZ.....	47
4.1 Resumen.....	47
4.2 Abstract.....	47
4.3 Introducción.....	48
4.4 Materiales y métodos.....	49
4.4.1 Evaluación de fungicidas <i>in vitro</i>	49
4.4.1.1 Aislamiento.....	49
4.4.1.2 Fungicidas.....	50
4.4.1.3 Germinación de teliosporas y formación de colonias.....	50
4.4.1.4 Concentración efectiva de fungicidas a la cual se inhibe el 50 y 90% de la germinación teliosporas y formación de colonias	51
4.4.2 Evaluación <i>in vivo</i> de fungicidas en el tratamiento a semilla.....	52
4.4.2.1 Material vegetal.....	52
4.4.2.2 Fungicidas.....	52
4.4.2.3 Inoculación de semilla.....	52
4.5 Resultados y discusión.....	53
4.5.1 Evaluación de fungicidas <i>in vitro</i>	53
4.5.1.1 Concentración efectiva de fungicidas a la cual se inhibe el 50 y 90% de la germinación teliosporas y formación de colonias.....	55
4.5.2 Evaluación <i>in vivo</i> de fungicidas en el tratamiento a semilla.....	56
4.6 Conclusiones.....	59
4.7 Literatura citada.....	60
CONCLUSIONES GENERALES.....	63

LISTA DE CUADROS

	Página
CAPITULO II	
Cuadro 1. Porcentaje de plántulas de maíz infectadas con <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> , generadas de semillas inoculadas con teliosporas utilizando diferentes tratamientos.....	26
Cuadro 2. Efecto de la concentración de inóculo de <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> en el porcentaje de infección de plántulas de maíz del híbrido AS-910.....	27
CAPITULO IV	
Cuadro 1. Formulación comercial de fungicidas seleccionados para evaluar su efecto en el control del carbón de la espiga del maíz (<i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>).....	50
Cuadro 2. Efecto de diferentes fungicidas adicionados al medio PDA en la germinación de teliosporas y la formación de basidiosporas de <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> a 25 °C en oscuridad durante 96 h de incubación.....	54
Cuadro 3. Efecto de diferentes dosis de fungicidas adicionados al medio PDA sobre el tamaño del tubo germinativo de teliosporas de <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> incubadas a 25 °C en oscuridad durante 96 h.....	55
Cuadro 4. Concentración efectiva de fungicidas a la cual se inhibe el 50 y 90% de germinación de teliosporas y desarrollo de colonias de basidiosporas de <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> incubadas a 25 °C en oscuridad durante 96 h.....	56
Cuadro 5. Porcentaje de incidencia del carbón de la espiga en plantas de maíz del híbrido AS-910, desarrolladas a partir de semillas tratadas con diferentes fungicidas.....	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPITULO I	
Figura 1. Fase saprofítica de <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> en medio de cultivo PDA. A) Teliosporas. B) Germinación de teliospora y desarrollo de basidio. C) Basidio septado en cuatro células con producción de basidiosporas.....	4
Figura 2. Plantas con síntomas del carbón de la espiga del maíz causados por <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> . A) Panoja. B) Mazorca.....	5
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> en maíz. Tomado y modificado de Kahmann y Kämper (2004).....	6
CAPITULO II	
Figura 1. Cortes transversales de tejido del mesocotilo de plántulas de maíz 25 d después de la siembra. A-C) Tejido de plántula no infectada. D-F) Tejido de plántula infectada. A) Células de la epidermis y parénquima. B) Células del parénquima. C) Células de la endodermis y cilindro vascular. D y E) Células del parénquima infectadas con micelio de <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> . F) Micelio intracelular de <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> infectando a células del parénquima cercanas a la endodermis.	23
Figura 2. Material vegetal con síntomas y signos del carbón de la espiga del maíz causado por <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> . Material colectado de plantas del híbrido AS-910 desarrolladas a partir de semillas inoculadas con una suspensión de 1% de carboximetilcelulosa de sodio y 1.7×10^7 teliosporas mL ⁻¹ , incubadas en condiciones controladas de 25 °C con 12 h de luz. A) Hoja con manchas cloróticas en nervadura central y lámina foliar 45 d después de la emergencia. B) Tejido con crecimiento de micelio intracelular obtenido de la zona clorótica de la hoja. C) Soros formados en panoja y mazorca, 102 d después de la siembra. D) Planta adulta con teliosporas en la panoja.....	24

Figura 3.	Productos de amplificación mediante PCR empleando el par de iniciadores SR1 y SR2; M. marcador molecular 1 kb; 1. ADN de colonias desarrolladas en medio de cultivo; 2. ADN de tejido vegetal de plántulas de maíz desarrolladas a partir de semillas inoculadas con <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> ; 3. ADN de tejido vegetal de plántulas de maíz desarrolladas a partir de semillas no inoculadas con el hongo; 4. Agua.....	25
------------------	--	----

CAPITULO III

Figura 1.	Síntomas del carbón de la espiga presentes en plantas de maíz provenientes de semilla inoculada con una suspensión de teliosporas de <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> de 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} a 1% de carboximetilcelulosa de sodio y sembradas en invernadero. A) Formación de soros en la mazorca. B) Formación de soros en la panoja.....	37
------------------	---	----

Figura 2.	Porcentaje de líneas S ₁ de maíz de endospermo blanco afectadas con carbón de la espiga en plantas en etapa de floración. A) Primera evaluación (2008). B) Segunda evaluación (2009).....	38
------------------	--	----

Figura 3.	Porcentaje de líneas S ₁ de maíz de endospermo amarillo afectadas con carbón de la espiga en plantas en etapa de floración. A) Primera evaluación (2008). B) Segunda evaluación (2009).....	39
------------------	--	----

Figura 4.	Porcentaje de líneas S ₂ de maíz de endospermo blanco afectadas con carbón de la espiga en plantas en etapa de floración (2009).....	41
------------------	---	----

Figura 5.	Porcentaje de líneas S ₂ de maíz de endospermo amarillo afectadas con carbón de la espiga en plantas en etapa de floración (2009).....	41
------------------	---	----

CAPITULO IV

Figura 1.	Plantas de maíz desarrolladas a partir de semilla inoculada con teliosporas de <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> , con formación de soros en panoja (A) y mazorca (B).....	58
------------------	--	----

INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz grano (*Zea mays* L.) es la principal fuente de alimentación humana en América. Se utiliza en más formas que cualquier otro cereal como alimento humano y para ganado, y para propósitos industriales. Cada parte de la planta tiene valor económico, el grano, las hojas, el tallo, las espiguillas y aún el raquis. De la industrialización del maíz se obtienen importantes subproductos utilizados como materias primas para la fabricación de telas, papel, cosméticos, materiales de lavandería, sasonadores, jarabes, saborizantes, botanas, galletas y cerveza. Los recientes usos del maíz en la industria incluyen la fabricación de plásticos, edulcorantes y etanol. La zeína, una proteína con propiedades termoplásticas, se usa para producir cintas adhesivas, linóleo y esmaltes. Actualmente, la semilla se refina para producir jarabes de alta fructosa, combustible y bebidas a base de alcohol, glucosa, dextrosa y almidón. La producción de etanol a partir de maíz ha sido un proceso de rápido desarrollo, debido en parte a la búsqueda de fuentes de energía alternativas.

Para el período 2009-2010 la producción mundial de maíz se estima en 794.04 millones de toneladas. Los principales países productores de maíz son, en orden de importancia: Estados Unidos de Norteamérica (329.05 millones de ton), China (160 millones de ton), la Unión Europea (55.87 millones de ton), Brasil (52 millones de ton), México (22.5 millones de ton), India (18.5 millones de ton), Argentina (14 millones de ton) y Sudáfrica (10.5 millones de ton); de los cuales se obtiene el 83.42% de la producción mundial. La producción anual de Estados Unidos de Norteamérica representa cerca del 41.43% del total mundial y se ha mantenido relativamente constante en los últimos años.

Por otra parte, México es uno de los países más importantes consumidores de maíz, con una gran tradición en este cultivo y un fuerte arraigo del producto como base de la alimentación de la población. La producción de maíz se da a todo lo largo y ancho del territorio nacional y se centra básicamente en la obtención de grano blanco para consumo. En este sentido la producción de los estados de Sinaloa, Jalisco, Guerrero, Michoacán, México, Veracruz y Guanajuato, aportan poco más del 50% de la producción nacional.

El maíz, como cualquier otro cultivo está expuesto a factores que le causan pérdidas en producción como son las condiciones ambientales, el potencial de producción, la fertilidad del suelo, la genética de cultivares y la acción sinérgica de diferentes plagas (malezas, enfermedades e insectos). En lo que se refiere a las enfermedades, todas las partes del maíz son susceptibles a un cierto número de ellas, las cuales reducen la capacidad de la planta para crecer de manera normal y, pueden producir en última instancia, la pérdida de la cosecha de grano. Una de estas enfermedades es el carbón de la espiga por el hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, presente en varios países con incidencias que van del 7.6% al 80%.

En México, el carbón de la espiga ha tenido mayor importancia en la zona del Bajío, donde ha ocasionado pérdidas de hasta el 30%. Sin embargo, esta problemática se ha extendido a los estados del altiplano del país (Hidalgo y México) afectando a una gran cantidad de maíces criollos e híbridos comerciales. En 1988, en el estado de Hidalgo se reportaron pérdidas de hasta el 50% de la superficie sembrada con híbridos susceptibles. Ante esta situación, se tomaron medidas tendientes a controlar la enfermedad con aplicaciones de fungicidas a la semilla y la evaluación de tolerancia o susceptibilidad de híbridos de maíz, siendo esta última medida la de mayor importancia. Sin embargo, en la actualidad se carece de material resistente a la enfermedad, se desconoce la eficiencia de los fungicidas utilizados en el tratamiento a semilla y se carece de un método eficiente de inoculación que permita seleccionar germoplasma resistente. Esto ha favorecido la dispersión del patógeno y el incremento en la superficie con problemas de carbón, ejemplo de ello es el Valle del Mezquital, Hgo., donde en el año de 1998 se registraron 16.6 ha con carbón de la espiga del maíz y en 2003 ya existían 1275 ha con este problema; situación similar ocurrió con el número de híbridos afectados con carbón, ya que en el mismo período el número aumentó de 3 a 27 híbridos susceptibles a la enfermedad.

Con estas evidencias, se hace necesario generar germoplasma tolerante al carbón de la espiga con características agronómicas que repercutan en un buen rendimiento y adaptabilidad a los Valles Altos de México. Para lograr lo anterior el presente trabajo se dividió en dos principales etapas, la primera consistió en desarrollar un método de inoculación que permitiera una alta incidencia de la enfermedad y, la segunda en utilizar

ese método para identificar y seleccionar materiales resistentes al carbón de la espiga procedentes de una población con grano de endospermo blanco y otra con endospermo amarillo, con amplia base genética derivadas de un programa de selección y mejoramiento para *S. reilianum* f. sp. *zeae* en los estados de México e Hidalgo. También, como método de control a corto plazo, se evaluó la eficiencia de diferentes fungicidas en el control de dicho patógeno.

Objetivos

1. Desarrollar e identificar una técnica de inoculación eficiente de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en semillas de maíz.
2. Identificar germoplasma de maíz resistente a *S. reilianum* f. sp. *zeae*.
3. Determinar la eficiencia de diferentes fungicidas en el control de *S. reilianum* f. sp. *zeae*.

CAPITULO I

EL CARBÓN DE LA ESPIGA DEL MAÍZ: *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*

1.1 Agente causal y síntomas

El carbón de la espiga del maíz (*Zea mays* L.), es causado por el hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon y Fullerton (Basidiomycota, Ustilaginaceae), sinónimo *Sphacelotheca reiliana* (Khün) Clinton. Este hongo se reproduce mediante teliosporas, las cuáles son de forma esférica a subesférica, de color café oscuro, equinuladas, con un diámetro de 6.4 a 11 μ (Figura 1A). Cuando las teliosporas germinan dan origen a un basidio (Figura 1B), el cual da origen a basidiosporas unicelulares saprofíticas (Figura 1C). El crecimiento esporidial ocurre en varios medios de cultivo, pero el crecimiento filamentoso se ha observado solo en la planta hospedante (Wilson y Frederiksen, 1970), o cuando este se ha desarrollado en medio de cultivo que contiene extracto de la planta hospedera (Bhaskaran y Smith, 1995).



Figura 1. Fase saprofítica de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en medio de cultivo PDA. A) Teliosporas. B) Germinación de teliospora y desarrollo de basidio. C) Basidio septado en cuatro células con producción de basidiosporas.

El principal síntoma de la enfermedad es el desarrollo de soros en la mazorca y/o panoja (Figura 2), los cuales sustituyen la formación de grano y polen ocasionando pérdidas en la producción (Njuguna, 1998; Baggett y Kean, 1989). Un soro es una masa compacta de teliosporas, cubierto con una delgada membrana de color blanca a

grisácea la cual al madurar se rompe y libera las teliosporas. También se han observado síntomas tempranos como el desarrollo de manchas cloróticas en hojas de plántulas infectadas, acumulación de antocianina en el tallo (Matyac y Kommedhal, 1985a) y enanismo de plantas ocasionado por el acortamiento de entrenudos (Stromberg *et al.*, 1984; Halisky, 1963).

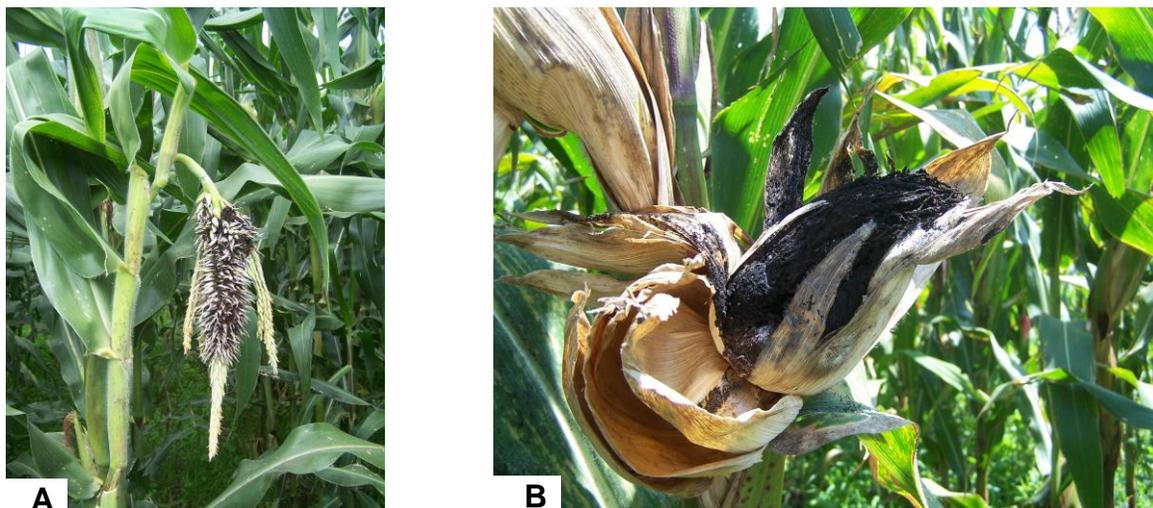


Figura 2. Plantas con síntomas del carbón de la espiga del maíz causados por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. A) Panoja. B) Mazorca.

1.2 Ciclo de la enfermedad

El hongo *S. reilianum* f. sp. *zeae* inverna como teliosporas en el suelo y ocasionalmente sobre la semilla. La supervivencia del hongo se ve favorecida en suelos con bajo contenido de humedad más que en los húmedos (Matyac y Kommedahl, 1986).

Cuando se presentan las condiciones óptimas de temperatura y humedad del suelo para el desarrollo de las teliosporas, éstas germinan dando origen a un filamento corto llamado promicelio o probasidio, en el cual el núcleo diploide migra y experimenta la meiosis dando como resultado cuatro células, cada una con un núcleo haploide. Estas células da origen a basidiosporas, las cuales dan origen a otras y así sucesivamente formando cadenas de células haploides denominadas esporidias. Las esporidias tienen la característica de poseer tipos de acoplamiento opuestos (+ y -), generalmente producidos en igual número (Ingold, 1994; Téféri *et al.*, 1989; Baier y Krüger, 1962).

Esporidias con tipos de acoplamiento opuesto se unen dando origen a hifas infectivas dicarióticas (binucleadas). Estas hifas dicarióticas infectan a las plántulas de maíz vía mesocotilo o raíz (Martinez *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2000; Fowler, 1985) e invaden sistémicamente los tejidos del meristemo y el tejido floral indiferenciado (Martínez *et al.*, 1999; Matyac, 1985; Fullerton, 1970). Durante la floración, tanto en la espiga como en la mazorca, aparecen soros, los cuales se forman por la aglutinación de gran cantidad de micelio (Pataky, 1999). Posteriormente las células binucleadas de las hifas (presentes en los soros) se agrandan y gelatinizan, subsecuentemente se separan y se forma una gruesa pared celular alrededor de cada una, dando origen a teliosporas diploides uninucleadas. La fusión nuclear (cariogamia) ocurre en algún punto durante la formación de la teliospora (Kahmann y Kämper, 2004). Al madurar, los soros se rompen y dejan expuesta la masa de teliosporas que es dispersada por el viento y lluvia (Montes y Díaz, 2006).

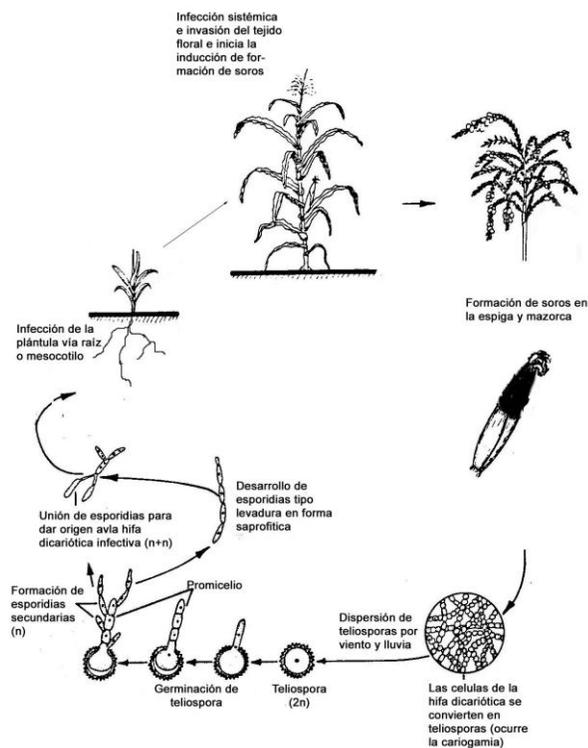


Figura 3. Ciclo de vida de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae* en maíz. Tomado y modificado de Kahmann y Kämper (2004).

1.3 Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad

Entre los factores que influyen en el desarrollo del carbón de la espiga del maíz se encuentran: la humedad y temperatura del suelo, la fertilidad, la distancia de siembra y el tipo de suelo. Al respecto, se ha reportado que la mayor cantidad de infección ocurre con temperaturas del suelo de 23-30 °C y con contenido de humedad bajo (Matyac y Kommedahl, 1985b; Baier y Krüger, 1962).

Los niveles de fertilidad del suelo pueden incrementar o reducir la frecuencia y desarrollo del carbón de la espiga. Esta enfermedad decrece cuando se aplica sulfato de amonio, pero se incrementa con la aplicación nitrato de calcio (Matyac y Kommedahl, 1985b). El tipo de suelo y distancia de siembra pueden afectar la incidencia de la enfermedad. Reportes indican que algunos tipos de suelos reducen la incidencia, aunque la enfermedad ha ocurrido en una gran variedad de ellos (Stromberg, 1981; Lynch *et al.*, 1980). Sin embargo, se ha observado un menor porcentaje de incidencia en suelos arcillosos que en los arenosos (Matyac y Kommedahl, 1985b).

Referente al efecto de otros factores agronómicos en la incidencia del carbón de la espiga, Mack *et al.*, (1984), reportan que la incidencia de la enfermedad se reduce con riegos tempranos y frecuentes (un total de 15-20 cm de agua durante los primeros 18 a 21 días después de la siembra), comparado con la no irrigación durante el mismo período. El porcentaje de infección se incrementa conforme aumenta la profundidad de siembra de 2.5 a 7.6 cm. Estos autores también reportan una menor infección en plantas que provenían de semillas grandes en comparación con las de semillas pequeñas.

1.4 Importancia económica del carbón de la espiga

El carbón de la espiga nunca ha sido una enfermedad devastadora, pero causa pérdidas importantes en el rendimiento en casi todas las regiones maiceras. En este contexto se han reportado pérdidas del 7.6% en Nueva Zelanda (Wright *et al.*, 2006), del 30-80% en Nepal (Pradhanang y Ghimire, 1996), del 31.35% en Minnesota (Stienstra, *et al.*, 1985) y del 70% en Kenya (Njuguna, 1998).

En México, el Bajío es la zona con mayor problemática ya que se han reportado pérdidas de hasta el 30% por esta enfermedad (Martínez y Ledesma, 1990). En los

últimos años, el carbón de la espiga se ha presentado con considerable incidencia en los Valles Altos (estados de México e Hidalgo), donde la mayoría de los híbridos utilizados son altamente susceptibles y no se cuenta con materiales resistentes. En Hidalgo, las pérdidas han alcanzado el 50% de la producción (Aguirre, 1988) y tanto la dispersión del patógeno como la superficie con problemas de carbón ha ido en aumento. Al respecto, en el año de 1998 había 16.6 ha con carbón de la espiga del maíz y para el 2003 ya existían 1275 ha con este problema; situación similar se presentó con el número de híbridos afectados con carbón, ya que en el mismo período el número aumentó de 3 a 27 híbridos afectados por la enfermedad (Pérez *et al.*, 2006).

1.5 Control

Debido a que el inóculo se encuentra en el suelo de cultivo, el control del carbón de la espiga se realiza principalmente mediante el uso de cultivares resistentes y tratamiento a la semilla con fungicidas, en donde el principal objetivo es evitar la infección durante el desarrollo de la plántula. La rotación de cultivos es poco recomendable y cuestionable debido a que las esporas pueden sobrevivir en el suelo por 2, 3 ó hasta 5 años (Wu *et al.*, 1981; Grisenko y Dudka, 1979; McDougall, 1941).

La identificación de genotipos resistentes a la enfermedad se ha realizado en China (Wang *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 1992), Kenya (Njuguna, 2001), Francia (Lübberstedt *et al.*, 1999), Estados Unidos de Norteamérica (Baggett y Koepsell, 1983) y Sudáfrica (Krüger, 1962). En México, a pesar de que es una enfermedad importante en la zona del Bajío y los estados de Hidalgo y México, los programas de mejoramiento no contemplan la selección para resistencia y únicamente se ha determinado el porcentaje de incidencia en materiales comerciales, en evaluaciones hechas bajo condiciones de infección natural.

Aunque por razones económicas y ecológicas, el cultivo de variedades resistentes es el principal medio de control, el uso de fungicidas como propiconazole ha resultado ser efectivo para reducir el porcentaje de infección por carbón de la espiga cuando la aplicación se realiza a la semilla (Wright *et al.*, 2006; Pradhanang y Ghimire, 1996; Martínez y Ledesma, 1990; Stienstra *et al.*, 1985; Simpson y Fenwick, 1971).

1.6 Literatura citada

- Aguirre, B. M. 1988. Validación del maíz de riego H-135 en el Distrito de Desarrollo Rural 063 de Mixquiahuala, Hgo., En: Primera Reunión Científica Forestal y Agropecuaria. Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de Hidalgo. INIFAP. Pachuca, Hidalgo, México.
- Baggett, J. R., and Kean, D. 1989. Reduction of plant height by head smut infection in sweet corn cultivars. *HortScience* 24:497-499.
- Baggett, J. R., and Koepsell, P. A. 1983. Field inoculation of sweet corn with the head smut pathogen (*Sphacelotheca reiliana*). *HortScience* 18:67-68.
- Baier, W., and Krüger, W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. II-Field studies on the effect of soil conditions. *South African J. of Agric. Sci.* 5:183–190.
- Bhaskaran, S., and Smith, R. H. 1995. Effect of proteolytic and glycolytic enzymes on a factor in *Sorghum bicolor* that induces mycelial growth in the smut fungus, *Sporisorium reilianum*. *Mycopathologia* 130:95-101.
- Duan, Y. Z., Li, X. X., Ai, F. Z., Yang, J. H., and Li, F. M. 1992. Selection and identification on resistance resource of corn head smut of Shanxi Province. *Acta Agric. Sin.* 1:83–86.
- Fowler, M. 1985. Diseases of maize in New Zealand. In: Maize management to market. Special Publication No. 4. Agron. Soc. New Zealand.
- Fullerton, R. A. 1970. An electron microscopy of the intracellular hyphae of some smut fungi (Ustilaginales). *Aust. J. Bot.* 18:285-292.
- Grisenko, G. V., and Dudka, E. L. 1979. The survival of chlamydospores of *Sporisorium reilianum* (Kuehn) McAlp., in the field. *Rev. Plant Pathol.* 58:496.

- Halisky, P. M. 1963. Head smut of sorghum, sudan grass, and corn, caused by *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. *Hilgardia* 34:287-304.
- Ingold, C. T. 1994. Products of teliospore germination in *Sporisorium* spp. *Mycol. Res.* 98:467-473.
- Kahmann, R., and Kämper, J. 2004. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytol.* 164:31-42.
- Krüger, W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. I. Infection and control studies, South Africa *J. Agric. Sci.* 5:43–56.
- Lübberstedt, T., Xia, X. C., Tan, G., Liu, X., and Melchinger, A. E. 1999. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reiliana* in maize. *Theor. Appl. Gen.* 99:593–598.
- Lynch, K. V., Edington, L. V., and Busch, L.V. 1980. Head smut: A new disease of corn in Ontario. *Canadian J. Plant Pathol.* 2:176-178.
- Mack, H. J., Baggett, J. R., and Koepsell, P. A. 1984. Effects of cultural practices on the incidence of head smut in sweet corn. *HortScience* 19:77-78.
- Martinez, C. A., Roux, C., Jauneau, A., and Dargent, R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f.sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94:505–514.
- Martinez, C. A., Jauneau, C., Roux, C., Savy, C., and Dargent, R. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Protoplasma* 213:83-92.
- Martinez, C., Roux, C., and Dargent, R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *Zee* in vegetative shoot apex of maize. *Biochem. Cell Biol.* 89:247-253.

- Martínez, R. J. L., y Ledesma, M. J. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint., del maíz, en el valle de Zapopan, Jalisco. Rev. Mex. Fitopatol. 8:68-70.
- Matyac, C. A. 1985. Histological development of *Sphacelotheca reiliana* on *Zea mays*. Phytopathology 75:924-929.
- Matyac, C. A., and Kommedahl, T. 1985a. Occurrence of chlorotic spots on corn seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. Plant Disease 69:251-254.
- Matyac, C. A., and Kommedahl, T. 1985b. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. Phytopathology 75:577-581.
- Matyac, C. A., and Kommedahl, T. 1986. Survival of teliospores of *Sphacelotheca reiliana* in soil. Phytopathology 76:487-490.
- McDougall, J. C. 1941. Report of the working of the Department of Agriculture in the Central Provinces and Berar for the year ending 31st March. Rev. Appl. Mycol. 20:289.
- Montes, G. N., y Díaz, F. A. 2006. Fitopatología. pp. 192-213. En: L.A. Rodríguez del Bosque (ed.). Campo Exptl. Río Bravo: 50 años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos. Cap. 12. Libro Técnico No. 1. Campo Exptl. Río Bravo. INIFAP. Río Bravo, Tamaulipas, México. 325 p.
- Njuguna, J. G. M. 2001. Combating head smut of maize caused by *Sphacelotheca reiliana* through resistance breeding. Seventh East. and South. Africa Reg. Mize Conf. pp 110-112.

- Njuguna, J. G. M. 1998. Potential for control of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* in CIMMYT maize germplasm. Sixth East. South. Africa Reg. Maize Conf. NARC Muguga, Nairobi, Kenya. pp. 67-68.
- Pataky, J. K. 1999. Smuts. pp 33-35. In: White D.G. (ed). Compendium of corn diseases. 3rd. Edit. St. Paul, MN. APS Press.
- Pérez, C. J. P., Bobadilla, M. M., Velásquez, C. G., Zacatenco, G. M. A., y Espinoza, C. A. 2006. Logros y aportaciones de la investigación en maíz de riego en el Valle del Mezquital, Hidalgo. pp. 55-65. En: Memorias de veinte años de investigación y desarrollo tecnológico. Campo Exptl. Pachuca, Hidalgo, INIFAP, Pachuca, México. pp: 55-65.
- Pradhanang, P. M., and Ghimire, S. R. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. Trop. Agric. 73:325-328.
- Simpson, W. R., and Fenwick, H. S. 1971. Suppression of corn head smut with Carboxin seed treatments. Plant Dis. Repr. 55:501-503.
- Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Stromberg, E. L., Matyac, C. A., Windels, C.E., and Morgan, F. 1985. Suppression of Corn head smut with seed and soil treatments. Plant Dis. 69:301-302.
- Stromberg, E. L. 1981. Head smut of maize: A new disease in Minnesota. Phytopathology 71:906.
- Stromberg, E. L., Stienstra W. C., Kommedahl T., Matyac C. A., and Windels C.E. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. Plant Dis. 68:880-884.

- Téféri, A., Petitprez, M., Valles, V., and Albertini, L. 1989. Influence of soil water potential and soil texture on infection of maize by head smut. *Agronomie* 9:677–682.
- Wang, Z. H., Li, X. H., Xie, C. X., Li, M. S., Hao, Z. F., George, M. L. C., Xiao, M. J., Gao, S. R., and Zhang, S. H. 2008. Genetic diversity in a collection of chinese maize inbred lines for resistance to head smut caused by *Sporisorium reilianum*. *Maydica* 53:47-54.
- Wilson, J. M., and Frederiksen, R. A. 1970. Histopathology and the interaction of *Sorghum bicolor* and *Sphacelotheca reilianum*. *Phytopathology* 60:828-832.
- Wright, P. J., Fullerton, R. A., and Koolaard, J. P. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetcorn (*Zea mays*). *New Zealand J. Crop Hort. Sci.* 34:23-26.
- Wu, X., Pang, Z., Tian, L., and Hu, J. 1981. On the environmental factors affecting infection and cultural measures of controlling corn head smut. *Acta Phytophylacica Sin.* 8:41-46.

CAPITULO II

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE INOCULACIÓN DE SEMILLAS DE MAÍZ CON *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*

2.1 Resumen

Durante 2006 y 2007, en el Colegio de Postgraduados, México, se evaluaron diferentes técnicas de inoculación de semillas de maíz con teliosporas del hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, agente causal del carbón de la espiga del maíz. El objetivo fue desarrollar e identificar un método de inoculación que permita un alto y consistente porcentaje de infección durante la etapa de plántula. El propósito es implementar su uso en programas de selección de germoplasma resistente a este patógeno. Se determinó que semillas inoculadas con una suspensión de 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹ y 1% de carboximetilcelulosa de sodio, sembradas en macetas con suelo estéril e incubadas en condiciones controladas de 25 °C con fotoperíodo de 12 h luz, produjeron 93.3% y 96.6% de infección en plántulas de maíz susceptible del criollo Blanco de Toluca y del híbrido AS-910, respectivamente. El porcentaje de infección se evaluó 25 días después de la siembra, mediante la detección de micelio en cortes transversales de los tejidos del mesocotilo, a este período de tiempo se observó que en las plántulas infectadas, el micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae* se desarrolló intracelularmente en el parénquima del mesocotilo, sin provocar síntomas visibles en el hospedante. La identidad del micelio presente en el mesocotilo se confirmó mediante la técnica de PCR al amplificar un fragmento de ADN de 0.96 kb con iniciadores específicos para *S. reilianum* f. sp. *zeae*.

Palabras clave: *Zea mays*, carbón de la espiga, carboximetilcelulosa, infección, teliosporas.

2.2 Abstract

Development of an inoculation method on maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. During 2006 and 2007, in the Colegio de Postgraduados, Mexico, different maize-seed inoculation techniques were evaluated with teliospores of the fungus *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, causal agent of head smut in maize. The

objective was to develop and identify an inoculation method of maize seeds with teliospores of *S. reilianum* f. sp. *zeae*, which induces a high and consistent infection percentage during the seedling stage. The purpose is to implement the use of such technique in selection programs of resistant germplasm to this pathogen. Results determined that inoculated seeds with a suspension of 1.7×10^7 teliospores mL^{-1} and 1% of sodium carboxymethylcellulose, sown in pots with sterile soil and incubation under controlled conditions at 25 °C with photoperiod of 12 h light, produced 93.3 and 96.6% of infected seedlings in susceptible criollo Blanco de Toluca and hybrid AS-910 maize cultivars, respectively. The infection percentage was evaluated 25 days after sown by means of mycelium detection in cross sections of mesocotyl tissues. At this period of time mycelium of *S. reilianum* f. sp. *zeae* developed intracellularly in the mesocotyl parenchyma of infected seedlings, without causing additional symptoms in the host. The identity of the mycelium present in mesocotyl was determined by PCR test. With this technique, amplified a fragment of DNA of 0.96 kb corresponding to the pathogen in study.

Key words: *Zea mays*, head smut, carboxymethylcellulose, infection, teliospores.

2.3 Introducción

El carbón de la espiga del maíz (*Zea mays* L.), causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton (Basidiomycota, Ustilaginaceae), sinónimo *Sphacelotheca reiliana* (Kuhn) Clint., se encuentra en varios países de Europa, Norte y Sur de América, México, China, Australia, Nueva Zelanda, India occidental, Palestina, y otros países. En México, es de mayor importancia en la zona del Bajío donde en 1956-1961 ocasionó pérdidas de 30%. Esta enfermedad se ha extendido a los estados de Hidalgo y México, y afecta a maíces criollos e híbridos de maíz. En Hidalgo, se han reportado pérdidas de 50% en la superficie sembrada con el híbrido H-133 (Pérez *et al.*, 2006).

La reducción en la producción causada por *S. reilianum* f. sp. *zeae* se debe principalmente a la infección sistémica y la producción de soros que reemplazan parcial o totalmente a la mazorca y panoja durante la floración afectando así la producción de grano. Los soros son estructuras fructíferas del hongo que incluyen las teliosporas, las cuales en el siguiente ciclo de cultivo germinan en el suelo, producen un basidio de

cuatro células y cada célula origina una basidiospora haploide (Ingold, 1994). La unión de dos aislamientos haploides compatibles dan origen al dicarion (hifa parasítica), que penetra la raíz de las plántulas de maíz (Martínez *et al.*, 2000) e invade los tejidos en forma sistémica hasta llegar al meristemo apical (Martínez *et al.*, 1999).

Debido a que la infección ocurre durante la germinación y las primeras etapas de desarrollo de la plántula de maíz, las estrategias de control se basan en evitar el contacto entre el patógeno y el hospedante durante estas etapas; por tanto, las principales tácticas de control son la aplicación de fungicidas a la semilla (Pérez *et al.*, 2005) y evaluación de resistencia a la infección de genotipos de maíz (Pérez *et al.*, 2006).

La obtención de materiales resistentes es el método más efectivo de control del carbón de la espiga, por ello se requieren técnicas de inoculación efectivas para promover la infección del hospedante por el patógeno. Los procedimientos se aplican en programas de mejoramiento genético tanto en invernadero como en campo con la finalidad de identificar y desarrollar germoplasma de maíz resistente a la enfermedad. Para lograr la infección de plántulas de maíz, se han usado mezclas de suelo con teliosporas y su deposición junto con semillas (Pradhanang y Ghimire, 1996; Whyte y Gevers, 1988; Matyac y Kommedahl, 1985b; Stromberg *et al.*, 1984), suspensiones de teliosporas aplicadas al momento de la siembra (Martínez y Ledesma, 1990; Baggett y Koepsell, 1983), inoculación hipodérmica de plántulas con basidiosporas (Craig y Frederiksen, 1992), e infiltración de teliosporas a la semilla mediante la generación de vacío (Metha, 1967). Sin embargo, estos métodos producen porcentajes de infección variables, lo cual limita su utilidad en un programa de selección de resistencia a la enfermedad. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue desarrollar e identificar un método de inoculación eficaz y práctico, con el cual se obtenga un alto y consistente porcentaje de infección de plántulas con la finalidad de que pueda implementarse en programas de selección de germoplasma de maíz resistente a la enfermedad.

2.4 Materiales y métodos

Esta investigación se realizó durante los años 2006 y 2007, en las instalaciones del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, estado de México. Cada ensayo se repitió dos veces.

2.4.1 Recolección y almacenaje de teliosporas

En el verano de 2006 se recolectaron panojas y mazorcas de plantas de maíz infectadas con *S. reilianum* f. sp. *zeae*, en lotes con siembras comerciales de maíz en el Municipio de Mixquiahuala, estado de Hidalgo, México. El material vegetal infectado se colocó en charolas de plástico y se dejó secar por 7 d en un invernadero, para posteriormente recuperar las teliosporas en bolsas de papel, donde se conservaron a 20 ± 2 °C hasta su utilización.

2.4.2 Viabilidad de teliosporas

Se utilizaron teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* previamente desinfectadas en una solución acuosa a 1% (peso/volumen) de CuSO_4 por 24 h, lavadas con tres cambios de agua destilada estéril y recuperadas en papel filtro.

La viabilidad del inóculo se verificó previo a los tratamientos de inoculación en semilla. Para ello se preparó una suspensión de 50 000 teliosporas mL^{-1} en agua destilada estéril y se depositó 1 mL por caja Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C por 48, 72 y 96 h. Se cuantificó el total de teliosporas germinadas en cuatro campos del microscopio de luz en 40X para calcular el promedio.

2.4.3 Inoculación de semillas de maíz con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae*

Semillas de maíz de los cultivares Criollo Blanco de Toluca (CBT) y del híbrido Aspros-910 (AS-910), ambos de endospermo blanco y susceptibles al carbón de la espiga, se desinfectaron con una solución a 1.5% de NaOCl por 3 min, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril y se secaron a 22 °C sobre papel absorbente estéril. Anterior a la inoculación de semillas, se verificó el efecto de la carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC), Agrocer 010, dispersante, esmalte y cápsulas sobre el porcentaje de germinación de las teliosporas; para esto, 1 mL de las suspensiones de esporas y NaCMC, Agrocer 010, dispersante, esmalte y cápsulas (5 capsulas disueltas en 100 mL de agua+0.1 g de teliosporas) se sembraron en cajas con medio de cultivo PDA con tres repeticiones. El medio inoculado en cajas de Petri se incubó en oscuridad a 25 °C por 96 h y se evaluó el porcentaje de germinación en tres campos a 40X por caja. Al no detectar diferencias en la germinación de las teliosporas después de estar en contacto

con estos compuestos (datos no presentados) se procedió a utilizarlos como vehículo en los siguientes tratamientos de inoculación en semilla:

1. Carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC). Se preparó una suspensión a 1% de NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En esta suspensión se incorporaron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron y se secaron a 22 °C.
2. Cápsulas. Cápsulas de colágeno y sorbitol se llenaron con teliosporas y se depositaron junto a semillas de maíz al momento de la siembra, depositando una cápsula por semilla.
3. Agrocerc 010. Se preparó una suspensión de Agrocerc 0.2 % (volumen/volumen (v/v)) y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En ésta suspensión se sumergieron 50 semillas de maíz por 1 min. Inmediatamente después las semillas se recuperaron y se secaron a 22 °C.
4. Dispersante. Se preparó una suspensión de 0.2 % (coadyuvante coloidal) (volumen/volumen (v/v)) y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En ésta suspensión se sumergieron 50 semillas de maíz por 1 min y se secaron a 22 °C.
5. Semilla impregnada con teliosporas. En una bolsa de polietileno se depositaron 3 g de teliosporas, se agregaron 50 semillas de maíz y se mezclaron por 1 min.
6. Semilla con daño mecánico e impregnada con teliosporas. Entre dos papeles lija No. 4 se frotaron 50 semillas de maíz por 1 min, se depositaron en una bolsa de polietileno con 3 g de teliosporas y se mezclaron por 1 min.
7. Esmalte. En una bolsa de polietileno se depositaron 3 g de teliosporas, se agregaron 50 semillas de maíz y se agitaron por 1 min. Las semillas se extrajeron y, después de rociarlas con esmalte en aerosol por 1 min, se secaron a 22 °C.
8. Testigo. Semilla desinfectada.

Las semillas de maíz inoculadas de los tratamientos anteriores se sembraron en macetas con suelo estéril con pH de 8.0, conductividad eléctrica de 5.08 dSm^{-1} , contenido de materia orgánica de 3.23% y textura franco-arenosa (arena 75.6%, limo 14.5% y arcilla 9.9%). Se utilizaron siete macetas por tratamiento y cinco semillas por maceta. El arreglo experimental fue de bloques completamente al azar. Las macetas se colocaron en una cámara bioclimática (Warren Sherer mod. CEL 38-15) y se incubaron a 25 °C con un fotoperíodo de 12 h luz.

2.4.4 Evaluación de la infección

El número de plántulas infectadas, registradas en los diferentes tratamientos, se determinó mediante la detección de micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae* 25 d después de la siembra. Para esto se colectaron 30 plántulas por tratamiento para realizar cortes transversales del mesocotilo con navaja de afeitar en el microscopio estereoscópico. Las secciones se tiñeron con azul de algodón a 0.5% en lactofenol por 3 min, se colocaron en una solución de safranina a 1% en etanol 70% por 1 min, y se lavaron en glicerol 70% por 1 min. Las secciones se montaron en glicerol 70% y se examinaron en un microscopio compuesto (Carl Zeis, 40X). Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y separación de medias mediante la diferencia mínima significativa a un nivel de significancia de 0.05 y 0.01. Las imágenes de tejido se tomaron con una cámara digital Moticam 2300.

Las plántulas restantes de cada tratamiento se conservaron en macetas bajo las mismas condiciones en la cámara bioclimática para registrar desarrollo de síntomas característicos de la enfermedad.

2.4.5 Identificación molecular del micelio infectivo

La identidad del micelio observado en los tejidos del mesocotilo se verificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con los iniciadores SR1 5'-CAGGTTATGTATGGGCCG-3' y SR2 5'-TTGAGCGATGACCATTCC-3', específicos para *S. reilianum* f. sp. *zeae* (Xu *et al.*, 1999). Para la extracción de ADN, tanto de tejido vegetal como de basidiosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae*, se utilizó el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 2009) siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

El ADN de tejido vegetal se obtuvo del mesocotilo de plántulas 25 días después de su siembra, procedentes tanto de semillas inoculadas con el hongo (1% de NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1}) como de semillas sin inocular (Testigo). Para obtener el ADN de basidiosporas se preparó una suspensión de 50 000 teliosporas mL^{-1} en agua destilada estéril y se depositaron 0.5 mL de la suspensión por caja Petri con medio de cultivo PDA. Cada alícuota se distribuyó uniformemente sobre el medio de cultivo con un triángulo de vidrio estéril y las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C por 72 h para

el desarrollo de colonias de basidiosporas. Finalmente, se rayaron colonias separadas sobre PDA para obtener aislamientos monoesporidiales de las cuales se extrajo el ADN. Las pruebas de PCR incluyeron un testigo positivo (ADN de basidiosporas), un testigo negativo (ADN de tejido vegetal de plantas testigo sin inocular) y muestras de plantas inoculadas (ADN de tejido vegetal de plantas desarrolladas a partir de semillas inoculadas).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μL y por cada reacción se utilizó un tubo para PCR en el cual se adicionaron los siguientes reactivos: 10 μL de GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega), 5 μL de MgCl 25 mM, 1 μL de mezcla de nucleotidos a 10 mM de cada uno, 1 μL de cada iniciador a 1 μM , 0.25 μL de la enzima GoTaq[®] ADN polimerasa (5u/ μL), 4 μL de DNA correspondiente y 27.75 μL de agua libre de nucleasa. Los reactivos se mezclaron con un paso de vórtex y la mezcla se centrifugó por 5 segundos. Las reacciones PCR se realizaron con los siguientes parámetros: 1 ciclo de 4 min a 94 °C, 1 min a 56 °C y 2 min a 72 °C, seguido por 36 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C y 2 min a 72 °C. El programa finalizó con 10 min a 72 °C. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1%, se tiñeron con bromuro de etidio y visualizaron en un transiluminador UV. La detección de un fragmento de 0.96 kb fue evidencia de la presencia de *S. reilianum* f. sp. *zeae* en el tejido vegetal, de acuerdo a Xu *et al.*, (1999).

2.4.6 Relación entre concentración de inóculo y número de plántulas infectadas

Teliosporas desinfectadas se utilizaron para preparar diferentes concentraciones de inóculo en agua destilada estéril. Con la cámara de Neubauer se calculó una suspensión inicial a 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . Mediante diluciones se prepararon suspensiones de 2×10^6 , 4×10^6 , 6×10^6 , 8×10^6 , 1×10^7 , 1.2×10^7 , 1.4×10^7 y 1.6×10^7 teliosporas mL^{-1} . Por cada 100 mL de suspensión se agregó 1 g de NaCMC en donde se sumergieron 30 semillas de maíz del híbrido AS-910 por 1 min, se recuperaron y se secaron a 22 °C. Las semillas de maíz tratadas se sembraron en macetas con suelo estéril, 6 semillas por maceta por tratamiento. Las macetas se colocaron en una cámara bioclimática (Warren Sherer mod. CEL 38-15) a 25 °C y 12 h luz, en un arreglo de diseño experimental completamente al azar. La infección se evaluó en plántulas de maíz 25 d después de la siembra, mediante la detección de micelio en el mesocotilo

utilizando la técnica de tinción con azul de algodón y safranina. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y separación de medias mediante la diferencia mínima significativa a un nivel de significancia de 0.05 y 0.01.

2.5 Resultados y discusión

2.5.1 Viabilidad de teliosporas

En medio de cultivo PDA a 25 °C, se registró 19, 29.8 y 35.4 % de germinación de teliosporas después de 48, 72 y 96 h, respectivamente. Las teliosporas formaron un basidio septado con cuatro células, cada una de las cuales originó una basidiospora que desarrolló colonias tipo levadura de color crema. La desinfección de esporas con CuSO₄ al 1% inhibió la germinación de contaminantes como *Fusarium* spp.

Los porcentajes de germinación de teliosporas observados en esta investigación después de 24 h de incubación fueron superiores a los reportados por Osorio y Frederiksen (1998), quienes obtuvieron germinaciones máximas de 12% en PDA y 28% en agua-sucrosa-agar después de 24 h de incubación. Las diferencias pueden deberse a las condiciones de almacenaje, incubación y medio de crecimiento utilizado. Pai y Pan (1964) observaron que teliosporas de *S. reilianum* almacenadas por 30 d sobre papel húmedo a 30-35 °C germinaron a una tasa de 60-90% en una solución de sucrosa; sin embargo, cuando se mantuvieron durante el mismo tiempo en un ambiente frío y seco, la germinación fue 10%. En el presente estudio teliosporas conservadas en bolsas de papel a 20±2 °C registraron un porcentaje máximo de germinación de 35.4%.

2.5.2 Evaluación de los tratamientos de inoculación

Ninguno de los compuestos o material utilizados como vehículo para la inoculación (NaCMC, Agrocer 010, dispersante, esmalte o cápsulas) tuvo efecto negativo en la germinación de las teliosporas, las cuales presentaron entre 34.2 y 35.4% de germinación después de 96 h de incubación en oscuridad a 25 °C. En las plantas testigo y en las que resultaron libres de infección, después de cada tratamiento con el hongo, no se registró micelio ni alteraciones morfológicas en las células de los tejidos del mesocotilo (Figura 1A-1C). En contraste, en el parénquima y en la zona cercana a la endodermis, de las plántulas infectadas, se observó intracelularmente micelio delgado (0.9-1.3 µm), liso y septado (Figura 1D-1F).

En el mesocotilo de plántulas infectadas, el micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae* se desarrolló intracelularmente sin causar alteraciones en las células colonizadas ni desarrollo de síntomas, pero no proliferó en los tejidos vasculares. Lo anterior coincide con lo reportado por Martínez *et al.* (1999), quienes observaron que las células infectadas del meristemo vegetativo tienen una actividad normal, por lo que el hongo actúa como un endófito biotrófico durante las primeras etapas de su desarrollo. Aunque contrasta con lo reportado por Matyac (1985), quien encontró micelio de *Sphacelotheca reiliana* en el floema y el xilema de plantas de maíz.

Por otra parte, las plantas inoculadas con teliosporas desarrollaron síntomas característicos de la enfermedad. A los 45 d después de la emergencia y a partir de la cuarta hoja, se registraron manchas cloróticas (1-2 mm de diámetro), tanto en la lámina foliar como en la nervadura central (Figura 2A). En cortes transversales de estas zonas cloróticas, se observó la presencia de micelio intracelular que fue más abundante en la zona con clorosis (Figura 2B). A los 102 d después de la siembra, se encontró formación de soros tanto en la panoja como en la mazorca de las plantas. Las panojas fueron parcialmente invadidas por el carbón, lo que afectó el desarrollo de las espiguillas y con ello la producción de polen (Figura 2C). Así mismo, la producción de grano resultó afectada por el desarrollo de soros en la mazorca (Figura 2C).

El reemplazo total o parcial de las estructuras de la panoja y la mazorca por soros, es una de las principales características de la infección y del desarrollo de la enfermedad por *S. reilianum* en maíz (Pataky, 1999; Matyac y Kommedahl, 1985a). Por otra parte, Foster y Frederiksen (1977) registraron el desarrollo de manchas cloróticas en hojas como el síntoma inicial en el desarrollo de la enfermedad en plántulas. En el presente trabajo, tanto las plántulas del cultivar CBT como las de híbrido AS-910 presentaron manchas cloróticas en etapas tempranas y posteriormente desarrollaron soros durante la etapa de floración. Por lo anterior, la aparición de pequeñas manchas cloróticas a partir de la cuarta hoja podría usarse como un indicador de la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en maíz. Previamente, Matyac y Kommedahl (1985b) usaron este síntoma como un indicador indirecto de la infección en plantas inoculadas artificialmente y desarrolladas en invernadero.

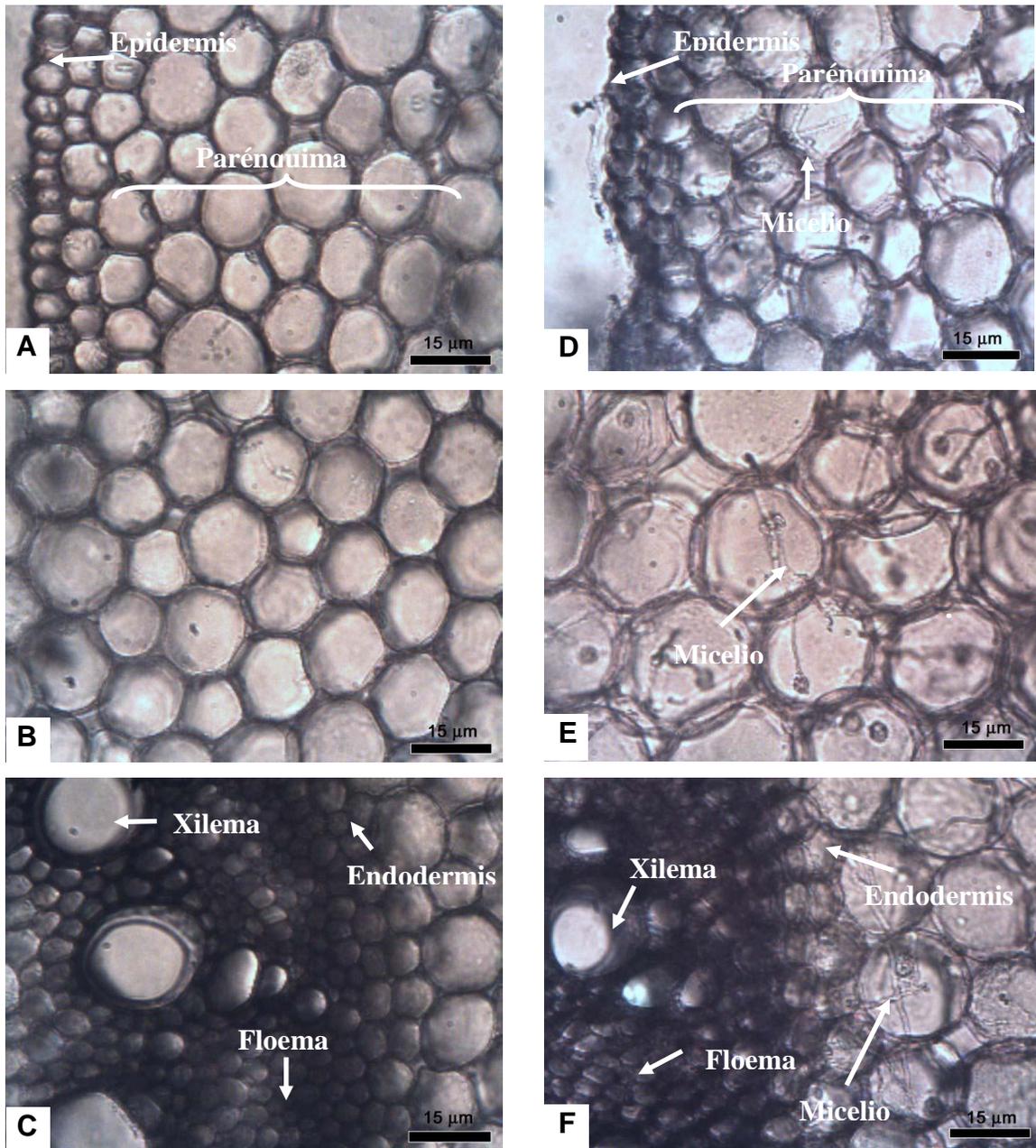


Figura 1. Cortes transversales de tejido del mesocotilo de plántulas de maíz 25 d después de la siembra. A-C) Tejido de plántula no infectada. D-F) Tejido de plántula infectada. A) Células de la epidermis y parénquima. B) Células del parénquima. C) Células de la endodermis y cilindro vascular. D y E) Células del parénquima infectadas con micelio de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zea*. F) Micelio intracelular de *S. reilianum* f. sp. *zea* infectando a células del parénquima cercanas a la endodermis.

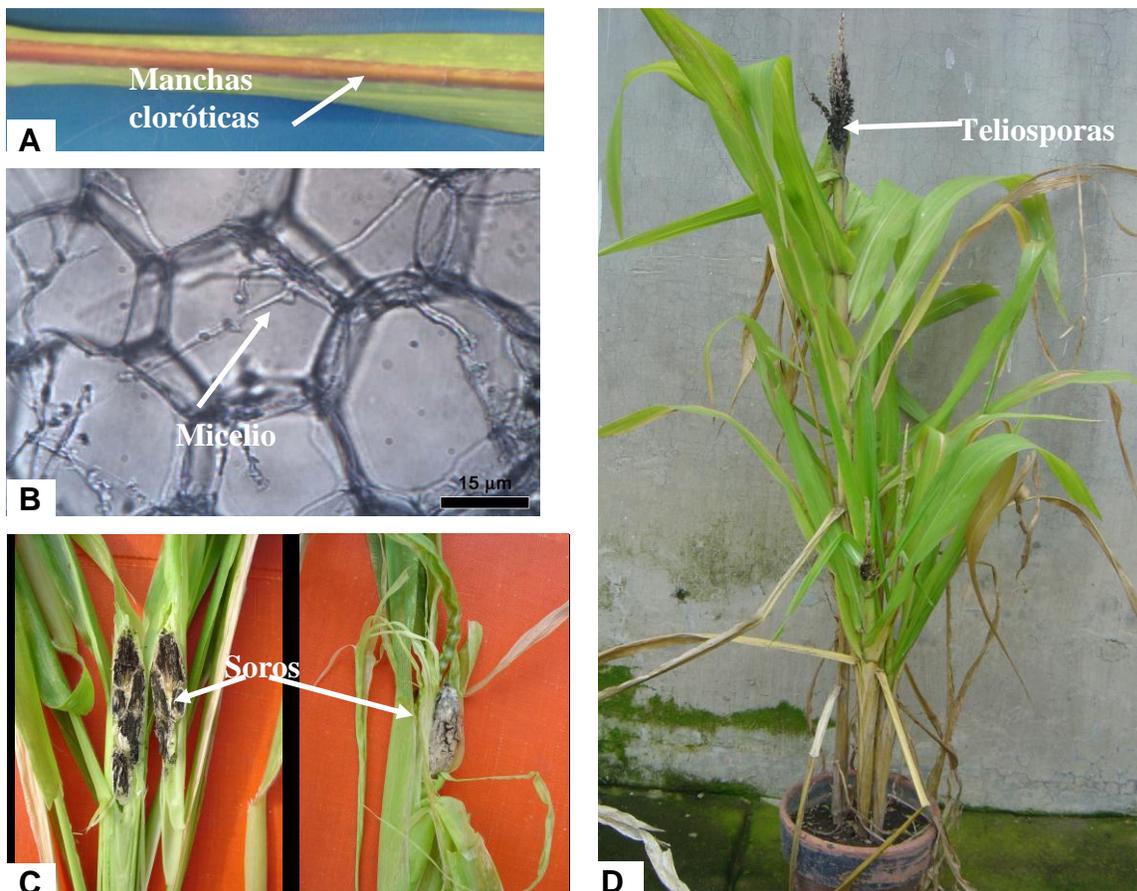


Figura 2. Material vegetal con síntomas y signos del carbón de la espiga del maíz causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*. Material colectado de plantas del híbrido AS-910 desarrolladas a partir de semillas inoculadas con una suspensión de 1% de carboximetilcelulosa de sodio y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} , incubadas en condiciones controladas de 25 °C con 12 h de luz. A) Hoja con manchas cloróticas en nervadura central y lámina foliar 45 d después de la emergencia. B) Tejido con crecimiento de micelio intracelular obtenido de la zona clorótica de la hoja. C) Soros formados en panoja y mazorca, 102 d después de la siembra. D) Planta adulta con teliosporas en la panoja.

En esta investigación, además de la evidencia del micelio en el tejido del hospedante y la presencia de soros al final del experimento se adicionó la verificación molecular de la identidad del micelio en las plántulas colectadas después de 25 días de siembra. Cuando se utilizó ADN de tejido vegetal de plántulas desarrolladas a partir de semillas inoculadas con *S. reilianum* f. sp. *zae* se amplificó un segmento de 0.96 kb con los iniciadores SR1 y SR2. Este fragmento también se amplificó a partir de ADN de un cultivo puro del hongo desarrollado en medio de cultivo de PDA. El tamaño de las bandas obtenidas coincide con el reportado por Xu *et al.*, (1999) para *S. reilianum* f. sp.

zeae. En contraste, no se obtuvo amplificación con las muestras de ADN de tejido vegetal de plántulas desarrolladas a partir de semillas no inoculadas con el hongo (Figura 3).

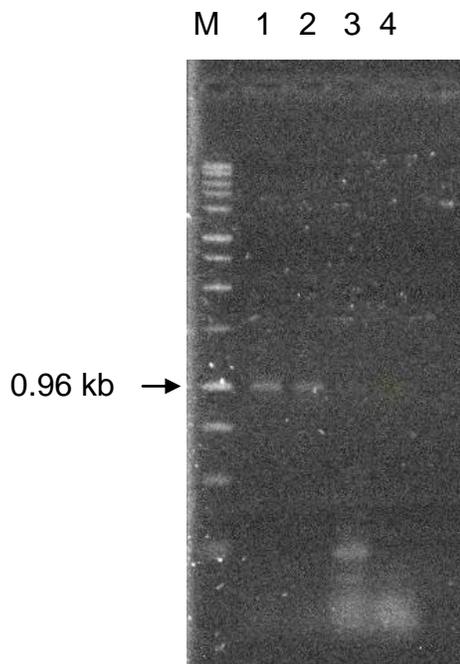


Figura 3. Productos de amplificación mediante PCR empleando el par de iniciadores SR1 y SR2; M. marcador molecular 1 kb; 1. ADN de colonias desarrolladas en medio de cultivo; 2. ADN de tejido vegetal de plántulas de maíz desarrolladas a partir de semillas inoculadas con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*; 3. ADN de tejido vegetal de plántulas de maíz desarrolladas a partir de semillas no inoculadas con el hongo; 4. Agua.

El número de plántulas infectadas con micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae*, observado en tejido del mesocotilo 25 d después de la siembra se presenta en el Cuadro 1. Tanto el cultivar CBT como el AS-910 presentaron infección cuando las semillas se inocularon con NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . Este tratamiento registró valores de infección de 93.3 y 96.6% en CBT y AS-910, respectivamente, significativamente superiores a los demás ($P < 0.05$). La inoculación con cápsulas, semilla impregnada y esmalte produjo infección de plántulas en ambos materiales de maíz, pero sin ser significativamente diferentes del testigo ($P > 0.05$). Ningún tratamiento afectó negativamente la germinación de las teliosporas.

En este trabajo, el porcentaje de infección obtenido con NaCMC fue superior al reportado por Baggett y Koepsell (1983), quienes al inocular semillas de maíz dulce de un cultivar susceptible, con metilcelulosa y teliosporas de *Sphacelotheca reiliana* obtuvieron como máximo 54.5% de infección en campo.

Cuadro 1. Porcentaje de plántulas de maíz infectadas con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, generadas de semillas inoculadas con teliosporas utilizando diferentes tratamientos.

Tratamiento	Infección de plántulas de maíz (%)	
	Criollo Blanco de Toluca	Híbrido AS-910
1) Carboximetilcelulosa de sodio	93.3	96.6
2) Cápsulas	6.6	20.0
3) Agrocer	0.0	6.6
4) Dispersante	0.0	6.6
5) Semilla impregnada	10.0	13.3
6) Semilla con daño	0.0	0.0
7) Esmalte	6.6	13.3
8) Testigo	0.0	0.0
Coefficiente de variación (%)	50.88	62.18
DMS _{0.05}	9.61	15.78
DMS _{0.01}	12.96	21.25

DMS=Diferencia mínima significativa.

2.5.3 Relación entre concentración de inóculo y número de plántulas infectadas
 Los resultados muestran que el número de plántulas infectadas por *S. reilianum* f. sp. *zeae* varió de acuerdo con la cantidad de teliosporas utilizadas en la inoculación de semillas del cultivar AS-910. Es decir, se registró una relación directa ($r=0.97$, $r^2=0.95$) entre la concentración de inóculo y el número de plántulas infectadas. El mayor porcentaje de plántulas infectadas (90 y 95%) se obtuvo cuando las semillas se inocularon con las concentraciones de 1.4×10^6 , 1.6×10^7 y 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹ y 1% de NaCMC. Estas concentraciones de inóculo dieron porcentajes de infección estadísticamente superiores ($P < 0.05$) a los registrados con las concentraciones menores (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la concentración de inóculo de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en el porcentaje de infección de plántulas de maíz del híbrido AS-910.

Concentración de inóculo (teliosporas mL ⁻¹)	Plántulas infectadas (%)
2x10 ⁶	20
4x10 ⁶	15
6x10 ⁶	35
8x10 ⁶	40
1x10 ⁷	60
1.2x10 ⁷	80
1.4x10 ⁷	90
1.6x10 ⁷	95
1.7x10 ⁷	95
Coeficiente de variación (%)	30.63
DMS _{0.05}	23.24
DMS _{0.01}	31.35

DMS=Diferencia mínima significativa.

El escape a la enfermedad en ensayos de campo se explica por la falta de uniformidad en la distribución del inóculo; sin embargo, la cantidad de inóculo así como las condiciones de luz y temperatura también son factores importantes a considerar (Osorio y Frederiksen, 1998; Stromberg *et al.*, 1984; Baggett y Koepsell, 1983), lo anterior coincide con este estudio ya que se registró una mayor incidencia de la enfermedad cuando las semillas se inocularon con altas concentraciones de teliosporas y se mantuvieron en condiciones controladas de 25 °C con fotoperíodo de 12 h luz. En promedio, se aplicaron 18.6 mg de teliosporas por semilla cuando éstas se trataron con una suspensión de 1.7x10⁷ teliosporas mL⁻¹, lo que resultó en 95% de infección.

2.6 Conclusiones

Los tratamientos de inoculación no registraron un efecto negativo en el porcentaje de germinación de teliosporas, pero la inoculación de semillas de maíz con una suspensión de 1.7x10⁷ mL⁻¹ teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* y 1% de carboximetilcelulosa de sodio, induce un 96.6% de plántulas infectadas.

El método de tinción diferencial con azul de algodón a 0.5 % en lactofenol y safranina a 1% en etanol a 70% aplicado en cortes transversales del mesocotilo de plántulas de maíz 25 días después de la siembra, es efectivo en la tinción de micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae*.

En inoculaciones artificiales de semilla de maíz con teliosporas de carbón de la espiga, la cantidad de inóculo aplicado determinó el porcentaje de plántulas infectadas.

Es posible la identificación del micelio infectivo presente en el mesocotilo, mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa e iniciadores específicos.

2.7 Literatura citada

Baggett, J. R., and Koepsell, P. A. 1983. Field inoculation of sweet corn with the head smut pathogen (*Sphacelotheca reiliana*). Hortscience 18:67-68.

Craig, J., and Frederiksen, R. A. 1992. Comparison of sorghum seedling reactions to *Sporisorium reilianum* in relation to sorghum head smut resistance classes. Plant Dis. 76:314-318.

Foster, J. H., and Frederiksen, R. A. 1977. Symptoms of head smut in maize seedlings and evaluation of hybrids and inbreds. Texas Agric. Exptl. Stat. PR 3423.

Ingold, C. T. 1994. Products of teliospore germination in *Sporisorium* spp. Mycol. Res. 98:467-473.

Martinez, C. A., Jauneau, C., Roux, C., Savy, C., and Dargent, R. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. Protoplasma 213:83-92.

Martinez, C., Roux, C., and Dargent, R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. Phytopathology 89:247-253.

- Martinez, R. J. L., y Ledesma, M. J. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en el Valle de Zapopan, Jalisco. Rev. Mex. Fitopatol. 8:68-70.
- Matyac, C. A. 1985. Histological development of *Sphacelotheca reiliana* on *Zea mays*. Phytopathology 75:924-929.
- Matyac, C. A., and Kommedahl, T. 1985a. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. Phytopathology 75:577-581. Falta en texto.
- Matyac, C.A., and Kommedahl, T. 1985b. Occurrence of chlorotic spots on corn seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. Plant Dis. 69:251-254.
- Metha, B. K. 1967. Evaluation of physiological specialization in *Sphacelotheca reiliana*. Phytopathology 57:925-928.
- Osorio, J. A., and Frederiksen, R. A. 1998. Development of an infection assay for *Sporisorium reilianum*, the head smut pathogen on sorghum. Plant Dis. 82:1232-1236.
- Pai, C. K., and Pan, S. F. 1964. Studies on factors influencing the germination of the chlamydospores of *Sphacelotheca reiliana*. Acta Phytopathol. Sin. 7:53-60.
- Pataky, J. K. 1999. Smuts. pp. 33-35. In: White D.G. (ed). Compendium of corn diseases. 3rd. Edit. St. Paul, MN. APS Press.

- Pérez, C. J. P., Bobadilla, M. M., Velásquez, C. G., Zacatenco, G. M. A., y Espinoza, C. A. 2006. Logros y aportaciones de la investigación en maíz de riego en el Valle del Mezquital, Hidalgo. pp. 55-65. En: Memorias de veinte años de investigación y desarrollo tecnológico. Campo Exptl. Pachuca, Hidalgo, INIFAP, Pachuca, México.
- Pérez, C. J. P., Bobadilla, M. M., y Jeffers, D. 2005. Evaluación de fungicidas sistémicos para el control del carbón de la espiga de maíz (*Sphacelotheca reiliana*) Kühn, Clinton, en el Valle del Mezquital, Hgo. pp 25-30. En: Memorias del encuentro de innovación y transferencia de tecnología. Fundación Hidalgo Produce, A. C. Pachuca, Hidalgo, México.
- Pradhanang, P. M., and Ghimire, S. R. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. Trop. Agric. 73:325-328.
- Stromberg, E. L., Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Matyac, C. A., and Windels, C. E. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacllothea reiliana* in Minnesota. Plant Dis. 68:880-884.
- Whythe, I. V., and Gevers, H. O. 1988. Diallel analysis of resistance of eight maize inbred lines to *Sphacelotheca reiliana*. Phytopathology 78:65-68.
- Xu, M. L., Melchinger, A. E., and Lübberstedt, T. 1999. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. Plant Dis. 83:390-395.

CAPITULO III

RESPUESTA DE LÍNEAS S₁ Y S₂ DE MAÍZ A LA INFECCIÓN POR *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*

3.1 Resumen

Durante 2008 y 2009, en el Colegio de Postgraduados, México, se evaluó la respuesta a la infección por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en líneas S₁ y S₂ de maíz, procedentes de poblaciones de amplia base genética, una con endospermo blanco y otra con endospermo amarillo. Los ensayos se realizaron en condiciones de invernadero y campo utilizando un método de inoculación novedoso que ha demostrado su eficiencia. El objetivo fue identificar germoplasma resistente a este patógeno, para implementar su uso en un programa de mejoramiento de resistencia genética a la enfermedad. En 258 líneas S₁ de endospermo blanco se observaron incidencias de 0 a 92.3 % y de 0 a 41.7% en las 71 de endospermo amarillo. En base a la incidencia y características agronómicas deseables, en vivero de selección establecido en campo se seleccionaron y autofecundaron 38 líneas S₁ de endospermo blanco con incidencias de 0 a 7.7% y 24 de endospermo amarillo con incidencias de 0 a 12.5%. Se obtuvieron 123 y 114 líneas S₂ de endospermo blanco y amarillo, respectivamente. Estas líneas S₂ se inocularon y evaluaron en condiciones de invernadero, en donde la incidencia de la enfermedad fue de 0 a 42.8% y de 0 a 28.5%, respectivamente. Esta técnica probó que inoculación de semillas con una suspensión de teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* de 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹ a 1% de carboximetilcelulosa de sodio y siembra en invernadero, permite identificar líneas con diferente porcentaje de infección, además de seleccionar materiales resistentes. Las líneas seleccionadas en el presente estudio podrán ser recombinadas o autofecundadas para su utilización en programas de selección de resistencia genética a la enfermedad en los Valles Altos de México.

Palabras clave: carbón de la espiga, resistencia, inoculación de semilla, teliosporas, carboximetilcelulosa.

3.2 Abstract

Response of S₁ and S₂ maize lines to the infection by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. During 2008 and 2009, in the Colegio de Postgraduados, Mexico, the response to the infection by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in S₁ and S₂ maize lines was evaluated. The lines were originated from wide genetic base maize populations with endosperm white or yellow. The tests were carried out in both greenhouse and field conditions, using a novel method of inoculation that has demonstrated its efficiency. The objective was to identify resistant germplasm to this pathogen, and implement its use in a genetic breeding program. In 258 S₁ lines with white endosperm were observed incidences from 0 to 92.3% and from 0 to 41.7% in 71 S₁ lines with yellow endosperm. On the basis of incidence and agronomic characteristics, in a breeding nursery in field conditions, 38 S₁ lines with white endosperm were selected, with incidences from 0 to 7.7% and 24 yellow lines with incidences from 0 to 12.5%. Selected plants in selected S₁ lines were self-pollinized and 123 and 114 S₂ lines with white or yellow endosperm, were obtained; the incidence in these lines was from 0 to 42.8% and from 0 to 28.5%, respectively. By means of seeds inoculation with a teliospores suspension of *S. reilianum* f. sp. *zeae* at a concentration of 1.7×10^7 teliospores mL⁻¹ and 1% of sodium carboximethylcellulose planted in a greenhouse conditions, allows to identify lines with different infection percentage, and select resistant germplasm. The selected lines in this research could be recombined or continued inbreeding for their use in plant breeding programs for selection of resistant germplasm in High Valleys of Mexico.

Key words: head smut, resistance, seed inoculation, teliospores, carboximethylcellulose.

3.3 Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es susceptible a varias enfermedades, las cuales afectan a las plantas en diferentes etapas de su desarrollo. En este contexto, el carbón de la espiga causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon y Fullerton, sinónimo *Sphacelotheca reiliana* (Khün) Clint. (Matyac y Kommedahl, 1985a; Matyac y Kommedahl, 1985b) ha sido un serio problema desde la década de 1970 en diferentes países incluyendo Estados Unidos, México, Australia, China, Sudáfrica y Francia (Jin *et al.*, 2000; Bernardo *et al.*, 1992; Stromberg, 1981).

Los síntomas del carbón de la espiga son visibles hasta la floración, aun cuando el patógeno infecta la raíz durante la germinación y primeras etapas de desarrollo de la plántula de maíz (Martinez *et al.*, 2000). Posteriormente, el micelio infectivo invade sistemáticamente los tejidos, hasta llegar al meristemo apical (Martinez *et al.*, 1999; Frederiksen y Reyes, 1980). El principal daño es ocasionado durante la floración, cuando el micelio establecido en el meristemo produce soros que reemplazan a la mazorca y panoja. Al madurar, los soros liberan las teliosporas, las cuales caen al suelo y son transportadas por aire a cortas distancias (Montes y Díaz, 2006).

Debido a que el inóculo se encuentra en el suelo de cultivo, los esfuerzos por combatir a esta enfermedad se enfocan en evitar la infección durante el desarrollo de la plántula. Para esto se han utilizado diferentes estrategias de control como el tratamiento de semilla con fungicida (Wright *et al.*, 2006; Pradhanang y Ghimire, 1996; Martínez y Ledesma, 1990; Stienstra *et al.*, 1985), prácticas culturales (Matyac y Kommedahl, 1985a; Mack *et al.*, 1984) y la resistencia del hospedante (Song *et al.*, 2000; Stromberg *et al.*, 1984; Baggett y Koepsell, 1983), siendo esta última la más significativa ya que evita daños ecológicos y reduce los costos de producción.

Son varios los esfuerzos realizados con el fin de identificar genotipos resistentes al carbón de la espiga. Entre estos destacan los trabajos realizados en china (Wang *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 1992), Kenya (Njuguna, 2001), Francia (Lübberstedt *et al.*, 1999), Estados Unidos de Norteamérica (Baggett y Koepsell, 1983) y Sudáfrica (Krüger, 1962). En México, a pesar de que es una enfermedad importante en los Valles Altos de México (estados de Hidalgo y México), los programas de mejoramiento no contemplan la selección para resistencia y únicamente se han determinado porcentajes de incidencia en materiales comerciales, en evaluaciones hechas bajo condiciones de infección natural.

Afortunadamente, mediante la colaboración de diferentes instituciones, se creó un programa de mejoramiento genético contra el carbón de la espiga en los Valles Altos, en el cual se han generado y seleccionado diferentes líneas de maíz de endospermo blanco o amarillo con el propósito de aumentar sus niveles de resistencia. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue generar líneas S_1 y determinar si estas líneas son susceptibles o resistentes a *S. reilianum* f. sp. *zeae*, evaluadas bajo condiciones de inoculación artificial a la semilla.

3.4 Materiales y métodos

La respuesta a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en líneas S₁ y S₂ de maíz se determinó durante los años 2008 y 2009, en las instalaciones del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, estado de México. Por otra parte, la generación y selección de líneas S₁ y S₂ se realizó en campo, en un vivero de selección ubicado en un terreno libre de la enfermedad en el estado de Tlaxcala. Cada ensayo de inoculación de líneas con endospermo blanco o amarillo se repitió dos veces.

3.4.1 Respuesta a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en líneas S₁ de maíz

3.4.1.1 Material vegetal

Líneas S₁ procedentes de una población con grano de endospermo blanco y otra con endospermo amarillo, con amplia base genética, derivadas de un programa de selección y mejoramiento para *S. reilianum* f. sp. *zeae* en de los estados de México e Hidalgo, fueron utilizadas para evaluar su resistencia o susceptibilidad a dicho patógeno. En total, se evaluaron 258 líneas S₁ de endospermo blanco y 71 de endospermo amarillo.

Las líneas se generaron en un vivero de selección y mejoramiento que se estableció en el estado de Tlaxcala sin incidencia de la enfermedad. Veintidós semillas de cada línea se sembraron en un surco de 3 m de largo.

3.4.1.2 Inóculo

Se utilizaron teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* obtenidas de panojas y mazorcas de plantas de maíz infectadas. Las teliosporas se desinfestaron en una solución de 1% de CuSO₄ por 24 h, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril y se recuperaron en papel filtro para su secado.

La viabilidad del patógeno se determinó en medio de cultivo PDA. Una suspensión de teliosporas previamente desinfestadas, se preparó a una concentración de 50 000 teliosporas mL⁻¹ de agua destilada estéril. Se depositó 0.5 mL de la suspensión por caja Petri con PDA, cada alícuota se distribuyó uniformemente sobre el medio de cultivo con un triángulo de vidrio estéril. Las cajas se colocaron en una incubadora donde permanecieron en oscuridad a 25 °C. El porcentaje de germinación se determinó a 96 h

de incubación. El total de teliosporas en cuatro campos del microscopio de luz, a una magnificación de 40X, fue cuantificado y se registró el número de esporas germinadas. La media del porcentaje de germinación por caja Petri fue calculado usando la media de cuatro campos observados.

3.4.1.3 Inoculación de semillas

Veintidós semillas de cada línea se depositaron en sobres de papel por separado. Posteriormente se preparó una suspensión de carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) a 1% en agua destilada estéril y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . Las semillas de cada línea se sumergieron por separado en esta suspensión durante 1 min. Las semillas se recuperaron y secaron con ventilador durante 24 h en laboratorio a 22 °C. Semillas del híbrido susceptible AS-910 fueron usadas como testigo.

3.4.1.4 Siembra

Las semillas tratadas se sembraron en macetas con suelo a una profundidad de 2 cm. el suelo presentó un pH de 8, conductividad eléctrica de 5.08 dSm^{-1} , contenido de materia orgánica de 3.23% y textura franco-arenosa (arena 75.6%, limo 14.5% y arcilla 9.9%). Se utilizó una maceta por cada línea y las macetas se colocaron en un invernadero en el Colegio de Postgraduados. Después de la siembra, las macetas se regaron a capacidad de campo. Para incrementar el porcentaje de infección, se evitó el riego constante durante las primeras etapas de desarrollo de las plántulas. Temperatura y humedad dentro del invernadero así como temperatura y humedad en el suelo fueron registradas (Datalogger Watchdog, modelo 450).

3.4.1.5 Evaluación de la infección

La respuesta a la infección se registró durante floración por observación visual de síntomas del carbón tanto en la mazorca como en la panoja de las plantas de cada línea. Se consideró planta enferma a aquella con presencia de soros en la mazorca, en la panoja o en ambos. Se determinó el porcentaje total de plantas infectadas por línea.

3.4.2 Respuesta a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en líneas S₂ de maíz
Treinta y tres semillas sin inocular de las líneas S₁, se sembraron en campo en un vivero de selección en un terreno sin problemas de la enfermedad en el estado de Tlaxcala. En este lote, las mejores líneas se seleccionaron en base a características agronómicas y bajo porcentaje de incidencia a carbón de la espiga evaluada previamente en condiciones de invernadero. Seis o siete plantas de las líneas seleccionadas se autofecundaron para obtener mazorcas S₂. Después de cosecha, las semillas de mazorcas S₂ se inocularon y sembraron utilizando las metodologías antes mencionadas. La respuesta a la infección se registró durante floración, por observación visual de síntomas del carbón tanto en la mazorca como en la panoja de las plantas de cada línea. En total, se evaluaron 123 líneas S₂ de endospermo blanco y 114 de endospermo amarillo.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Respuesta a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en líneas S₁ de maíz
Las teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* utilizadas como inóculo, presentaron un porcentaje de germinación de 31% después de 96 h de incubación en oscuridad a 25 °C. Las teliosporas formaron un basidio septado con cuatro células, cada una de las cuales originó una basidiospora, estas últimas desarrollaron colonias de color crema y con crecimiento tipo levadura.

3.5.1.1 Síntomas en plantas

Los síntomas se observaron durante la floración en invernadero (Figura 1), en plantas en que las mazorcas fueron reemplazadas por soros en las plantas infectadas de diferentes líneas. Dentro de los soros se observaron las teliosporas agrupadas en una masa de color negro. En la panoja las florecillas fueron reemplazadas por teliosporas, también se presentó la proliferación de espiguillas y en algunos casos una filodia de brácteas. Las plantas que presentaron estos síntomas fueron clasificadas como positivas a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae*, y sirvieron para determinar el porcentaje de incidencia de la enfermedad en las líneas S₁ y S₂ evaluadas.

Los signos y síntomas, observados en la mazorca y panoja coinciden con los reportados por Pataky (1999), Baggett y Kean (1989) y Stromberg *et al.* (1984). La

infección en la panoja fue más fácil de identificar a simple vista, mientras que la mazorca tuvo que ser seccionada para poder observar la presencia del patógeno.

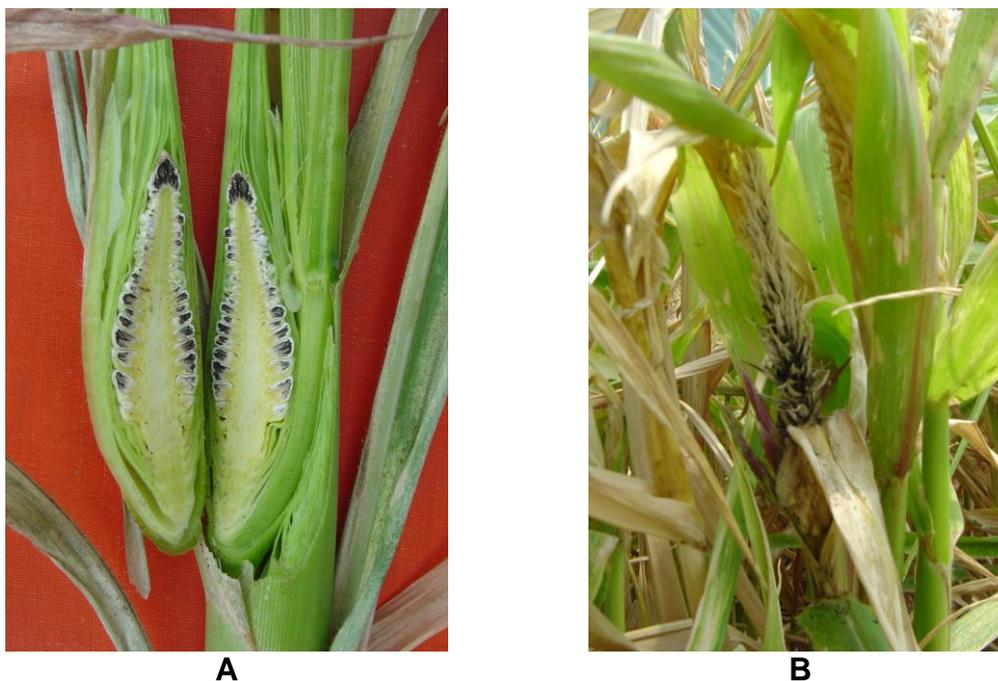


Figura 1. Síntomas del carbón de la espiga presentes en plantas de maíz provenientes de semilla inoculada con una suspensión de teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* de 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} a 1% de carboximetilcelulosa de sodio y sembradas en invernadero. A) Formación de soros en la mazorca. B) Formación de soros en la panoja.

3.5.1.2 Evaluación de la incidencia en líneas S_1

En los experimentos llevados a cabo para evaluar la respuesta de diferentes líneas S_1 de maíz a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae* con inoculación artificial, se observó una incidencia de 92.3 y 41.7% en las líneas más susceptibles con endospermo blanco y amarillo, respectivamente.

El porcentaje de líneas de maíz y su porcentaje de infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* se muestra en las Figuras 2 y 3. La incidencia del carbón de la espiga en los materiales de endospermo blanco se presentó de 0 a 70% en las dos diferentes evaluaciones, (Figura 2a y 2b), solamente una línea presentó un valor de incidencia de 92.3 y 81.3% en la primera y segunda evaluación, respectivamente; incluso superó al testigo que presentó un valor de 77.8% de incidencia de la enfermedad. En el caso de las líneas de

endospermo amarillo, la distribución de la incidencia se presentó de 0 a 40% en el primer experimento (Figura 3a) y de 0 a 41.7% en el segundo (Figura 3b).

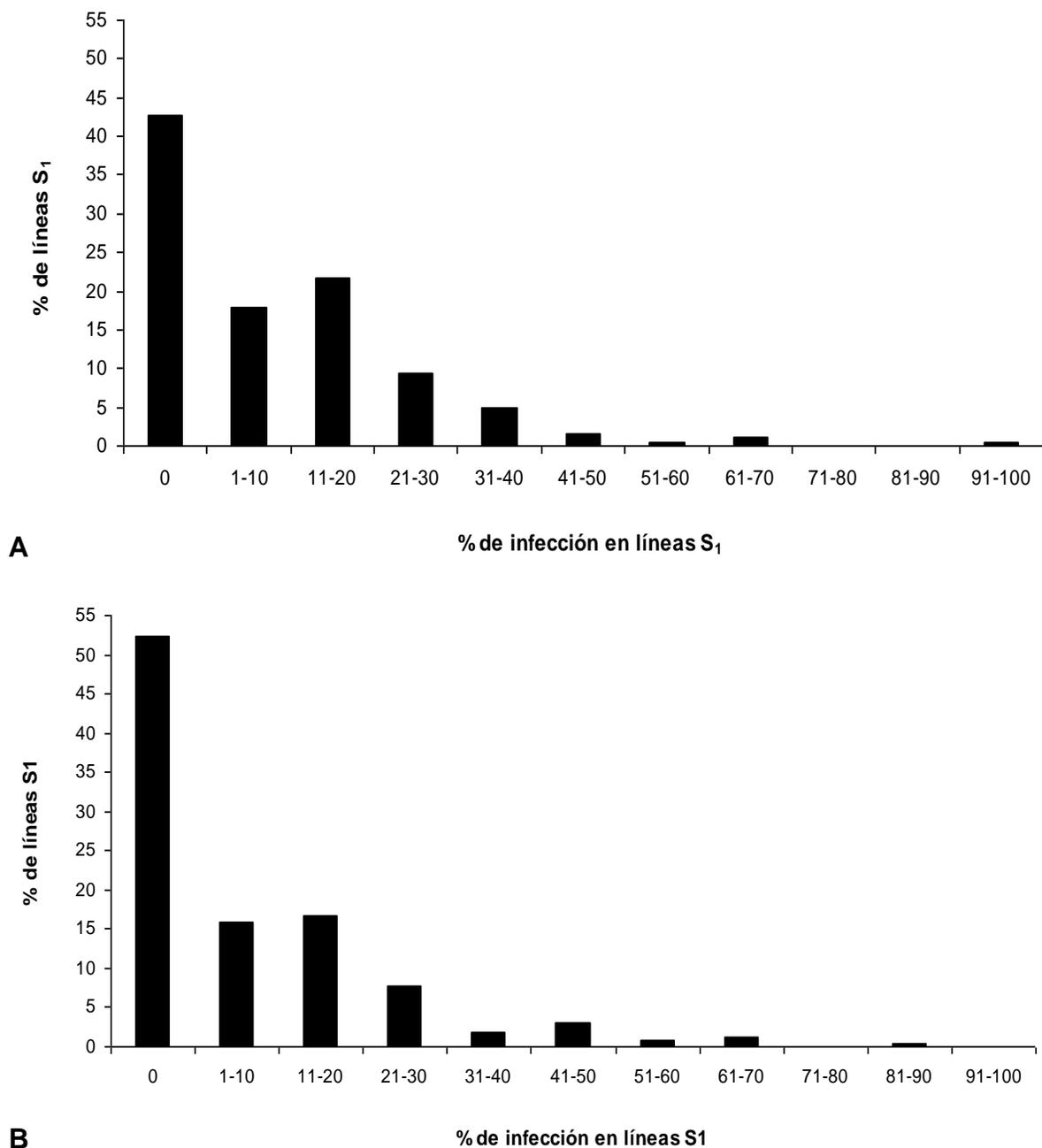


Figura 2. Porcentaje de líneas S₁ de maíz de endospermo blanco afectadas con carbón de la espiga en plantas en etapa de floración. A) Primera evaluación (2008). B) Segunda evaluación (2009).

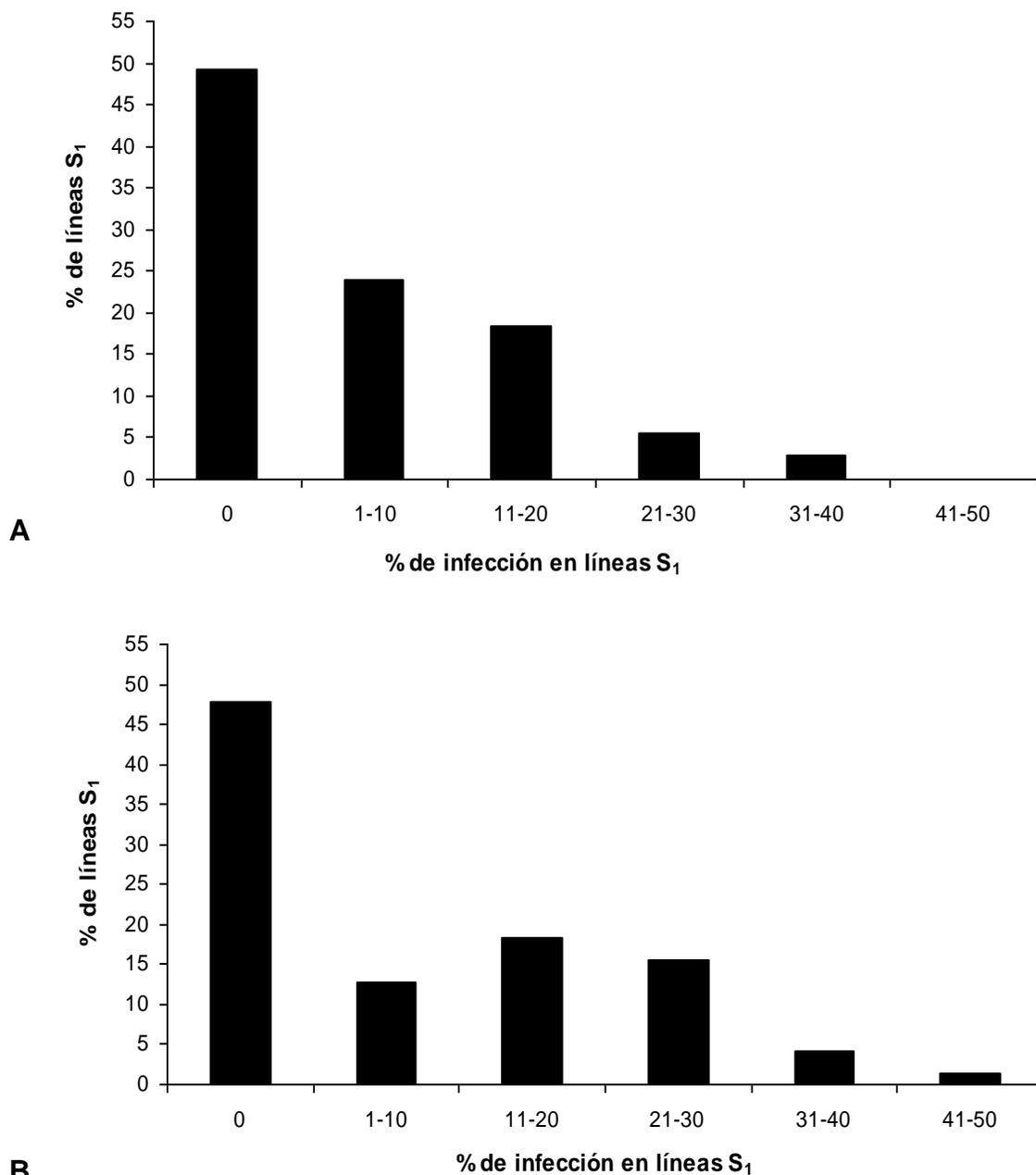


Figura 3. Porcentaje de líneas S₁ de maíz de endospermo amarillo afectadas con carbón de la espiga en plantas en etapa de floración. A) Primera evaluación (2008). B) Segunda evaluación (2009).

De las 258 líneas de endospermo blanco, el 42.6% presentaron incidencias de 0%, el 17.8% incidencias entre 1 y 10%, y el resto incidencias entre 11 y 92.3% en la primera evaluación (Figura 2a). Sin embargo, en la segunda evaluación el 52.3% presentó incidencia de 0%, el 15.9% entre 1 y 10% de incidencia, y las demás entre 11 y 90%

(Figura 2b). A pesar de las diferencias entre evaluaciones, se observó que de las 258 líneas, el 46.1% presentaron igual valor de incidencia en las dos diferentes evaluaciones y el 18.2% valores similares.

En el caso de las 71 líneas S_1 de endospermo amarillo, el 49.3% presentaron incidencias de 0%, el 23.9% incidencias entre 1 y 10%, y el resto incidencias entre 11 y 40% en la primera evaluación (Figura 3a). En la segunda evaluación, el 47.9% presentó incidencia de 0%, el 12.7% entre 1 y 10% de incidencia, y las demás entre 11 y 41.7% (Figura 3b). Sin embargo, se observó que de las 71 líneas, el 42.3% presentaron valores de incidencia de igual valor, el 16.9% valores similares entre las diferentes evaluaciones.

Los valores promedio de temperatura en la primera evaluación (año 2008) fueron de 19.4 y 22.1 °C para el suelo y ambiente, respectivamente; la humedad relativa fue de 70%. En la segunda evaluación se registro una temperatura de 18 °C en el suelo y de 22.23 °C en el ambiente. La humedad relativa fue de 68.1%.

Con base en los resultados de infección obtenidos en invernadero y características agronómicas observadas en campo, en el vivero de mejoramiento se eligieron 38 líneas S_1 de endospermo blanco, de las cuales 28 presentaron 0% de incidencia y 10 con incidencias de 5.3-7.7%. De las líneas S_1 de endospermo amarillo se seleccionaron 24 líneas, de las cuales 13 presentaron 0% de incidencia, y 11 con incidencias de 5.3-12.5%. Las plantas de las líneas S_1 se autofecundaron, y después las semillas S_2 se sometieron a inoculación y evaluación de la respuesta a la infección con *S. reilianum* f. sp. *zeae*.

3.5.2 Infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en líneas S_2 de endospermo blanco y amarillo

La distribución de la incidencia del carbón de la espiga en líneas S_2 con endospermo blanco o amarillo (Figuras 4 y 5), se presentó de 0 a 42.8% para los de endospermo blanco, de 0 a 28.5% en las líneas de endospermo amarillo y 86.1% en el testigo.

De las 123 líneas de endospermo blanco, el 79.7% presentaron incidencias de 0%, el 17.1% incidencias entre 1 y 10%, y el 3.2% incidencias entre 11 y 42.8%. En el caso de las 114 líneas de endospermo amarillo, el 73.7% presentaron incidencias de 0%, el

19.3% incidencias entre 1 y 10%; y el 7% de las líneas, incidencias entre 11 y 28.5%. Durante el desarrollo del ensayo en invernadero se registraron temperaturas promedio de 18.47 °C en el suelo y 21.61 °C en el ambiente, además de una humedad relativa promedio de 69.76%.

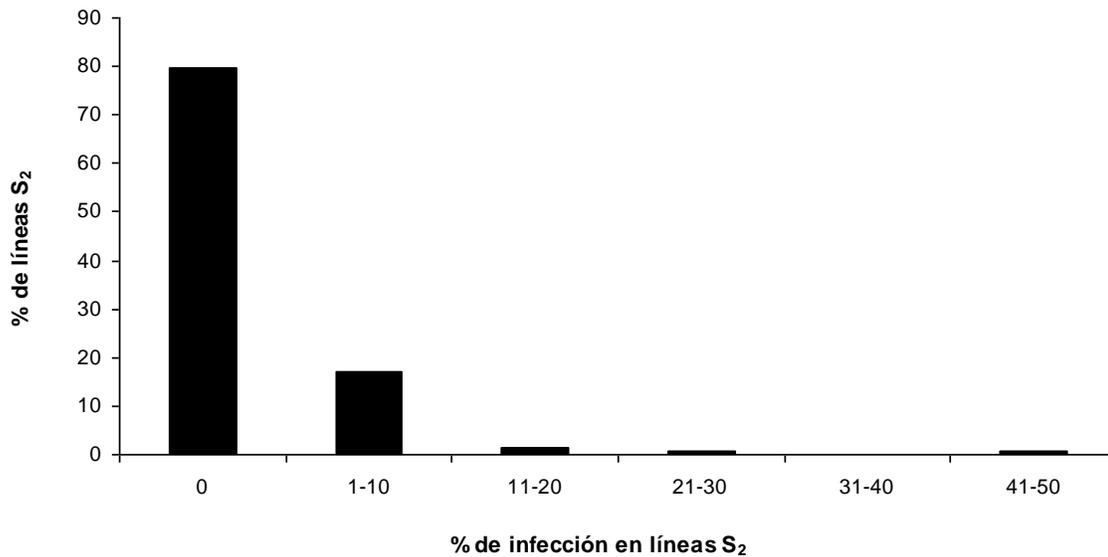


Figura 4. Porcentaje de líneas S₂ de maíz de endospermo blanco afectadas con carbón de la espiga en plantas en etapa de floración (2009).

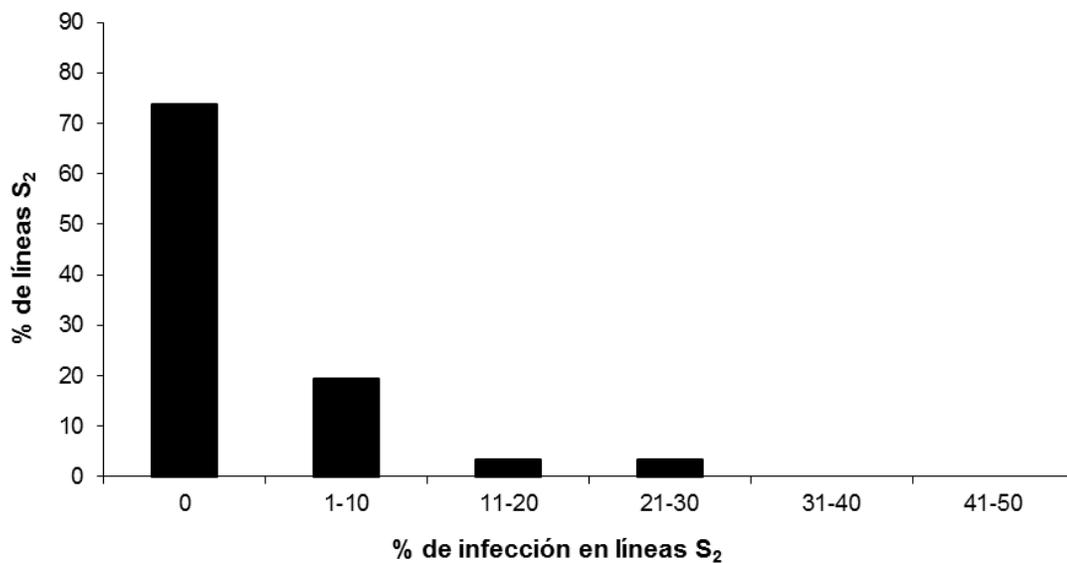


Figura 5. Porcentaje de líneas S₂ de maíz de endospermo amarillo afectadas con carbón de la espiga en plantas en etapa de floración (2009).

La respuesta de plantas de maíz a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae* ha sido evaluada con el objetivo de identificar germoplasma resistente, para esto se han utilizado diferentes métodos de inoculación de semilla al momento de la siembra; al respecto Njuguna y Odhiambo (1989), reportan incidencias de hasta 62.8% con la deposición de teliosporas sobre la semilla; Stromberg *et al.* (1984), obtuvieron incidencias de hasta 56% mediante inoculación a la semilla con sustrato contaminado con teliosporas. En el presente estudio, la inoculación de semilla se realizó con una suspensión de 1% de NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} , y se obtuvieron incidencias en líneas S_1 de 0 a 92.3% en los materiales de endospermo blanco y de 0 a 41.7% en las de endospermo amarillo. Por otra parte, en líneas S_2 , la distribución de la infección presentó incidencias de 0 a 42.8% en las líneas de endospermo blanco y de 0 a 28.5% en las de endospermo amarillo, en ambos tipos de líneas la proporción de estas con 0% de incidencia fue mayor. Lo anterior demuestra que este novedoso método de inoculación, propicia niveles de infección confiables en un programa de selección de germoplasma resistente al carbón de la espiga.

En las diferentes líneas inoculadas, la presencia o ausencia de soros en la mazorca o en la panoja fue usada como indicador de la infección. Se determinó que es posible identificar y desarrollar germoplasma de maíz resistente a *S. reilianum* f. sp. *zeae* mediante selección fenotípica en condiciones de inoculación artificial lo cual coincide con diferentes autores (Li *et al.*, 2008; Njuguna, 2001; Whythe y Gevers, 1988; y Stromberg *et al.*, 1984).

En las diferentes evaluaciones llevadas a cabo, se identificaron varias líneas tanto de endospermo blanco como amarillo que presentaron una estable y consistente resistencia a *S. reilianum* f. sp. *zeae* en las dos evaluaciones hechas para líneas S_1 . Sin embargo, solo se seleccionaron 38 líneas de color blanco y 24 amarillas para generar líneas S_2 debido a que estas presentaron las mejores características agronómicas.

Además de contar con un buen método de inoculación, la temperatura y humedad del suelo son factores importantes en la germinación de teliosporas e infección del hospedante. La temperatura del suelo registrada durante el desarrollo de los diferentes ensayos osciló entre los 18.47 y 19.4 °C, lo cual difiere con Matyac y Kommedahl (1985a) y Baier y Krüger (1962), quienes reportan que temperaturas entre 23 y 30 °C son ideales para la germinación de las teliosporas e infección de las plántulas.

Adicionalmente, durante la germinación de las semillas y primeras etapas de desarrollo de las plántulas, se evitó el riego constante, manteniendo el contenido de humedad del suelo en promedio de 26.18 kPa, equivalentes a 0.2618 bar, estos resultados también difieren a los reportados por Matyac y Kommedahl (1985a) quienes reportan que una humedad del suelo correspondiente a 1.5 bar, propicia un mayor número de plantas infectadas, obteniendo incidencias de 32%. A pesar de esto, en el presente estudio se obtuvieron incidencias desde 0 hasta 92.3%, lo cual indica que bajo estas condiciones es posible identificar germoplasma resistente al carbón de la espiga.

3.6 Conclusiones

Existen fuentes de resistencia útiles contra *S. reilianum* f. sp. *zeae* dentro de las poblaciones de líneas de maíz evaluadas, las cuales son producto de un programa de mejoramiento genético de resistencia a este patógeno.

La inoculación de semillas de maíz con una suspensión de teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* de 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} a 1% de carboximetilcelulosa de sodio y la siembra en invernadero, permite identificar líneas con diferente porcentaje de infección.

Las líneas resistentes identificadas en el presente estudio, permitirán a mejoradores y productores de semilla la reducción de pérdidas ocasionadas por *S. reilianum* f. sp. *zeae*.

3.7 Literatura citada

Baggett, J. R., and Kean, D. 1989. Reduction on plant height by head smut infection in sweet corn cultivars. HortScience 24:497-499.

Baggett, J. R., and Koepsell, P. A. 1983. Field inoculation of sweet corn with the head smut pathogen (*Sphacelotheca reiliana*). HortScience 18:67-68.

Baier, W., and Krüger, W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. II. Field studies on the effect of soil conditions. South Africa J. Agric. Sci. 5:183–190.

- Bernardo, R., Bourrier, M., and Oliver, J. L. 1992. Generation means analysis of resistance to head smut in maize. *Agronomie* 12:303-306.
- Duan, Y. Z., Li, X. X., Ai, F. Z., Yang, J. H., and Li, F. M. 1992. Selection and identification on resistance resource of corn head smut of Shanxi Province. *Acta Agric. Sin.* 1:83–86.
- Frederiksen, R. A., and Reyes, L. 1980. The head smut program at Texas A&M. pp. 367-372. In: R.J. Williams, R.A. Frederiksen, L.K. Mughogho, and G.D. Bengston (eds.). *Sorghum Diseases: A World Review*. ICRISAT. Patancheru, A.P., India.
- Ingold, C. T. 1994. Products of teliospore germination in *Sporisorium* spp. *Mycol. Res.* 98:467-473.
- Jin, Q. M., Li, J. P., Zhang, X. W., Wang, G. X., Song, S. Y., Liu, Y. C., and Wang, L. X. 2000. Establishment IPM of system of corn diseases and pest insects in the spring corn belt. *J. Maize Sci.* 8:84-88.
- Krüger, W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. I. Infection and control studies, South Africa *J. Agric. Sci.* 5:43–56.
- Li, X. H., Wang, Z. H., Gao, S. R., Shi, H. L., Zhang, S. H., George, M. L. C., Li, M. S., and Xie, C. X. 2008. Analysis of QTL for resistance to head smut (*Sporisorium reiliana*) in maize. *Field Crops Res.* 106:148-155.
- Lübberstedt, T., Xia, X. C., Tan, G., Liu, X., and Melchinger, A. E. 1999. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reiliana* in maize. *Theor. Appl. Gene.* 99:593–598.
- Mack, H. J., Baggett, J. R., and Koepsell, P. A. 1984. Effects of cultural practices on the incidence of head smut in sweet corn. *HortScience* 19:77-78.

- Martinez, C. A., Jauneau, C., Roux, C., Savy, C., and Dargent, R. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Protoplasma* 213:83-92.
- Martinez, C. A., Roux, C., and Dargent, R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Phytopathology* 89:247-253.
- Martínez, R. J. L., y Ledesma, M. J. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en el Valle de Zapopan, Jalisco. *Rev. Mex. Fitopatol.* 8:68-70.
- Matyac, C. A., and Kommedahl, T. 1985a. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology* 75:577-581.
- Matyac, C. A., and Kommedahl, T. 1985b. Occurrence of chlorotic spots on corn seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. *Plant Dis.* 69:251-254.
- Montes, G. N., y Díaz, F. A. 2006. Fitopatología. pp. 192-213. En: L.A. Rodríguez del Bosque (ed.). *Campo Exptl. Río Bravo: 50 años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos. Capítulo 12. Libro Técnico No. 1. Campo Exptl. Río Bravo. INIFAP. Río Bravo, Tamaulipas, México. 325 p.*
- Njuguna, J. G. M. 2001. Combating head smut of maize caused by *Sphacelotheca reiliana* through resistance breeding. *Seventh East. South. Africa Reg. Mize Conf.* pp 110-112.
- Njuguna, J. G. M., and Odhiambo, R. O. 1989. Head smut distribution, expression and genetic resistance of maize to *Sphacelotheca reiliana* in Kenya. *East African Agric. Fores. J.* 55:81-83.

- Pataky, J. K. 1999. Smuts. pp 33-35. In: White D.G. (ed). Compendium of corn diseases. 3rd. Ed. St. Paul, MN, APS Press.
- Pradhanang, P. M., and Ghimire, S. R. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. Trop. Agric. 73:325-328.
- Song, S. Y., Sun, X. H., Guo, W. G., and Liu, J. R. 2000. Identification of germplasm for resistance to head smut in maize. Agric. Sci. Jilin 25:32-33.
- Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Stromberg, E. L., Matyac, C. A., Windels, C. E., and Morgan, F. 1985. Suppression of Corn head smut with seed and soil treatments. Plant Dis. 69:301-302.
- Stromberg, E. L., Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Matyac, C. A., Windels, C. E., and Geadelman, J. L. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. Plant Dis. 68:880-884.
- Stromberg, E. L. 1981. Head smut of Maize, a new disease in Minnesota. Phytopathology 71:906.
- Wang, Z. H., Li, X. H., Xie, C. X., Li, M. S., Hao, Z. F., George, M. L. C., Xiao, M. J., Gao, S. R., and Zhang, S. H. 2008. Genetic diversity in a collection of chinese maize inbred lines for resistance to head smut caused by *Sporisorium reiliana*. Maydica 53:47-54.
- Whythe, I. V., and Gevers, H. O. 1988. Diallel analysis of resistance of eight maize inbred lines to *Sphacelotheca reiliana*. Phytopathology 78:65-68.
- Wright, P. J., Fullerton, R. A., and Koolaard, J. P. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetcorn (*Zea mays*). New Zealand J. Crop and Hort. Sci. 34:23-26.

CAPITULO IV

EVALUACIÓN DE FUNGICIDAS PARA CONTROL DEL CARBÓN DE LA ESPIGA (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) DEL MAÍZ

4.1 Resumen

El carbón de la espiga del maíz, causado por el hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, infecta las plántulas de este cultivo durante las primeras etapas de desarrollo cuando germinan las teliosporas presentes en el suelo. Aun cuando la información publicada sobre el control de esta enfermedad es controversial, es común utilizar fungicidas para el tratamiento de semilla. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la efectividad de diferentes fungicidas sobre la germinación de las teliosporas *in vitro* y el control de la enfermedad en plantas de maíz mediante tratamiento de semilla. En 2008 y 2009 se evaluaron los fungicidas siguientes: carboxín, carboxín+captán, difeconazole, propiconazole, tebuconazole, tebuconazole+thiram y triadimenol. Los fungicidas se evaluaron en tres diferentes dosis, alta (1.5x), recomendada (1x) y baja (0.5x), donde “x” fue la dosis de aplicación recomendada por el fabricante. Carboxín, carboxín+captán, tebuconazole y tebuconazole+thiram, inhibieron completamente la germinación de teliosporas y desarrollo de colonias *in vitro* después de 96 h de incubación en oscuridad a 25 °C. En tratamiento de semilla, todos los fungicidas redujeron significativamente el porcentaje de plantas infectadas por el hongo; tebuconazole+thiram y tebuconazole resultaron en 0% de incidencia cuando se aplicaron en la dosis comercial recomendada de 300 y 500 mL por 100 kg de semilla, respectivamente.

Palabras clave: teliosporas, germinación, dosis de aplicación.

4.2 Abstract

Fungicide evaluation for control of head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) on maize. Head smut of maize, caused by the fungus *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, infects this crop during the first stages of development when the teliospores in the soil germinate. Even though the published information about the control of the disease is

controversial, the use of seed treatment with fungicides is the most common means to control the disease. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of different fungicides on teliospores germination and the control of the disease on maize plants by mean of seed treatment. In 2008 and 2009 the following fungicides were evaluated: carboxin, carboxin+captan, difeconazole, propiconazole, tebuconazole, tebuconazole+thiram and triadimenol. The fungicides were evaluated at three different rates, high (1.5x), recommended (1x) and low (0.5x), where “x” was the application rate recommended by the manufacturer. Carboxin, carboxin+captan, tebuconazole and tebuconazole+thiram, completely inhibited the teliospore germination and colony development *in vitro* after 96 h of incubation at 25 °C in darkness. On seed treatment, all fungicides significantly reduced the percentage of infected plants, tebuconazole+thiram and tebuconazole resulted in 0% of incidence when they were applied at the commercial dose recommended of 300 and 500 mL 100 kg of seed⁻¹, respectively.

Key words: teliospores, germination, application rates.

4.3 Introducción

La enfermedad carbón de la espiga del maíz (*Zea mays* L.), causada por el hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon y Fullerton (Basidiomycota, Ustilaginaceae) sinónimo *Sphacelotheca reiliana* (Khun) Clint. (Matyac y Kommedahl, 1985a; Matyac y Kommedahl, 1985b), cuyos síntomas se manifiestan al momento de la floración, ha sido un serio problema desde la década de 1970 en diferentes países incluyendo Estados Unidos de Norteamérica, México, Australia, China, Sudáfrica y Francia (Stromberg, 1981; Bernardo *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 2000).

El hongo *S. reilianum* f. sp. *zeae* infecta durante las primeras etapas de desarrollo de la planta de maíz (Fredericksen, 1977), cuando la hifa parasítica penetra por la raíz (Martínez *et al.*, 2000) e invade los tejidos en forma sistémica hasta llegar al meristemo apical (Fredericksen y Reyes, 1980; Martínez *et al.*, 1999), resultando en el desarrollo de soros en la panoja y mazorca (Pataky, 1999). En los soros se encuentran las teliosporas, las cuales germinan en el suelo produciendo un basidio de cuatro células (Ingold, 1994); cada célula origina una basidiospora haploide y la unión de dos aislamientos compatibles haploides dan origen al dicarion (hifa parasítica). Debido a que la infección ocurre durante la germinación de la semilla, el control químico se basa

en el tratamiento de esta con fungicidas (Fullerton, 2002; Wright *et al.*, 2006) con el propósito de evitar la germinación de teliosporas y/o la infección de las plántulas.

En México el carbón de la espiga es un problema severo sobre todo en el suroeste de la República, en localidades que varían de 1500-1800 msnm. La enfermedad está presente en los estados de Jalisco, Nayarit, Michoacán y Guanajuato. Recientemente, *S. reilianum* f. sp. *zeae* se detectó con considerable incidencia en los Valles Altos de 1800 a 2600 msnm de los estados de México e Hidalgo. Para controlar la enfermedad, como medida de solución a corto plazo se han utilizado diferentes fungicidas sistémicos en tratamiento de semilla (Pérez *et al.*, 2006; Martínez y Ledesma, 1990). Sin embargo, existe incertidumbre acerca de la efectividad de estos fungicidas en el control de la enfermedad, debido a que las evaluaciones se han realizado en campo, en terrenos con problemas de la enfermedad donde la distribución del inóculo es aleatoria.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de diferentes fungicidas en el control de la germinación *in vitro* de teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* y en la infección de plantas desarrolladas a partir de semillas inoculadas con el hongo.

4.4 Materiales y métodos

La investigación se realizó en las instalaciones del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, Texcoco, estado de México, durante 2008 y 2009.

4.4.1 Evaluación de fungicidas *in vitro*

4.4.1.1 Aislamiento

En este estudio, se utilizaron teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* obtenidas de panojas y mazorcas de plantas de maíz naturalmente infectadas. Las teliosporas se desinfestaron en una solución de 1% de CuSO₄ por 24 h, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril y se recuperaron en papel filtro para su secado.

4.4.1.2 Fungicidas

Se evaluó el efecto de fungicidas sobre la inhibición de germinación y formación de colonias de *S. reilianum* f. sp. *zeae* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Formulación comercial de fungicidas seleccionados para evaluar su efecto en el control del carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*).

Ingrediente activo (i.a.)	Nombre comercial	Contenido de i.a.	Dosis de aplicación	Acción
Carboxín*	Vitavax 34FF	400 g i.a. L ⁻¹	250 mL 100 kg semilla ⁻¹	Sistémico
Carboxín+captán*	Vitavax 300	200+200 g i.a. Kg ⁻¹	260 g 100 kg semilla ⁻¹	Sistémico y contacto
Difeconazole	Sico	250 g i.a. L ⁻¹	500 mL 100 L agua ⁻¹	Sistémico
Propiconazole	Tilt	250 g i.a. L ⁻¹	500 mL 100 L agua ⁻¹	Sistémico
Tebuconazole	Raxil	120 g i.a. L ⁻¹	500 mL 100 kg semilla ⁻¹	Sistémico
Tebuconazole+thiram	Raxil-Thiram	6.6+220 g i.a. L ⁻¹	300 mL 100 kg semilla ⁻¹	Sistémico y contacto
Triadimenol*	Baytan	150 g i.a. L ⁻¹	500 mL 100 kg semilla ⁻¹	Sistémico

* = Recomendado por el fabricante para el control de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*.

Cada fungicida fue adicionado a medio papa-dextrosa-agar (PDA) a una temperatura de 50 °C en la cantidad requerida para evaluar tres dosis: alta (1.5x), recomendada (1x) y baja (0.5x), donde “x” fue la dosis de aplicación indicada por el fabricante. En el caso del testigo se utilizó agua destilada estéril. El fungicida y el PDA se mezclaron durante 1 min con un agitador magnético estéril. La mezcla se vació en cajas Petri de plástico dejando reposar por 48 h. Se prepararon cuatro cajas por tratamiento.

4.4.1.3 Germinación de teliosporas y formación de colonias

Se preparó una suspensión de 50 000 teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* por mL en agua destilada estéril. Posteriormente se depositó 0.5 mL de la suspensión por caja con PDA mezclado con fungicida, cada alícuota se distribuyó uniformemente sobre el medio de cultivo con un triángulo de vidrio estéril. Las cajas se incubaron por 96 h en oscuridad a 25 °C. La efectividad de los fungicidas se determinó en base al número de teliosporas germinadas y colonias desarrolladas en ese lapso de tiempo. El porcentaje de inhibición de la germinación y desarrollo de colonias para cada dosis se calculó con respecto al porcentaje de germinación del testigo. Se cuantificó el total de teliosporas

en cuatro campos del microscopio de luz en 40x y se determinó el número de esporas germinadas y colonias formadas. El porcentaje medio por caja Petri se calculó usando la media de los cuatro campos observados. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y separación de medias mediante la diferencia mínima significativa a un nivel de significancia de $P=0.05$. El experimento se repitió dos veces bajo un diseño completamente al azar.

4.4.1.4 Concentración efectiva de fungicidas a la cual se inhibe el 50 y 90% de la germinación teliosporas y formación de colonias

Para determinar la concentración efectiva con la cual se inhibe el 50 y 90% de germinación y desarrollo de colonias (CE_{50} , CE_{90}), cada fungicida (Cuadro 1) se adicionó al medio de PDA a 50 °C para obtener seis diferentes concentraciones: 0 (testigo), 0.1, 1, 10, 100 y 1000 mg i.a. L^{-1} . Una vez adicionado el fungicida al PDA, ambos se mezclaron durante 1 min con un agitador magnético estéril. La mezcla se vació en cajas Petri de plástico y se dejaron reposar por 48 h. Se prepararon cuatro cajas por cada concentración de fungicida y testigo. Posteriormente, se preparó una suspensión de teliosporas, previamente desinfectadas, en agua destilada estéril; la concentración se ajustó a 50 000 teliosporas mL^{-1} . Se depositó una alícuota de 0.5 mL de la suspensión por caja con PDA y fungicida, cada alícuota se distribuyó uniformemente sobre el medio de cultivo con un triángulo de vidrio estéril. Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C. El efecto de los fungicidas sobre la germinación de teliosporas y desarrollo de colonias de basidiosporas se evaluó después de 96 h de incubación como se describió anteriormente. El experimento se repitió dos veces bajo un diseño factorial (fungicida, tiempo, repetición).

El porcentaje de inhibición de la germinación y desarrollo de colonias para cada concentración de fungicida se calculó con respecto al porcentaje del testigo. El análisis de regresión Probit se utilizó para calcular los valores de concentración efectiva con la cual se inhibe el 50 y 90% de germinación y desarrollo de colonias. Los valores de la concentración efectiva a 50 y 90% se analizaron mediante un análisis de varianza interpretado con el modelo lineal general (GLM) de SAS (Statistical Analysis System, versión 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Los factores considerados en el modelo

fueron: experimento (ejecutado 2 veces) y fungicida. Se hizo una comparación de medias utilizando la diferencia mínima significativa (DMS) calculada a $P=0.05$.

4.4.2 Evaluación *in vivo* de fungicidas en el tratamiento a semilla

4.4.2.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas del híbrido AS-910, reportado por agricultores del Valle de Toluca como un material muy susceptible al carbón de la espiga. Las semillas se lavaron con agua destilada y se desinfectaron con una solución a 1.5% de NaOCl por 3 min, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril y se secaron a 22 °C sobre papel absorbente estéril.

4.4.2.2 Fungicidas

Se utilizaron los fungicidas mencionados en el Cuadro 1 en tres diferentes dosis: alta (1.5x), recomendada (1x) y baja (0.5x), donde “x” fue la dosis de aplicación indicada por el fabricante. La cantidad requerida de cada fungicida (en sus diferentes dosis) se midió o pesó y adicionó por separado a 100 g de semilla tratada vía húmeda al 2% de agua y contenida en bolsas de polietileno. Las bolsas se agitaron vigorosamente por 5 min para lograr la distribución uniforme del fungicida y se secaron por 24 h a 22 °C. Semilla sin tratar se usó como testigo.

4.4.2.3 Inoculación de semilla

Por separado, se sumergieron en una suspensión de 1% carboximetilcelulosa de sodio y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} semillas tratadas previamente con los fungicidas y sin tratar; después de 1 min, se recuperaron, secaron a 22 °C por 24 h y se sembraron en macetas con suelo a una profundidad de 2 cm. Las características del suelo utilizado fueron: pH de 8.0, conductividad eléctrica de 5.08 dSm^{-1} , contenido de materia orgánica de 3.23% y textura franco-arenosa (arena 75.6%, limo 14.5% y arcilla 9.9%). Se utilizaron 3 macetas por tratamiento con 20 semillas cada una. Las macetas se colocaron en un invernadero con un arreglo experimental fue completamente al azar. La efectividad de los tratamientos anteriores se midió en base a la incidencia del carbón de la espiga en plantas de maíz desarrolladas y la comprobación de la infección se realizó mediante la identificación de soros en la panoja, mazorca o en ambos. Los datos

de incidencia de carbón se sometieron a análisis de varianza y separando de medias mediante la diferencia mínima significativa a un nivel de significancia de $P=0.05$.

4.5 Resultados y discusión

4.5.1 Evaluación de fungicidas *in vitro*

La mayor cantidad de teliosporas germinadas en el testigo (32%) se obtuvo después de 96 h de incubación. Tanto en el testigo como en algunos tratamientos con fungicida, las teliosporas formaron un basidio septado con cuatro células, cada una de las cuales originó una basidiospora.

Todos los fungicidas inhibieron significativamente la germinación de teliosporas comparados con el testigo ($P<0.05$) a 96 h después de la inoculación de cajas (Cuadro 2). Carboxín, carboxín+captán, tebuconazole y tebuconazole+Thiram, inhibieron completamente la germinación en sus tres dosis mientras que el porcentaje de inhibición se incrementó conforme aumentó la concentración de fungicida de difeconazole, propiconazole y triadimenol. Dichos fungicidas tuvieron el mismo efecto en la formación de basidiosporas y con ello el de las colonias.

Se observaron diferencias morfológicas a nivel del largo del tubo germinativo. Todos los fungicidas, excepto triadimenol a 0.5x, redujeron significativamente el tamaño del tubo germinativo respecto al testigo a las 96 h después de la inoculación de cajas (Cuadro 3). Difeconazole en sus tres diferentes dosis fue el fungicida que redujo en mayor proporción el largo del tubo germinativo mientras que propiconazole solo en la dosis de 1.5x.

Cuadro 2. Efecto de diferentes fungicidas adicionados al medio PDA en la germinación de teliosporas y la formación de basidiosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* a 25 °C en oscuridad durante 96 h de incubación.

Fungicida	Dosis	mL fungicida/100 g de semilla	% inhibición de germinación	% de inhibición de colonias
Testigo	--	0.0	0.0	0.0
Carboxín	0.5x	0.125	100	100
	1.0x	0.250	100	100
	1.5x	0.375	100	100
Carboxín+captán	0.5x	0.13*	100	100
	1.0x	0.26*	100	100
	1.5x	0.39*	100	100
Difeconazole	0.5x	0.25	37.5	98.2
	1.0x	0.50	50.0	100
	1.5x	0.75	67.7	100
Propiconazole	0.5x	0.25	21.9	77.2
	1.0x	0.50	45.8	96.2
	1.5x	0.75	57.3	97.1
Tebuconazole	0.5x	0.25	100	100
	1.0x	0.50	100	100
	1.5x	0.75	100	100
Tebuconazole+thiram	0.5x	0.15	100	100
	1.0x	0.30	100	100
	1.5x	0.45	100	100
Triadimenol	0.5x	0.25	9.4	62.1
	1.0x	0.50	25.0	77.9
	1.5x	0.75	58.3	79.4
CV %			3.52	0.34
DMS _(0.05)			4.33	0.52

x = dosis de aplicación recomendada por el fabricante, * = gramos de producto, DMS=Diferencia mínima significativa.

Cuadro 3. Efecto de diferentes dosis de fungicidas adicionados al medio PDA sobre el tamaño del tubo germinativo de teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* incubadas a 25 °C en oscuridad durante 96 h.

Fungicida	Dosis de fungicida/Largo de tubo germinativo (μm)		
	1.5x	1x	0.5x
Difeconazole	16.5	17.2	17.3
Propiconazole	16.3	20.2	21.1
Triadimenol	20.8	20.5	21.6
Testigo		22.8	
CV %		9	
DMS		1.4	

x = dosis de aplicación recomendada por el fabricante, DMS=Diferencia mínima significativa.

4.5.1.1 Concentración efectiva de fungicidas a la cual se inhibe el 50 y

90% de la germinación teliosporas y formación de colonias

Debido a que el triadimenol no afectó la germinación de teliosporas, los resultados obtenidos con sus diferentes concentraciones no se incluyeron en el análisis estadístico. La CE_{50} y CE_{90} para la inhibición de la germinación de teliosporas de *S. reilianum* se presentan en el Cuadro 4. Carboxín, carboxín+captán y tebuconazole+thiram tuvieron el mayor efecto en la inhibición de la germinación con valores de 0.054 a 0.130 mg i.a. L^{-1} para CE_{50} y de 0.091 a 3.539 mg i.a. L^{-1} para CE_{90} ; mientras que, difeconazole, propiconazole y tebuconazole, el menor efecto, con valores de 0.306 a 2.104 mg i.a. L^{-1} para la CE_{50} .

En el caso de la concentración efectiva para inhibir el 90% de la germinación, los fungicidas difeconazole, propiconazole y tebuconazole tuvieron menor efectividad con valores mayores a las concentraciones evaluadas en este trabajo (>1000 mg i.a. L^{-1}) para el caso de difeconazole y propiconazole.

También en el Cuadro 4 se presentan los valores de la CE_{50} y CE_{90} para la inhibición de la formación de colonias de basidiosporas de *S. reilianum*. Carboxín en todas sus concentraciones probadas fue el único fungicida que inhibió la formación de colonias.

En el caso de la concentración requerida para inhibir el 50% de las colonias (CE_{50}) todos los fungicidas fueron efectivos estadísticamente con valores menores a 0.1 mg i.a. L^{-1} , con excepción de propiconazole el cual presentó un valor de 0.251 mg i.a. L^{-1} .

Respecto a la CE_{90} , el análisis de varianza de los valores medios determinó que carboxín+captán, difeconazole, tebuconazole y tebuconazole+thiram fueron los más efectivos en la reducción de formación de colonias con intervalo de valores de 0.27 a 12.10 mg i.a. L^{-1} . Propiconazole fue menos efectivo en la reducción de formación de colonias con un valor de CE_{90} de 136.32 mg i.a. L^{-1} .

Cuadro 4. Concentración efectiva de fungicidas a la cual se inhibe el 50 y 90% de germinación de teliosporas y desarrollo de colonias de basidiosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* incubadas a 25 °C en oscuridad durante 96 h.

Fungicida	Germinación		Formación de colonias	
	CE_{50}	CE_{90}	CE_{50}	CE_{90}
Carboxín	0.054	0.091	0.000	0.00
Carboxín+captán	0.109	1.117	0.075	0.27
Difeconazole	1.095	3916.205	0.064	12.10
Propiconazole	2.104	6116.464	0.251	136.32
Tebuconazole	0.306	23.948	0.088	6.63
Tebuconazole+thiram	0.130	3.539	0.035	1.46
DMS	0.876	5.963	0.077	61.996

DMS=Diferencia mínima significativa.

4.5.2 Evaluación *in vivo* de fungicidas en el tratamiento a semilla

En el Cuadro 5 se presentan los resultados del porcentaje de incidencia de carbón de la espiga en plantas de maíz desarrolladas a partir de semillas inoculadas con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* y tratadas con diferentes fungicidas y dosis.

Todos los tratamientos con semillas inoculadas con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* y tratadas con diferentes dosis de fungicidas, redujeron significativamente el número de plantas infectadas con *S. reilianum* f. sp. *zeae* comparados con el testigo ($P < 0.05$), el cual registró 73.67% de plantas infectadas. Sin embargo, tebuconazole y tebuconazole+thiram, proporcionaron mejor control cuando se aplicaron en su dosis recomendada y alta (0 % de incidencia de carbón). Estos mismos fungicidas, en dosis baja, resultaron en 12.12 y 7.87% de incidencia, respectivamente. Carboxín, carboxín+captán, difeconazole, propiconazole y triadimenol en sus tres dosis resultaron en incidencias del carbón de la espiga significativamente diferentes al testigo, pero ineficientes en el control de la enfermedad con respecto a los fungicidas tebuconazole y tebuconazole+thiram.

Cuadro 5. Porcentaje de incidencia del carbón de la espiga en plantas de maíz del híbrido AS-910, desarrolladas a partir de semillas tratadas con diferentes fungicidas.

Producto	Dosis	mL fungicida/100 g de semilla	% de incidencia
Testigo	--	--	73.67
Carboxín	0.5x	0.125	31.11
	1.0x	0.250	7.41
	1.5x	0.375	5.55
Carboxín+captán	0.5x	0.13*	32.22
	1.0x	0.26*	25.92
	1.5x	0.39*	25.00
Difeconazole	0.5x	0.25	21.07
	1.0x	0.50	17.80
	1.5x	0.75	13.17
Propiconazole	0.5x	0.25	14.50
	1.0x	0.50	11.90
	1.5x	0.75	6.97
Tebuconazole	0.5x	0.25	12.12
	1.0x	0.50	0.00
	1.5x	0.75	0.00
Tebuconazole+thiram	0.5x	0.15	7.87
	1.0x	0.30	0.00
	1.5x	0.45	0.00
Triadimenol	0.5x	0.25	27.67
	1.0x	0.50	23.93
	1.5x	0.75	13.70
CV %			79.92
DMS _(0.05)			20.72

x = dosis de aplicación recomendada por el fabricante, * = gramos de fungicida por 100 g de semilla, DMS=Diferencia mínima significativa.

Las plantas de maíz desarrolladas a partir de semilla inoculada con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae*, presentaron formación de soros en panoja y mazorca. Las panojas se encontraron parcialmente invadidas por el hongo y las espiguillas poco desarrolladas (Figura 1A). En la mazorca, los soros eliminaron la producción de grano (Figura 1B).

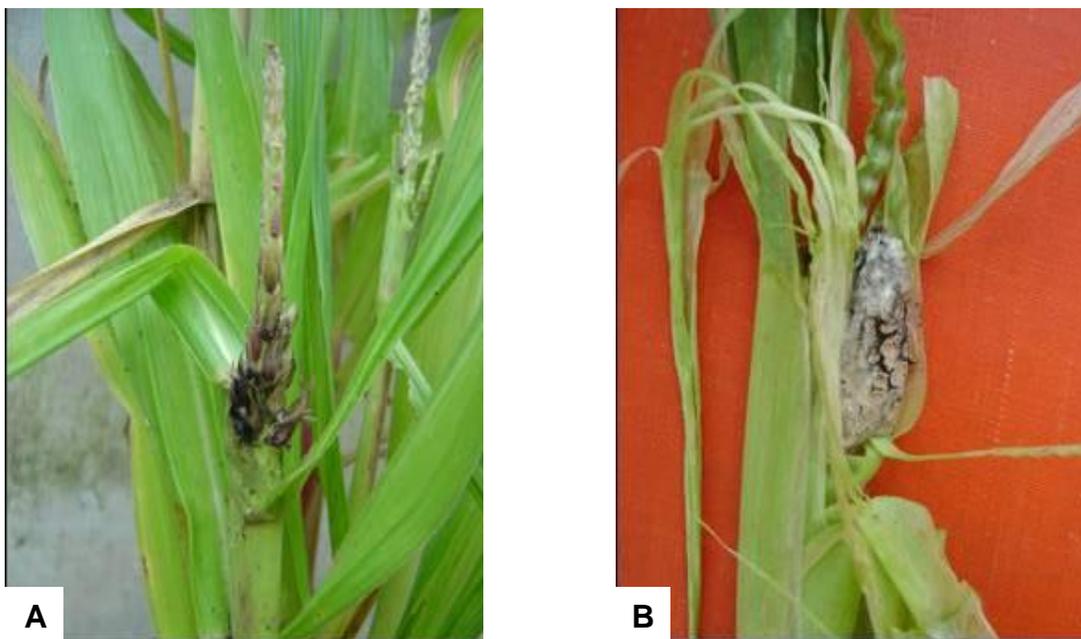


Figura 1. Plantas de maíz desarrolladas a partir de semilla inoculada con teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, con formación de soros en panoja (A) y mazorca B).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el control del carbón de la espiga es posible mediante el tratamiento de semilla con tebuconazole y tebuconazole+thiram. Esto coincide con lo reportado por Pradhanang y Ghimire (1996), quienes también registraron 0% de infección al utilizar tebuconazole en el tratamiento a semilla. Sin embargo, en su investigación el método de inoculación no resultó en alta infección como la reportada en el presente estudio. En México, estos fungicidas ofrecen alternativas viables en el control de la enfermedad, pero infortunadamente ninguno está registrado para su uso en maíz.

En el caso de triadimenol, se han observado diferentes grados de control de la enfermedad con porcentajes de incidencia entre 8 y 30.52% (Pradhanang y Ghimire, 1996; Martínez y Ledesma, 1990; Koepsell y Bagget, 1980). En este estudio, se obtuvo como máximo 27.67 % de plantas enfermas cuando las semillas fueron tratadas con la dosis baja de triadimenol y 23.93 % con la recomendada. Este producto está recomendado para control del carbón de la espiga de maíz aplicado a la semilla para el control de la infección de plántulas con *S. reilianum* principalmente en el estado de México, por lo que se recomienda precaución en el uso de este insumo.

Los tratamientos carboxín+captán y carboxín fueron inefectivos en el control del carbón de la espiga; estos presentaron, en dosis baja el mayor número de plantas (32.22 y 31.11%) con síntomas de carbón de la espiga después del testigo, en la recomendada 25.92 y 7.41% y en dosis alta 25 y 5.55%. Estos resultados coinciden con lo reportado por Martínez y Ledesma (1990), Stienstra *et al.* (1985) y Stienstra *et al.* (1983); además Wright *et al.*, (2006) reportan a carboxín como inefectivo en el control de la infección de plantas de maíz por *Sporisorium reilianum*. Cuando estos tratamientos se adicionaron al medio PDA evitaron la germinación de teliosporas por lo que se deduce que la falta de control de la infección de plantas de maíz puede deberse a la rápida degradación del ingrediente activo (carboxín) por microorganismos que habitan el suelo, por sus condiciones físicas y químicas o bien por la cantidad de fungicida aplicado. Al respecto, se sabe que el carboxín se puede degradar completamente en 15 días dependiendo de los microorganismos presentes en el suelo (Balasubramanya y Patil, 1980b), en 30 días relacionado con las propiedades fisicoquímicas del suelo (Balasubramanya y Patil, 1980a) y entre 20 y 36 días dependiendo de la cantidad de fungicida aplicado al suelo (Agnihotri *et al.*, 1973).

Por último, difeconazole y propiconazole proporcionaron diferentes porcentajes de control de la infección, ya que todos sus tratamientos disminuyeron significativamente el número de plantas infectadas respecto al testigo obteniéndose porcentajes de incidencia entre 13.17-21.07% para difeconazole y 6.97-14.50 para propiconazole. Por tal efecto, en base a los resultados obtenidos en este trabajo, estos productos no se recomiendan para el tratamiento de semilla de maíz debido a que se obtuvieron mejores resultados con tebuconazole y tebuconazole+thiram.

4.6 Conclusiones

La inhibición de la germinación de teliosporas y el control del carbón de la espiga es posible mediante el uso de tebuconazole y tebuconazole+thiram, a dosis de aplicación recomendada en semilla de maíz a 500 y 300 mL 100 kg de semilla⁻¹, respectivamente.

En las pruebas *in vitro*, carboxín y carboxín+captán inhiben en 100% la germinación de teliosporas; sin embargo, fueron inefectivos en el control del carbón de la espiga

cuando se aplicaron a la semilla, permitiendo porcentajes de incidencia de hasta 31.11 y 32.22, respectivamente.

Aunque triadimenol es un producto recomendado para el control del carbón de la espiga, en este trabajo permitió la germinación de teliosporas hasta en un 90.6% y resultó en 27.67% de incidencia de la enfermedad en plantas desarrolladas a partir de semillas tratadas.

4.7 Literatura citada

Agnihotri, V. P., Singh Kishan, and Budhraj, T. R. 1973. Persistence and degradation of vitavax in soil and sugarcane setts and its effect on soil fungi. *Indian J. Sugarcane Res.* 39:561-568.

Balasubramanya, R. H., and Patil, R. B. 1980a. Degradation of carboxin and oxycarboxin in different soils. *Plant and Soil* 57:195-201.

Balasubramanya, R. H. and Patil, R. B. 1980b. Degradation of carboxin and oxycarboxin by microorganisms. *Plant and Soil* 57:457-462.

Bernardo, R., Bourrier, M., and Oliver, J. L. 1992. Generation means analysis of resistance to head smut in maize. *Agronomie* 12:303-306.

Frederiksen, R. A. and Reyes, L. 1980. The head smut program at Texas A&M. pp. 367-372. In: R.J. Williams, R.A. Frederiksen, L.K. Mughogho, and G.D. Bengston (eds.). *Sorghum Diseases: A World Review*. ICRISAT. Patancheru, A.P., India.

Fredericksen, R. A. 1977. Head smut of corn and sorghum. *Proc. Corn Sorghum Res. Conf.* 32:89-104.

Fullerton, R. A. 2002. A smutty story. *Grower* 57:44-52.

- Ingold, C. T. 1994. Products of teliospore germination in *Sporisorium* spp. Mycol. Res. 98:467-473.
- Jin, Q. M., Li, J. P., Zhang, X. W., Wang, G. X., Song, S. Y., Liu, Y. C., and Wang, L.X. 2000. Establishment IPM of system of corn diseases and pest insects in the spring corn belt. J. Maize Sci. 8:84-88.
- Koepsell, P. A. and Bagget, J. R. 1980. Chemical control of corn head smut on corn. Fungic. Nemat. Tests 36:156.
- Martinez, C. A., Jauneau, C., Roux, C., Savy, C., and Dargent, R. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. Protoplasma 213:83-92.
- Martinez, C. A., Roux, C. and Dargent, R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. Phytopathology 89:247-253.
- Martínez, R. J. L. y Ledesma, M. J. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en el Valle de Zapopan, Jalisco. Rev. Mex. Fitopatol. 8:68-70.
- Matyac, C. A., and Kommedahl, T. 1985a. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. Phytopathology 75:577-581.
- Matyac, C. A., and Kommedahl, T. 1985b. Occurrence of chlorotic spots on corn seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. Plant Dis. 69:251-254.
- Pataky, J. K. 1999. Smuts. pp 33-35. In: White D.G. (ed). Compendium of corn diseases. 3rd. Ed. St. Paul, MN, APS Press.

- Pérez, C. J. P., Bobadilla, M. M., Velásquez, C. G., Zacatenco, G. M. A., y Espinoza, C. A. 2006. Logros y aportaciones de la investigación en maíz de riego en el Valle del Mezquital, Hgo. pp 55-65. En: Memorias de veinte años de investigación y desarrollo tecnológico. Campo Exptl. Pachuca, Hidalgo, INIFAP, Pachuca, México.
- Pradhanang, P. M., and Ghimire, S. R. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. Trop. Agric. 73:325-328.
- Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Stromberg, E. L., Matyac, C. A., Windels, C. E., and Morgan, F. 1985. Suppression of Corn head smut with seed and soil treatments. Plant Dis. 69:301-302.
- Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Matyac, C. A., Windels, C. E., and Geadelmann, J. L. 1983. Corn head smut control by hybrid selection and chemical seed treatment. Phytopathology 73:844.
- Stromberg, E. L. 1981. Head smut of Maize, a new disease in Minnesota. Phytopathology 71:906.
- Wright, P. J., Fullerton, R. A., and Koolaard, J. P. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetcorn (*Zea mays*). New Zealand J. Crop and Hort. Sci. 34:23-26.

CONCLUSIONES GENERALES

La inoculación de semillas de maíz con una suspensión de 1.7×10^7 mL⁻¹ teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* y 1% de carboximetilcelulosa de sodio, induce un 96.6% de plántulas infectadas en materiales susceptibles bajo condiciones controladas de 25 °C y 12 h luz.

Es posible identificar líneas de maíz resistentes a *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* mediante la inoculación de sus semillas con una suspensión de 1.7×10^7 mL⁻¹ teliosporas y 1% de carboximetilcelulosa de sodio y siembra en invernadero con condiciones de humedad relativa de 69.76% y 21.61 °C de temperatura ambiente.

El mejor método de control de *S. reilianum* f. sp. *zeae* es mediante la identificación de genotipos de maíz resistentes a este patógeno; sin embargo, el tratamiento de semilla con los fungicidas tebuconazole y tebuconazole+thiram representa una alternativa de control ya que inhiben la germinación de teliosporas y proporcionan un 0% de infección de plantas a dosis de aplicación de 500 y 300 mL 100 kg de semilla⁻¹, respectivamente.