



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**HERENCIA DE LA RESISTENCIA A *Sporisorium*
reilianum f. sp. *zeae* EN GERMOPLASMA DE MAÍZ (*Zea*
mays L.) DE ALTURA**

GUILLERMO MARQUEZ LICONA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

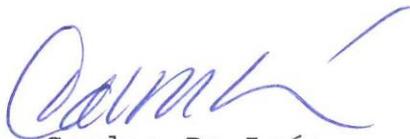
CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Guillermo Márquez Licona, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Carlos De León, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis HERENCIA DE LA RESISTENCIA A Sporisorium reilianum f. sp. zae EN GERMPLASMA DE MAÍZ (Zea mays L.) DE ALTURA y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 27 de diciembre de 2017



Firma del
Alumno (a)



Dr. Carlos De León

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **HERENCIA DE LA RESISTENCIA A *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae* EN GERMPLASMA DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE ALTURA** realizada por el alumno: **GUILLERMO MARQUEZ LICONA** 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
FITOPATOLOGIA**

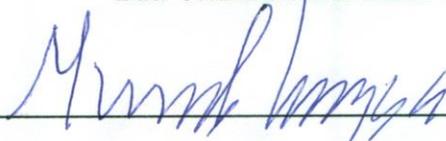
CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:



DR. CARLOS DE LEÓN

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:



DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR:



DR. DANIEL TÉLIZ ORTIZ

ASESOR:



DR. FERNANDO CASTILLO GONZÁLEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2017

HERENCIA DE LA RESISTENCIA A *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* EN GERMOPLASMA DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE ALTURA

Márquez Licona Guillermo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El carbón de la espiga del maíz causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* es una enfermedad importante debido a las pérdidas que ocasiona por reducción en el rendimiento. A pesar de que existen diferentes métodos de control, la selección de resistencia genética es la medida de control más eficiente para el manejo de la enfermedad. Debido a la falta de información sobre la herencia de la resistencia a la enfermedad en germoplasma de maíz de altura de México, en Mixquiahuala, Hgo. se determinó la base genética de la resistencia a *S. reilianum* f. sp. *zeae* en este germoplasma, mediante la caracterización de la aptitud combinatoria general (ACG), la aptitud combinatoria específica (ACE), heredabilidad (h^2) y heterosis de 14 líneas S_3 mediante el diseño II de Griffing que incluyó 14 líneas parentales más las 91 cruzas directas. Se utilizó el diseño experimental fue bloques completos al azar con tres repeticiones. Tanto la ACG como la ACE fueron altamente significativas ($P < 0.01$), lo que indica que tanto los efectos de dominancia como los efectos de aditividad son importantes en la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, la ACG fue más grande que la ACE, indicando que los efectos aditivos son más importantes. Los híbridos más resistentes fueron los derivados de dos líneas con una alta ACG. Las mejores líneas para producir híbridos altamente resistentes fueron P2 y P1, que tuvieron los mejores efectos negativos de ACG. La heredabilidad en sentido estricto fue de 0.22. Lo anterior indica que mediante selección recurrente los genes de resistencia pueden ser acumulados e incrementar el nivel de resistencia a la enfermedad. De igual forma, se evaluó la respuesta de maíces nativos a la infección del carbón de la espiga del maíz, mediante inoculación artificial. Considerando la procedencia geográfica de las poblaciones evaluadas, los maíces del estado de México presentaron un menor porcentaje de plantas infectadas, lo que puede indicar la presencia de genes de resistencia a la enfermedad.

Palabras clave: Herencia de la resistencia, diseño dialélico, maíz nativo, carbón de la espiga, inoculación artificial con teliosporas.

INHERITANCE OF RESISTANCE TO *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* IN MAIZE GERMPLASM (*Zea mays* L.) OF HIGHLANDS

Márquez Licona Guillermo, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Head smut of maize caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* is a disease of importance due to losses caused by the reduction in yield. Although there are different control methods, the selection of genetic resistance is the most efficient control measure for the management of the disease. Due to the lack of information on the inheritance of disease resistance in highland maize germplasm from Mexico, in Mixquiahuala, Hgo. the genetic basis of resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* was determined in this germplasm, through the characterization of the general combinatorial aptitude (GCA), the specific combinatorial aptitude (ACE), heritability (h^2) and heterosis of 14 S_3 lines through the design II of Griffing that included 14 parental lines plus 91 direct crosses. We used the experimental design of the complete blocks at random with three repetitions. Both the ACG and the ACE were highly significant ($P < 0.01$), which indicates that both the dominance and additivity effects are important in the resistance to the disease. However, the ACG was larger than the ACE, indicating that the additive effects are more important. The most resistant hybrids were those derived from the lines with a high ACG. The best lines to produce hybrids were P2 and P1, which had the best negative effects of ACG. The heritability in the strict sense was 0.22. This indicates that through recurrent selection, the resistance genes can be accumulated and increase the level of resistance to the disease. Similarly, the response of native maize to infection by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, causal agent of the head smut, was evaluated by artificial inoculation. Considering the geographical origin of the populations, the maize of the state of Mexico presented a lower percentage of infected plants, which may indicate the presence of genes of resistance to the disease.

Key words: Inheritance of the resistance, dialélico design, native maize, head smut, artificial inoculation with teliospores.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 371568 otorgada para la realización de mis estudios de postgrado.

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

A mi consejo particular Dr. Carlos De León, Dr. Santos Gerardo Leyva Mir, Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dr. Mateo Hernández Vargas y Dr. Fernando Castillo González por su amistad, consejos, asesoría y apoyo en la dirección, planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

A la Dra. Alma Rosa Solano Báez por todo el apoyo técnico aportado al presente trabajo de investigación.

Al Ing. Jaime Ortega Bernal por su apoyo y valiosas aportaciones a la presente investigación.

Al personal de administrativo del Postgrado de Fitopatología por facilitar mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

DEDICATORIA

A mi esposa Alma Rosa Solano Báez,
por tu amor y apoyo incondicional.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS	3
CAPITULO I. EL CARBÓN DE LA ESPIGA DEL MAÍZ.....	5
1.1.- Historia de la enfermedad	5
1.2.- Taxonomía del patógeno	6
1.3.- Desarrollo histórico de la enfermedad en México	7
1.4.- Agente causal y síntomas	7
1.5.- Ciclo de la enfermedad.....	9
1.6.- Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad	10
1.7.- Transmisión por semilla.....	10
1.8.- Control.....	10
1.9.- Resistencia genética a enfermedades	11
1.10.- Herencia de la resistencia.....	13
1.11.- Análisis de diseños dialélicos.....	14
1.12.- Aptitud Combinatoria General y Específica	16
1.13.- Heredabilidad	17
1.14.- Heterosis.....	18
Literatura citada.....	18
CAPITULO II. INOCULACIÓN ARTIFICIAL DE <i>Sporisorium reilianum</i> f.	
sp. <i>zeae</i> EN GERMOPLASMA DE MAÍZ.....	24
Resumen	24
Abstract.....	24
1.- Introducción	25
2.- Materiales y Métodos	27
2.1.- Inóculo.....	27
2.2.- Evaluación de los tratamientos en invernadero.....	29

2.3.- Validación en campo.....	31
2.4.- Implementación del mejor método para la selección de germoplasma.....	32
3.- Resultados y discusión	33
3.1.-Inóculo.....	33
3.2.- Evaluación de los tratamientos en invernadero.....	36
3.3.- Validación en campo.....	38
3.4.- Implementación del mejor método para la selección de germoplasma.....	39
4.- Conclusiones	41
5.- Literatura citada.....	41
CAPITULO III .. HERENCIA DE LA RESISTENCIA A <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> EN GERMOPLASMA DE MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.) DE ALTURA	45
Resumen	45
Abstract.....	46
1.- Introducción	46
2.- Materiales y Métodos	48
2.1.- Germoplasma de maíz utilizado.....	48
2.2.- Evaluación de infección de líneas S ₃	48
2.3.- Selección de progenitores	49
2.4.- Diseño de apareamiento genético.....	49
2.5.- Análisis de información colectada	50
2.6.- Análisis dialélico.....	50
3.- Resultados y discusión	51
3.1.- Análisis de varianza	52
3.2.- Variabilidad de los progenitores	53
3.3.- Variabilidad de los híbridos	54
3.4.- Análisis dialélico.....	57
3.4.1.- Efectos de Aptitud Combinatoria General	57
3.4.2.- Efectos de Aptitud Combinatoria Especifica	59
3.5.- Heredabilidad	62
3.6.- Heterosis.....	62
4.- Conclusiones	64

5.- Literatura citada.....	64
CAPITULO IV. RESPUESTA DE GERMOPLASMA NATIVO DE MAÍZ A LA	
INFECCIÓN POR <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>	67
Resumen	67
Abstract.....	67
1.- Introducción	68
2.- Materiales y Métodos	69
2.1.- Germoplasma de maíces nativos	69
2.2.- Inóculo.....	70
2.3.- Inoculación de semillas de maíz con teliosporas de <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>	70
2.4.- Siembra	71
2.5.- Evaluación.....	71
2.6.- Análisis de datos	71
3.- Resultados y discusión	72
4.- Conclusiones	80
5.- Literatura citada.....	80
CONCLUSIONES GENERALES	82

LISTA DE CUADROS

CAPITULO II

Cuadro 2.1. Tratamientos evaluados para la determinar una técnica de inoculación eficiente de <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> en semillas de maíz.....	29
Cuadro 2.2. Efecto de los adherentes sobre la germinación de teliosporas de <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>	36
Cuadro 2.3. Porcentaje de plántulas de maíz infectadas con <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> , generadas de semillas inoculadas con teliosporas utilizando diferentes tratamientos.	38
Cuadro 2.4. Porcentaje de plántulas de maíz infectadas con <i>S. reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i> , generadas de semillas inoculadas con teliosporas utilizando diferentes tratamientos en la evaluación en campo.	39

CAPITULO III

Cuadro 3.1. Nombre, origen e incidencia de infección de progenitores utilizados en el diseño de apareamiento dialélico tipo Griffing Diseño II.	52
Cuadro 3.2. Análisis de varianza para la incidencia del CEM en el dialélico.....	52
Cuadro 3.3. Análisis de varianza para la incidencia del CEM en las 18 líneas parentales que conforman al diseño dialélico.	53
Cuadro 3.4. Porcentajes de infección del CEM registrados en las 18 líneas progenitoras seleccionadas para el diseño dialélico.	54
Cuadro 3.5. Análisis de varianza para la incidencia del CEM en los 91 híbridos del diseño dialélico.....	54
Cuadro 3.6. Incidencia promedio del CEM registrada en 91 híbridos incluidos en el diseño dialélico.....	56
Cuadro 3.7. Aptitud combinatoria general calculada en el diseño dialélico para la resistencia al CEM.....	57
Cuadro 3.8. Efectos de aptitud combinatoria especifica estimados para los 91 híbridos resultantes del diseño dialélico del CEM.	61

Cuadro 3.9. Componentes de varianza y heredabilidad en los dos sentidos calculada en el diseño dialélico para la resistencia al carbón de la espiga del maíz.	62
Cuadro 3.10. Heterosis absoluta estimada para los 91 híbridos resultantes del diseño dialélico del CEM.....	63

CAPITULO IV

Cuadro 4.1. Origen geográfico de las 55 poblaciones de maíz nativo	70
Cuadro 4.2. Porcentaje de poblaciones de maíz nativo por estado afectadas con carbón de la espiga en 2015.....	73
Cuadro 4.3. Porcentaje de poblaciones de maíz nativo por estado afectadas con carbón de la espiga en 2016.....	74
Cuadro 4.4. Separación de medias Tukey de los genotipos de maíces nativos evaluados en 2015.	74
Cuadro 4.5. Número de poblaciones evaluadas y afectadas de maíces nativos por estado evaluados en 2015.	76
Cuadro 4.6. Separación de medias Tukey de los genotipos maíces nativos evaluados en 2016.	76
Cuadro 4.7. Número de poblaciones evaluadas y afectadas de maíces nativos por estado evaluados en 2016.	78

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1.1. Mazorcas de maíz con signos y síntomas de *S. reilianum* f. sp. *zeae*. 8
- Figura 1.2. Panojas de maíz con signos y síntomas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* 8

CAPITULO II

- Figura 2.1. Estructuras de *S. reilianum* f. sp. *zeae*. A. Masa de teliosporas, B. Teliospora, C. Células estériles agrupadas. D. Teliospora germinada. 34
- Figura 2.2. Aspecto de las colonias de *S. reilianum* f. sp. *zeae* en medio cultivo PDA. 35
- Figura 2.3. Productos de amplificación mediante PCR empleando los iniciadores ITS1F y NL4. MM. marcador molecular Pst1. 1. ADN de cultivo monobasidial generado a partir de teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* usadas en inoculación de semillas de maíz. 2. ADN de cultivo monobasidial de teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* de espigas enfermas de maíz colectadas al momento de la evaluación final en invernadero. 3. ADN de espigas sanas. 4.- Testigo con agua. 35
- Figura 2.4. A. Aspecto de las plantas y B. mazorcas de plantas testigo (T) y de plantas de semilla inoculada (I) con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae*. 37
- Figura 2.5. Distribución de incidencia en líneas S3 de maíz de endospermo blanco afectadas con carbón de la espiga 45 días después de floración. 40

CAPITULO III

- Figura 3.1. Esquema del diseño de apareamiento dialélico tipo Griffing Diseño II. 49
- Figura 3.2. Frecuencia de incidencia del CEM en líneas S3 de maíz de endospermo blanco en plantas 45 días después de floración. 51
- Figura 3.3. Aptitud combinatoria general de las 14 líneas que constituyeron el diseño dialélico para resistencia al CEM. 58

CAPITULO IV

Figura 4.1. Porcentaje de poblaciones de maíces nativos con carbón de la espiga en 2015.	72
Figura 4.2. Porcentaje de poblaciones de maíces nativos con carbón de la espiga en 2016.	73
Figura 4.3. Número de poblaciones de maíces nativos con carbón de la espiga evaluados en los ciclos 2015 y 2016.	79

INTRODUCCIÓN GENERAL

Mesoamérica es reconocida como el centro de origen y diversidad de aproximadamente 225 especies vegetales cultivadas, siendo el maíz (*Zea mays* L.) una de las contribuciones más importantes. Es aceptado que el teosinte es el ancestro silvestre del maíz y que ha participado directamente en el origen del maíz cultivado (Kato *et al.*, 2009).

El maíz fue una de las primeras plantas cultivadas por los agricultores hace 10 000 años. La evidencia más antigua del maíz como alimento humano proviene de cuevas en México, donde se encontraron pequeñas mazorcas de maíz estimadas en más de 5 000 años de antigüedad (Paliwal, 2001).

Debido a su origen ancestral, este cultivo presenta una amplia gama de usos desde alimenticios, religiosos, medicinales, decorativos, artesanales, industriales como abono o combustible. Por ejemplo, gracias al proceso de nixtamalización que favorece la biodisposición del calcio, aminoácidos y niacina, los granos pueden usarse para la elaboración de la masa para tortillas, tamales, atole, etc. (Kato *et al.*, 2009). La industria utiliza el maíz como forraje y en la obtención de diversos compuestos químicos que son comercializados en alimentos, medicinas y cosméticos: miel de maíz, azúcar de maíz, dextrosa, almidón o fécula, aceite, color caramelo, dextrina, malto dextrina, ácido láctico, sorbitol, etc. Por otro lado, se le considera un recurso energético renovable, ya que de él se obtiene etanol que se utiliza principalmente como combustible de automóviles y camiones (Esteva, 2003).

Actualmente, el maíz es uno de los cultivos más sembrados a nivel mundial, en 2016 se estima que la producción superó los 1300 millones de toneladas, convirtiéndolo en el segundo cultivo con mayor producción mundial, siendo los principales productores Estados Unidos, China, Brasil, Argentina y México. En nuestro país representa el principal cultivo en cuanto a superficie sembrada, alcanzado los 7.6 millones de hectáreas sembradas anualmente, con una producción total de 28.3 millones de toneladas de maíz, alcanzando un rendimiento promedio de 3.72 ton/ha (FAO, 2017).

Como cualquier otro cultivo, el maíz está expuesto a diversos factores que causan pérdidas tanto en calidad como en cantidad, por lo que el potencial productivo del cultivo es limitado por diversas causas, tales como las condiciones ambientales desfavorables, la fertilidad del suelo, malezas y la acción de diferentes plagas y enfermedades (Paliwal, 2001). Dentro de los factores bióticos que limita la producción del maíz, las enfermedades son el principal problema. Entre ellas destacan, la pudrición de mazorcas y tallos causada por diferentes especies de *Fusarium* (White, 2004), entre las enfermedades foliares sobresalen los tizones foliares ocasionados por *Exserohilum turcicum* y/o *Bipolaris maydis*, royas causadas por *Puccinia sorghi* o *Puccinia polysora*, el complejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Conothyrium phyllachorae*), la mancha foliar causada por *Cercospora zea-maydis*, el mildiu inducido por *Peronosclerospora sorghi* (De León, 2008). En mazorca y espiga, la principal enfermedad es el carbón causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, (Kühn) Langdon & Fullerton (Basidiomycota, Ustilaginaceae) llegando a reportarse incidencias de hasta el 80% (Frederiksen 1977), con reducciones en el rendimiento superiores al 30% (Matyac y Kommendahl, 1985).

El uso de productos químicos en la semilla es la medida de control más utilizada para el manejo del carbón de la espiga del maíz (Fullerton *et al.* 1974). Wang *et al.*, (2008) mencionan que el control químico es viable, sin embargo, por razones ecológicas y económicas el desarrollo de materiales resistentes a la enfermedad es la mejor estrategia de control. Wright *et al.* (2006) indican que el uso de germoplasma resistente a la enfermedad puede usarse de manera conjunta dentro un programa de manejo integrado de la enfermedad.

Actualmente, existe la necesidad de materiales resistentes al carbón de la espiga del maíz. Sin embargo, no se dispone de materiales resistentes debido a la falta de una técnica de inoculación eficiente para la selección de germoplasma resistente en campo abierto. De igual forma, se dispone de muy poca información sobre a la base genética de la resistencia y hasta la fecha no hay estudios exploratorios sobre la presencia de genes de resistencia a la enfermedad en maíces nativos. Por lo anterior, la presente investigación se planteó con los siguientes:

OBJETIVOS

- a. Desarrollar un método de inoculación de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, que permita un alto y consistente porcentaje de infección en campo para la selección confiable de germoplasma con resistencia genética a este patógeno.
- b. Determinar la base genética de la resistencia a *S. reilianum* f. sp. *zeae* en germoplasma de maíz con endospermo blanco, adaptado a Valles Altos de México.
- c. Determinar la respuesta de germoplasma nativo de maíz de los estados de Guerrero, México, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae*.

Literatura citada

- De León, C. 2008. Enfermedades importantes. En: El cultivo del maíz. Temas selectos. 2008. Vol. 1. Rodríguez-Montessoro, R. y De León, C. Eds. 127 p.
- Esteva, G. 2003. Los árboles de las culturas mexicanas. En: Esteva, G. y C. Marielle (eds). Sin maíz no hay país. CONACULTA. Museo Nacional de las Culturas Populares. México. pp. 17-28.
- Frederiksen, R. A. 1977. Head smuts of corn and sorghum. Proc. Annu. Corn Sorghum Res. Conf. 32nd. 89–105p.
- FAO. 2017. FAOSTAT statistics database. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Italia. (Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>).
- Fullerton, R. A., Scott, D. J., and Graham, G. J. 1974. Effect of fungicides on the control of head smut of maize, and the relationship between infection level and crop yield.

New Zeal. J. Exp. Agric. 2(2):177–179.

Kato, T.A., C. Mapes, L.M. Mera, J.A. Serratos, R.A. BYe. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 116 pp.

Matyac, C.A. and Kommendahl, T. 1985. Factors affecting the developmental of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology* 75:577–581.

Paliwal, L. R. 2001. Mejoramiento para resistencia a las enfermedades. En: Paliwal, L. R., Granados, G., Renée, L. H. y Violic, D. A. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma FAO.

Wang, Z. H., Li, X. H., Xie, C. X., Li, M. S., Hao, Z. F., George, M. L. C., *et al.* 2008. Genetic diversity in a collection of chinese maize inbred lines for resistance to head smut caused by *Sporisorium reiliana*. *Maydica*. 53:47–54.

Wright, P. J., Fullerton, R. A., and Koolaard, J. P. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetcorn (*Zea mays*). *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 34:23–26.

CAPITULO I

EL CARBÓN DE LA ESPIGA DEL MAÍZ

1.1.- Historia de la enfermedad

Kuhn (1875) describió por primera vez al hongo causal del carbón de la espiga del maíz como *Ustilago reiliana* en honor a su colector el Dr. Reili, quien, en 1868 le envió los primeros especímenes de Egipto. Sin embargo, Khun, Passerini (1877) y Brefeld (1883) fallaron al describir las esporas como lisas, cuando en realidad muestran equinulaciones cuando están maduras y secas.

Hirschhorn (1941) y Fisher (1953) reclasificaron el hongo dentro de los generos *Ustilago*, *Cintractia*, *Sporisorium* y *Sphacelotheca*. Actualmente se le ha reclasificado como *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) de acuerdo con Langdon & Fullerton (Martinez *et al.*, 1999).

El carbón de la espiga del maíz se ha reportado a través del tiempo en los siguientes lugares:

- 1.- India (Cooke, 1876).
- 2.- Italia (Passerini, 1877).
- 3.- Egipto (Kühn, 1878).
- 4.- África Oriental (Cugini, 1891; Busse, 1904).
- 5.- Japón (Hori, 1907).
- 6.- Australia (McAlpine, 1910).
- 7.- África del sur (Mundy, 1910; Evans, 1911).
- 8.- En 1876, Hennings reportó que la enfermedad se encontraba en África del Norte, África Oriental, Madagascar, India Oriental, así como en el centro y Sur de Europa.
- 9.- En Estados Unidos, los primeros reportes de la enfermedad fueron en Kansas (Failyer y Willard, 1890) en siembras de sorgo “Red Liberian” y se asume que esa fue la fuente de contaminación original en el Continente Americano, aunque Kellerman y Swingle (1890) lo habían reportado inicialmente en sorgo dulce “Amber sorghum” en Nueva Jersey.

10.- Posteriormente, MacKie (1920) lo reportó en sorgo y maíz en California y Halisky y Smeltzer (1961) lo reportan en éste mismo estado en Zacate Sudán.

11.- Brasil (Pinto-Viegas, 1944).

12.- Argentina (Hirschhorn, 1941a, 1941b)

13.- México (Borlaug, 1946).

14.- Uruguay y Argentina (Gheorghianov y Fisher, 1952).

15.- Actualmente, tiene una distribución cosmopolita en clima templado y subtropical en condiciones de baja humedad relativa y baja humedad en el suelo.

1.2.- Taxonomía del patógeno

Se sabe que *S. reilianum* tiene especialización patogénica. Existen dos formas especiales con diferente preferencia de hospedantes. *S. reilianum* f. sp. *reilianum* (SRS) que es altamente virulento en sorgo, pero no induce esporulación en maíz y *S. reilianum* f. sp. *zeae* (SRZ) virulento en maíz, pero no afecta sorgo. Se cree que la f. sp. *zeae* tiene origen en sorgo de donde más tarde se especializó en maíz (Halisky, 1963). Su clasificación taxonómica se muestra a continuación:

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

Phyllum: Basidiomycota

Subphyllum: Ustilaginomycotina

Clase: Ustilaginomycetes

Orden: Ustilaginales

Familia: Ustilaginaceae

Género: *Sporisorium*

Especie: *Sporisorium reilianum*
f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon and
Fullerton [sin. *Sphacelotheca reiliana*
(Kühn) Clint.]

(NCBI, 2017).

También es conocido con los siguientes nombres (CABI, 2017):

Cintractia reiliana (J. G. Kühn) Clinton

Sorosporium holci-sorghii (Riv.) Moesz

Sorosporium reilianum (J. G. Kühn) McAlpine

Sphacelotheca holci-sorghii (Riv.) Cif.

Sporisorium holci-sorghii (Riv.) Cif.

Sporisorium reilianum (J. G. Kühn) Langdon & Full.

Ustilago holci-sorghii Riv.

Ustilago reiliana J. G. Kühn 1875

Ustilago pulveracea Cook

Ustilago reiliana f. *zeae*

1.3.- Desarrollo histórico de la enfermedad en México

El primer reporte de la enfermedad en México fue hecho por Borlaug en 1946 en teocinte en la región de Amecameca, México. También quedó identificada en el herbario de la Oficina de Estudios Especiales de la SAG (Zenteno *et al.*, 1955). El primer reporte de esta enfermedad en maíz en campos de agricultores lo hizo López *et al.*, (1959) en el Bajío del Altiplano de México quienes reportaron incidencias superiores al 30%. Después, Fuentes (1962), indicó que la enfermedad se presentaba en el Bajío esporádicamente desde muchos años atrás, pero su incidencia había aumentado en los últimos 5-6 años fluctuando entre 20-30% en las cercanías de La Piedad, Michoacán. Recientemente, en México, la enfermedad se ha reportado en los estados de Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Aguascalientes, pero su distribución puede ser aún más extensa (Aquino-Martínez *et al.*, 2011).

1.4.- Agente causal y síntomas

S. reilianum f. sp. *zeae* es un hongo fitopatógeno dimórfico, que presenta una fase saprofítica haploide y una fase parasítica diplóide (Martinez *et al.*, 2001). Potter (1914) indicó que el síntoma principal de la enfermedad es la producción de soros negros con abundantes teliosporas que reemplazan total o parcialmente a la mazorca y/o panoja (Figura 1.1 y 1.2).



Figura 1.1. Mazorcas de maíz con signos y síntomas de *S. reilianum* f. sp. *zae*.



Figura 1.2. Panojas de maíz con signos y síntomas de *S. reilianum* f. sp. *zae*

Los soros inicialmente están cubiertos con un peridio de color blanco a café pálido, el cual se rompe irregularmente y se desprenden escamas del mismo, para liberar la masa de teliosporas con grupos de células estériles y numerosas columelas, sinuosas y filiformes o robustas. El hongo forma grupos de teliosporas de 60-100 μm de diámetro, compuestas de

numerosas teliosporas. Las teliosporas son globosas, subglobosas, oviodes o ligeramente irregulares, de 10-13 x 10.5-14.5 μm de color olivo claro a café, densa y equinuladas. Las células estériles se encuentran en grupos persistentes e irregulares, redondeadas en las superficies libres o aplanadas en las superficies en contacto, de 8 -16 μm de longitud, de hialinas a matices amarillos, lisas, con pocas gotas de aceite en cada célula. Al germinar las teliosporas produce un basidio de 4 células, sobre el cual se forman basidiosporas laterales o terminales (Vanky, 2012).

En plántulas infectadas de 6 semanas de edad se pueden observar manchas cloróticas inconspicuas en la hoja y la acumulación de antocianinas en el tallo (Matyac, 1985). De igual forma, en líneas endogámicas de maíz altamente susceptibles al carbón de la espiga del maíz, pueden observarse síntomas de achaparramiento y filodia (Stromberg *et al.*, 1984).

1.5.- Ciclo de la enfermedad

El carbón de la espiga del maíz es una enfermedad sistémica de origen edáfico que también puede presentarse en sorgo (Lübberstedt *et al.*, 1999). El hongo destruye total o parcialmente la mazorca y/o panoja del maíz mediante la formación de soros llenos de teliosporas (Martinez *et al.*, 2002, 2003). Las teliosporas son diseminadas por el viento y lluvia para finalmente depositarse en el suelo (Martinez *et al.*, 2001). El hongo infecta al maíz únicamente durante la emergencia de las plántulas, por medio de las teliosporas presentes en el suelo (Xu *et al.*, 1999). Bajo condiciones de humedad y temperatura específicas las teliosporas germinan formando un basidio de 4 células, de cada una de ellas, se forma un gran número de basidiosporas de aspecto de levadura, que corresponden a la fase saprofítica haploide (Martinez *et al.*, 2002). Posteriormente mediante el apareamiento de células compatibles se forma la fase parasítica diploide (Martinez *et al.*, 1998). El micelio infectivo penetra las raíces de las plántulas de maíz, por esta razón, en etapas tempranas de la infección hay una proliferación de hifas alrededor de la raíz (Martinez *et al.*, 2001). El micelio crece sistémicamente con el meristemo hasta que después de la esporogénesis, las inflorescencias son remplazadas por soros negros llenos de teliosporas (Xu *et al.*, 1999).

1.6.- Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad

La humedad, fertilidad y temperatura del suelo, así como la profundidad de siembra y el tipo de suelo pueden afectar el desarrollo de la enfermedad (Matyac y Kommedahl, 1985). La temperatura del suelo óptima para el desarrollo de *S. reilianum* es de 23-30 °C, permitiendo la infección en maíz y sorgo.

1.7.- Transmisión por semilla

Se ha especulado sobre la posible transmisión por semilla y diseminación de la enfermedad por medio de semilla contaminada (Halisky y Smeltzer, 1961), pero esta posibilidad quedó eliminada por trabajos de otros investigadores (Christensen, 1926; Zehner y Humphrey, 1929). Ullstrup (1971) menciona la alternativa de tratamiento de semilla con fungicidas como Vitavax para eliminar esta posibilidad.

1.8.- Control

Las teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* sobreviven hasta 5 años viables en el suelo (Matyac y Kommendahl, 1986), por lo que, para el manejo cultural de la enfermedad, se recomienda barbecho profundo, destrucción de plantas infectadas y rotación de cultivos (Mazhara, 1978). Danilevskii *et al.*, (1973), reporta que una fórmula de fertilización baja en potasio y alta en nitrógeno ayuda a reducir la incidencia de la enfermedad. Saf'yanov *et al.*, (1980) señala que el riego frecuente durante los 18-21 días después de la siembra, reduce la incidencia de la enfermedad, recomendando una lámina de riego de 15-20 cm, además indica que la incidencia de la enfermedad se incrementa con la profundidad de siembra. Sin embargo, Matyac y Kommedahl, (1985) no encontraron diferencias en la frecuencia de la enfermedad en siembras a 2.5 y 8 cm de profundidad.

El control químico del patógeno se basa en el tratamiento a la semilla con fungicidas sistémicos (Martínez y Ledesma, 1990; Wright *et al.*, 2006), el cual es costoso y no elimina por completo al hongo (Stienstra *et al.*, 1985; Pradhanang y Ghimire, 1996); algunos productos pueden retrasar el crecimiento de la planta (Pradhanang y Ghimire, 1996), mientras que otros reducen la germinación de la semilla y la resistencia de la planta al

patógeno (Stromberg *et al.*, 1984). La resistencia genética es la alternativa más factible y económica para el manejo de la enfermedad, pero es necesario identificar los genotipos de maíz con alto rendimiento y resistencia al carbón.

1.9.- Resistencia genética a enfermedades

El término resistencia vegetal se refiere a la capacidad que tiene una planta hospedante para impedir o limitar la actividad patogénica del parásito, después de que se ha establecido un contacto íntimo entre ambos o cuando el patógeno se ha establecido y ha comenzado su desarrollo (Bos y Parlevliet, 1995; Robinson, 1996; Nicks *et al.*, 2011). Los mecanismos de resistencia son diversos y pueden estar presentes en el hospedante independientemente de la presencia o ausencia del parásito (pasivo), o puede activarse tan pronto como el parásito intenta establecer una relación parásita (activo). En cualquier caso, la resistencia puede ser de origen bioquímico, fisiológico o anatómico/morfológico (Nicks *et al.*, 1993).

Hay dos clases de resistencia vegetal, la resistencia vertical y la resistencia horizontal (Robinson, 1996). Vanderplank (1963) fue el primero en aclarar teóricamente las bases y conceptos de los dos tipos de resistencia vegetal, usando el término resistencia vertical para describir a la resistencia monogénica o completa y el término resistencia horizontal para describir la resistencia poligénica o parcial.

La resistencia vertical ocurre cuando existen genes simples de resistencia en la planta hospedante y genes simples de habilidad parasítica en el patógeno. Este fenómeno es conocido como la relación gen a gen. Esta teoría fue inicialmente formulada por H.H. Flor (1940) trabajando con el patosistema lino (*Linus usitatissimum*) – roya del lino (*Melampsora lini*) (Robinson, 1996). Flor demostró que por cada gen de resistencia en el hospedante existe un gen específico complementario que condiciona avirulencia en el patógeno (Niks y Lindhout; 2004).

La resistencia vertical se expresa como una reacción de hipersensibilidad, la cual es activada por el producto génico de un gen de avirulencia correspondiente. La avirulencia es la propiedad de un patógeno por la cual no puede infectar a un hospedante debido a la efectividad de uno o más genes de resistencia presentes en la planta. Dependiendo de la

combinación de genes en la planta hospedante y el aislamiento del patógeno, la interacción resulta en compatibilidad (infección exitosa) o incompatibilidad (no infección debido a la reacción de resistencia de la planta hospedante) (Nicks *et al.*, 2011).

La resistencia monogénica normalmente es una resistencia cualitativa en el sentido de que no presenta valores intermedios, está presente o ausente con muy pocas excepciones (Robinson, 1996). Este tipo de resistencia es generalmente dominante y controlada por genes individuales ligados o independientes, mientras la patogenicidad es generalmente recesiva y regulada por genes individuales e independientes (Jiménez-Díaz, 2000).

La resistencia vertical se caracteriza por su alta especificidad, siendo no solo específica a especies de patógenos, sino también a ciertos genotipos de un mismo patógeno. De este modo, cuando varios genotipos del hospedante son inoculados con varios aislados del patógeno se observa un espectro diferente de virulencia para cada aislado. El espectro de virulencia es la gama de líneas resistentes para las cuales un aislado muestra virulencia y así, aislados con el mismo espectro de virulencia constituyen una raza (Nicks *et al.*, 2011).

Son varias las ventajas de la resistencia monogénica incluyendo la selección de plantas resistentes en una progenie segregante es relativamente simple debido a que las clases fenotípicas resistentes y susceptibles pueden identificarse rápidamente; la transferencia de la resistencia germoplasma a otro es simple; la selección de resistencia puede hacerse dirigida contra razas específicas de un patógeno y una vez transferida la resistencia la protección es completa (Paliwal, 2001; Agrios, 2005). Sin embargo, la principal desventaja de la resistencia vertical es su durabilidad. Este tipo de resistencia se puede perder fácil y rápidamente con la mutación de un solo gen, por lo que una vez alcanzada es necesario e imprescindible comenzar nuevamente con la búsqueda de una nueva fuente genética de resistencia (Robinson, 1996).

La resistencia poligénica es una resistencia cuantitativa en el sentido que puede presentarse a cualquier nivel entre un mínimo y un máximo (Robinson, 1996). La resistencia horizontal o no específica, es aquella que confiere una protección incompleta pero permanente (Agrios, 2005), su característica definitoria es que no involucra la relación gene a gene,

sino generalmente está dada por un tipo de herencia poligénica (cuantitativa), aunque en ocasiones se hereda de forma mendeliana sin que estos genes mendelianos establezcan una relación una relación gene a gene (Robinson, 1996). En este caso las categorías de resistencia y susceptibilidad en el hospedante son difíciles de reconocer ya que el efecto de cada gen es limitado (Paliwal, 2001). En general, este tipo de resistencia es de carácter cuantitativo debido a la presencia de genes menores de efectos aditivos (QTLs); así, cuando se evalúa la progenie de un cruzamiento de dos padres con diferentes niveles de resistencia parcial se observa una segregación con una distribución continua de niveles de infección (Nicks *et al.*, 2011).

A diferencia de la resistencia vertical, la resistencia horizontal opera contra todas las razas de un patógeno, incluyendo a las de mayor patogenicidad (Robinson, 1996). Otra característica significativa de la resistencia horizontal es su mayor estabilidad y durabilidad debido al efecto amortiguador del sistema poligénico (Paliwal, 2001). Esta durabilidad se debe a la baja probabilidad de que un aislado del patógeno rompa la combinación específica de genes menores presentes en la planta. Generalmente, el patógeno podrá romper uno o dos genes de resistencia parcial, lo que resulta en una disminución en el nivel de resistencia, que en la práctica es difícil de observar (Robinson, 1996).

Vanderplank (1984) señala que la resistencia horizontal y la resistencia vertical pueden coexistir y que la resistencia de cualquier planta puede ser una mezcla de ambos tipos en proporciones variables. Robinson (1996), indica que, dentro del sistema de protección de la planta, la resistencia vertical es la primera barrera de defensa y cuando esta es rota la resistencia horizontal entra en acción.

1.10.- Herencia de la resistencia

Según Vanderplank (1984) Biffen en 1905, reportó que la resistencia a la roya amarilla del trigo (*Puccinia striiformis*) era heredada de forma Mendeliana, desde entonces se han documentado muchos casos de resistencia donde la herencia ocurre de manera simple. En este tipo de resistencia, la dominancia es muy común para el caso de plagas y patógenos mientras que la resistencia monogénica recesiva es menos frecuente y solo en algunos casos se ha reportado la interacción génica no alélica (epistasia). La resistencia también puede

basarse en varios genes cada uno con un efecto relativamente pequeño. Ejemplos de resistencia de herencia poligénica son la resistencia en papa a *Phytophthora infestans*, en maíz a *Puccinia sorghi*, y en cebada a *Puccinia hordei*. En estos y en otros patosistemas tanto la resistencia poligénica parcial como la resistencia hipersensible de genes principales se conoce, mientras que la resistencia de herencia citoplásmica es extremadamente rara (Nicks *et al.*, 1993).

1.11.- Análisis de diseños dialélicos

Schmidt (1919) introdujo el “Método de cruzamiento dialélico” o “Método de intercruzamiento completo” como una forma de estimar el valor de los genes de los padres a través de la evaluación de su progenie. El término se refiere al conjunto de todas las cruzas posibles dentro de un número de variedades, en donde las cruzas recíprocas y los padres pueden ser o no incluidos. Este conjunto de cruzas obviamente es de interés para el mejorador, pero la información recabada de la evaluación de dichas cruzas puede no ser de mucho valor debido a la complejidad de obtener todas las cruzas (Gilbert, 1958).

Los diseños de apareamiento dialélico y su análisis se han desarrollado para padres diversos que van desde líneas endogámicas hasta variedades de amplia base genética. Después de realizarse las cruzas, evaluarse y analizarse, estos diseños de apareamiento dialélico permiten hacer inferencias con respecto a los tipos de acción genética. Las suposiciones y limitaciones del diseño de apareamiento dialélico son realizadas cuando se analizan e interpretan los datos, por lo que, de hacerlo de manera correcta, los diseños de apareamiento dialélico son muy poderosos. Dicho modelo ha sido extensamente usado en maíz y en otras especies vegetales para estimar varianzas y efectos de aptitud combinatoria general y específica (Hallauer *et al.*, 2010).

Las cruzas dialélicas se emplean para estimar los componentes genéticos de la variación observada entre las distintas cruzas que se realizan con las líneas de interés. El propósito de estimar los parámetros genéticos es contar con información relativa a la naturaleza de la acción génica involucrada en la herencia del o los caracteres que se están investigando, y por consiguiente, proporcionar las bases necesarias para la evaluación de los métodos de

mejoramiento más convenientes y eficaces en base a la naturaleza genética de la característica que se quiere mejorar (Robinson y Cockerham, 1965).

Fue Griffing (1956), quien presentó por primera vez una descripción detallada y completa de los métodos y distintos sistemas de cruzamiento dialélico, así como la metodología para su análisis. Hayman (1954) analizó la teoría de las cruzas dialélicas y estableció que el material con el cual se trabaje debe cumplir con los supuestos de que exista una segregación diploide, exista una distribución y acción independiente de los genes no alélicos, la inexistencia de alelos múltiples y que los progenitores sean homocigóticos.

Respecto al origen de las líneas utilizadas en los diseños dialélicos, Hayman (1954) y Jinks y Hayman (1953) se abocaron al uso de un conjunto de líneas particulares *per se*, mientras que Kempthorne (1956) considero a las líneas como una muestra representativa de la población de origen a partir de la cual podían inferir las propiedades genéticas de la misma. Posteriormente, Griffing (1956), demostró que ambas alternativas son posibles de considerar, así la atención recae en distinguir bajo qué supuesto se coloca a las líneas; esto es de importancia ya que cada interés trae consigo diferencias en las estimaciones estadísticas y en los supuestos de las pruebas de hipótesis, recayendo en los efectos de aptitud combinatoria.

Griffing (1956) propuso los siguientes modelos en los diseños dialélicos:

Modelo I o de Frecuencias Fijas: Para este modelo las líneas son deliberadamente escogidas y no pueden ser consideradas como una muestra aleatoria de ninguna población. Los materiales experimentales constituyen en sí mismos la totalidad de la población de la cual las inferencias serán hechas. De este modo, los objetivos son comparar las habilidades combinatorias de los progenitores e identificar a las combinaciones más o menos promisorias.

Modelo II o de Frecuencias Aleatorias: Las líneas parentales o el material experimental son asumidos en su totalidad como una muestra aleatoria de alguna población de la cual se quieren hacer inferencias. De este modo el interés es estimar los componentes genéticos y ambientales de la compleja

varianza de la población de interés.

Dentro de cada uno de estos dos modelos, Griffing (1956) clasificó cuatro diseños posibles, que varían en función de si las cruzas recíprocas están presentes o no, y si los progenitores son o no incluidos.

Las cuatro posibles variaciones de los diseños dialélicos de Griffing (1956) son:

Diseño 1: Incluye las líneas parentales, así como a todas las cruzas simples directas y recíprocas posibles (F1), es decir, todas las P2 combinaciones.

Diseño 2: Incluye las líneas parentales, así como a todas las cruzas simples directas (F1), pero descartando todas las cruzas recíprocas, es decir, $\frac{1}{2} p (p+1)$ combinaciones.

Diseño 3: Incluye a todas las cruzas simples directas y recíprocas (F1), pero no a las líneas parentales, es decir, $p (p-1)$ combinaciones.

Diseño 4: Incluye únicamente a las cruzas simples directas (F1), descartando todas las cruzas recíprocas y las líneas parentales, es decir, $\frac{1}{2} p (p-1)$ combinaciones.

Hallauer *et al.*, (2010) señalan que dentro de las desventajas que se tienen al usar los diseños dialélicos está que cuando el número de progenitores (y por consiguiente el número de cruzas) es grande, se vuelve impráctica la evaluación en campo del gran número de cruzas resultantes, además de que se pierde precisión en la estimación de los efectos de aptitud combinatoria general, y ocurre lo opuesto en la estimación de los efectos de aptitud combinatoria específica. Finalmente, la estimación de los componentes de varianza de poblaciones de amplia base genética proporciona información al mejorador sobre su estructura genética y como consecuencia el mejorador puede seleccionar las metodologías más adecuadas para cada población basándose en la información colectada.

1.12.- Aptitud Combinatoria General y Específica

Sprague y Tatum (1942) definieron a la Aptitud Combinatoria General (ACG) como el comportamiento promedio de una línea endogámica en una serie de combinaciones híbridas y a la Aptitud Combinatoria Específica (ACE) como las desviaciones de determinadas cruzas con relación al comportamiento promedio de los progenitores.

Al cruzar una línea con otras proporciona una valoración media de la línea en todos sus cruces. Esta valoración, cuando se expresa como desviación con respecto a la media de todos los cruces, se denomina Aptitud Combinatoria General de la línea. Es el valor promedio de todas las F1 que tienen a esta línea como parental, desviado de la media general de los cruces totales. Cualquier cruce concreto tiene, por lo tanto, un valor “esperado” que es la suma de las Aptitudes Combinatorias Generales de sus dos líneas parentales. Sin embargo, el cruce puede desviarse de ese valor esperado en mayor o menor medida. Esta desviación se denomina Aptitud Combinatoria Específica de la combinación de estas dos líneas. En términos estadísticos, las aptitudes combinatorias generales son los efectos principales y la aptitud combinatoria específica es una interacción (Falconer y Mackay, 1996).

Sprague y Tatum (1942) también definieron que genéticamente la ACG está asociada con genes menores de efectos aditivos, mientras que la ACE se debe a desviaciones del esquema aditivo debidas a genes con efectos de dominancia o epistasis.

Actualmente los conceptos de aptitud combinatoria general y específica han sido bastante útiles para caracterizar líneas endogámicas en cruces sobre diversos organismos, ya que permiten la caracterización de la varianza genética y determinar el tipo de acción génica operante en las cruces obtenidas de diversas líneas; por lo tanto, las nociones de ACG y ACE han sido usadas extensivamente en el mejoramiento genético de maíz y otras muchas especies cultivadas (Hallauer *et al.*, 2010).

1.13.- Heredabilidad

El concepto de heredabilidad se refiere a la efectividad de selección para un carácter depende de la importancia relativa de los factores genéticos y no genéticos en la expresión de diferencias fenotípicas entre genotipos de una población. La heredabilidad de un carácter tiene importancia mayor sobre los métodos de inoculación seleccionados para el mejoramiento de la población. La selección de una sola planta puede ser efectivo para un carácter con alta heredabilidad, pero inefectivo para un carácter de baja heredabilidad (Fehr, 1993).

Molina Galán (1992), menciona que la heredabilidad puede expresarse en dos formas:

1.- Heredabilidad en sentido amplio (H^2) es la relación entre la varianza genotípica y la varianza fenotípica, lo que representa la proporción de la varianza fenotípica u observada atribuible a los efectos totales de los genes de una población.

2.- Heredabilidad en sentido restringido (h^2) es la relación entre la varianza genética aditiva y la varianza fenotípica, lo que representa la parte porcentual de la varianza fenotípica atribuible a los efectos aditivos (heredables) de los genes en la población.

1.14.- Heterosis

El término heterosis se refiere a la superioridad en el comportamiento de los híbridos respecto a los padres. La ocurrencia de heterosis es común en plantas, pero su nivel de expresión es altamente variable. El rendimiento de un híbrido respecto a sus padres puede ser expresado de dos formas (Fehr, 1993):

- 1.- Heterosis respecto al padre medio que es el desempeño del híbrido comparado con el comportamiento promedio de los padres.
- 2.- Heterosis respecto al mejor padre que es una comparación del comportamiento del híbrido respecto al mejor padre en la crucea.

Literatura citada

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5 ed. Elsevier Acad. Press. 952 p.
- Aquino-Martínez, J. G., Sánchez-Flores, A., González-Huerta, A. y Sánchez-Pale, J. R. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. Rev. Mex. Fitopatol. 29:39–49.
- Borlaug, N. E. 1946. Disease of teocintle in México. Phytopathology 36:395 (Abstr.)
- Bos, L. and Parlevliet, J. E. 1995. Concepts and terminology on plant/pest relationships: Toward consensus in plant pathology and crop protection. Ann. Rev. Phytopathology 33(2):69–102.
- Brefeld, O. 1883. Die Brandpilze. I. 220p 13 pl. Leipzig. (Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Heft 5).

- Busse, W. 1904. Untersuchungen über die Krankheit der Sorghu-Hirse. Arb. K. Grandhthsamt. Biol. Abst. 4:319–426.
- CABI. 2017. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/cpc.
- Christensen, J. J. 1926. The relation of soil temperature and soil moisture to the development of head smut of soghum. *Phytopathology* 16:353–357.
- Cooke, M. C. 1876. Some Indian fungi. *Grevillea* 4:114-118.
- Cugini, G. 1891. Il cabone del grano turco. *Biol. R. Staz. Agr. Modena*, n. s. 10, 1890:71–87.
- Danilevskii, A. E., Klok, V. S. and Chekalenko, A. F. 1973. Fertilizers and disease infection on maize. *Zashchita Rastenii. Russia*. No.3. 48.
- Evans, I. B. 1911. Maize smut or “Brand.” *Sorosporium reilianum* (Kühn) McAlp. *Agr. J. Union South Africa* I:697.
- Failyer, G. H., and Willard, J. T. 1890. Experiments with sorghum. *Kansas Agric. Stat. Bul.* 16:135–149.
- Fehr, W. R. 1993. Principles of cultivar development. Theory and technique Vol. 1. Macmillian, Ames, Iowa. 536 p.
- Fisher, G. W. 1953. Manual of the North American smut fungi. The Ronald Press Co. Ed. 343 p.
- Falconer, D. S. and Mackay, T. F. C. 1996. Introducción a la genética cuantitativa. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 469 p. ISBN 8420009490.
- Fuentes, F. S. 1962. Estudio sobre algunos métodos de prevención contra *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en la zona del Bajío, México (*Ustilaginales: Ustilaginaceae*). Tesis Fac. Biol. Inst. Politéc. Nal. 62 p.
- Gilbert N. E. G. 1958. Diallel cross in plant breeding. *Heredity* 12:477–492. doi:10.1038/hdy.1958.48
- Gheorghianov, V. y Fischer, G. J. 1952. “Smut” in maize. *Arch. Fitotec. Uruguay* 5:175 (Resumen).
- Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian J. Biol. Sci.* 9(4):463–493.

- Hallauer A. R., Carena M. J. and Miranda-Filho J. B. 2010 Quantitative genetics in maize breeding. 2nd Ed. Springer, N.Y. USA. 663 p.
- Halisky, P. M. 1963. Head smut of sorghum, sudangrass, and corn, caused by *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. J. of Agric. Sci. 34 (8):287–304.
- Halisky, P. M. and Smeltzer, D. G. 1961. Head smut established in California. Calif. Agric. 15:10–12.
- Hayman, B. I. 1954. The theory and analysis of diallel crosses. Genetics 39:789–800.
- Hennings, P. 1896. Pilzkrankheiten des Sorghums [*Andropogon sorghum* (L.) Brot.]. Notizbl. K. Gartens u. Mus. Berlin. I:118–121.
- Hirschhorn, E. 1941a. Las especies de *Sorosporium* de la flora argentina. Rev. Mus. La Plata, N.S., Secc. Bot. 3:335–354.
- Hirschhorn, E. 1941b. Presencia de *Sorosporium reilianum* en los cultivos de maíz y sorgo en la República Argentina. Inst. Fitotec., Dir. Gral. Invest. Agric. Publ.148. 4 p.
- Hori, S. 1907. Seed infection by smut fungi of cereals. Bull. Imp. Cent. Agric. Exp. Sta. Japan. Tokyo. I:163–176.
- Jiménez-Díaz, M. R. 2000. Interacciones planta-hongo: mecanismos de infección, patogénesis y resistencia. En: Llácer, G.; López, M. M.; Trapero, A.; Bello, A. (Eds.). Patología Vegetal. Soc. Española de Fitopatología. Ed. Mundi Prensa. Madrid.
- Jinks J. L. and Hayman B. I. 1953. Analysis of diallel crosses. Maize Genetic Coop. News Lett. 27:48–54.
- Kellerman, W. A., and Swingle, W. T. 1890. Notes of sorghum smuts. Trans. 23th Meeting. Kansas Acad. Sci. 12:158–159.
- Kempthorne, O. 1956. The theory of the diallel cross. Genetics 41:451–459.
- Kühn, J. 1875. *Ustilago reiliana*. In: Rabenhorst, G. L. Fungi Europeaei Exsiccati ed. Nova. No. 1998. Dresdae.
- Kühn, J. 1878. Die Brandformen der Sorghumarten. Hedwigia 17:6–14.
- López, L. C., Covarrubias, R. y Niederhauser, J. S. 1959. El carbón de la espiga del maíz. Agric. Téc. en México. 8:11–13.
- 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. Genet. 99:593–598.

- MacKie, W. W. 1920. Head smut in sorghum and maize. *Phytopathology* 10:307–308.
- 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, C., Bu´ee, M., Jauneau, A., Bécard, G., Dargent, R and Roux, C. 2001. Effects of a fraction from maize root exudates on haploid strains of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Plant Soil* 236:145–153.
- Martinez, C., C. Roux, and R. Dargent. 1998. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Biochem. Cell Biol.* 89:247–253.
- Martinez, C., Roux, C., Jauneau, A. and Dargent, R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f.sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94(3):505–514.
- Martinez, C., Roux, C., Jauneau, A. and Dargent, R. 2003. Effect of water potential on the development of an haploid strain of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Plant Soil* 251:65–71.
- Matyac, C. A. 1985. Histological development of *Sphacelotheca reiliana* on *Zea mays*. *Phytopathology* 75:924–929.
- Matyac, C. A., and Kommedahl, T. 1985. 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 5:487–490.
- Mazhara, V. N. 1978. How to prevent smut of maize. *Zashchita Rastenii*. Russia. No. 9:48–49.
- McAlpine, D. 1910. The smut of maize and its treatment. *J. Dept. Agric. Victoria* 8:290–298.
- Molina-Galán, J. D. 1992. Introducción a la genética de poblaciones y cuantitativa. 1ª Ed. AGT Editor, S.A., Mexico, D.F. 349 p.
- Mundy, H. G. 1910. Maize smut. (Rhodesia). *Dept. Agr. Bul.* 46, 4 p.
- NCBI. 2015. *Sphacelotheca reiliana* (head smut of maize). Taxonomy. National Center for Biotechnology Information Rockville Pike, Bethesda MD. 20894 USA.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Niks, R. E., Ellis, P. R. and Parlevliet, J. E. 1993. Resistance to parasites. In: Hayward, M. D.; Bosermark, N. O.; Romagosa, I (Eds.). Plant breeding: Principles and prospects. London, Chapman & Hall. 553 p.
- Niks, R. E., Lindhoud, W. H. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia durable a patógenos especializados. 3ª Ed. Preduza. Wageningen Agricultural University. The Netherlands. 212 p.
- Niks, R. E., Parlevliet, J. E., Lindohout, P. and Bai, Y. 2011. Breeding crops with resistance to diseases and pests. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. 198 p.
- Paliwal, L. R. 2001. Mejoramiento para resistencia a las enfermedades. En: Paliwal, L. R., Granados, G., Renée, L. H. y Violic, D. A. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma FAO.
- Passerini, G. 1876. *Ustilago reiliana* J. Kühn. In. Rabenhorst, G. L. Fungi Europeaei Exsiccati ed. Nova. No. 2096.
- Passerini, G. 1877. Fungi Parmensi. Fam. IV-Ustilaginei. Nuovo Gior. Bot. Ital. 9:235-239.
- Pinto-Viegas, A. 1944. Alguns fungos do Brasil III. Ustilaginales. Bragantia. (S. Paulo). 4:739–751.
- Potter, A. A. 1914. Head smut of sorghum and maize. J Agric Res II:339–380.
- Pradhanang, P. M. and Ghimire, S. R. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. Tropical Agriculture 73:325–328.
- Robinson A. R. 1996. Return to resistance. Breeding crops to reduce pesticide dependence. agAccess. Davis, CA. 500 p.
- Robinson, H. F. y Cockerham C. C. 1965. Estimación y significado de los parámetros genéticos. Fitot. Latinoam. 2(1):23–38.
- Rockefeller Foundation Program in the Agricultural Sciences. 1960. Mexican Agricultural Research Program, Ann. Rept. 1959-1960:13–102.
- Rockefeller Foundation Program in the Agricultural Sciences. 1961. Mexican Agricultural Research Program, Ann. Rept. 1960-1961:9–101.

- Schmidt, J. 1919. La valeur de l'individu à titre de générateur appréciée suivant la méthode du croisement diallèle. C. R. Trav. Lab. Carlsberg 14(6):1–33.
- Safyanov, S. P., Bystrova, Z. F., Silpv, A. I. 1980. Head smut of sorghum. Zashchita Rastenii. Rusia. No.8:43–44.
- Sprague, G.; Tatum, L.; 1942. General vs. specific combining ability in single crosses of corn. J. Am. Soc. Agron. 34:923–932.
- Stienstra, W. C., Kommedahl, E. L., 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 Geadelmann J. L. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. Plant Dis. 69:880–884.
- Ullstrup, A. J. 1971. Correspondencia personal. Purdue Univ. Dept. of Bot. Plant Pathol.
- Vánky, K. 2012. Smut fungi of the world. APS Press. St Paul, MN. 1480 p.
- Vanderplank, J. E. 1963. Plant diseases: Epidemics and control. Academic Press. New York and London. 349 p.
- Vanderplank, J. E. 1984. Disease resistance in plants. Academic Press Ed. 2nd Ed. FL. 194 p.
- Wright, P. J., Fullerton, R. A. and Koolaard, J. P. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetcorn (*Zea mays*). New Zeal. J. Crop Hortic. Sci. 34:23–26. Available at:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01140671.2006.9514383>.
- Xu, M. L., Melchinger, A. E. and Lübberstedt, T. 1999. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reiliana* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. Plant Dis. 83:390–395.
- Zehner, M. G., and Humphey, H. B. 1929. Smuts and rusts in cereals by hypodermic injection of inoculums. J. Agric. Res. 38:623–627.
- Zenteno, Z. M., Yerkes, W. D. y Niederhauser, J. S. 1955. Primera lista de hongos de México arreglada por huéspedes. Programa Coop. Agric. SAG. Ofna. Est. Esp. SAG. México. Folleto Téc. 14:43 pp.

CAPITULO II

INOCULACIÓN ARTIFICIAL DE *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* EN GERMOPLASMA DE MAÍZ

Resumen

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método de inoculación de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, causal del carbón de la espiga del maíz, que permita un alto y consistente porcentaje de infección en campo para la selección confiable de germoplasma con resistencia genética a este patógeno. Semillas del híbrido AZ 41801® (Azteca) se inocularon con teliosporas impregnadas usando como adherentes NaCMC 1%, ADH® 100%, alginato de sodio 2%, azúcar mascabado 50% (w/v), agar – agar 2% (w/v), grenetina 10% (w/v) y un tratamiento inóculo: suelo 1:200 (v/v). En 2014, la semilla tratada se sembró en invernadero en bolsas de plástico de 40 x 40 cm con suelo estéril y en 2015, la semilla se sembró en un vivero experimental en Mixquiahuala, Hgo. El tratamiento de grenetina 10% como adherente, indujo 96.3 % de plantas enfermas en invernadero y 90% en campo respectivamente. En 2016, este método de inoculación se evaluó nuevamente en Mixquiahuala, Hgo., con el propósito de aplicar el método desarrollado en la selección de germoplasma, para esto, se evaluaron 160 líneas C₂-S₃ provenientes de un programa de mejoramiento de una población de maíz con endospermo blanco para resistencia genética al patógeno. La incidencia de la enfermedad en los tres experimentos se evaluó 45 días después de la floración, con la observación directa de síntomas y signos en las inflorescencias masculina y femenina. Las líneas mostraron una incidencia que varió de 0 a 54.5%. El híbrido AZ 41801 mostró 70.7% de plantas enfermas.

Palabras clave: *Zea mays*, inoculación artificial con teliosporas.

Abstract

The objective of this research was to develop an inoculation method of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, causal agent of the head smut of maize, which allows a high and consistent percentage of infection in field conditions, for the reliable selection of

germplasm with genetic resistance to this pathogen. Seeds of the hybrid AZ 41801® (Azteca) were inoculated with teliospores impregnated using as adherents NaCMC 1%, ADH®, sodium alginate 2%, brown sugar 50% (w/v), agar – agar 2% (w/v), grenetin 10% (w/v) and a treatment with inoculum:soil 1:200 (v/v). In 2014, the treated seeds were planted in a greenhouse in 40 x 40 cm plastic bags with sterile soil and in 2015, the seeds were planted in an experimental plot established in Mixquiahuala, Hgo. In 2014 and 2015, the treatment of grenetin 10% as adherent, induced 96.3% of diseased plants in greenhouse and 90% in the nursery respectively. In 2016, this method of inoculation was evaluated again in Mixquiahuala, Hgo., with the purpose of apply the method developed in the selection of germplasm, for this, 160 C₂-S₃ lines from a maize population improvement program with white endosperm for genetic resistance to the pathogen were treated. The incidence of the disease in the three experiments was evaluated 45 days after flowering, with direct observation of symptoms and signs in male and female inflorescences. In lines, the incidence of the disease ranged from cero to 54.5%. The hybrid AZ 41801 showed 70.7% of diseased plants.

Key words: *Zea mays*, artificial inoculation with teliospores.

1.- Introducción

El carbón de la espiga del maíz (*Zea mays* L.), causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zaae*, es una enfermedad importante bajo ciertas condiciones que favorecen su desarrollo, llegando a reportarse incidencias de hasta el 80% (Frederiksen, 1977). Entre las principales condiciones que favorecen el desarrollo del patógeno se encuentran la vulnerabilidad genética de los híbridos cultivados (Fehr 1993), tipo de suelo, nivel de fertilidad, profundidad de siembra, temperatura y humedad del suelo (Matyac y Kommedahl, 1985a).

El carbón de la espiga del maíz es una enfermedad sistémica de origen edáfico (Lübberstedt et al. 1999). El hongo infecta al maíz únicamente durante la emergencia de las plántulas, por medio de las teliosporas presentes en el suelo (Xu *et al.*, 1999). Las teliosporas germinadas forman un basidio de 4 células (promicelio), donde se producen un gran número de basidiosporas haploides. Posteriormente, mediante el apareamiento de células

compatibles se forma la fase parasítica del hongo (Martinez *et al.*, 1998) y el micelio infectivo penetra las raíces de las plántulas de maíz (Martinez *et al.*, 2001). El micelio crece sistémicamente con la zona del meristemo hasta que, después de la esporogénesis, las inflorescencias son remplazadas por soros negros llenos de teliosporas (Xu *et al.*, 1999).

El uso de productos químicos en la semilla es la medida de control más utilizada para el manejo del carbón de la espiga del maíz (Fullerton *et al.*, 1974). Wright *et al.*, (2006) reportan que el tratamiento a la semilla con propiconazole reduce hasta 70% el porcentaje de plantas enfermas, respecto a semilla no tratada. Sin embargo, mencionan que el uso de germoplasma resistente a la enfermedad puede usarse de manera conjunta dentro un programa de manejo integrado de la enfermedad. Wang *et al.*, (2008) mencionan que el control químico es viable; sin embargo, por razones ecológicas y económicas el desarrollo de materiales resistentes a la enfermedad es la mejor estrategia de control. Para desarrollar materiales resistentes es primordial contar con un método de inoculación práctico y eficiente que considere la naturaleza del cultivo, la etapa de desarrollo al momento de la evaluación, así como el ciclo de vida y variabilidad genética del patógeno. Esto, asegura la posibilidad de evaluar una gran cantidad de germoplasma y tener un porcentaje de infección elevado que permita discriminar claramente entre materiales resistentes y susceptibles (Niks *et al.*, 2011).

Los métodos de inoculación desarrollados hasta el momento (Metha, 1967; Baggett y Koepsell, 1983; Stromberg *et al.*, 1984; Matyac y Kommedahl, 1985b; Whythe y Gevers, 1987; Martinez y Ledesma, 1990; Craig y Frederiksen, 1992; Pradhanang y Ghimire, 1996; Quezada-Salinas *et al.*, 2013), han sido la base para diversas investigaciones, pero no existe claridad acerca de la eficiencia de dichos métodos en la selección de germoplasma en condiciones de campo, debido a que los porcentajes de infección inducidos varían considerablemente, limitando su uso en un programa de mejoramiento genético a la enfermedad.

Se han observado diferencias en los porcentajes de germinación de las teliosporas de *S. reilianum* del 11 % al 35 % (Potter, 1914; Osorio y Frederiksen, 1998; Quezada-Salinas *et al.*, 2013), llegando a reportarse de 60 a 90% de germinación bajo condiciones específicas

de almacenaje e incubación (Pai y Pan, 1964). Esto, compromete la eficiencia en reproducción de los porcentajes de plantas infectadas, imposibilitando la adecuada evaluación de germoplasma por resistencia al patógeno.

Actualmente, existe la necesidad de materiales resistentes al carbón de la espiga del maíz para las zonas agrícolas donde el patógeno ha cobrado importancia. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar una técnica de inoculación eficiente de semilla de maíz con *S. reilianum* f. sp. *zeae*, para la selección de germoplasma resistente a la enfermedad.

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Inóculo

Con el propósito de seleccionar una fuente de inóculo con un porcentaje de germinación alto, durante 2013 se realizaron colectas de panojas y mazorcas de maíz infectadas con *S. reilianum* f. sp. *zeae*, incluyendo 2 colectas en el estado de Guanajuato, 10 en el estado de Hidalgo, 6 en el estado de México y 1 en el estado de Zacatecas. Las teliosporas se retiraron de los soros, se pasaron por un tamiz de 117 micras (Mont Inox®), se almacenaron en envases de plástico con CaCl₂ (J. T. Baker y Macron Fine Chemicals® 94%), y se conservaron a 20 ± 2°C hasta su utilización. La viabilidad del inóculo se verificó previo a la inoculación de la semilla de acuerdo a lo descrito por Quezada-Salinas *et al.* (2013), seleccionándose como inóculo la colecta con el mayor porcentaje de germinación.

La caracterización morfológica del inóculo se realizó observando laminillas de teliosporas del patógeno. Para esto, se caracterizaron 100 esporas al microscopio óptico y se realizaron mediciones en un microscopio de luz a 100 X (CX31RBSFA, Olympus®). La caracterización molecular se realizó a partir de cultivos monobasidiales, amplificando la región ITS (Internal Transcribed Spacer) y parte de la región LSU rDNA (Large Subunit Ribosomal DNA) usando los primers ITS1F/NL4.

Para la obtención de cultivos monobasidiales, se utilizaron teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* previamente desinfectadas en una solución acuosa de CuSO₄ 1.5% (w/v) por 24 h

(Holliday 1974), lavadas con tres cambios de agua destilada estéril y recuperadas mediante vacío, usando un embudo Büchner con papel filtro estéril grado 1 (Whatman®). Se preparó una suspensión de 50 000 teliosporas mL en agua destilada estéril y se depositó 1 mL por caja Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), distribuyendo la suspensión en la superficie del medio y eliminando el exceso de agua, decantándola sobre papel secante estéril. Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C por 24 h. De las teliosporas germinadas, se tomaron basidios individuales y se transfirieron a cajas de Petri con PDA. Los cultivos monobasidiales se dejaron crecer por 15 días y posteriormente se seleccionaron tres cultivos monobasidiales para la extracción de ADN.

La extracción total de ADN de los cultivos monobasidiales, se realizó con el kit comercial Ultra Clean® Microbial DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories Inc. La integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1% y la cantidad de ADN se determinó por espectrofotometría a 260 nm de absorbancia con un espectrofotómetro (Nanodrop® ND-1 V 3.2.1). Para amplificación se usó una mezcla de 25 µL, buffer My Taq 1X, 10 pm de cada iniciador, 1U MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline Germany) y 100 ng de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf®, mod. Mastercycler Pro con una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 min para la desnaturalización, 55 °C 1 min y 72 °C por 1 min para la extensión, más un ciclo de 72 °C por 10 min para la extensión final.

La visualización de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 120 volts por 30 min. Para estimar el tamaño del fragmento amplificado se utilizó el marcador molecular Pst I (Microzone®), el cual indica 28 tamaños diferentes de fragmentos que van de 15 pares de bases a 11.49 kilobases. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se analizó con un fotodocumentador Chemi Genius 2 Bio Imaging System (Syngene®). Los productos de PCR se purificaron según lo descrito por Kirby (1965) y se mandaron a secuenciar a MacroGen Europe, Amsterdam, Holanda.

La calidad de las secuencias se determinó mediante la observación de los electroferogramas usando el software 4peaks® Nucleobytes (Griekspoor y Groothuis, 1994), mientras que las

secuencias se alinearon usando el software U GENE (Okonechnikov *et al.* 2012). Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos del banco de genes GENBANK utilizando la herramienta BLAST (Altschul *et al.* 1990) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

2.2.- Evaluación de los tratamientos en invernadero

Se usaron semillas de maíz de los híbridos de endospermo blanco AS1503® (Aspros), AZ 41801® (Azteca) y Euros® (Unisem) todos de endospermo blanco. El tratamiento fungicida comercial de la semilla se eliminó lavándola con una solución 1% de detergente Roma® (Fábrica de Jabón La Corona S.A. de C.V.) agitando vigorosamente, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Con el propósito de inactivar las moléculas de fungicida aún presentes en la superficie de las semillas, la semilla se trató con una solución de cal (pH 12) por 5 min. Posteriormente, la semilla se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) 1.5% por 2 min, se lavó con tres cambios de agua destilada estéril y se secó a 22°C sobre papel absorbente estéril.

Anterior a la inoculación de semillas, se verificó el efecto de la carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC), ADH®, ácido algínico, azúcar mascabado, agar y grenetina sobre el porcentaje de germinación de las teliosporas; para esto, 1 mL de las suspensiones de teliosporas se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo PDA con tres repeticiones. Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C por 24 h y se evaluó el porcentaje de germinación en tres campos a 40X por caja. Al no detectar efecto detrimental en la germinación de las teliosporas debido a estos compuestos, se procedió a utilizarlos en los tratamientos de inoculación en semilla (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Tratamientos evaluados para la determinar una técnica de inoculación eficiente de *S. reilianum* f. sp. *zeae* en semillas de maíz.

No.	Tratamiento	Inóculo	Procedimiento
1	Testigo	-	-
2	Carboximetilcelulosa	1.7x10 ⁷	Las semillas se incorporaron a la

	de sodio (NaCMC) 1%	teliosporas mL-1	suspensión de teliosporas por 1 min, se recuperaron y se secaron a 23 ± 2 °C por 24 h. con ayuda de un ventilador (Quezada-Salinas <i>et al.</i> , 2013).
3	ADH® Producto comercial	1.7×10^7 teliosporas mL-1	Las semillas se incorporaron a la suspensión de teliosporas por 1 min, se recuperaron y se secaron a 23 ± 2 °C por 24 h.
4	Alginato de sodio al 2%	1.7×10^7 teliosporas mL-1	Las semillas de maíz se incorporaron una por una en esta suspensión por 1 min, se recuperaron y se colocaron en una solución de nitrato de calcio 1.6%. Se recuperaron en una caja de Petri con agua destilada estéril hasta el momento de la siembra (Bashan, 1998).
5	Azúcar mascabado 50% (w/v)		Las semillas se incorporaron a la suspensión de teliosporas por 1 min, se recuperaron en una caja de Petri, se cubrieron completamente con teliosporas.
6	Agar – agar 2% (w/v)		Después, las semillas se colocaron en una caja de Petri y se secaron a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) por 24 h.
7	Grenetina 10% (w/v) (Wilson ®)		
8	Mezcla de inóculo:suelo 1:200 (v/v).	1.8×10^6 T/g suelo	Las semillas se sembraron en macetas con una mezcla inóculo-suelo (Matyac y Kommedahl, 1985b).

En 2014, las semillas de maíz inoculadas se sembraron en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Méx. ($19^{\circ}27'43.1''N$ $98^{\circ}54'13.4''W$) en bolsas de plástico de 40x40 con suelo estéril de características similares al usado por Quezada *et al.* (2013). Después de la siembra, las macetas se regaron a capacidad de

campo. Con el propósito de incrementar el porcentaje de infección, se evitó el riego constante durante las primeras etapas de desarrollo de las plántulas (Wu *et al.*, 1981; Mack *et al.*, 1984). Las plantas se fertilizaron cada 20 días usando una solución nutritiva de 5000 ppm de nitrógeno (Urea 46-00-00). La humedad y temperatura del invernadero se registró con la ayuda de un datalogger (RHT10 EXTECH® Instruments).

La incidencia de la enfermedad se midió 45 días después de floración, contando el número total de plantas por maceta y el número de plantas infectadas en los diferentes tratamientos. Las panojas se evaluaron por observación directa de signos y síntomas, mientras que las mazorcas se seccionaron longitudinalmente para observar la presencia interna de soros. Nuevamente, las teliosporas procedentes de las plantas infectadas se caracterizaron morfológica y molecularmente.

Los datos obtenidos se analizaron en base al modelo de un diseño de parcelas divididas, donde las parcelas mayores fueron los híbridos, las parcelas menores los tratamientos, con tres repeticiones por tratamiento y 10 plantas por unidad experimental. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación múltiple de medias mediante el método de la diferencia significativa honesta de Tukey a un nivel de significancia del 5%, usando del software estadístico SAS® Systems for Windows V 9.4 (SAS Institute Inc. 1999).

2.3.- Validación en campo

En 2015, se procedió a la validación en campo de los métodos de inoculación. Para esto, se usaron semillas del híbrido AZ 41801® inoculadas con los métodos evaluados en invernadero y como testigo se usaron también semillas del híbrido AZ 41801® sin inocular. Previo a la inoculación, se determinó la viabilidad del inóculo utilizado. La infección se midió sembrando las semillas en un lote en el Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hgo. (20°11'24.6"N 99°14'35.2"W). La semilla inoculada se sembró en un surco de 3 m de largo, 0.80 entre surcos, a una profundidad de 5 cm y 14 cm entre semillas. Después de la siembra, el terreno se regó por inundación y después se evitó el riego constante con el propósito de incrementar el porcentaje de infección (Wu *et al.*, 1981; Mack *et al.*, 1984).

La incidencia de la enfermedad se registró 45 días después de floración. Se consideró como planta enferma aquella que presentó síntomas en la panoja, jilote o en ambos. El experimento se llevó a cabo a una temperatura media diaria de 14.2 °C, precipitación promedio de 29mm y humedad relativa promedio de 60%.

Los datos obtenidos se analizaron en base al modelo de un diseño en bloques completos al azar, con tres repeticiones por tratamiento y 22 plantas por unidad experimental. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación múltiple de medias mediante el método de la diferencia significativa honesta de Tukey a un nivel de significancia del 5%, usando del software estadístico SAS® Systems for Windows V 9.4 (SAS Institute Inc. 1999).

2.4.- Implementación del mejor método para la selección de germoplasma

Posterior a la evaluación en invernadero y campo, se procedió a la validación del mejor método en la selección de germoplasma de maíz. Para esto, se inocularon 22 semillas de cada una de 160 líneas C₂-S₃ de endospermo blanco, derivadas de un programa de mejoramiento poblacional para resistencia genética a *S. reilianum* f. sp. *zeae* en los estados de Toluca, Méx. y Mixquiahuala, Hgo. Como testigo se usaron semillas del híbrido AZ 41801® inoculadas y sin inocular. Previo a la inoculación, se determinó la viabilidad del inóculo utilizado.

Durante 2016, la infección de las líneas C₂-S₃ inoculadas con *S. reilianum* f. sp. *zeae* se midió sembrándolas en un lote en el Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hgo. (20°11'24.6"N 99°14'35.2"W). La semilla inoculada de cada línea se sembró en un surco de 3 m de largo, 0.80 entre surcos, a una profundidad de 5 cm y 14 cm entre semillas. Después de la siembra, el terreno se regó por inundación y después se evitó el riego constante con el propósito de incrementar el porcentaje de infección (Wu *et al.*, 1981; Mack *et al.*, 1984).

La incidencia de la enfermedad en cada una de las líneas C₂-S₃ se registró 45 días después de floración. Se consideró como planta enferma aquella que presentó síntomas en la panoja, jilote o en ambos. El experimento de campo sembrado en el ciclo primavera-verano

(marzo-septiembre) se llevó a cabo a una temperatura media diaria de 12.7 °C, precipitación promedio de 31mm y humedad relativa promedio de 62%.

La respuesta a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae* de las 160 líneas se separó en base a los porcentajes de plantas enfermas, considerando los rangos 0 %, 0.1 – 10 %, 11 - 20%, 21 - 30%, 31 - 40%, 41 - 50%, 51 - 60% y > 60% de infección.

3.- Resultados y discusión

3.1.-Inóculo

Después de 24 h en cajas de Petri con PDA a 25 °C, 18 de las 19 muestras de inóculo probadas registraron porcentajes de germinación de teliosporas entre 5 y 19%. En contraste, las teliosporas colectadas en un lote de maíz del híbrido Cardenal (Asgrow®) en el Municipio de Tenango del Valle, Méx., alcanzaron 45.3% de germinación después de 24 h. Este inóculo fue seleccionado para usarse en el presente trabajo.

La desinfección de esporas con CuSO₄ 1.5% inhibió el desarrollo de hongos contaminantes presentes en los soros, como *Fusarium* spp. El porcentaje de germinación de teliosporas observado en la muestra usada como inóculo después de 24 h de incubación, fue superior a los reportados por Potter (1914), Osorio y Frederiksen (1998) y Quezada-Salinas *et al.*, (2013) quienes obtuvieron germinaciones máximas de 15, 28 y 35.4%, respectivamente. Esta variación en los porcentajes de germinación puede afectar los porcentajes de plantas infectadas en los métodos de inoculación. Quezada-Salinas *et al.*, (2013) mencionan que las diferencias en el porcentaje de germinación de teliosporas pueden deberse a las condiciones de almacenaje, tal como sucedió con el porcentaje de germinación de la muestra usada como inóculo en el presente trabajo, la cual, tuvo un período de secado en invernadero de 3 meses, mientras que el resto de las muestras tuvieron solamente 5 días de secado; sin embargo, es necesaria más investigación al respecto. En el presente estudio, teliosporas con un período de secado en invernadero por 3 meses y conservadas en botes de plástico con CaCl₂ (J. T. Baker y Macron Fine Chemicals® 94%), almacenadas a 22±2 °C, sembradas en medio PDA e incubadas en obscuridad a 25 °C por 24 h registraron un porcentaje máximo de germinación de 45.3%.

En la observación microscópica de los soros, se determinó que están constituidos por masas de teliosporas de 63-82 μm (Figura 2.1 A). Las teliosporas tienen forma globosa a subglobosa, algunas oviodes o de forma irregular, principalmente de coloración café. El tamaño de las teliosporas varió entre 10-12 x 11-13.5 μm , con presencia de ornamentaciones (Figura 2.1 B). También, se observaron células estériles agrupadas irregularmente, de color café claro a amarillo o hialinas de 9-16 μm , generalmente aplanadas en la superficie de contacto entre ellas (Figura 2.1 C). Estas características corresponden con la caracterización morfológica hecha por Vánky (2012). Las teliosporas germinadas formaron un basidio septado de cuatro células, de cada una se formó una basidiospora (Figura 2.1 D), de las cuales se desarrollaron numerosas esporidias secundarias que posteriormente, en medio de cultivo PDA, formaron colonias tipo levadura color crema que a los 25 días tomaron un color café claro a negro (Figura 2.2).

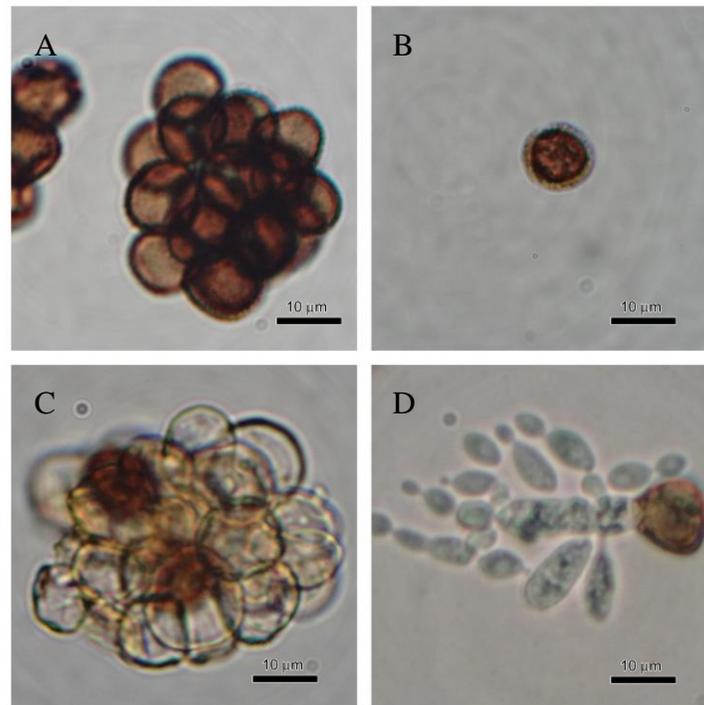


Figura 2.1. Estructuras de *S. reilianum* f. sp. *zae*. A. Masa de teliosporas, B. Teliospore, C. Células estériles agrupadas. D. Teliospore germinada.

El ADN proveniente de los cultivos monobasidiales obtenidos de la muestra usada como inóculo, así como el ADN de las teliosporas recuperadas de espigas y mazorcas enfermas al

final del experimento en invernadero, usando el par de iniciadores ITS1F y NL4, amplificaron un fragmento de aproximadamente 1300 pares de bases (Figura 2.3), como lo reportado por Stoll *et al.*, (2005).

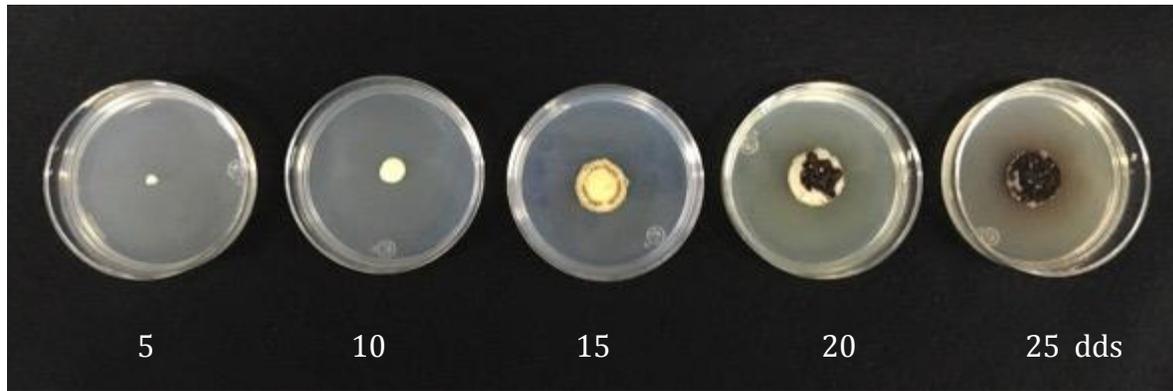


Figura 2.2. Aspecto de las colonias de *S. reilianum* f. sp. *zae* en medio cultivo PDA. dds = días después de la siembra.

El fragmento amplificado a corresponden al tamaño esperado de la región ITS completa de *S. reilianum*, más la porción de la región LSU rDNA (Stoll *et al.*, 2005)

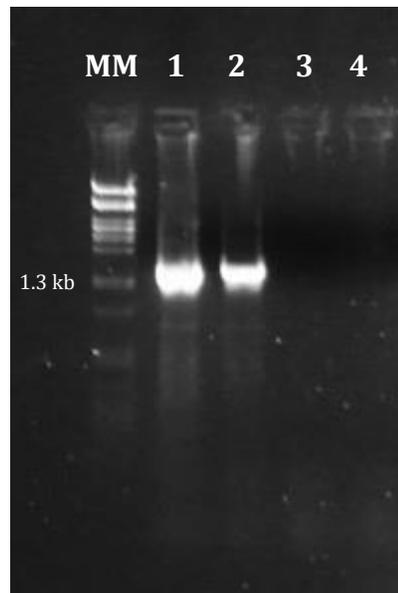


Figura 2.3. Productos de amplificación mediante PCR empleando los iniciadores ITS1F y NL4. MM. marcador molecular Pst1. 1. ADN de cultivo monobasidial generado a partir de teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zae* usadas en inoculación de semillas de maíz. 2. ADN

de cultivo monobasidial de teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* de espigas enfermas de maíz colectadas al momento de la evaluación final en invernadero. 3. ADN de espigas sanas. 4.- Testigo con agua.

Las secuencias obtenidas (KY856895, KY856896) se alinean con un 99% de identidad a las secuencias depositadas en el GenBank por Schirawski *et al.*, (2008) quienes secuenciaron el genoma completo de *S. reilianum*, corroborando la identidad del patógeno inoculado y recuperado después de la evaluación en invernadero. No se obtuvo amplificación con el ADN proveniente del tejido de planta sana y la mezcla de reacción donde el ADN se sustituyó por agua para PCR estéril.

3.2.- Evaluación de los tratamientos en invernadero

Ninguno de los materiales utilizados como vehículo para la inoculación de teliosporas del hongo en semillas de maíz tuvo efecto negativo en la germinación de las teliosporas (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Efecto de los adherentes sobre la germinación de teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae*

No.	Adherente	% de germinación
1	Testigo	45.3
2	NaCMC	44.2
3	ADH®	43.0
4	Alginato de sodio	42.0
5	Azúcar mascabado	43.2
6	Agar – agar	46.1
7	Grenetina	45.5

Después de 45 días de floración, en las plantas testigo no se observaron signos ó síntomas de la enfermedad, mientras que en plantas provenientes de semilla inoculada se observó formación de soros llenos de teliosporas que remplazaron total o parcialmente la panoja y la

mazorca de las plantas (Figura 2.4), lo que corresponde con lo descrito por Matyac y Kommedahl (1985b). Los cambios a nivel fisiológico y morfológico observados en plantas de los tres híbridos inoculados con el patógeno, causaron una reducción en la producción de polen y grano, como es señalado por Ghareeb *et al.*, (2011).

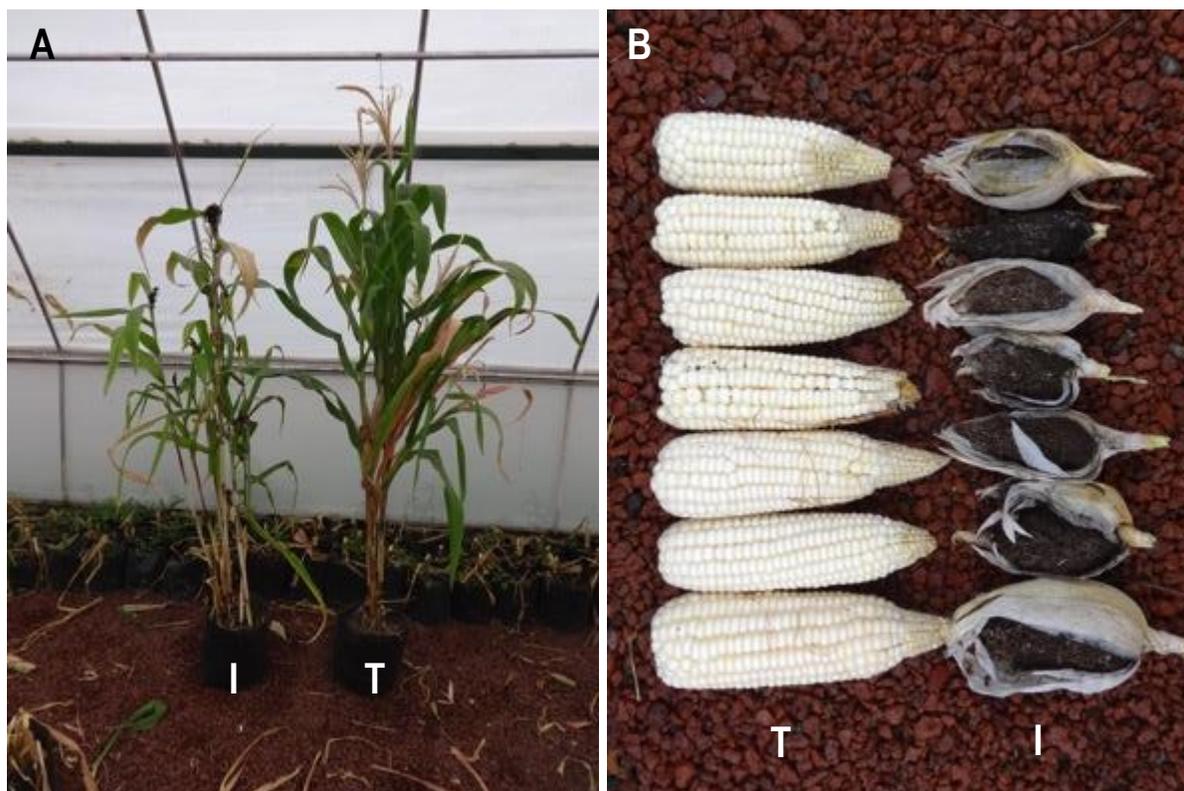


Figura 2.4. A. Aspecto de las plantas y B. mazorcas de plantas testigo (T) y de plantas de semilla inoculada (I) con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zae*.

El ANOVA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta a la infección entre los tres híbridos evaluados (Cuadro 2.3). Sin embargo, la tendencia de porcentaje de plantas infectadas fue: AZ 41801 (48.7%) > Euros (42.5%) > AS1503 (31.6%).

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación evaluados (Cuadro 2.3). Los híbridos AS1503, AZ 41801 y Euros presentaron el mayor porcentaje de plantas infectadas cuando las semillas fueron inoculadas usando grenetina como adherente. Este tratamiento indujo medias de plantas infectadas del 86.1, 96.3 y 95.2%

respectivamente, demostrando que este método es superior al resto de los métodos probados. El segundo grupo, lo constituyen los tratamientos inóculo/suelo (Trat. 8) y agar-agar (Trat. 6) con porcentajes de plantas infectadas del 74.71 y 51.79, respectivamente. El tratamiento de NaCMC (Trat. 2) indujo solo un 40.59 % de plantas infectadas y el resto de los tratamientos promovieron porcentajes más bajos. En los testigos no se presentaron plantas enfermas.

Cuadro 2.3. Porcentaje de plántulas de maíz infectadas con *S. reilianum* f. sp. *zea*, generadas de semillas inoculadas con teliosporas utilizando diferentes tratamientos.

Tratamiento	Infección promedio de plántulas de maíz (%)			
	AS1503	Euros	AZ 41801	Media
1) Testigo	0.0	0.0	0.0	0.0 e
2) NaCMC	35.9	35.8	50.0	40.59 cd
3) ADH	5.6	20.8	29.0	18.46 de
4) Acido algínico	11.1	20.0	21.4	17.51 de
5) Azúcar mascabado	4.2	42.1	49.2	31.81cd
6) Agar-agar	41.7	54.2	59.5	51.79 bc
7) Grenetina	86.1	95.2	96.3	92.54 a
9) Inóculo:Suelo	68.1	72.0	84.1	74.71 ab
Media	31.6 a	42.5 a	48.7 a	

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

DMS (5%): 29.93

CV: 48.65

3.3.- Validación en campo

Durante la evaluación de la incidencia de la enfermedad en las plantas provenientes de semillas inoculadas con los diferentes tratamientos se observaron síntomas característicos de la enfermedad, mientras que el testigo se mantuvo libre de la enfermedad. El ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En el Cuadro 2.4 se muestra la separación de medias por el método de Tukey de los 8 tratamientos evaluados, en donde nuevamente se demuestra que el tratamiento en donde se usó grenetina como adherente obtuvo el mayor porcentaje de infección.

Cuadro 2.4. Porcentaje de plántulas de maíz infectadas con *S. reilianum* f. sp. *zeae*, generadas de semillas inoculadas con teliosporas utilizando diferentes tratamientos en la evaluación en campo.

Tratamiento	Infección promedio de plántulas (%)
1) Testigo	0.0 d
2) NaCMC	21.93 bc
3) ADH	13.40 cd
4) Ácido algínico	29.90 bc
5) Azúcar	28.86 bc
6) Agar-agar	34.93 b
7) Grenetina	90.03 a
8) Inóculo:Suelo	19.26 bcd

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

DMS (5%): 20.42

CV: 23.79

3.4.- Implementación del mejor método para la selección de germoplasma

La inoculación artificial con grenetina como adherente en las 160 líneas C₂-S₃ de maíz de endospermo blanco resultó con un porcentaje de plantas enfermas que vario de cero a 54.5%, mientras que en el híbrido AZ 41801® se encontró un 70.7 %.

La distribución de la enfermedad en las 160 líneas inoculadas con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* usando como adherente grenetina al 10% fue: 84 líneas (52.5%) no presentaron la enfermedad, 29 (18.1%) con incidencia de 1-10%, 27 (16.8 %) con incidencia de 11-20%, 15 (9.4%) con incidencia de 21-30%, y el resto de las líneas (5) presentaron incidencia entre 31-55%. La incidencia máxima encontrada en este experimento fue de 54.5 %, mientras que el testigo sin inocular no presentó la enfermedad (Figura 2.5). Las 84 líneas C₂-S₃, se recombinarán siguiendo un programa de mejoramiento S₁ recurrente, mediante polinización controlada y posteriormente generar nuevas líneas S₁ y continuar seleccionado líneas resistentes a la enfermedad, para usarse en la formación de nuevas variedades sintéticas de polinización libre con alto rendimiento y resistencia a la

enfermedad.

Los porcentajes de plantas infectadas son más bajos respecto a lo obtenido en los híbridos evaluados en invernadero, debido a que las líneas C₂-S₃ tuvieron previamente 2 ciclos de selección a la enfermedad bajo condiciones de infección natural eliminando líneas homocigóticas susceptibles a la enfermedad.

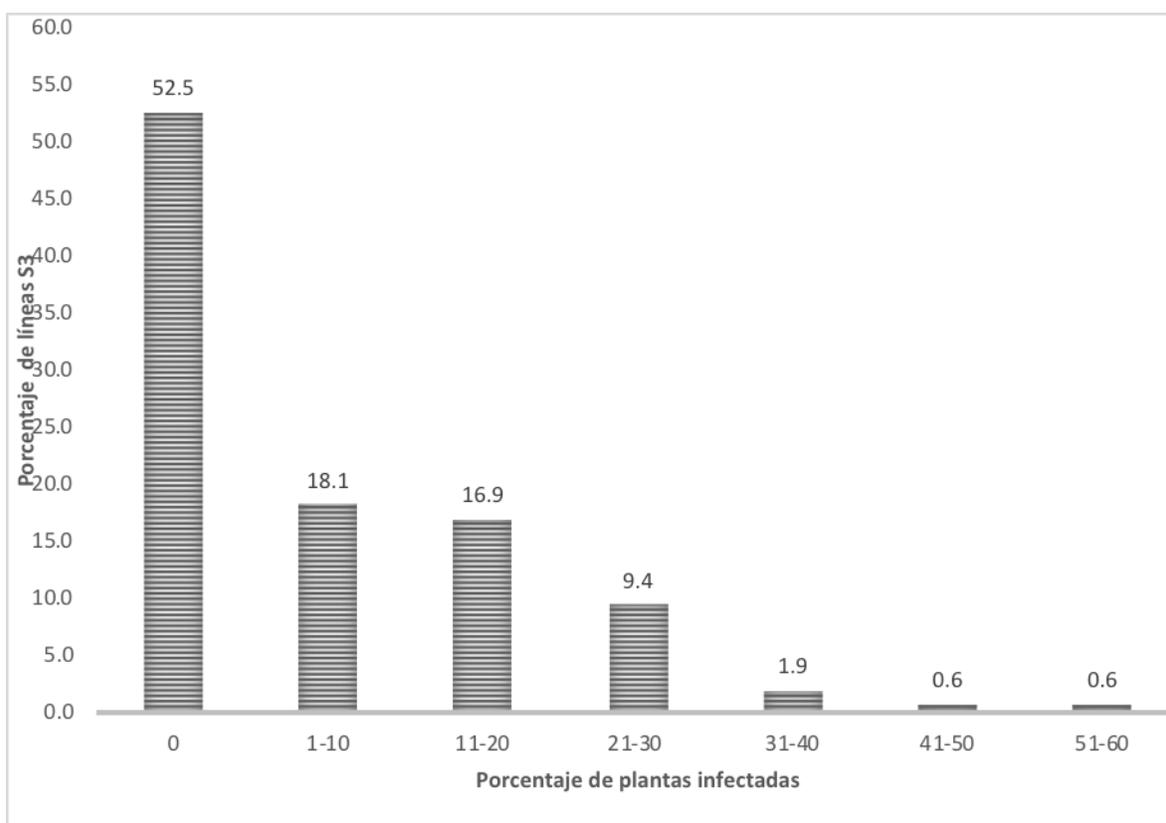


Figura 2.5. Distribución de incidencia en líneas S3 de maíz de endospermo blanco afectadas con carbón de la espiga 45 días después de floración.

El uso de grenetina como adherente en la inoculación de semillas de maíz asegura la permanencia del inóculo sobre la semilla, ya que la pérdida de inóculo durante el transporte y manejo en campo es menor comparado con el tratamiento NaCMC (Quezada-Salinas *et al.*, 2013). Con base en los porcentajes de plantas infectadas obtenidos en la presente investigación, se propone en uso de grenetina como adherente en la inoculación de semillas de maíz con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae*, para la evaluación de germoplasma de

maíz dentro de un programa de mejoramiento para resistencia al carbón de la espiga del maíz.

4.- Conclusiones

El método de inoculación con grenetina mostró ser mejor que el resto de los métodos evaluados.

La validación en campo del método de inoculación con grenetina demostró que esta metodología es efectiva para la selección de germoplasma, ya que permite diferenciar claramente entre germoplasma resistente y susceptible, bajo condiciones de campo.

Ésta técnica de inoculación es válida, pero queda la opción de seguir investigando para desarrollar una técnica más eficiente.

5.- Literatura citada

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403–410.
- Baggett, J. R., and Koepsell, P. A. 1983. Field inoculation of sweet corn with the head smut pathogen (*Sphacelotheca reiliana*). *HortScience.* 18:67–68.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16(4):729–770.
- Craig, J., and Frederiksen, R. A. 1992. Comparison of sorghum seedlings reactions to *Sporisorium reilianum* in relation to sorghum head smut resistance classes. *Plant Dis.* 76:314–318.
- Fehr, W. R. 1993. Principles of cultivar development. Theory and technique Vol. 1. Ames, Iowa.: Macmillian. 536 p.
- Frederiksen, R. A. 1977. Head smuts of corn and sorghum. In *Proc. Annu. Corn Sorghum Res. Conf.* 32nd., ed. American Seed Trade Association. Washington, D.C., p. 89–105.
- Fullerton, R. A., Scott, D. J., and Graham, G. J. 1974. Effect of fungicides on the control of head smut of maize, and the relationship between infection level and crop yield. *New Zeal. J. Exp. Agric.* 2(2):177–179.
- Ghareeb, H., Becker, A., Iven, T., Feussner, I., and Schirawski, J. 2011. *Sporisorium*

- reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. *Plant Physiol.* 156:2037–52.
- Griekspoor, A. and Groothuis, T. 1994. 4Peaks by A. :nucleobytes.com.
- Holliday, R. 1974. *Ustilago maydis*. In *Handbook of genetics*. Vol. 1, ed. R. C. King. New York, NY: Plenum Press, p. 575–595.
- Kirby, K. S. 1965. Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid. *Biochem. J.* 96:266–269.
- Lübberstedt, T., Xia, X. C., Tan, G., Liu, X., and Melchinger, A. E. 1999. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reilianum* in maize. *Theor. Appl. Genet.* 99:593–598.
- Mack, H. J., Baggett, J. R., and Koepsell, P. . 1984. Effects of cultural practices on the incidence of head smut in sweet corn. *HortScience.* 19(1):77–78.
- Martinez, C., Bu´ee, M., Jauneau, A., Bécard, G., Dargent, R., and Roux, C. 2001. Effects of a fraction from maize root exudates on haploid strains of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Plant Soil.* 236:145–153.
- Martinez, C., Roux, C., and Dargent, R. 1998. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Biochem. Cell Biol.* 89:247–253.
- Martinez, R. J. L., and Ledesma, M. J. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en el Valle de Zapopan, Jalisco, México. *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 seedling 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.* 57:952–928.
- Niks, R. E., Parlevliet, J. E., Lindohout, P., and Bai, Y. 2011. *Breeding crops with resistance to diseases and pests*. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. 198 p.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., and Fursov, M. 2012. The UGENE team. Unipro

- UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 28:1166–1167.
- 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(11):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.
- Potter, A. A. 1914. Head smut of sorghum and maize. *J. Agric. Res.* II(5):339–380.
- Pradhanang, P. M., and Ghimire, S. R. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. *Trop. Agric.* 73(4):325–328.
- Quezada-Salinas, A., De León-García de Alba, C., Hernández-Anguiano, A. M., and Nava Díaz, C. 2013. Evaluation of inoculation methods on maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. *Mex. Rev. Phytopathol.* 31(2):80–90.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS user's guide: Statistics. 1028 p.
- Schirawski, J., G. Mannhaupt, K. Münch, T. Brefort, K. Schipper, G. Doehlemann, M. Di Stasio, N. Rössel, A. Mendoza-mendoza, D. Pester, O. Müller, B. Winterberg, E. Meyer, H. Ghareeb, T. Wollenberg, M. Münsterkötter, P. Wong, M. Walter, E. Stukenbrock, U. Guldener, and Kahmann R. 2008. Pathogenicity determinants in smut fungi Revealed by genome comparison. *Science*. 330: 1546–1548.
- Stoll, M., Begerow, D., and Oberwinkler, F. 2005. Molecular phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequences. *Mycol. Res.* 109(3):342–356.
- Stromberg, E. L., Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Matyac, C. A., Windels, C. E., and Geadelmann, J. L. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. *Plant Dis.* 69:880–884.
- Vánky, K. 2012. Smut Fungi of the World. St. Paul, MN. USA. APS Press. The American Phytopathol. Soc. 1458p.
- Wang, Z. H., Li, X. H., Xie, C. X., Li, M. S., Hao, Z. F., George, M. L. C., *et al.* 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. 1987. 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 Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 34:23–26 Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01140671.2006.9514383>.
- Wu, X. L., Pang, Z. C., Tian, L. M., and Hu, J. C. 1981. On the environmental factors affecting infection and cultural measures of controlling corn head smut (*Sphacelotheca reiliana* (Kuhn) Clint). *Acta Phytopathol. Sin.* 8(1):41–46.
- Xu, M. L., Melchinger, A. E., and Lübberstedt, T. 1999. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reiliana* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. *Plant Dis.* 83:390–395.

CAPITULO III

HERENCIA DE LA RESISTENCIA A *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* EN GERMOPLASMA DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE ALTURA

Resumen

El carbón de la espiga del maíz (*Zea mays* L.) causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon and Fullerton es una enfermedad de distribución mundial y de importancia económica en México debido a las pérdidas que ocasiona por reducción en el rendimiento. A pesar de que existen diferentes métodos de control, la selección de resistencia genética es la medida de control más eficiente para el manejo de la enfermedad. Debido a la falta de información sobre la herencia de la resistencia a la enfermedad en germoplasma de maíz de altura de México, en Mixquiahuala, Hgo. se determinó la base genética de la resistencia a *S. reilianum* f. sp. *zeae* en este germoplasma, mediante la caracterización de la aptitud combinatoria general (ACG), la aptitud combinatoria específica (ACE), heredabilidad (h^2) y heterosis de 14 líneas S_3 mediante el diseño II de Griffing que incluyó 14 líneas parentales más las 91 cruzas directas. Se utilizó el diseño experimental fue bloques completos al azar con tres repeticiones. Tanto la ACG como la ACE fueron altamente significativas ($P < 0.01$), lo que indica que tanto los efectos de dominancia como los efectos de aditividad son importantes en la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, la ACG fue más grande que la ACE, indicando que los efectos aditivos son más importantes. Los híbridos más resistentes fueron los derivados de dos líneas con una alta ACG. Las mejores líneas para producir híbridos altamente resistentes fueron P2 y P1, que tuvieron los mejores efectos negativos de ACG. La heredabilidad en sentido estricto fue de 0.22. Lo anterior indica que mediante selección recurrente los genes de resistencia pueden ser acumulados e incrementar el nivel de resistencia a la enfermedad. La determinación del número de genes involucrados en la resistencia a la enfermedad se continuará trabajando.

Palabras clave: Herencia de la resistencia, diseño dialélico, heredabilidad.

Abstract

Head smut of maize (*Zea mays* L.) caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* (Kühn) Langdon and Fullerton is a disease of worldwide distribution and of economic importance in Mexico, due to losses caused by the reduction in yield. Although there are different control methods, the selection of genetic resistance is the most efficient control measure for the management of the disease. Due to the lack of information on the inheritance of disease resistance in highland maize germplasm from Mexico, in Mixquiahuala, Hgo. the genetic basis of resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* was determined in this germplasm, through the characterization of the general combinatorial aptitude (GCA), the specific combinatorial aptitude (ACE), heritability (h^2) and heterosis of 14 S3 lines through the design II of Griffing that included 14 parental lines plus 91 direct crosses. We used the experimental design of the complete blocks at random with three repetitions. Both the ACG and the ACE were highly significant ($P < 0.01$), which indicates that both the dominance and additivity effects are important in the resistance to the disease. However, the ACG was larger than the ACE, indicating that the additive effects are more important. The most resistant hybrids were those derived from the lines with a high ACG. The best lines to produce hybrids were P2 and P1, which had the best negative effects of ACG. The heritability in the strict sense was 0.22. This indicates that through recurrent selection, the resistance genes can be accumulated and increase the level of resistance to the disease. The determination of the number of genes involved in the resistance to the disease will continue working.

Key words: Inheritance of the resistance, dialélico design, heritability.

1.- Introducción

El agente causal del carbón de la espiga del maíz (CEM) (*Zea mays* L.) es *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* (Kühn) Langdon and Fullerton (syn. *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint.) (Ustilaginales: Ustilaginaceae) (Martinez *et al.*, 2002). El patógeno es un hongo dimórfico, que presenta una fase saprofítica haploide y otra parasítica diploide (Martinez *et al.*, 2001). La infección es causada por basidiosporas presentes en el suelo, en las primeras etapas de desarrollo de la raíz (Martinez *et al.*, 2000). Posteriormente, el hongo crece con el

meristemo apical hasta invadir las inflorescencias del maíz (Martinez, Roux, and Dargent 1999), donde produce soros negros con teliosporas que reemplazan las mazorcas y panojas (Potter, 1914). Una vez que el patógeno alcanza la madurez, el peridio de los soros se rompe y libera las teliosporas, mismas que son diseminadas por el viento y se depositan de nuevo en el suelo (Martinez *et al.*, 2001).

La enfermedad tiene una amplia distribución a nivel mundial (Li *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2016). En México, la enfermedad se ha reportado en los estados de Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Aguascalientes, pero su distribución puede ser más extensa (Aquino-Martínez *et al.*, 2011). En germoplasma de maíz susceptible se han reportado incidencias de hasta 80% (Frederiksen, 1977), con reducciones en el rendimiento superiores al 30% (Matyac y Kommedahl, 1985).

La resistencia genética es una estrategia importante para el control del CEM (Pataky, 1999). En la evaluación de diferentes fuentes de germoplasma de maíz se ha observado un amplio rango de respuestas a la infección del patógeno, presentándose incidencias que van del 0 al 90% (Stromberg *et al.*, 1984; Whyte y Gevers, 1987; Ali y Baggett, 1990; Wang *et al.*, 2008). Diferentes investigaciones indican que la resistencia genética a la enfermedad es de origen cuantitativo, con herencia principalmente aditiva y altamente compleja (Anderson *et al.* 2016). Lübberstedt *et al.*, (1999) después de evaluar 220 familias F3 derivadas de la cruce de las líneas D32 y D145, identificaron 2 conjuntos de 3 y 8 QTLs que explicaron el 13% y 44% de la resistencia, respectivamente. También, encontraron que entre los 11 QTLs, la principal acción génica fue aditividad o dominancia parcial, con algunas interacciones epistáticas digénicas.

Li *et al.*, (2008) evaluaron una población de 184 familias F2 y F3 derivadas de la cruce entre las líneas homocigóticas Mo17 (resistente) y Huangzao4 (susceptible), encontrando que las varianzas genotípica y GxE para incidencia de la enfermedad fueron altamente significativas en la población. La heredabilidad del carácter de resistencia a la enfermedad varió entre 0.62 a 0.70 e identificaron cinco QTLs que explicaron del 5.0 al 43.7% de las

varianzas fenotípicas en cuatro ambientes. Tres de los cuales habían sido identificados previamente por Lübberstedt *et al.*, (1999). El QTL de mayor importancia fue el localizado en el cromosoma 2, que explicó hasta el 43.7% de la varianza fenotípica, el cual puede ser usado para la selección asistida por marcadores moleculares para la resistencia a la enfermedad. Recientemente, Wang *et al.*, (2012), a partir de la genotipificación de 144 líneas endogámicas usando 45 868 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) encontraron 18 nuevos genes asociados con la resistencia al carbón de la espiga del maíz. Debido a que hasta el momento no se cuenta con información sobre la genética de la resistencia a la enfermedad en maíces de altura en México, se planteó el presente estudio con el objetivo de determinar la base genética de la resistencia a *S. reilianum* f. sp. *zeae* en germoplasma de maíz con endospermo blanco, adaptado a Valles Altos de México.

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Germoplasma de maíz utilizado

Inicialmente, se usaron 60 líneas S₂ procedentes de una población con amplia base genética de endospermo blanco, derivadas de un programa de selección y mejoramiento para resistencia genética a *S. reilianum* f. sp. *zeae* en Toluca, Méx. y Mixquiahuala, Hgo. En el verano de 2013, se generaron 160 líneas S₃ en un vivero de selección y mejoramiento en el municipio de Valle de Bravo, Méx., en donde se seleccionaron las mejores plantas entre y dentro de líneas S₂ seleccionadas.

2.2.- Evaluación de infección de líneas S₃

La infección de las líneas S₃ a *S. reilianum* f. sp. *zeae* se evaluó inoculando artificialmente 22 semillas de cada línea y sembrándolas en un lote en el Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hgo. La semilla de cada línea, inoculada con una solución acuosa de grenetina 10%, se sembró en un surco de 3 m de largo y 0.80 entre surcos, a una profundidad de 5 cm, con separación de 14 cm entre semillas. Después de la siembra, el terreno se regó por inundación y se evitó el riego constante con el propósito de incrementar el porcentaje de infección (Matyac y Kommedahl 1985). La incidencia de la infección de cada línea S₃ se registró 45 días después de floración. Se consideró como planta enferma aquella que presentó síntomas en la panoja, en el jilote o ambos. Como testigo se usaron semillas del

híbrido AZ 41801® inoculadas y sin inocular. El experimento de campo sembrado en el ciclo 2015 (marzo-septiembre) se llevó a cabo a una temperatura media diaria de 12.7°C, precipitación promedio de 31mm y humedad relativa promedio de 62%.

2.3.- Selección de progenitores

La respuesta de las 160 líneas S₃ a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae* se agrupó en base a la incidencia de la enfermedad, considerando los rangos 0 %, 0.1 – 10 %, 11 - 20%, 21 - 30%, 31 - 40%, 41 - 50%, 51 - 60% y > 60% de infección. Con base a la incidencia de infección en las líneas S₃, se seleccionaron 7 resistentes y 7 susceptibles a la enfermedad.

2.4.- Diseño de apareamiento genético

Las 14 líneas seleccionadas se sembraron en un vivero en el Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hgo. para generar todas las combinaciones posibles requeridas en el diseño de apareamiento dialélico tipo II (Griffing 1956). Los cruzamientos se realizaron para constituir el dialelo, incluyendo todos los cruzamientos directos posibles (Figura 3.1). Los 14 progenitores y las 91 cruzas resultantes generaron un total de 105 entradas, según la

fórmula $\frac{n(n-1)}{2} = \frac{14*13}{2} = 91$ híbridos + 14 progenitores.

		R							S						
♀/♂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
R	1		oo												
	2			oo											
	3				oo										
	4					oo									
	5						oo								
	6							oo							
	7								oo	oo	oo	oo	oo	oo	
S	8								oo	oo	oo	oo	oo	oo	
	9									oo	oo	oo	oo	oo	
	10										oo	oo	oo	oo	
	11											oo	oo	oo	
	12												oo	oo	
	13													oo	
	14														

Figura 3.1. Esquema del diseño de apareamiento dialélico tipo Griffing Diseño II.

Susceptible = S = ° y Resistente = R = •

A partir de la evaluación de infección de la generación F1 mediante inoculación artificial, se obtuvieron los parámetros genéticos de ACG, ACE, h^2 y heterosis. El experimento de campo, sembrado en el ciclo 2016 (marzo-septiembre) se llevó a cabo a una temperatura media diaria de 15.9 °C, precipitación promedio de 34.9mm y humedad relativa promedio de 66%.

2.5.- Análisis de información colectada

Los datos del porcentaje de plantas enfermas por CEM se analizaron utilizando un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación múltiple de medias mediante el método de la diferencia significativa honesta de Tukey a un nivel de significancia del 5%, usando del software estadístico SAS® Systems for Windows V 9.4. (SAS Institute Inc. 1999).

2.6.- Análisis dialélico

Para el análisis del dialélico se utilizó el Modelo I o de frecuencias fijas para el cálculo de las ACG y ACE, donde las líneas son deliberadamente escogidas y no pueden ser consideradas como una muestra aleatoria de ninguna población. Mientras que para la estimación de los componentes de varianza y la heredabilidad se utilizó el Modelo II o de frecuencias aleatorias, en donde líneas parentales son asumidos en su totalidad como una muestra aleatoria de alguna población de la cual se quieren hacer inferencias, propuesto por Griffing (1956). Ambos modelos bajo el diseño 2 que incluye las líneas parentales, así como todas las cruzas directas posibles, sin considerar las cruzas recíprocas.

En el ciclo 2017, en un vivero establecido en Cinta Larga, se hicieron cruzas fraternales en cada F1 mediante polinización controlada, para obtener la F2 y posteriormente determinar la herencia en las cuatro generaciones (P1, P2, F1 y F2). Para determinar el número de genes implicados en la resistencia a la enfermedad se continuará trabajando. Las cruzas de estas generaciones podrán utilizarse en la formación de variedades sintéticas de polinización libre con alto rendimiento y resistencia a la enfermedad.

3.- Resultados y discusión

En la inoculación artificial en las 160 líneas S3 de maíz de endospermo blanco se obtuvo con un máximo de 54.5% de infección en la línea más susceptible, mientras que el híbrido AZ 41801® tuvo 70.7 %. Los porcentajes de plantas infectadas en las líneas S3 son más bajos respecto al testigo inoculado, debido a que las líneas S2 del germoplasma original donde se generaron las líneas S3, tuvieron previamente 2 ciclos de selección a la enfermedad bajo condiciones de infección natural y las líneas homocigóticas a la enfermedad eran eliminadas. Desafortunadamente, por escases de semilla, la línea más susceptible no se incluyó como progenitor dentro del diseño dialélico.

La distribución de la enfermedad en las 160 líneas inoculadas con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zaae* se muestra en la Figura 3.2.

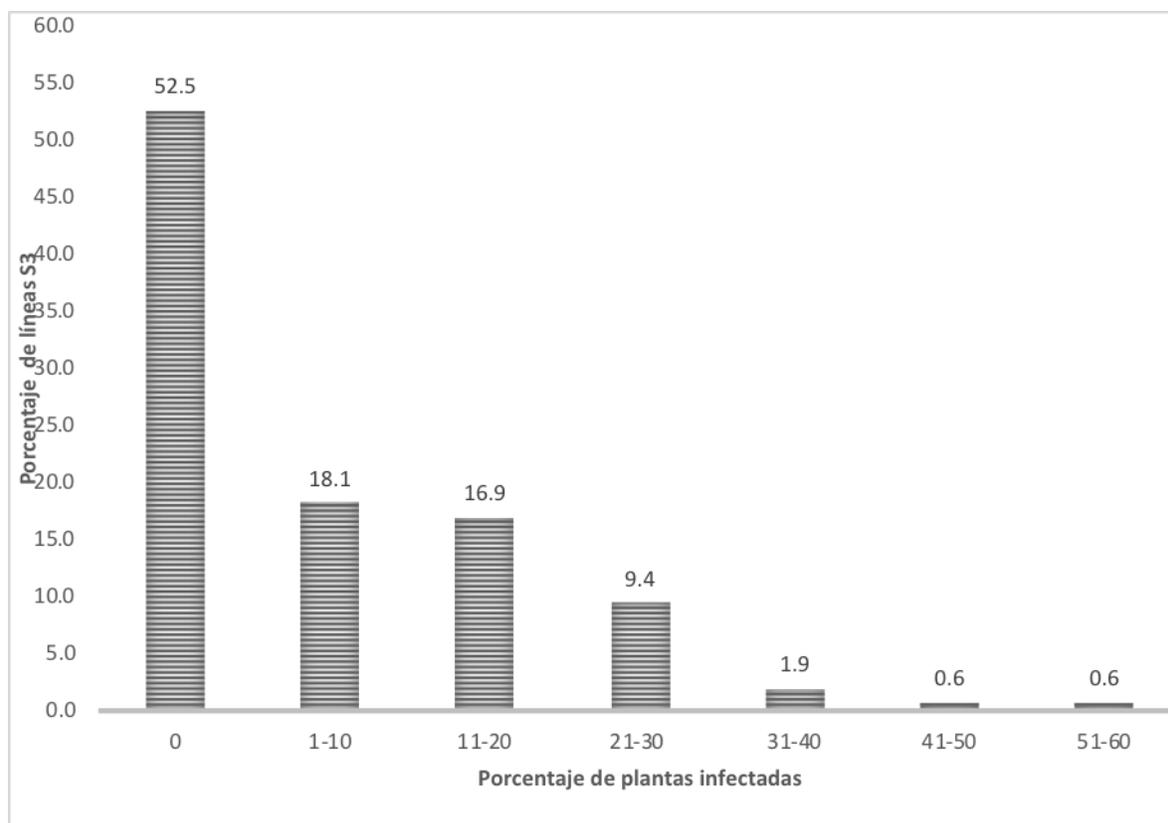


Figura 3.2. Frecuencia de incidencia del CEM en líneas S3 de maíz de endospermo blanco en plantas 45 días después de floración.

Las líneas seleccionadas para el diseño de apareamiento dialélico, así como el origen y los porcentajes de infección alcanzados mediante inoculación artificial se muestran en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Nombre, origen e incidencia de infección de progenitores utilizados en el diseño de apareamiento dialélico tipo Griffing Diseño II.

RESISTENTES			SUSCEPTIBLES		
No. línea	Origen	%	No. línea	Origen	% infección
	CL 15	infección		CL 15	
P1	19-66	0	P8	19-18	40.0
P2	19-68	0	P9	19-27	28.57
P3	19-95	0	P10	19-56	28.57
P4	19-112	0	P11	19-73	25.0
P5	19-117	0	P12	19-76	27.27
P6	19-120	0	P13	19-104	23.08
P7	19-129	0	P14	19-115	25.0

3.1.- Análisis de varianza

Los resultados del análisis de varianza del diseño de apareamiento dialélico se muestran en el Cuadro 3.2, en donde se observa que tanto la ACG como la ACE fueron altamente significativas ($P < 0.01$), lo que indica que tanto los efectos génicos de dominancia como los efectos génicos de aditividad son importantes en la resistencia a la enfermedad. Sin embargo, la ACG fue más relevante que la ACE, indicando que los efectos aditivos son más importantes.

Cuadro 3.2. Análisis de varianza para la incidencia del CEM en el dialélico.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr(>F)
Repetición	2	2884.55	1442.27	24.71	2.35421E-10
Cruza	104	95826.75	921.41	15.79	1.44849E-60
ACG	13	26826.80	2063.60	35.35	0

ACE	91	68999.95	758.24	12.99	0
Error	208	12140.63	58.37		

3.2.- Variabilidad de los progenitores

Los resultados del ANOVA para el porcentaje de plantas infectadas por el CEM de los catorce progenitores se presentan en el Cuadro 3.3. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los 14 progenitores ($P < 0.01$), lo que indica que hubo una alta variabilidad en el porcentaje de plantas infectadas por el CEM. Esto se muestra en la agrupación Tukey en donde las líneas P12 y P8 son estadísticamente las líneas más susceptibles, seguidas por el grupo conformado por las líneas P10, P9, P11, P14, P13 que mostraron un nivel de susceptibilidad menor, mientras el resto de las líneas fueron resistentes.

Cuadro 3.3. Análisis de varianza para la incidencia del CEM en las 18 líneas parentales que conforman al diseño dialélico.

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Pr(>F)
Bloques	2	56.23	28.11	0.27	0.7651
Genotipos	13	12978.52	998.34	9.60	<.001
Error	26	2702.71	103.95		
Total	52	15737.46	1130.40		

$R^2=0.83$, $CV= 62.46$

El agrupamiento Tukey se muestra en el Cuadro 3.4, en donde se observa que, tanto las líneas susceptibles como las resistentes tuvieron el mismo comportamiento que en la evaluación previa que permitió seleccionarlas para constituir el dialélico, ya que las líneas parentales resistentes se comportaron como resistentes con una media de cero y los susceptibles se mostraron como susceptibles alcanzando una media de 32.4, siendo la línea 12 la que presentó la mayor susceptibilidad.

Cuadro 3.4. Porcentajes de infección del CEM registrados en las 18 líneas progenitoras seleccionadas para el diseño dialélico.

Línea	Media	Agrupamiento
P12	50.90	A
P8	42.37	A
P10	28.43	AB
P9	28.33	AB
P11	28.20	AB
P14	25.27	AB
P13	25.00	AB
P7	0.0	B
P1	0.0	B
P2	0.0	B
P3	0.0	B
P4	0.0	B
P5	0.0	B
P6	0.0	B

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes ($\alpha=0.05$, DMS 30.67).

3.3.- Variabilidad de los híbridos

Para el porcentaje de plantas infectadas por el CEM, los resultados del ANOVA de los 91 híbridos se presentan en el Cuadro 3.5. El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas entre los 91 híbridos ($P<0.01$); indicando una alta variabilidad en la respuesta a la infección del CEM de los híbridos evaluados.

Cuadro 3.5. Análisis de varianza para la incidencia del CEM en los 91 híbridos del diseño dialélico.

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor F	Pr(>F)
Bloques	2	3002.57	1501.28	29.07	<.001
Híbridos	90	83120.38	923.55	17.88	<.001

Error	180	9295.34	51.64
Total	272	95418.29	2476.47

R²=0.90, CV= 44.23

Los porcentajes de infección que tuvieron los 91 híbridos se presentan el Cuadro 3.6. Considerando las cruzas RxR, las cinco cruzas más sobresalientes por su resistencia al CEM, fueron P1xP3, P1xP7, P2xP3, P2xP7, P5xP7, dentro de las cuales sobresalen aquellas que involucran las siguientes líneas: P1, P2 y P7.

En el grupo de cruzas SxS, los híbridos más susceptibles fueron P8xP11, P10xP11, P10xP12, P10xP13, P11xP13, P12xP13 y P12xP14, siendo P10 y P12 las líneas que derivaron una mayor proporción de híbridos susceptibles. Sin embargo, los híbridos con mayor susceptibilidad al CEM fueron aquellos en donde P8 y P12 estuvieron involucradas.

La severidad promedio de las cruzas que involucran dos padres resistentes fue de 7.4, la craza de resistentes por susceptibles fue de 15.0 y la media de las cruzas de dos padres susceptibles fue de 25.5, mientras que la media general fue de 3. Estos valores sugieren que la incidencia del CEM fue aceptable para discriminar entre diferentes niveles de resistencia.

Respecto a los híbridos que fueron el resultado de cruzar un material inmune con materiales altamente susceptibles dieron origen a híbridos F1 con nivel intermedio de resistencia de 15, excepto en aquellas cruzas donde la ACE fue significativa. Resultados similares se han encontrado durante el estudio de la herencia de la resistencia de otras enfermedades del maíz. Josephson y Naidu, (1971) y Loesch y Zuber (1972) indican que esto es evidencia de que la resistencia al CEM es parcialmente dominante y controlada por pocos genes, mientras que Borges (1987) y Halseth *et al.*, (1991) argumentan que este tipo de distribución sugiere que la resistencia es poligénica y parcialmente dominante; no obstante, esto deberá ser comprobado en futuros análisis de segregación.

Cuadro 3.6. Incidencia promedio del CEM registrada en 91 híbridos incluidos en el diseño dialélico.

Línea	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	Media
P1	0.0	16.0	0.0[†]	3.2	6.3	5.2	0.0[†]	0.0	12.6	8.4	44.6	3.1	27.2	0.0	9.7
P2		0.0	0.0[†]	7.4	2.5	11.7	0.0[†]	12.1	2.8	7.2	0.0	30.5	2.5	21.7	8.2
P3			0.0	3.0	0.0[†]	25.2	3.6	6.6	5.5	22.2	5.2	30.9	14.1	37.8	14.0
P4				0.0	22.2	10.0	19.0	40.9	0.0	4.5	29.2	2.4	29.4	0.0	15.8
P5					0.0	69.5	0.0[†]	4.1	11.1	36.2	0.0	6.7	0.0	29.9	17.5
P6						0.0	3.2	23.5	0.0	9.7	12.0	0.0	41.3	8.9	12.3
P7							0.0	16.9	0.0	29.6	18.8	57.6	0.0	28.0	21.6
P8								40.6	19.4	19.9	70.1^{††}	0.0	21.0	10.3	23.5
P9									28.3	2.5	27.3	9.8	0.0	0.0	7.9
P10										28.4	39.4^{††}	43.1^{††}	39.6^{††}	26.3	37.1
P11											28.2	26.0	63.3^{††}	15.4	34.9
P12												50.9	41.0^{††}	60.0^{††}	50.5
P13													25.0	0.0	0.0
P14														25.3	
Media		16.0	0.0	4.5	7.8	24.3	4.3	14.9	6.4	15.6	24.7	19.1	23.3	18.3	

[†] indica los 6 híbridos estadísticamente más resistentes al CEM dentro del grupo de cruzas R*R

^{††} indica los 7 híbridos estadísticamente más susceptibles al CEM dentro del grupo de cruzas S*S

3.4.- Análisis dialélico

3.4.1.- Efectos de Aptitud Combinatoria General

Debido a que los efectos genéticos aditivos fueron los más significativos en conferir la resistencia al CEM es necesario hacer énfasis en los valores de ACG estimados para cada línea. Los efectos estimados de ACG para cada uno de los 14 progenitores se presentan en el Cuadro 3.7 (y Figura 3.3) en donde los valores negativos indican una contribución hacia resistencia, mientras que los valores positivos representan lo opuesto. Con base en los efectos de ACG, los mejores progenitores para generar híbridos con un alto nivel de resistencia al CEM son el P2 y P1, dónde los efectos de ACG fueron negativos y significativamente diferentes de cero, mientras que las líneas P12 y P11 tuvieron la mayor ACG positiva, siendo las líneas que contribuyeron hacia susceptibilidad.

Generalmente las líneas con mayor ACG produjeron los híbridos más resistentes, en contraparte Ulrich *et al.*, (1990), en el patosistema *Cercospora zea-maydis* determinaron que las líneas con mayor ACG no siempre producían los híbridos más resistentes, sugiriendo que la evaluación debería ser necesaria para diferenciar los distintos niveles de resistencia de las líneas que los componen. En la presente investigación, el comportamiento fenotípico de las líneas *per se* provee es suficiente para predecir su comportamiento en cruza considerando que la ACE sea significativa. Borges y Orángel, (1987) y Huff *et al.*, (1988) sugieren que bajo ésta situación la selección de nuevos progenitores para formar combinaciones híbridas puede ser principalmente basada en el comportamiento *per se* de las líneas, permitiendo evaluar otras características agronómicas deseables en los híbridos. Hung and Holland, (2012) también indican que la ACG es un buen indicador del comportamiento de líneas en combinaciones híbridas.

Cuadro 3.7. Aptitud combinatoria general calculada en el diseño dialélico para la resistencia al CEM.

Progenitor	ACG	Error			
		estandar	Valor de T	Probabilidad T	Rango
P1	-7.315**	1.063	-6.884	0.000	13

P2	-8.076**	1.063	-7.600	0.000	14
P3	-5.588**	1.063	-5.259	0.000	11
P4	-4.517**	1.063	-4.251	0.001	10
P5	-3.440**	1.063	-3.237	0.006	8
P6	-1.461	1.063	-1.375	0.192	7
P7	-4.176**	1.063	-3.930	0.002	9
P8	5.154**	1.063	4.850	0.000	5
P9	-5.996**	1.063	-5.643	0.000	12
P10	6.370**	1.063	5.995	0.000	3
P11	10.251**	1.063	9.647	0.000	2
P12	10.585**	1.063	9.961	0.000	1
P13	5.370**	1.063	5.054	0.000	4
P14	2.839*	1.063	2.672	0.019	6

*, ** Significativamente diferente de cero y con un valor de probabilidad de 0.05 y 0.01 respectivamente.

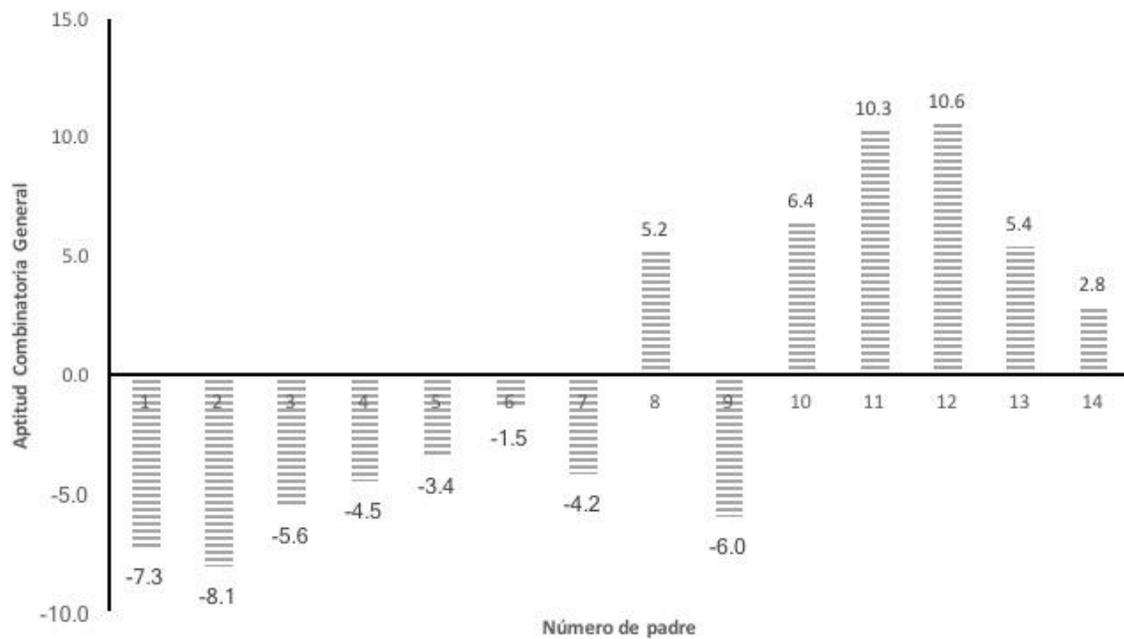


Figura 3.3. Aptitud combinatoria general de las 14 líneas que constituyeron el diseño dialélico para resistencia al CEM.

Adicionalmente, las líneas P8 y P13 tuvieron efectos de ACG positivos, contribuyendo con susceptibilidad al CEM. Sin embargo, tuvieron los menores efectos de ACG positiva (5.15 y 5.37, respectivamente y $\alpha = 0.01$) en comparación con el resto de las líneas susceptibles, pero el híbrido resultante de estas líneas resultó en un menor nivel de resistencia a la enfermedad (ACE -5.8), sugiriendo que ambas líneas presentan niveles acumulados de resistencia.

Las líneas P5 y P7 tuvieron valores de ACG negativos, contribuyendo con resistencia a la enfermedad. Sin embargo, tuvieron los menores efectos de ACG negativa (3.44 y 4.17, respectivamente y $\alpha = 0.01$) en comparación al resto de las líneas resistentes. El híbrido resultante de estas líneas fue más resistente que cada una de las líneas *per se*, sugiriendo que ambas líneas presentan niveles adecuados de resistencia, para ser incluidas en programas de mejoramiento para resistencia a la enfermedad.

Las líneas P2 y P1 tuvieron los mayores efectos negativos de ACG, comportándose inmunes al CEM, con una incidencia promedio de 12.3 en combinaciones híbridas con materiales susceptibles. El amplio rango de respuestas a la infección de *S. reilianum* indica que en la resistencia estén involucrados distintos genes que operan tanto aditiva como predominantemente; Vanderplank, (1984) señala que tanto la resistencia monogénica como poligénica pueden subsistir en una misma planta en proporciones variables. (Renfro 1984) plantea que en la planta de maíz la situación ideal sería la combinación de los dos sistemas operando en forma conjunta.

3.4.2.- Efectos de Aptitud Combinatoria Especifica

Debido a que la ACE también fue significativa, se concluye que los efectos de dominancia y/o epistasia fueron los más importantes en algunas cruzas específicas, por lo que algunos híbridos no reaccionaron como se esperaba de acuerdo con la ACG de sus progenitores. Indicando que las cruzas más resistentes no siempre procedieron de las líneas con mayor ACG, y en algunos casos padres con una buena ACG dieron origen a híbridos susceptibles. Los valores estimados de ACE para localidades combinadas se muestran en el Cuadro 3.8.

Dentro del grupo de cruzas RxS, los híbridos con mayor ACE positiva fueron los que involucran a la línea resistente P7 con las líneas P10, P12 y P14, lo que posiblemente indica que la composición genética de estas líneas contenga genes que interfieren con la expresión de los genes de resistencia del P7 ya que el valor fenotípico de estas cruzas fue estadísticamente igual al de híbridos provenientes de dos líneas susceptibles. El resto de las cruzas que involucran al P7 por un susceptible se mostraron resistentes.

Las cruzas con mayor ACE negativa resultaron más resistentes de lo esperado; no obstante, estas cruzas no fueron las más resistentes, por lo que la resistencia al CEM no se debe únicamente a los altos efectos de ACE, comprobando nuevamente que la ACG es la más importante.

En general, las cruzas RxR no generaron los híbridos más resistentes a la enfermedad y el híbrido más susceptible resultó de la cruce de las líneas resistentes P5xP6. Sin embargo, dado que la ACG de la línea P6 no fue significativa, es probable que este hecho obedezca a un error relacionado con la ACG. Los híbridos más resistentes a la enfermedad fueron producto de cruzas entre líneas RxS y SxS.

Finalmente, se debe considerar que la endogamia de las líneas con la que se realizó el presente trabajo (S_3) influyó de manera negativa en los resultados obtenidos, debido a que para este tipo de estudios es necesario trabajar con líneas con un mayor grado de endogamia.

Cuadro 3.8. Efectos de aptitud combinatoria específica estimados para los 91 híbridos resultantes del diseño dialélico del CEM.

Línea	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14
P1	15.12**	-3.34	-1.24	0.78	-2.23	-4.75	-14.08**	9.64	-6.93	25.46**	-16.44**	12.97**	-11.76**	
P2		-2.57	3.75	-2.19	4.96	-3.99	-1.18	0.60	-7.33	-18.41**	11.75**	-11.03**	10.70*	
P3			-3.13	-7.21	16.04**	-2.84	-9.17	0.85	5.18	-15.77**	9.66	-1.95	24.38**	
P4				13.89**	-0.26	11.49**	24.09**	-5.72	-13.56**	7.23	-19.87**	12.31**	-14.56**	
P5					58.20**	-8.62	-13.89**	4.33	17.06**	-23.05**	-16.72**	-18.17**	14.30**	
P6						-7.44	3.54	-8.78	-11.48**	-13.03**	-25.36**	21.19**	-8.72	
P7							-0.28	-6.07	11.20**	-3.55	34.92**	-17.43**	13.13**	
P8								4.00	-7.86	38.46**	-31.98**	-5.80	-13.90**	
P9									-14.15**	6.77	-10.96**	-15.61**	-13.08**	
P10										6.57	9.91	11.62**	0.85	
P11											-11.11**	31.47**	-13.96**	
P12												8.84	30.37**	
P13														-24.45**
P14														

*, ** Significativamente diferente de cero y con un valor de probabilidad de 0.05 y 0.01 respectivamente.

† Los valores de ACE negativos indican una tendencia hacia una resistencia mayor a la espera por la ACG de las líneas parentales que conforman al híbrido.

†† Los valores de ACE positivos indican una tendencia hacia una susceptibilidad mayor a la esperada por la ACG de las líneas parentales que conforman al híbrido.

3.5.- Heredabilidad

Para el carácter de resistencia genética al CEM, se determinó una heredabilidad en sentido estricto del 22%, lo que representa un valor moderado (Cuadro 3.9). La heredabilidad en sentido restringido (h^2) es la fracción de la variabilidad fenotípica que es transmisible a la descendencia (Molina-Galan, 1992), por lo tanto, la selección de un par de plantas como progenitores no sería suficiente para transmitir el carácter de resistencia a la siguiente generación (Fehr 1993). En este sentido, la selección recurrente puede ser útil para la selección de resistencia genética al CEM.

Cuadro 3.9. Componentes de varianza y heredabilidad en los dos sentidos calculada en el diseño dialélico para la resistencia al carbón de la espiga del maíz.

Componente	Componente	GCA-SCA	Varianza		
ACG	ACE	ratio	fenotípica	h^2	H^2
41.7757	233.2909	0.1791	375.2106	0.22	0.84

3.6.- Heterosis

La heterosis se refiere a la superioridad en el comportamiento de los híbridos respecto a los padres. Los valores de heterosis absoluta respecto al padre medio calculados para los 91 híbridos se muestran en el Cuadro 3.10. En él se muestra la tendencia observada en el análisis de los efectos de ACE, donde las cruzas RxR no generaron los híbridos más resistentes a la enfermedad, sino que estos fueron producto de cruzas entre líneas RxS y SxS.

Cuadro 3.10. Heterosis absoluta estimada para los 91 híbridos resultantes del diseño dialélico del CEM.

Línea	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	Total
P1	0.00	15.97	0.00	3.18	6.31	5.23	0.00	-20.28	-1.60	-5.84	30.52	-22.39	14.74	-12.63	0.94
P2		0.00	0.00	7.41	2.52	11.69	0.00	-8.16	-11.37	-7.02	-14.11	5.03	-9.98	9.11	-1.14
P3			0.00	2.98	0.00	25.22	3.61	-13.65	-8.65	8.01	-8.96	5.45	1.59	25.22	3.40
P4				0.00	22.17	10.00	19.02	20.67	-14.17	-9.68	15.09	-23.00	16.89	-12.63	4.03
P5					0.00	69.53	0.00	-16.22	-3.06	22.03	-14.11	-18.78	-12.50	17.29	4.42
P6						0.00	3.18	3.18	-14.17	-4.53	-2.12	-25.45	28.82	-3.74	-1.65
P7							0.00	-3.33	-14.17	15.40	4.66	32.13	-12.50	15.38	4.70
P8								0.00	-15.05	-14.59	35.72	-45.73	-11.81	-22.56	-10.57
P9									0.00	-25.90	-1.02	-29.77	-26.67	-26.79	-18.36
P10										0.00	11.12	3.41	12.88	-0.53	5.38
P11											0.00	-13.59	36.73	-11.36	2.94
P12												0.00	3.09	21.95	8.35
P13													0.00	-25.13	-12.56
P14														0.00	0.00
Media	0.00	7.99	0.00	3.39	6.20	20.28	3.69	-4.72	-9.14	-2.21	5.16	-11.06	3.18	-1.89	0.05

4.- Conclusiones

Debido a los valores de ACG y ACE de las líneas evaluadas, se recomienda un esquema de selección recurrente para la selección de resistencia al carbón de la espiga del maíz.

Las cruzas RR que generaron los híbridos más resistentes al CEM fueron aquellas que involucraron a las líneas P1, P2 y P7.

Las cruzas SS que formaron los híbridos más susceptibles al CEM fueron aquellas que involucraron a las líneas P10 y P12.

Las cruzas RS dieron origen a híbridos con un nivel intermedio de resistencia.

5.- Literatura citada

- Ali, A., and Baggett, J. R. 1990. Inheritance of resistance to head smut disease in corn. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 115:668–672.
- Anderson, S. J., Simmons, H. E., French-Monar, R. D., and Munkvold, G. P. 2016. Susceptibility of maize inbreds and incidence of symptomless infection by the head smut pathogen, *Sphacelotheca reiliana*. Plant Heal. Prog. 17:1–5.
- Aquino-Martínez, J. G., Sánchez-Flores, A., González-Huerta, A., and Sánchez-Pale, J. R. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. Rev. Mex. Fitopatol. 29:39–49.
- Borges, F., and Orángel, L. 1987. Diallel Analysis of Maize Resistance to Sorghum Downy Mildew. Crop Sci. 27:178–180 Available at: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700020006x>.
- Fehr, W. R. 1993. Principles of cultivar development. Theory and technique Vol. 1. Macmillian. Ames, Iowa. 536 p.
- Frederiksen, R. A. 1977. Head smuts of corn and sorghum. In: Proc. Annu. Corn Sorghum Res. Conf. 32nd., ed. American Seed Trade Association. Washington, D.C., p. 89–105.
- Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Aust. J. Biol. Sci. 9:463–493 Available at: <http://www.publish.csiro.au/paper/BI9560463>.

- Halseth, D. E., Pardee, W. D., and Viands, D. R. 1991. Inheritance of Resistance to *Helminthosporium carbonum* Race 3 in Maize. *Crop Sci.* 31:612–617 Available at: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100030012x>.
- Huff, C. A., Ayers, J. E., and Hill Jr, R. R. 1988. Inheritance of resistance in corn (*Zea mays*) to gray leaf spot. *Phytopathology* 78:790–794.
- Hung, H. Y., and Holland, J. B. 2012. Diallel analysis of resistance to Fusarium ear rot and fumonisin contamination in maize. *Crop Sci.* 52:2173–2181.
- Josephson, L. M., and Naidu, B. 1971. Reaction in diallel crosses of corn inbreds (*Zea mays* L.) to maize dwarf mosaic virus. *Crop Sci.* 11:664–667. Available at: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1971.0011183X001100050018x>.
- 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 reilianum*) in maize. *F. Crop. Res.* 106:148–155.
- Loesch, P. J., and Zuber, M. S. 1972. Inheritance of resistance to maize dwarf mosaic virus. *Crop Sci.* 12:350–352. Available at: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1972.0011183X001200030027x>.
- Lübberstedt, T., Xia, X. C., Tan, G., Liu, X., and Melchinger, A. E. 1999. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reilianum* in maize. *Theor. Appl. Genet.* 99:593–598.
- Martinez, C., Bu'ee, M., Jauneau, A., Bécard, G., Dargent, R., and Roux, C. 2001. Effects of a fraction from maize root exudates on haploid strains of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Plant Soil.* 236:145–153.
- Martinez, C., Jauneau, A., 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. *Biochem. Cell Biol.* 89(3): 247-253. Available at: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHYTO.1999.89.3.247>
- Martinez, C., 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.
- Matyac, C. A. and Kommedahl, T. 1985. Factors affecting the development of head smut

- caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology*. 75:577–581.
- Molina Galan, J. D. 1992. Introducción a la genética de poblaciones y cuantitativa. Primera Ed. Mexico, D.F.: AGT Editor, S.A. 349p.
- Pataký, J. K. 1999. Head smut. In: Compendium of corn diseases, ed. D. G. White. St. Paul, Minnesota. USA. APS Press. The American Phytopathology Society. p. 33.
- Potter, A. A. 1914. Head smut of sorghum and maize. *J. Agric. Res.* II:339–380.
- Renfro, B. L. 1984. Breeding methods and genetic control of disease resistance in tropical maize. *Rev. Trop. Plant Pathol.* 1:225–244.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS user's guide: Statistics. 1028 p.
- Stromberg, E. L., Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Matyac, C. A., Windels, C. E., and Geadelmann, J. L. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. *Plant Dis.* 69:880–884.
- Ulrich, J. F., Hawk, J. A., and Carroll, R. B. 1990. Diallel analysis of maize inbreds for resistance to gray leaf spot. *Crop Sci.* 30:1198–1200 Available at: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000060007x>.
- Vanderplank, J. E. 1984. Disease resistance in plants. 2nd Ed. Orlando, Florida. USA.: Academic Press. 194 p.
- Wang, M., Yan, J., Zhao, J., Song, W., Zhang, X., Xiao, Y. and Zheng, Y. 2012. Genome-wide association study (GWAS) of resistance to head smut in maize. *Plant Sci.* 196:125–131.
- Wang, Z. H., Li, X. H., Xie, C. X., Li, M. S., Hao, Z. F., George, M. L. C., *et al.* 2008. Genetic diversity in a collection of Chinese maize inbred lines for resistance to head smut caused by *Sporisorium reiliana*. *Maydica*. 53:47–54.
- Whyte, I. V., and Gevers, H. O. 1987. Diallel analysis of resistance of eight maize inbred lines to *Sphacelotheca reiliana*. *Phytopathology*. 78:65–68.

CAPITULO IV

RESPUESTA DE GERMOPLASMA NATIVO DE MAÍZ A LA INFECCIÓN POR *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*

Resumen

Se evaluó la respuesta de maíces nativos a la infección por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, agente causal del carbón de la espiga del maíz, mediante inoculación artificial. Semillas de 55 poblaciones de maíces nativos provenientes de los estados de Guerrero, México, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala se inocularon artificialmente usando una solución acuosa de grenetina 10% y se impregnaron con teliosporas. Como testigo se usó semilla inoculada del híbrido AZ 41801®. La semilla inoculada se sembró en un vivero experimental en Mixquiahuala, Hgo., en los ciclos 2015 y 2016. La incidencia de la enfermedad se evaluó 45 días después de iniciada la floración, con la observación directa de signos y síntomas en las inflorescencias masculina y femenina. En 2015, la inoculación de los materiales nativos resultó en un porcentaje máximo de plantas infectadas del 28.8%, mientras que en 2016 fue de 22.2%. Considerando la procedencia geográfica de las poblaciones, los maíces del estado de México presentaron un menor porcentaje de plantas infectadas en ambos ciclos, lo que puede indicar la presencia de genes de resistencia a la enfermedad. El híbrido AZ 41801® inoculado alcanzó 70.7% de plantas enfermas.

Palabras clave: *Zea mays*, maíz nativo, carbón de la espiga, inoculación artificial con teliosporas.

Abstract

The response of native maize to infection by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, causal agent of the head smut, was evaluated by artificial inoculation. Seeds from 55 populations of native maize from the states of Guerrero, Mexico, Oaxaca, Puebla and Tlaxcala were artificially inoculated using an aqueous solution of 10% grenetin and impregnated with teliospores. As a control, inoculated seed of hybrid AZ 41801 was used. The inoculated seed was planted in an experimental nursery in Mixquiahuala, Hgo., in the 2015 and 2016

cycles. The incidence of the disease was evaluated 45 days after the beginning of flowering, with the direct observation of signs and symptoms in the male and female inflorescences. In 2015, the inoculation of native materials resulted in a maximum percentage of infected plants of 28.8%, while in 2016 it was 22.2%. Considering the geographical origin of the populations, the maize of the state of Mexico presented a lower percentage of infected plants in both cycles, which may indicate the presence of genes of resistance to the disease. The AZ 41801 hybrid inoculated reached 70.7% of diseased plants.

Key Words: *Zea mays*, native maize, head smut, artificial inoculation with teliospores.

1.- Introducción

El cultivo de maíz ocupa el primer lugar de área cultivada en México, principalmente bajo condiciones de temporal representando el 80% de la superficie cultivada, con rendimiento promedio de 2.22 t/ha condicionados por factores bióticos y abióticos desfavorables. Sin embargo, las áreas de temporal aportan el 49.52% de la producción nacional de maíz, que en el año 2015 ascendió a 23,637,630 (SIAP, 2015).

Las poblaciones nativas de maíz son importantes ya que permiten la subsistencia de los pequeños productores, constituyen la base genética de las semillas mejoradas y presentan adaptación al ambiente de su origen como resultado de la evolución bajo domesticación y de la aplicación del conocimiento de los agricultores (Hernández, 1985). Actualmente, más del 80% de la superficie cultivada de maíz se siembra con materiales nativos que los productores han conservado por generaciones. Así, la mayor diversidad genética de maíz se encuentra en manos de agricultores, misma que hasta el momento ha sido explotada en forma limitada programas de mejoramiento genético (Castillo *et al.*, 2000).

Dentro de los factores bióticos que limita la producción del maíz, las enfermedades son el principal problema. Entre ellas destacan, la pudrición de mazorcas y tallos causada por diferentes especies de *Fusarium* (White, 2004), entre las enfermedades foliares sobresalen los tizones foliares ocasionados por *Exserohilum turcicum* y/o *Bipolaris maydis*, royas causadas por *Puccinia sorghi* o *Puccinia polysora*, el complejo de la mancha de asfalto

(*Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Conothyrium phyllachorae*), la mancha foliar causada por *Cercospora zea-maydis*, el mildiu inducido por *Peronosclerospora sorghi* (De León, 2008). En mazorca y espiga, la principal enfermedad es el carbón causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, (Kühn) Langdon & Fullerton (Basidiomycota, Ustilaginaceae) llegando a reportarse incidencias de hasta el 80% (Frederiksen, 1977), con reducciones en el rendimiento superiores al 30% (Matyac y Kommendahl, 1985).

Las pérdidas en rendimiento ocasionadas por el carbón de la espiga del maíz se deben a que el hongo reemplaza total o parcialmente las mazorcas y panojas del maíz con soros negros llenos de teliosporas. Actualmente, la enfermedad está ampliamente distribuida en las zonas productoras de maíz con clima subtropical del mundo (Martinez *et al.*, 2002). La disminución en rendimiento de grano depende de las prácticas de manejo como la fertilización y la humedad en el suelo durante las primeras etapas de desarrollo del cultivo (Matyac y Kommendahl, 1985), así como la susceptibilidad genética de los materiales cultivados, en los cuales se presenta achaparramiento y filodias en las inflorescencias (Stromberg *et al.*, 1984).

Hasta el momento no hay estudios sobre la exploración de posibles fuentes de resistencia a la enfermedad en poblaciones de maíces nativos. La presente investigación tiene como objetivo determinar la respuesta de germoplasma nativo de maíz de los estados de Guerrero, México, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae*, con el propósito de identificar posibles fuentes de resistencia genética a la enfermedad que puedan ser incluidas en programas de mejoramiento genético.

2.- Materiales y Métodos

2.1.- Germoplasma de maíces nativos

Se evaluaron 55 poblaciones de maíces nativos (Briones-Reyes *et al.*, 2015) de 19 localidades ubicadas entre los 1498 y 2520 m de altitud, en cinco estados: 13 de la región de Montaña de Guerrero, 11 del Sureste del Edo. México, 13 de la Mixteca Alta de Oaxaca, 6 de Puebla y 12 de Tlaxcala. Dependiendo del color del endospermo/pericarpio, las poblaciones se clasificaron en 22 blancos cristalinos (BC), 11 azules (A), 6 amarillos (Am),

4 cremas (C), 6 blancos anchos harinosos (BA) y 6 rojos (R) (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Origen geográfico de las 55 poblaciones de maíz nativo

Estados	Procedencia geográfica Municipios	Rango de Altitud (msnm)	Color endospermo/pericarpio *						Total
			Am	A	BC	BA	C	R	
Tlaxcala	Ixtacuixtla, Españita, Nanacamilpa, Totolac	2220- 2720	1	3	7	0	1	0	12
Guerrero	Chilapa, Cualác, Tixtla, Zitlala.	1498- 2222	1	3	2	4	0	3	13
Puebla	Xochitlán y Libres.	1610- 2400	2	1	3	0	0	0	6
Oaxaca	Huamelulpan, Tayata, Peñasco, Ticuá, Tataltepec.	2144- 2290	2	3	5	0	0	3	13
México	Ayapango, Chalco, Tepetlixpa, Texcoco.	2249- 2450	0	1	5	2	3	0	11
Total			6	11	22	6	4	6	55

* BC: Blanco Cristalino; A: Azul; Am: Amarillo; C: Crema; BA: Blanco Ancho; R: Rojo.

2.2.- Inóculo

Como inóculo de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* se utilizaron teliosporas colectadas en 2014 en un lote de maíz del híbrido Cardenal (Asgrow®) en el municipio de Tenango del Valle, Méx. Las teliosporas se retiraron de los soros, se pasaron por un tamiz de 117 micras (Mont Inox®), se almacenaron en envases de plástico con CaCl₂ (J. T. Baker y Macron Fine Chemicals® 94%), y se conservaron a 20 ± 2 °C. La viabilidad del inóculo se verificó previo a la inoculación de la semilla siguiendo lo descrito por Quezada-Salinas *et al.*, (2013).

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

Se inocularon 66 semillas de cada población, usando como adherente una solución acuosa de grenetina 10%. Las semillas se incorporaron a la solución por 1 min, se recuperaron y se cubrieron con teliosporas en una caja de Petri. Las semillas inoculadas se secaron por 24 hrs a 22 °C. Como testigo se usaron semillas de maíz del híbrido AZ 41801®.

2.4.- Siembra

La infección de las poblaciones a *S. reilianum* f. sp. *zeae* se evaluó sembrándolas en un lote en el Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hgo. (20°11'24.6"N 99°14'35.2"W), en los ciclos 2015 y 2016. La semilla inoculada de cada población se sembró en un surco de 3 m de largo y 0.80 entre surcos, a una profundidad de 5 cm, con separación de 16 cm entre semillas, con tres repeticiones, usando un diseño en bloques completos al azar. Después de la siembra, el terreno se regó por inundación y se evitó el riego constante con el propósito de incrementar el porcentaje de infección (Matyac y Kommedahl, 1985).

En 2015, los valores promedio de temperatura de marzo a septiembre fue de 17.7 °C, con una precipitación de 67.5mm, y humedad relativa de 72.6%. En 2016, el mismo período, los valores promedio de temperatura fue de 16.8°C, precipitación de 101.2mm y humedad relativa de 74.8%.

2.5.- Evaluación

La incidencia de la infección de cada una de las poblaciones se registró 45 días después del inicio de la floración. Se consideró como planta enferma aquella que presentó síntomas en la panoja, en la mazorca o ambas.

2.6.- Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron agrupando las poblaciones según el porcentaje de incidencia de la infección dentro de los siguientes rangos: 0.0-5.0%, 5.1-10.0%, 10.1-15.0%, 15.1-20.0%, 20.1% -25.0% y 25.1% a más. Los datos se analizaron estadísticamente, pero debido a que un porcentaje importante de los genotipos evaluados no presentaron la enfermedad con valores de infección cero en las tres repeticiones, estos no se incluyeron en el análisis de datos, al no presentar diferencias significativas.

Para corregir lo anterior, se probaron alternativas de transformación de datos incluyendo logarítmica y arco seno de la raíz cuadrada. Así mismo, se probó el modelo lineal generalizado con la distribución Poisson y función de enlace logaritmo, pero aun aplicando estos métodos no se obtuvieron diferencias significativas. Por tanto, se decidió eliminar los

genotipos que presentaban un valor de cero en sus tres repeticiones. La información remanente se analizó usando el modelo lineal generalizado con $\text{Dist} = \text{Poisson}$ y $\text{Link} = \text{Logaritmo}$ y la comparación múltiple de medias mediante el método de la diferencia significativa honesta de Tukey a un nivel de significancia del 5%, usando del software estadístico SAS® Systems for Windows V 9.4. (SAS Institute Inc. 1999).

3.- Resultados y discusión

En 2015, la severidad promedio de la enfermedad en los 55 materiales fluctuó entre 0 y 28.79%. De las 55 poblaciones de maíces nativos, 32.7% presentaron incidencias de 0%, 16.4% incidencias entre 0.1 y 5%, 23.6% incidencias entre 5.1 y 10.0%, 10.9% incidencias entre 10.1 y 15.0%, y el resto incidencias > 15% (Figura 4.1).

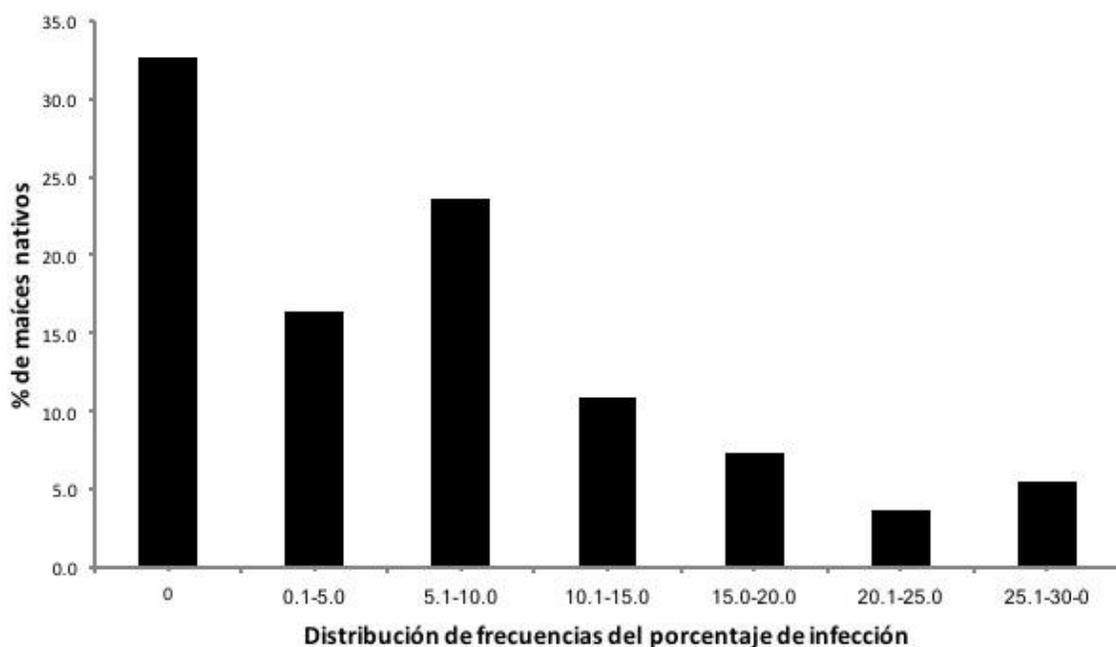


Figura 4.1. Porcentaje de poblaciones de maíces nativos con carbón de la espiga en 2015.

En el Cuadro 4.2 pueden observarse la respuesta de las poblaciones de maíces nativos evaluados en el ciclo 2015, divididas por estado en donde se muestra que las poblaciones menos afectadas son las nativas del Estado de México.

Cuadro 4.2. Porcentaje de poblaciones de maíz nativo por estado afectadas con carbón de la espiga en 2015.

Estado	% de infección						
	0	0.1-5.0	5.1-10.0	10.1-15.0	15.1-20.0	20.1-25.0	25.1-30.0
Tlaxcala	45.5	9.1	36.4	18.2	0	0	0
Guerrero	16.7	16.7	16.7	8.3	25	8.3	16.7
Puebla	33.3	16.7	16.7	16.7	16.7	0	0
Oaxaca	7.7	30.8	30.8	15.4	0	7.7	7.7
México	72.7	9.1	18.2	0	0	0	0

En 2016, la severidad promedio de la enfermedad en los 55 materiales, fluctuó entre 0 y 22.2%. De las 55 poblaciones de maíces nativos, 63.6% presentaron incidencias de 0%, 20% incidencias entre 0.1 y 5%, 10.9% incidencias entre 5.1 y 10.0%, 1.8% incidencias entre 10.1 y 15.0% y el resto incidencias > 15% (Figura 4.2).

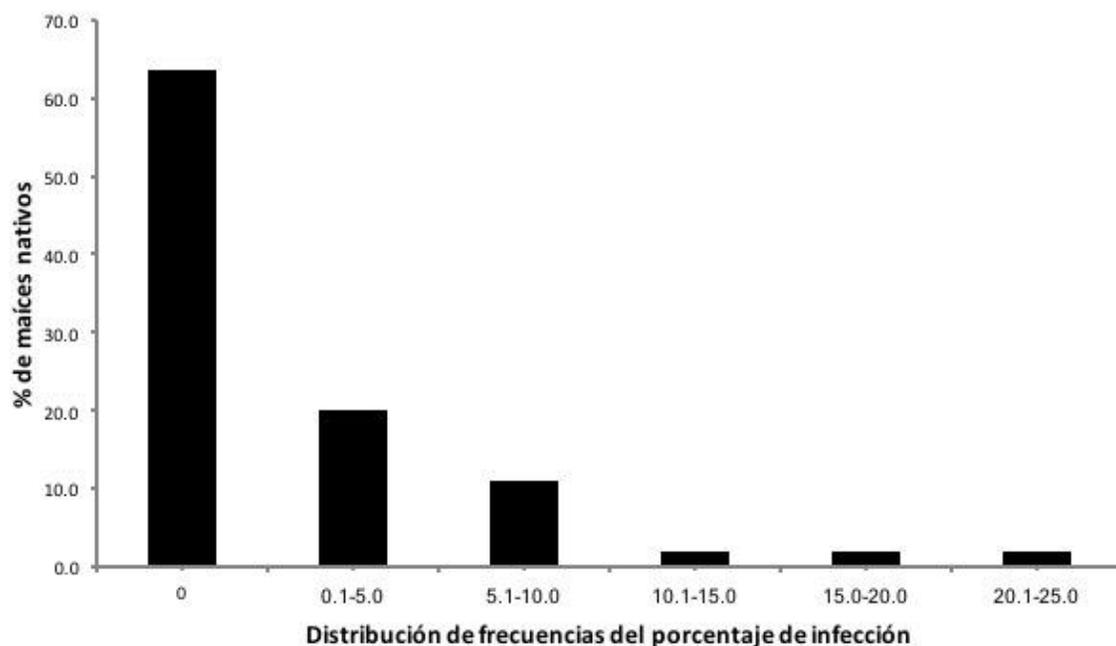


Figura 4.2. Porcentaje de poblaciones de maíces nativos con carbón de la espiga en 2016.

En el Cuadro 4.3 se presenta la respuesta de las poblaciones de maíces nativos evaluados en el ciclo 2016, divididas por estado en donde también se muestra que las poblaciones menos

afectadas son las originarias del Estado de México.

Cuadro 4.3. Porcentaje de poblaciones de maíz nativo por estado afectadas con carbón de la espiga en 2016.

Estado	% de infección						
	0	0.1-5.0	5.1-10.0	10.1-15.0	15.1-20.0	20.1-25.0	25.1-30.0
Tlaxcala	66.7	33.3	0	0	0	0	0
Guerrero	23.1	30.8	23.1	7.7	7.7	7.7	0
Puebla	50	16.7	16.7	16.7	0	0	0
Oaxaca	69.2	15.4	15.4	0	0	0	0
México	0	0	0	0	0	0	0

Aunque en las evaluaciones realizadas en los ciclos 2015 y 2016 la fuente de inóculo fue la misma y el porcentaje de germinación de la teliosporas fue de 45.3 y 44.1%, después de 24 h respectivamente. Sin embargo, en 2016 el promedio de lluvias fue mayor, por lo que la incidencia de la enfermedad fue menor, debido a que el hongo se ve afectado en su capacidad de infectar en presencia de alta humedad en el suelo durante las primeras etapas de desarrollo del cultivo (Matyac y Kommedahl 1985).

En el Cuadro 4.4, se muestra la separación de medias con el método de Tukey de las 37 poblaciones de maíces nativos evaluados en 2015, en los cuales se presentó el carbón de la espiga en al menos una de las repeticiones.

Cuadro 4.4. Separación de medias Tukey de los genotipos de maíces nativos evaluados en 2015.

Genotipo	Procedencia	Media	Agrupamiento
Testigo		70.70	a
21	Tixtla, Gro.	28.39	b
30	Santa Catarina Ticua, Oax.	26.03	bc
19	Zitlala, Gro.	26.00	bc
20	Cualac, Gro.	23.28	bcd

27	La Magdalena Peñasco, Oax.	22.56	bcd
25	Tixtla, Gro.	18.96	cde
23	Chilapa, Gro.	17.74	ed
22	Tixtla, Gro.	17.16	ed
36	Libres, Pue.	16.35	def
24	Zitlala, Gro.	13.94	efg
5	Totolac, Tlax.	13.15	efgh
26	Huamelulpan, Oax.	12.78	efgh
1	Cualac, Gro.	11.95	efghi
40	Españita, Tlax.	10.96	fghij
50	Xochitlan, Pue.	10.69	fghijk
31	Santa Catarina Ticua, Oax.	10.04	ghijk
39	Españita, Tlax.	9.45	ghijkl
29	Santa Catarina Ticua, Oax.	9.23	ghijkl
8	Tepetlixpa, Mex.	8.98	ghijklm
32	Huamelulpan, Oax.	8.21	hijklm
34	Huamelulpan, Oax.	7.30	ijklmn
48	Españita, Tlax.	7.01	ijklmno
51	Montecillo, Mex.	7.01	ijklmno
12	Ixtacuixtla, Tlax.	6.57	ijklmnop
49	Xochitlan, Pue.	6.16	jklmnop
28	Santa Catarina Ticua, Oax.	5.97	klmnop
2	Ixtacuixtla, Tlax.	5.97	klmnop
54	Tixtla, Gro.	5.05	lmnopq
53	Ayapango, Mex.	4.69	mnopq
10	Tayata, Oax.	4.69	mnopq
6	Cualac, Gro.	4.05	nopq
37	Nanacamilpa, Tlax.	3.65	nopq
35	La Magdalena Peñasco, Oax.	3.28	opq
38	Libres, Pue.	2.98	pq
17	Huamelulpan, Oax.	2.34	q
7	Cualac, Gro.	2.34	q
9	Tataltepec Oax.	2.05	q

El Cuadro 4.4, muestra la separación de medias con el método Tukey, que permite comparar valores entre las poblaciones de maíces nativos que presentaron la enfermedad, desatacándose la población 30 proveniente de Tixtla, Gro. colectada a 1593 msnm que presentó la media de incidencia más alta (28.39%) y la población 9 proveniente de Tataltepec, Oax. colectada a 1600 msnm y que presentó la media más de incidencia menor (2.05%).

Cuadro 4.5. Número de poblaciones evaluadas y afectadas de maíces nativos por estado evaluados en 2015.

Estado	Total poblaciones evaluadas	Poblaciones afectadas
Oaxaca	13	12
Guerrero	13	11
Tlaxcala	12	7
Puebla	6	4
México	11	3
Total	55	37

El Cuadro 4.5, muestra que las poblaciones de maíces nativos menos afectados fueron los provenientes del Estado de México, seguidas por las poblaciones provenientes de los estados de Puebla y Tlaxcala, de los que se puede inferir presentan genes de resistencia a la enfermedad mismos que pueden ser explotados dentro de un programa de mejoramiento.

En el Cuadro 4.6, se muestra la separación de medias con el método de Tukey de las 21 poblaciones de maíces nativos evaluados en 2016, en los cuales se presentó el carbón de la espiga en al menos una de las repeticiones.

Cuadro 4.6. Separación de medias Tukey de los genotipos maíces nativos evaluados en 2016.

Genotipo	Procedencia	Media	Agrupamiento
Testigo		42.30	A
23	Chilapa, Gro.	22.10	B

19	Zitlala, Gro.	19.60	B
24	Zitlala, Gro.	11.88	C
16	Libres, Pue.	11.04	CD
10	Tayata, Gro.	8.84	CDE
20	Cualác, Gro.	8.28	CDEF
6	Cualác, Gro.	6.69	DEFG
50	Xochitlan, Pue.	6.21	DEFGH
54	Tixtla, Gro.	5.85	EFGHI
9	Tataltepec, Oax.	5.05	EFGHIJ
28	Santa Catarina Ticua, Oax.	4.41	FGHIJK
18	Tixtla, Gro.	3.68	GHIJK
2	Ixtacuixtla, Tlax.	3.49	GHIJK
55	Tixtla, Gro.	3.01	GHIJK
13	Ixtacuixtla, Tlax.	2.76	HIJK
11	Ixtacuixtla, Tlax.	2.54	IJK
17	Huamelulpan, Oax.	2.45	IJK
48	Españita, Tlax.	2.36	KJ
36	Libres, Pue.	2,21	KJ
25	Tixtla, Gro.	2.07	KJ
7	Cualác, Gro.	1.74	K

En Cuadro 4.6, presenta la separación de medias con el método Tukey, que permite comparar valores entre las poblaciones de maíces nativos que presentaron la enfermedad, desatacándose la población 23 proveniente de Chilapa, Gro. que se colectó a 1523 msnm que presentó la media de incidencia más alta (22.1%) y la población 7 proveniente de Cualác, Gro. que se colecto a 2222 msnm y que presentó la media más baja (1.74%).

El análisis estadístico no mostró una correlación entre el porcentaje de infección y la altitud de colecta de las poblaciones de maíces nativos. Sin embargo, se recomienda ampliar el número de poblaciones de maíces nativos evaluados para determinar si existe o no una relación entre estos dos parámetros.

Cuadro 4.7. Número de poblaciones evaluadas y afectadas de maíces nativos por estado evaluados en 2016.

Estado	Total de poblaciones evaluadas	Poblaciones afectadas
Oaxaca	13	3
Guerrero	13	11
Tlaxcala	12	4
Puebla	6	3
México	11	0
Total	55	21

El Cuadro 4.7 muestra que las poblaciones de maíces nativos menos afectados fueron los provenientes del Estado de México, seguidas por las poblaciones provenientes de los estados de Puebla, Tlaxcala y Oaxaca, de lo que se puede inferir presentan genes de resistencia a la enfermedad que pueden ser explotados dentro de un programa de mejoramiento.

Aunque hubo variación entre los porcentajes de infección observados en las dos evaluaciones, producto de un mayor porcentaje de humedad en el suelo (Matyac y Kommedahl, 1985), se reflejó de manera directa en los porcentajes de infección del híbrido usado como testigo, que presentó un 70.7% de plantas infectadas en 2015 y 42.3 en 2016, manteniéndose la tendencia de que las poblaciones de maíces nativos provenientes del Estado de México fueron los menos afectados por el patógeno, lo que puede observarse en la Figura 4.3, con una disminución en el número de poblaciones de maíces nativos afectados de un año a otro. Esto, con excepción de las poblaciones provenientes del Estado de Guerrero, donde la proporción de poblaciones afectadas se mantuvo en ambas evaluaciones.

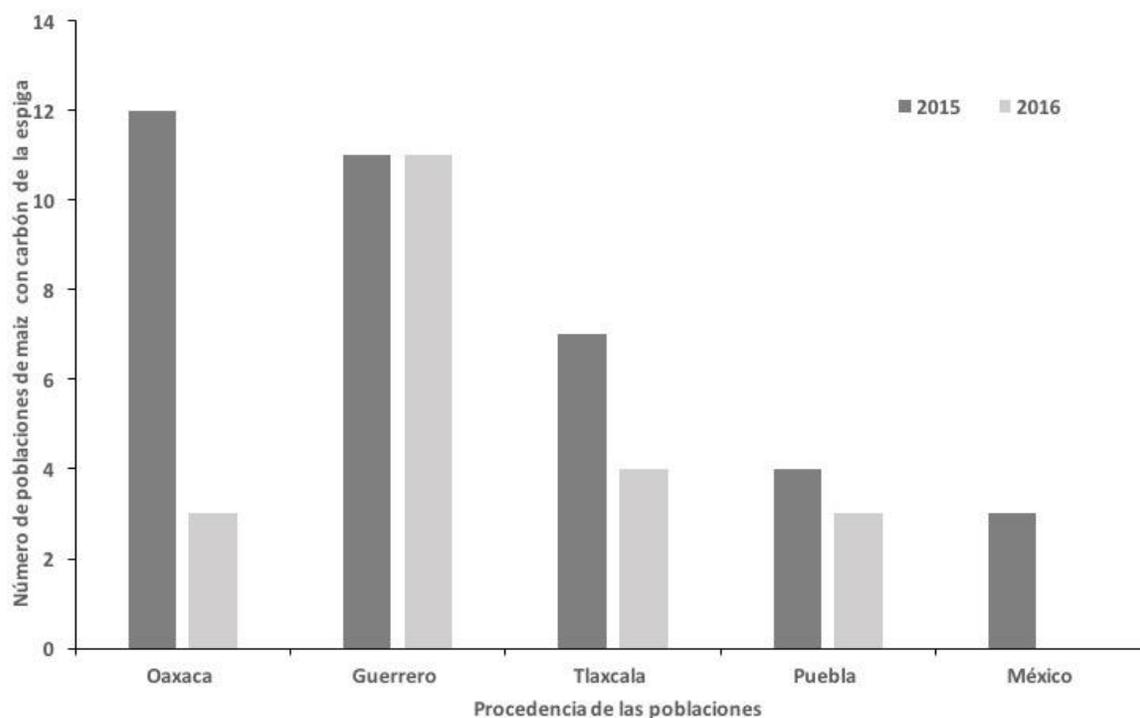


Figura 4.3. Número de poblaciones de maíces nativos con carbón de la espiga evaluados en los ciclos 2015 y 2016.

A la fecha, se carece de reportes del comportamiento de poblaciones de maíces nativos al carbón de la espiga, por lo que, la información aquí presentada es un indicio sobre la respuesta de materiales nativos ante el patógeno.

Los materiales chalqueños provenientes del Estado de México, resultaron más resistentes a la enfermedad, aun cuando se cree se han cultivado en zonas libres del patógeno y que por lo tanto no han coevolucionado en presencia del patógeno. Por lo anterior, se recomienda hacer más evaluaciones con un mayor número de poblaciones a fin de verificar la presencia de resistencia en esos materiales y usarlos como fuentes de resistencia genética a la enfermedad. De igual forma, se sugiere verificar la presencia/ausencia del patógeno en suelo proveniente de diferentes localidades del Estado de México y determinar el tipo de resistencia presente en los maíces nativos.

4.- Conclusiones

Las poblaciones de maíces nativos provenientes del Estado de México pueden usarse como fuente de resistencia a la enfermedad.

Los materiales del Estado de Guerrero no son aptos para la selección de resistencia al carbón de la espiga del maíz.

5.- Literatura citada

Briones-Reyes, D., Castillo-González, F., Chávez-Servia, J.L., Aguilar-Rincón, V.H., De León García-De Alba, C., Ramírez-Hernández, A. 2015. Respuesta del maíz nativo del altiplano mexicano a pudrición de mazorca, bajo infección natural. *Agron. Mesoam.* 26(1):73–85.

Castillo, F., Herrera, E., Romero, J., Ortega, R., Goodman, M., y Smith, M. 2000. Diversidad genética del maíz y su aprovechamiento in situ a nivel regional. En: CIAT, editor, *Fitomejoramiento Participativo en América Latina y el Caribe*. Mem. Simp. Internacional. Quito, Ecuador. Ago 31-Sep. 3. 1999. CIAT – Programa PRGA del CGIAR. Cali, Colombia. 7 p.

De León, C. 2008. Enfermedades importantes. En: *El cultivo del maíz. Temas selectos*. 2008. Vol. 1. Rodríguez-Montessoro, R. y De León, C. Eds. 127 p.

Frederiksen, R. A. 1977. Head smuts of corn and sorghum. *Proc. Annu. Corn Sorghum Res. Conf.* 32nd. 89–105p.

Hernández, X. E. 1985. *Biología agrícola. Los conocimientos biológicos y su aplicación a la agricultura*. CECSA. México DF. 59 p.

Matyac, C.A. and Kommendahl, T. 1985. Factors affecting the developmental of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology* 75:577–581.

- Martinez, C., Roux, C., Jauneau, A. and Dargent, R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f.sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94 (3): 505–514.
- Quezada-Salinas, A., De León García-De Alba, C., Hernández-Anguiano, A. M. y Navadía, C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. *Rev. Mex. Fitopatol.* 31(2):80–90.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS user's guide: Statistics. 1028 p.
- SIAP. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por estado. [http:// www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx) (Consultado 27 junio 2017).
- Stromberg, E. L., Stienstra, W. C., Kommedahl, T., Matyac, C. A., Windels, C. E. and Gealdelmann, J. L. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. *Plant Dis.* 68:880–884.
- White, D. G. 2004. Plagas y enfermedades del maíz. Ediciones Mundi Prensa. México. 77 p.

CONCLUSIONES GENERALES

La inoculación con grenetina demostró ser un método efectivo para la selección de germoplasma, ya que permite diferenciar claramente entre germoplasma resistente y susceptible bajo condiciones de campo.

Debido a los valores de ACG y ACE calculados de las líneas evaluadas, se recomienda un esquema de selección recurrente para la selección de resistencia al carbón de la espiga del maíz.

Las poblaciones de maíces nativos provenientes del Estado de México pueden usarse como fuente de resistencia a la enfermedad, mientras que los materiales del Estado de Guerrero no son aptos para la selección de resistencia al carbón de la espiga del maíz.