



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y  
PRODUCTIVIDAD**

**GENÉTICA**

## **RENDIMIENTO DE GRANO Y RESISTENCIA A TIZÓN FOLIAR (*Exserohilum turcicum*) EN HÍBRIDOS COMERCIALES FÉRTILES Y ANDROESTÉRILES DE MAÍZ**

**BENJAMÍN MARTÍNEZ NÚÑEZ**

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

**MAESTRO 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 Benjamín Martínez Núñez, 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. J. Jesús García Zavala, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Rendimiento de grano y resistencia a tizón foliar (Exserohilum turcicum) en híbridos comerciales fértiles y androestériles de maíz

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 06 de noviembre de 2017

  
Firma del  
Alumno (a)

  
Dr. J. Jesús García Zavala  
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: RENDIMIENTO DE GRANO Y RESISTENCIA A TIZÓN FOLIAR (*Exserohilum turcicum*) EN HÍBRIDOS COMERCIALES FÉRTILES Y ANDROESTÉRILES DE MAÍZ realizada por el (la) alumno (a): BENJAMÍN MARTÍNEZ NÚÑEZ bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

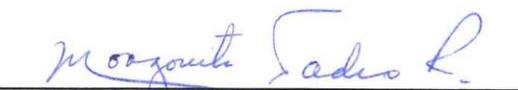
MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

  
DR. J. JESÚS GARCÍA ZAVALA

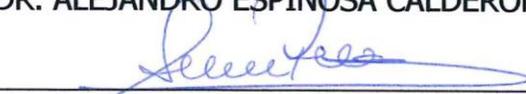
ASESORA

  
DRA. MARGARITA TADEO ROBLEDO

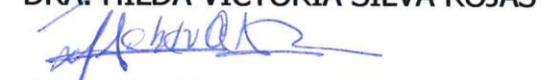
ASESOR

  
DR. ALEJANDRO ESPINOSA CALDERÓN

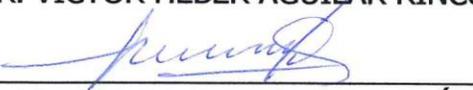
ASESORA

  
DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR

  
DR. VICTOR HEBER AGUILAR RINCÓN

ASESOR

  
DR. SALVADOR MIRANDA COLÍN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre 2017

**RENDIMIENTO DE GRANO Y RESISTENCIA A TIZÓN FOLIAR (*Exserohilum turcicum*) DE HÍBRIDOS COMERCIALES FÉRTILES Y ANDROESTÉRILES DE MAÍZ**

**Benjamín Martínez Núñez, M en C.**

**Colegio de Postgraduados, 2017**

**RESUMEN**

En México, muchos productores de maíz (*Zea mays* L.) enfrentan la problemática de tener que comprar semilla cara de los híbridos que cultivan. Una alternativa para abaratarles esta semilla es emplear la androesterilidad en la formación de los híbridos; sin embargo, esta característica está asociada con problemas fitosanitarios como el tizón foliar (*Exserohilum turcicum*), el cual es un patógeno que se presenta en México y cuya distribución es preocupante, siendo necesario contar con materiales resistentes a esta enfermedad y de buen rendimiento de grano. En este trabajo se evaluó el rendimiento y la resistencia a tizón norteño de cinco híbridos experimentales de maíz en su versión fértil y androestéril, y se compararon con cinco híbridos de fertilidad normal de amplio uso en la región de estudio, y con cinco híbridos androestériles ya liberados para uso comercial, dicha investigación se llevó a cabo en el ciclo agrícola Primavera-Verano 2016, en Cuautitlán y Texcoco, ambas localidades del Estado de México, en los Valles Altos del Centro de México. El rendimiento medio de grano (8.0 t ha<sup>-1</sup>) mostró que la expresión fenotípica de los híbridos fue sobresaliente, siendo los materiales comerciales Cimarrón, Aspros 823, P3368W y Tsiri Puma los que destacaron por su productividad de grano, al igual que el material experimental H3 en su versión fértil, aunque este último, presentó contrastes en la resistencia a tizón norteño. Los resultados mostraron que el mayor rendimiento de grano se produjo en las versiones de los híbridos de fertilidad normal, y que la resistencia a tizón foliar no dependió de la androesterilidad, dado que tanto genotipos androestériles y fértiles presentaron niveles similares de resistencia.

**Palabras clave:** *Zea mays*, *Exserohilum turcicum*, androesterilidad, rendimiento, resistencia.

**GRAIN YIELD AND RESISTANCE TO FOLIAR TISSUE (*Exserohilum turcicum*) IN  
COMMERCIAL AND ANDROTERILE HYBRIDS OF MAIZE**

**Benjamín Martínez Núñez, M. Sc.**

**Colegio de Postgraduados, 2017**

**ABSTRACT**

In Mexico, corn producers (*Zea mays* L.) face the problem of having to buy expensive seeds from the hybrids they grow. An alternative to cheapen this seed is to use male sterility in the formation of hybrids; however, this characteristic is associated with phytosanitary problems such as leaf blight (*Exserohilum turcicum*), which is a pathogen that occurs in Mexico and whose distribution is worrying, being necessary to have materials resistant to this disease and good grain yield. In this work, the yield and resistance to northern blight of five experimental maize hybrids in its fertile and masculine sterile version were evaluated and compared with five hybrids of normal fertility and with five hybrids male sterility and released for commercial use, this research was carried out in the Spring-Summer 2016 agricultural cycle, in Cuautitlan and Texcoco, both locations in the State of Mexico. The average yield of grain (8.0 t ha<sup>-1</sup>) showed that the phenotypic expression of the hybrids was outstanding, being the commercial materials Cimarron, Aspros 823, P3368W and Tsiri Puma those that stood out for their grain productivity, as the experimental material H3 in its fertile version, although the latter, presented contrasts in resistance to northern blight. The results showed that the highest grain yield was produced in the versions of the normal fertility hybrids, and that the resistance to leaf blight does not depend on the male sterility, since both sterile and fertile genotypes showed similar levels.

**Key words:** *Zea mays*, *Exserohilum turcicum*, male sterility, yield, resistance.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado que me permitió llevar a cabo mis estudios de Maestría en el Colegio de Postgraduados en el periodo 2015-2017.

Al Colegio de Postgraduados, por brindarme la oportunidad de superarme académicamente y albergarme durante dos años, en los cuales pude llevar a cabo mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC, UNAM), por las instalaciones del Campus 4 y Laboratorio de Semillas, que me permitieron desarrollar las evaluaciones experimentales de esta investigación.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IT201215), de la UNAM, por el financiamiento para la realización de los trabajos experimentales en conjunto con personal académico, investigadores y estudiantes.

Al Campo Experimental Valle de México, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CEVAMEX, INIFAP), por las instalaciones prestadas del campo por el Programa de Producción de Semillas, donde también se llevó a cabo parte de esta investigación.

A mi consejero y director de tesis Dr. J. Jesús García Zavala, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo, por sus enseñanzas y consejos. Por servirme de guía durante mi estancia en el colegio, gracias por su confianza.

A mi codirectora de tesis Dra. Margarita Tadeo Robledo, gracias por aceptarme nuevamente en este proyecto, por su apoyo incondicional desde la licenciatura, por permitirme continuar trabajando con usted a pesar de mis detalles.

A mi asesor Dr. Alejandro Espinosa Calderón, gracias por su apoyo invaluable, por brindarme ayuda en todo momento, por seguirme permitiendo trabajar con usted, por sus enseñanzas, por sus consejos y por los buenos momentos que me ha hecho pasar en campo, gracias por su amistad.

A mi asesora Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por permitirme trabajar con usted, por abrirme las puertas del laboratorio a su cargo, por sus valiosas aportaciones en cuestiones moleculares y por motivarme a seguir adelante.

A mi asesor Dr. Víctor Heber Aguilar Rincón, por su valioso apoyo y su asesoramiento en este proyecto de investigación, por sus enseñanzas en clase y por las buenas pláticas en los pasillos.

A mi asesor Dr. Salvador Miranda Colín, por su valioso apoyo para finalizar la última etapa de este proyecto y por los consejos brindados.

A mi Sinodal Dr. Serafín Cruz Izquierdo, por su valiosa colaboración y amplia disposición en esta última etapa de mi trabajo académico.

A mis compañeros del equipo de Producción de Semillas y Mejoramiento Genético de maíz de la FESC-UNAM Campo 4, Israel, Enrique, Consuelo, Julio, Karina, Antonio, por su ayuda en los trabajos de campo y laboratorio, por las risas que hemos pasado juntos, por eso y más, para ustedes mi reconocimiento y amistad.

A los muchachos del equipo de trabajo de Producción de Semillas de CEVAMEX, a Israel, Christian, Francisco, Felipe y Rolando, por su inigualable apoyo en las actividades realizadas en los experimentos de maíz.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis:

A mi familia, por estar presentes en mi vida.

Al creador del Universo, por permitirme llegar hasta este apreciado momento.

A las personas que con sus buenas enseñanzas pusieron su granito de arena para continuar en este camino académico.

La vida es un hermoso viaje, y seguimos en movimiento.

## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>LISTA DE CUADROS</b>	xii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xiv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Objetivos	4
1.2. Hipótesis	4
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	5
2.1. Generalidades del maíz	5
2.2. Producción de maíz en México	6
2.2.1. Descripción de los Valles Altos centrales de México	7
2.3. La producción de semillas mejoradas de maíz en México	8
2.3.1. Tipos de producción de semilla híbrida de maíz en México	9
2.3.1.1. Producción de semilla con progenitores fértiles	9
2.3.1.2. Producción de semilla con progenitores androestériles	10
2.4. Semillas mejoradas de maíz y sus tipos	11
2.4.1. Híbridos convencionales	12
2.4.2. Híbridos no convencionales	12
2.4.3. Híbridos genéticamente modificados o transgénicos	13
2.4.4. Variedades mejoradas	13
2.5. Androesterilidad y sus tipos	13
2.5.1. Esterilidad masculina genética	14
2.5.2. Esterilidad masculina citoplásmica	14
2.5.3. Esterilidad génico-citoplásmica	15
2.6. Enfermedades del maíz	15
2.6.1. Tizón norteño del maíz ( <i>Exserohilum turcicum</i> )	16
2.6.2. Aspectos generales de <i>Exserohilum turcicum</i>	17
2.6.3. Métodos de control de <i>Exserohilum. turcicum</i>	20
2.7. Mecanismos de defensa de la planta a <i>Exserohilum turcicum</i>	21

2.7.1. Resistencia	21
2.7.1.1. Resistencia a <i>Exserohilum turcicum</i> en maíz	22
2.7.1.2. Resistencia cualitativa a <i>Exserohilum turcicum</i> en maíz	23
2.7.1.3 Resistencia cuantitativa a <i>Exserohilum turcicum</i> en maíz	24
2.7.2. Tolerancia	25
2.7.3. Evasión	25
2.7.4. Evaluación de la resistencia	26
2.7.4.1. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad	27
2.8. Rendimiento	27
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1. Descripción de la zona de estudio	28
3.1.1. Condiciones edafoclimáticas de la localidad Cuautitlán, Estado de México	28
3.1.2. Condiciones edafoclimáticas de la localidad Texcoco, Estado de México	28
3.2. Material genético	29
3.3. Diseño experimental	30
3.3.1 Análisis estadístico	30
3.4. Aislamiento e identificación del agente causal del tizón norteño	30
3.4.1. Colecta de muestras con síntomas de tizón norteño	30
3.4.2. Aislamiento y obtención de cultivos monoconidiales	31
3.4.3. Identificación del hongo	32
3.4.3.1. Características morfológicas	32
3.4.3.2. Estudios moleculares	32
3.4.3.2.1. Extracción de DNA de <i>Exserohilum turcicum</i>	32
3.4.3.2.2. Cuantificación de DNA	33
3.4.3.2.3. PCR	34
3.4.3.2.4. Electroforesis	34
3.4.3.2.5. Limpieza de producto PCR	35
3.4.3.2.6. Secuenciación	35
3.4.3.2.7. Análisis bioinformático y comparación	35

3.5. Producción del inóculo	36
3.6. Inoculación	36
3.7. Manejo agronómico	37
3.8. Variables a evaluar	37
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
4.1. Aislamiento e identificación del agente causal del tizón norteño	42
4.1.1. Aislamientos	42
4.1.2. Morfología	43
4.2. Análisis molecular	45
4.2.1. Amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS)	45
4.2.2. Construcción del árbol filogenético	46
4.3. Rendimiento y resistencia	48
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>76</b>
<b>6. LITERATURA CITADA</b>	<b>77</b>

## LISTA DE CUADROS

		Página
<b>Cuadro 1</b>	Superficie, rendimiento, volúmenes de producción de maíz y crecimiento de la población en tres periodos distintos.	6
<b>Cuadro 2</b>	Superficie sembrada, producción y rendimiento de maíz, en los estados que conforman los Valles Altos de México.	7
<b>Cuadro 3</b>	Híbridos de maíz evaluados para rendimiento y resistencia a tizón foliar en tres ambientes distintos. Ciclo P-V 2016.	29
<b>Cuadro 4</b>	Escala para evaluar severidad de tizón norteño de la hoja en maíz.	40
<b>Cuadro 5</b>	Cuadrados medios y significancia estadística en el análisis de varianza combinado para diversas variables evaluadas en 20 híbridos de maíz, sometidos a inoculación y sin inoculación de tizón foliar ( <i>Exserohilum turcicum</i> ), en 3 ambientes diferentes de Valles Altos. Ciclo P-V 2016.	50
<b>Cuadro 6</b>	Comparación de medias de ambientes en Valles Altos, para las variables evaluadas considerando la media de 20 híbridos de maíz, sometidos a inoculación y sin inoculación de tizón foliar ( <i>Exserohilum turcicum</i> ). Ciclo P-V 2016.	53
<b>Cuadro 7</b>	Comparación de medias entre tratamientos para las diversas variables evaluadas considerando la media de 20 híbridos de maíz, sembrados en 3 ambientes distintos de Valles Altos. Ciclo P-V 2016.	57
<b>Cuadro 8</b>	Comparación de medias entre genotipos híbridos de maíz para 3 variables evaluadas, considerando el promedio de tres ambientes distintos y dos tratamientos diferentes. Ciclo P-V 2016.	61
<b>Cuadro 9</b>	Cuadrados medios y significancia estadística en el análisis de varianza para diversas variables evaluadas en 20 híbridos de maíz sometidos a inoculación y sin inoculación de tizón foliar ( <i>Exserohilum turcicum</i> ), en el ambiente de Cuautitlán, Estado de	64

	México. Ciclo P-V 2016.	
<b>Cuadro 10</b>	Comparación de medias entre tratamientos para las diversas variables evaluadas considerando la media de 20 híbridos de maíz, sembrados en el ambiente Cuautitlán, Estado de México. Ciclo P-V 2016.	66
<b>Cuadro 11</b>	Comparación de medias entre genotipos híbridos de maíz para 3 variables evaluadas, considerando el promedio de dos tratamientos diferentes, sembrados en el ambiente Cuautitlán, Estado de México. Ciclo P-V 2016.	68

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico de <i>E. turcicum</i> .	19
<b>Figura 2</b>	Escala diagramática para evaluación de porcentaje de tejido foliar dañado por <i>E. turcicum</i> (Pass.) Leonard y Suggs.	39
<b>Figura 3</b>	Síntomas de tizón foliar ( <i>E. turcicum</i> ) en plantas de maíz.	42
<b>Figura 4</b>	Aislamientos de <i>Exserohilum turcicum</i> .	43
<b>Figura 5</b>	Conidios y micelio en aislamientos de <i>Exserohilum turcicum</i> .	43
<b>Figura 6</b>	Amplificación por PCR del Espacio Transcrito Interno del rDNA de los 20 aislamientos del hongo obtenido de muestras de maíz, con un tamaño de banda esperado de ~550 bp.	45
<b>Figura 7</b>	Árbol filogenético de <i>Exserohilum turcicum</i> .	46
<b>Figura 8</b>	Rendimiento de grano de 20 genotipos de maíz, bajo 2 tratamientos distintos de inoculación de <i>Exserohilum turcicum</i> .	69
<b>Figura 9</b>	Porcentaje de severidad final alcanzado y ABCPE de genotipos de maíz, evaluados bajo el tratamiento 1 (inoculación con <i>Exserohilum turcicum</i> ).	72
<b>Figura 10</b>	Comparación del ABCPE de 20 híbridos de maíz bajo 2 tratamientos diferentes de inoculación con <i>E. turcicum</i> .	73
<b>Figura 11</b>	Comparación del porcentaje de Severidad final alcanzado de 20 híbridos de maíz bajo 2 tratamientos diferentes de inoculación con <i>E. turcicum</i> .	74

## 1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo más importante a nivel mundial en términos de producción, hoy en día se encuentra distribuido por todo el mundo, cultivado bajo un amplio rango de condiciones climáticas. Su importancia radica en su uso como alimento para consumo humano y animal; y como materia prima de diversos productos industriales, además, es un sistema genético modelo, dada su gran diversidad genética (Ding *et al.*, 2015).

El maíz es historia, tradición y cultura en México. Es el cultivo que cubre la mayor parte de la superficie sembrada en este país, así como uno de los principales detonadores en la generación de empleo y además, es el componente más importante en la dieta de los mexicanos, pues tiene un gran número de derivados alimenticios, siendo el principal la tortilla (Fernández *et al.*, 2013).

En México, centro de origen, domesticación y diversificación del maíz, se siembran anualmente cerca de ocho millones de hectáreas, las cuales producen alrededor de 28 millones de toneladas de grano; sin embargo, cada año se importan en promedio 10 millones de toneladas de grano entero. Este nivel de importación se explica, en parte, por el rendimiento promedio en el país, que es de 3.7 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2016).

En los Valles Altos de la Mesa Central de México, que abarcan los estados de Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Morelos, Estado de México y la Ciudad de México, se cultivan cerca de 1.5 millones de hectáreas con maíz, que representan cerca de 20% de la superficie nacional establecida con esta especie; de dicha extensión, cerca del 50% se ubican en zonas de riego y/o buen temporal, propias para usar semillas mejoradas (Turrent *et al.*, 2009).

En las áreas de producción de maíz, se requiere semilla de buena calidad física, fisiológica, genética y sanitaria, debido a que es el insumo fundamental para el rendimiento del cultivo. Se ha señalado que una semilla mejorada contribuye hasta en

60 % del rendimiento final, lo cual indica que es el producto esencial para lograr una buena producción (Espinosa *et al.*, 2008).

Desafortunadamente, los bajos rendimientos en maíz se deben a diversos factores, como la utilización de semillas con bajo potencial productivo, escasez de insumos, así como la presencia de plagas y enfermedades. Por lo cual, se han implementado programas de mejoramiento de maíz y paquetes tecnológicos, poniendo énfasis en la semilla mejorada, que es el insumo más importante para aumentar la productividad de maíz (García y Ramírez, 2014).

El abastecimiento de semillas mejoradas de maíz para Valles Altos, en las áreas de riego y buen temporal, está encaminada a ofrecer híbridos, en cuya producción existen dos esquemas. El primero de ellos, involucra el uso de progenitores de fertilidad normal, que se realiza en campos alternando regularmente seis surcos de hembra por dos surcos de macho (Tadeo *et al.*, 2010). Sin embargo, en este sistema de producción, la inflorescencia masculina del progenitor femenino debe ser eliminada antes de la liberación de polen, lo que conlleva labores que encarecen la semilla híbrida (Tadeo *et al.*, 2015).

El segundo esquema involucra el uso de progenitores hembra, cuyas plantas presenten esterilidad masculina, es decir que no produzcan polen, para evitar llevar a cabo el desespigue, dado que se hace uso de la androesterilidad. En este esquema de producción son necesarias líneas androestériles, mismas que debieron convertirse partiendo de una línea fértil a la que se incorpora la androesterilidad mediante un programa de retrocruzamiento (Poehlman, 2003; Reyes, 1990); este tipo de producción genera semilla híbrida de maíz más barata para el productor de semilla y quien adquiere semilla comercial.

Un ejemplo del uso de la androesterilidad en la producción de semillas mejoradas se dio en Estados Unidos de América, aunque dejó de utilizarse en 1970, debido a que la fuente de esterilidad citoplasmática denominada cms-T

incorporada a los progenitores de los híbridos para facilitar la producción de semilla, mostró susceptibilidad al tizón foliar causado por el hongo *Helminthosporium maydis* raza T, de tal manera que ocasionó una epifitía que afectó el 90% de las siembras de ese país (Grogan *et al.*, 1971; Airy *et al.*, 1978).

En el caso de Valles Altos, se pueden encontrar materiales híbridos de maíz, que prometen altos rendimientos y características agronómicas deseables, que han sido producto de la investigación pública, tanto de la UNAM como del INIFAP. Sin embargo, estos materiales no se han usado tanto como se esperaría por limitaciones en la producción de semilla certificada, por lo que se ha recurrido a la promoción de microempresas, para las cuales es conveniente ofrecer esquemas que faciliten la producción de semillas mejoradas (Espinosa *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2007).

Una oportunidad para hacer llegar al productor una semilla exitosa es el esquema de producción con materiales androestériles, para lo cual es importante contar con información de los híbridos y su rendimiento de grano en sus versiones androestériles y fértiles, así como asegurar que no son susceptibles al tizón foliar, y con esto dar la certeza al productor de que con un manejo adecuado se puede lograr la producción esperada.

Por lo anterior, se recurre a trabajos de investigación como el presente, en donde se valida la capacidad productiva y de resistencia a tizón foliar de diversos materiales híbridos producto de la investigación pública, en comparación con materiales comerciales de empresas privadas, con el fin de definir cuál de ellos es el que promete las mejores ventajas al productor y así establecer estrategias que fomenten su uso y por tanto, beneficios mayores a la sociedad en general.

## **1.1. Objetivos**

Evaluar el rendimiento de grano de híbridos androestériles y fértiles de maíz promisorios de la UNAM e INIFAP, en comparación con híbridos comerciales.

Evaluar la resistencia a tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) en los híbridos androestériles y fértiles promisorios de la UNAM e INIFAP, en comparación con híbridos comerciales.

## **1.2. Hipótesis**

El rendimiento de grano que exhiben los híbridos androestériles de maíz es mayor con respecto a las versiones fértiles de los híbridos, por lo que al menos un híbrido androestéril superará o igualará el rendimiento de los híbridos fértiles.

La resistencia a tizón foliar, se expresará de forma similar tanto en los híbridos androestériles como en los fértiles, y se esperará encontrar materiales experimentales resistentes y de buen rendimiento de grano.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo antiguo, del cual su origen ha sido muy discutido por años, se considera a México su centro de origen, puesto que los hallazgos arqueológicos que lo revelan se han encontrado en la Cueva de Coxcatlán, en el Valle de Tehuacán, Puebla, y datan de unos 7000 años de antigüedad (Kato, 2009).

El maíz se puede cultivar en lugares con clima cálido o frío. En México, la variabilidad para su cultivo es muy alta, pues se siembra en una amplia gama de ambientes desde el nivel del mar hasta más de 3000 msnm, y de climas húmedos tropicales a condiciones semidesérticas (Perales y Golicher, 2014).

Es una planta que se encuentra en la clase Angiosperma y subclase monocotiledónea, del orden de los cereales y familia Poaceae, su nombre científico es *Zea mays* L. El cultivo posee una gran diversidad genética, surgiendo varias hipótesis sobre su origen, siendo la más aceptada la que plantea que el maíz proviene del teocintle (*Euchlaena mexicana*) (Miranda, 1966).

La planta del maíz es de porte robusto, crecimiento erecto, de producción anual, y alcanza de medio metro a seis metros de altura. Las hojas tienen un limbo ancho y alargado. La mazorca nace del nudo ubicado en el tallo, envuelta en espigas. En cada mazorca se encuentran los granos dispuestos en hileras, cuyo número varía de ocho a cuarenta (Poehlman, 2003).

En el tallo de la planta en el extremo superior, se encuentra una panoja de flores masculinas que derraman polen, mientras que las femeninas se encuentran en la mazorca. La planta es monoica, lo cual es una gran ventaja para estudios de mejoramiento genético (Reyes, 1990).

## 2.2. Producción de maíz en México

En el mundo, Estados Unidos de América es el mayor productor aportando el 41% de la producción, seguido por China con el 19%, y Brasil con el 7%. México ocupa el sexto lugar, y la mayoría del grano que produce es de color blanco (SIAP, 2016). A pesar de ser México uno de los principales productores de maíz, las importaciones del mismo comenzaron en 1980, y se han incrementado a través del tiempo; en los últimos años han variado cerca de 10 millones de toneladas o más (SIAP, 2016) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Superficie, rendimiento, volúmenes de producción de maíz y crecimiento de la población en tres periodos distintos (SIAP, 2016).

<b>Periodo</b>	<b>Superficie (mill. de ha sembradas)</b>	<b>Rendimiento (t/ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Producción (mill. de t)</b>	<b>Población (mill. de hab)</b>
1940	3.50	0.45	1.58	19.60
1980	7.59	1.80	13.70	66.80
<b>Cambio</b>	<b>4.09</b>	<b>1.35</b>	<b>10.72</b>	<b>47.20</b>
1980	7.59	1.80	13.70	66.80
2010	7.86	2.66	22.30	112.33
<b>Cambio</b>	<b>0.27</b>	<b>1.46</b>	<b>11.00</b>	<b>45.53</b>
2010	7.86	2.70	22.30	112.33
2016	7.80	3.70	28.25	127.92
<b>Cambio</b>	<b>0.06</b>	<b>1.00</b>	<b>5.95</b>	<b>15.59</b>

Elaboración propia

El principal estado productor es Sinaloa, con 6, 430,676 toneladas, con un valor de poco más \$ 22, 000,000 (SIAP, 2016). El valor de la producción nacional alcanza \$ 99, 737,000, con una superficie sembrada de 7, 761,216 hectáreas. La producción de maíz se concentra en unos cuantos estados, dado que cinco de ellos generan 6 de cada 10 kilogramos de grano de maíz que se consume. Estos son, Sinaloa 22%, Jalisco 15%, Estado de México 7%, Michoacán 7% y Guerrero 6% (SIAP, 2016).

### 2.2.1. Descripción de los Valles Altos

La región de los Valles Altos abarca los estados de Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Morelos, Estado de México y la Ciudad de México, dentro de la Mesa Central del país y se encuentra entre los 2200 y 2600 msnm. Es el área maicera de mayor extensión a nivel nacional, puesto que cuenta con una superficie potencial de 3.5 millones de hectáreas (Turrent *et al.*, 2009).

Esta región se caracteriza por presentar una amplia gama de condiciones ambientales, donde anualmente se establecen 1.5 millones de hectáreas con maíz, de las cuales el 80% se cultivan bajo condiciones de temporal y el resto en punta de riego, con un rendimiento promedio de 3 t ha<sup>-1</sup>. En esta región hay un área potencial para el uso de híbridos superior a 300 mil hectáreas, para las cuales se requieren 7500 toneladas de semilla mejorada (Espinosa *et al.*, 2012).

En los Valles Altos, el Estado de México destaca por su mayor área sembrada y volumen de producción, en el 2016 ocupó el tercer lugar de la producción nacional con 2, 332,072 toneladas de grano (Cuadro 2), solo atrás de Sinaloa y Jalisco.

**Cuadro 2.** Superficie sembrada, producción y rendimiento de maíz, en los estados que conforman los Valles Altos de México. (SIAP, 2016).

<b>Estado</b>	<b>Superficie (ha sembradas)</b>	<b>Producción (ton)</b>	<b>Rendimiento (t ha<sup>-1</sup>)</b>
México	531,528.69	2,332,071.79	4.4
Puebla	558,165.71	1,061,811.20	1.9
Hidalgo	253,242.65	731,471.39	2.9
Tlaxcala	135,943.39	416,652.38	3.1
Querétaro	110,992.00	316,940.30	2.9
Morelos	31,248.76	91,373.09	2.9
Ciudad de México	3,628.90	5,059.65	1.4

### **2.3. La producción de semillas mejoradas de maíz en México**

En México, de los ocho millones de hectáreas de maíz que se siembran anualmente, solo 2 millones de hectáreas ocupan semilla mejorada certificada, siendo 1.75 millones donde se utilizan híbridos. En el mercado de semillas de maíz hay una participación importante de empresas privadas, 80% lo abarcan las transnacionales Monsanto y Pioneer (AMSAC, 2015).

En el país hay más de 120 productores de semillas certificadas de maíz (SAGARPA, 2016), desde pequeños productores hasta grandes empresas, principalmente en Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Estado de México. Aunque es importante destacar que las empresas transnacionales han investigado y patentado sus variedades de semillas (SNICS, 2016).

Para 2016, en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), máximo órgano de investigación pública nacional, se habían "liberado" 252 híbridos y variedades mejoradas, generados con líneas provenientes de razas de maíz descritas como mexicanas (SNICS, 2016).

Otras instituciones de enseñanza e investigación han registrado variedades e híbridos en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales, entre ellas destacan la Universidad Autónoma Chapingo, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, el Colegio de Postgraduados y la Universidad Nacional Autónoma de México (SNICS, 2016).

En el maíz, producción de semillas de híbridos es optimista, puesto que se obtiene mayor rentabilidad que de su cultivo para grano (Espinosa *et al.*, 2008). Sin embargo, generalmente su uso y los altos rendimientos están asociados a la agricultura comercial, mientras que la utilización de semillas nativas y los bajos rendimientos están asociados con la agricultura tradicional.

En los Valles Altos, los líderes del mercado en venta de semillas de híbridos son las empresas Asgrow y Pioneer, seguidos por Aspros. Otras semillas mejoradas en el mercado son los híbridos del INIFAP, comercializados por empresas pequeñas. Luna *et al* (2012), señalan que el 95 % de las ventas de semillas de maíz en esta región corresponden a las empresas grandes Monsanto y Pioneer.

La proporción de venta de semilla híbrida de maíz ha cambiado en los últimos años, esto por el crecimiento de algunas empresas que pasaron de pequeñas a medianas, y por la aparición de algunas nuevas. Una estimación gruesa a partir de datos de las empresas y datos oficiales del SNICS (2016), indica que, de un mercado de 3 millones de sacos de semillas, el 80% corresponde a ventas de las empresas Monsanto y Pioneer y el 20% restante a otras.

### **2.3.1. Tipos de producción de semilla híbrida de maíz en México**

En México se practican dos esquemas diferentes para la producción de semilla híbrida de maíz, los cuales son la producción de semilla con progenitores de fertilidad normal y la producción de semilla con progenitores androestériles, siendo ampliamente el primero el más empleado.

#### **2.3.1.1. Producción de semilla con progenitores de fértiles**

Para producir semilla con este tipo de progenitores, generalmente los campos son sembrados alternando dos surcos de plantas macho por seis surcos de plantas hembra, aunque esto puede variar, dependiendo de la cantidad del polen producido por el progenitor masculino, pero se debe cultivar el menor número de surcos macho posibles, aunque es muy importante que se produzca el polen suficiente para asegurar una fertilización completa (Tadeo *et al.*, 2010).

La inflorescencia masculina en el progenitor femenino debe ser eliminada antes de la floración o liberación del polen (desespigue), para asegurar la calidad genética de la

semilla híbrida que se desea producir. El desespigamiento manual es laborioso y costoso, dicha labor puede llevar de una a cinco semanas, e implica el empleo de hasta 34 jornales por hectárea, por lo cual se han buscado métodos para el emasculado mecánico (Tadeo *et al.*, 2015).

Actualmente, el desespigamiento mecánico es el método predominante empleado por la industria semillera, para garantizar que la producción de semilla híbrida cumpla con la calidad genética de este insumo (Yongzhong *et al.*, 2016), sin embargo, el trabajo no es tan eficiente e incluso puede eliminar cantidades significativas de material vegetativo que repercuten en reducciones de hasta el 40% del potencial de rendimiento de la producción (Wich, 1988).

El emasculado mecánico depende de las características topográficas de la parcela y de las cualidades fenotípicas del progenitor femenino, como es la uniformidad de las plantas en altura y floración, así como que la espiga, no se encuentre envuelta por más de una hoja, dado que el material foliar dañado representa un punto de entrada para las enfermedades, diversos estudios señalan que el área foliar por encima de la mazorca tiene efectos importantes sobre la cantidad y calidad de la semilla producida (Tadeo *et al.*, 2001).

El desespigamiento mecánico debe complementarse con el desespigamiento manual. La tarea de desespigue debe hacerse de modo que, en un día determinado, no más del 1% de las espigas del progenitor femenino estén soltando polen. En tres inspecciones, cualquiera que sea la liberación acumulativa del polen no debe exceder del 2% (Airy *et al.*, 1978).

#### **2.3.1.2. Producción de semilla híbrida con progenitores androestériles**

En México, han sido pocos los trabajos para el aprovechamiento de la androesterilidad masculina en la producción de semilla híbrida de maíz. En los últimos años, instituciones públicas como el INIFAP y la UNAM han desarrollado investigación

basada en ese principio. Sin embargo, en países como Rusia, la investigación sobre la androesterilidad se practica desde hace muchos años, con programas en los que se incluye la identificación genética de fuentes de esterilidad (Tadeo *et al.*, 2001).

En la producción de semilla híbrida de maíz utilizando la androesterilidad, es necesario contar con líneas androestériles, por lo que una línea fértil debe convertirse en estéril mediante un retrocruzamiento, en el cual el progenitor donante es la línea estéril y el progenitor recurrente la que se desea transformar en estéril, suponiendo que ésta es fértil y no restauradora; dicha línea estéril es la que se utiliza como progenitor femenino donde se produce la semilla (Jugenheimer, 1981).

Si una planta de maíz con androesterilidad citoplasmática es polinizada por otra planta fértil normal, pero que no contiene genes restauradores de la fertilidad masculina, la progenie que se produce será androestéril, por lo que la utilización de la androesterilidad en la producción de semilla se hace mediante dos métodos (la mezcla y los genes restauradores de la fertilidad masculina), para asegurar que en la parcela del productor de grano exista una fuente de polen que asegure la polinización, fertilización y producción (Reyes, 1990).

Sin embargo, estudios recientes indican que un material que ha sido restaurado puede no ser completamente fértil, puesto que puede originarse una restauración parcial, porque se ha encontrado que existen plantas que tienen menos anteras y menos polen que las plantas completamente fértiles sin la restauración de la fertilidad (Kohls *et al.*, 2011).

#### **2.4. Semillas mejoradas de maíz y sus tipos**

La semilla mejorada es el producto esperado de los programas de mejoramiento genético de maíz. Estos productos incluyen variedades mejoradas de polinización libre (VPL) e híbridos, que muestran ser eficientes en el uso de agua y nutrientes, y que generan el mayor rendimiento de grano por unidad de superficie, en relación con

el costo de producción, y que satisfacen las necesidades del productor y del consumidor.

Las VPL se obtienen por selección recurrente de las mejores plantas de una población, según el objetivo de mejoramiento, con recombinación únicamente entre los individuos seleccionados hasta obtener una población uniforme con las características deseadas. Los híbridos se obtienen de la cruce entre dos o más líneas endogámicas, donde la descendencia de la cruce entre dos padres diferentes presenta heterosis o vigor híbrido (Jugenheimer, 1981).

#### **2.4.1. Híbridos convencionales**

Son el resultado de la progenie de una cruce únicamente entre líneas, donde una de ellas es la hembra y la otra el macho, las cuales son endogámicas. Los híbridos pueden ser de cruce simple, doble o triple. Un híbrido simple es más vigoroso y productivo que sus progenitores, al recuperar el vigor híbrido que se perdió en el proceso de autofecundación (Jugenheimer, 1981). Tienen la más alta uniformidad fenotípica y el potencial de rendimiento de grano más alto, son utilizados por agricultores que utilizan alta tecnología (Espinosa *et al.*, 2012).

#### **2.4.2. Híbridos no convencionales**

Se caracterizan por tener poca uniformidad fenotípica y producen menos rendimiento de grano que los híbridos convencionales, aunque no es una regla, porque en condiciones adversas llegan a superarlos; además, tienen la ventaja que en la producción de semilla sólo se maneja uno o ningún progenitor endogámico, lo cual reduce el costo de la semilla certificada al agricultor (Espinosa *et al.*, 2000). Se clasifican en cuatro categorías: intervarietales, familiares, mestizos y mestizos dobles.

### **2.4.3. Híbridos genéticamente modificados o transgénicos**

Son materiales formados con líneas endogámicas en las cuales se insertaron genes que no pertenecen al genoma del maíz. Se caracterizan porque les confieren resistencia a herbicidas como el glifosato, y a algunas plagas del follaje, de la mazorca y del sistema radical. Son utilizados ampliamente en países como E.U., Canadá, Argentina, Brasil, entre otros, pero su uso ha causado grandes controversias, debido al desconocimiento de sus probables efectos negativos sobre la salud humana y la diversidad genética del maíz.

En México el Comité de Bioseguridad no ha autorizado las siembras comerciales de los transgénicos, debido a que el país es centro de origen y de diversidad del maíz y no se tienen los estudios ni resultados de su impacto ambiental. Sin embargo, se ha autorizado hacer investigación confinada con maíces transgénicos en los estados de Sonora, Sinaloa y Tamaulipas, la cual inició con permisos otorgados en el ciclo agrícola Invierno 2008-2009.

### **2.4.4. Variedades**

Son un grupo de individuos de una especie y raza con rasgos diferenciales más estrechos que aquellos manifestados por las razas. Las variedades se cruzan libremente y forman poblaciones diferenciales. Se caracterizan por tener plantas con alto vigor, y en la producción de semilla certificada no se requiere sembrar surcos hembra y macho (Espinosa *et al.*, 2010). Estas se clasifican en las siguientes categorías: sintéticas, mejoradas y criollas.

## **2.5. Androesterilidad y sus tipos**

La androesterilidad es la imposibilidad de la planta de generar órganos reproductivos masculinos completos o polen viable para la fertilización y fecundación de los óvulos de la flor femenina. Esta condición puede ser hereditaria. En la

producción de semilla híbrida, la androesterilidad elimina la necesidad del proceso de emasculación en plantas como cebolla y sorgo, así como el desespigamiento del maíz (Allard, 1967).

En las líneas de macho estéril las flores no producen anteras funcionales, por lo que no puede haber polinización. Poehlman (2003) indica que la esterilidad masculina puede ser controlada por la acción de genes específicos o por mecanismos hereditarios en el citoplasma. Al respecto existen tres tipos de androesterilidad:

### **2.5.1. Esterilidad masculina genética**

Este tipo de androesterilidad se manifiesta por medio de la actividad de genes nucleares que inhiben el desarrollo normal de las anteras y el polen. Esta es determinada predominantemente por un alelo recesivo “ms”; el alelo dominante “Ms” (male sterility), resulta en la formación de anteras y polen normales. En el caso de las especies diploides, el genotipo “msms” corresponde a la esterilidad masculina, por tanto, los genotipos MsMs y Msms corresponden a la fertilidad masculina (Poehlman, 2003).

### **2.5.2. Esterilidad citoplásmica**

Esta androesterilidad es controlada por los genes presentes en organelos del citoplasma, pero puede ser influenciada por genes de los cromosomas. En este caso, el citoplasma hace que un organismo presente esterilidad masculina y recibe el nombre de citoplasma estéril (S) o (CMS), en contraste con el citoplasma normal (N), que permite el desarrollo normal de anteras y polen funcionales. Con frecuencia el citoplasma estéril resulta de introducir cromosomas nucleares en un citoplasma extraño (Jugenheimer, 1981).

Al respecto, debido a que el citoplasma es transferido únicamente por medio de la célula huevo y célula espermática, aporta una cantidad sumamente pequeña de

citoplasma al cigoto; la esterilidad masculina citoplasmática se transmite sólo por medio de la planta hembra. Esta función desplazó en algunos sistemas de producción, al desespigamiento de las plantas hembras para producir semilla híbrida (Poehlman, 2003).

Debido a su naturaleza hereditaria para manifestar el gametofito masculino no funcional, la androesterilidad masculina es un sistema efectivo en cuanto a costo para la producción de semilla híbrida. Es por ello, que la esterilidad citoplásmica o CMS se utiliza ampliamente en la producción de semilla híbrida de diversos cultivos para evitar esfuerzos de emasculación artificial (Bohra *et al.*, 2016).

### **2.5.3. Esterilidad génico-citoplásmica**

En este caso la androesterilidad está determinada por la interacción entre el citoplasma (portador de plasmagenes que producen androesterilidad o no) y un par de alelos nucleares, que se denominan R y r.

La diferencia entre este tipo de androesterilidad y la citoplásmica radica en que la descendencia obtenida por el cruzamiento de una planta androestéril (como femenina) y una fértil no tiene que ser necesariamente androestéril, sino que depende del genotipo de la planta que actúa como parental masculino.

El citoplasma siempre se hereda por vía materna y puede ser:

- El citoplasma normal o fértil (N) o (F)
- El citoplasma estéril o androestéril (S). En el núcleo: el alelo recesivo "r" en homocigosis es el responsable de la androesterilidad, mientras que el alelo dominante "R" codifica para plantas androfértiles.

## **2.6 Enfermedades del maíz**

Los diversos climas bajo los que se cultiva el maíz en muchos de los casos, son favorables al crecimiento y diseminación de los agentes causales de enfermedades,

aunque con algunos, el maíz ha coexistido a lo largo del tiempo. Algunas enfermedades se presentan en casi todos los ambientes donde se cultiva maíz; estas incluyen principalmente a tizones, royas y pudriciones (Paliwal *et al.*, 2001).

### **2.6.1. Tizón norteño del maíz (*Exserohilum turcicum*)**

El tizón es una enfermedad causada por el hongo *Exserohilum turcicum* (Pass) (teleomorfo, *Setosphaeria turcica*), que se presenta sobre las hojas de la planta de maíz. Se encuentra distribuido por todo el mundo (Pataky y Ledencan, 2006) y ocurre particularmente en zonas con alta humedad relativa y temperaturas moderadas durante el periodo de crecimiento del cultivo. Cuando la infección se produce antes o durante la aparición de los estigmas, y si las condiciones son óptimas, puede ocasionar daños económicos considerables (De León, 1984).

La presencia de este patógeno puede ocasionar disminuciones en el rendimiento y en la calidad de la semilla. Si la enfermedad se manifiesta antes de la floración, puede provocar pérdidas en la producción de grano de hasta el 50% (Raymundo y Hooker, 1981). Si la infección es moderada o se retrasa hasta 6 semanas después de la floración, la reducción de rendimiento es mucho menor o nula (Sillón, 2008) sin embargo, se menciona que ha causado la disminución del rendimiento hasta un 91% en algunas zonas productoras de maíz en el mundo (CIMMYT, 2014).

Los ataques de enfermedades foliares como el tizón, suelen llegar a ser graves, dado que causan una reducción del área foliar, esto interfiere en el proceso fotosintético de la planta. Por lo tanto, los fotoasimilados son insuficientes para llenar el grano, y es entonces cuando la planta comienza a utilizar reservas existentes en el tallo, propiciando la movilización de nutrientes, lo cual conduce a un debilitamiento de tallos. Esto provoca la ruptura o acame del tallo, así como la aparición de enfermedades fúngicas en tallo y raíz (Sartori *et al.*, 2015).

## 2.6.2. Aspectos generales de *Exserohilum turcicum*

Se ha sugerido que el centro de origen de *E. turcicum* podría ser Mesoamérica o el Este de África, en un proceso coevolutivo con maíz o sorgo (Borchardt *et al.*, 1998). El primer reporte que se obtuvo fue en Italia por Passerini, en 1876. Las incidencias más graves ocasionadas por este patógeno han sido en Filipinas, Nigeria, Argentina y Estados Unidos (Harlapur *et al.*, 2007). Aunque se ha reportado que la enfermedad puede ser esporádica, y esto depende de las condiciones ambientales que se presenten (Bentolila *et al.*, 1991).

En Córdoba, Argentina se han presentado pérdidas cercanas al 40% en rendimiento de híbridos comerciales tizón foliar, y se ha encontrado que se presenta con mayor frecuencia en el área central del país, y cada año con diferentes niveles de gravedad (Sartori *et al.*, 2015). En el sur de Florida, en Estados Unidos de América, el tizón foliar es un problema, principalmente en híbridos de maíz dulce (Campaña y Pataky, 2005).

Al tizón también se le conoce como la mancha norteña de la hoja (Northern leaf blight, NLB en inglés) del maíz. El estado sexual (teleomorfo) es *Setosphaeria turcica* (Lutrell, Leonard y Suggs), anteriormente conocido como *Helminthosporium turcicum* (Perkins y Pedersen, 1987; Smith y White, 1988; Carson, 2006). De acuerdo a Agrios (2008), este patógeno es clasificado de la siguiente manera:

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Hyphales

Género: *Exserohilum*

Especie: *E. turcicum*

Teleomorfo: *Setosphaeria turcica* (sinónimo. *Trichometasphaeria turcica*)

Anamorfo: *Exserohilum turcicum* (sinónimo. *Helminthosporium turcicum*)

Es un hongo hemibiotrófico parásito facultativo, que vive en el tejido vegetal vivo antes de causar necrosis, y después se nutre del tejido muerto (Hurni *et al.*, 2015). Se encuentra generalmente como micelio o en sus fructificaciones asexuales (conidios) en residuos de cultivos anteriores, principalmente gramíneas, por lo que puede sobrevivir por muchos ciclos en un mismo terreno (Figura 1) (Robert y Findley, 1952; White, 2004).

También se ha encontrado que *E. turcicum* está asociado a la semilla, y es la vía de dispersión a largas distancias y la principal fuente de entrada a los lotes, dado que puede ser introducido a los campos de cultivo durante la siembra, para luego causar lesiones en plántulas, que se convierten en fuente de inóculo secundario para después infectar al resto del follaje y plantas vecinas (Hooker, 1977).

*E. turcicum*, produce conidios grandes (20 x 195  $\mu\text{m}$ ), que son de color gris-olivo-café, tienen de tres a ocho septos, forma ovalada con un hilum prominente que exhibe su germinación en un extremo del conidio. Tiene micelio grueso septado, cilíndrico, con una membrana externa fina y una interna hialina. Las hifas tienen coloración hialina hasta color gris-olivo-café, que dan origen a los conidióforos (White, 2004).

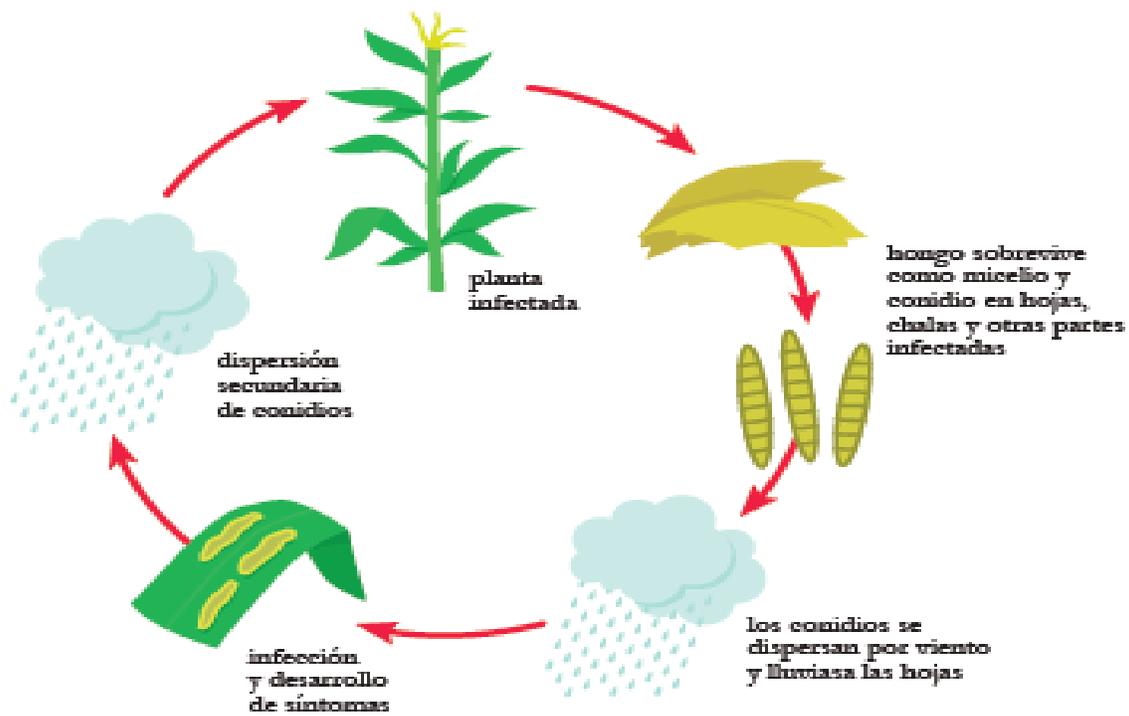
Se ha encontrado que *E. turcicum* es un ascomiceto que es sensible al fotoperiodo, mostrando un crecimiento vegetativo extenso en los ciclos de luz prolongada, deteniéndose hasta la formación de conidióforos, mientras que bajo ciclos de luz/oscuridad reduce su crecimiento vegetativo y la aparición de conidióforos y conidios maduros es más rápida (Flaherty y Dunkle, 2005).

Los conidióforos de *E. turcicum* son de color café amarillento, se producen individuales o en grupos de 2-6, con conidios ovalados de 3 a 8 septos. Sus divisiones internas se encuentran marcadas y son consistentes. El estado sexual, se ha logrado producir pseudotecios en laboratorio, pero no se han encontrado en forma natural; son elipsoidales, negros, con ascas cilíndricas (350-720  $\mu\text{m}$ ), donde se producen de uno a ocho ascosporas hialinas, con tres septos (White, 2004).

Uno de los primeros síntomas de tizón foliar consiste en la aparición de manchas pequeñas, ligeramente ovaladas que se producen en las hojas inferiores de la planta. Estas lesiones se transforman en zonas necróticas alargadas y ahusadas, cuyo número aumenta a medida que se desarrolla la planta. Se puede llegar a producir la quemadura total del follaje (De León, 1984).

Las lesiones son de color verde-grisáceo o café, pueden unirse y ocasionar el secado de la hoja (Hooker, 1977). La esporulación del hongo se forma en el centro de la lesión, lo cual da una coloración oscura. En ataques graves, las hojas se deforman, marchitan y se secan, se rajan longitudinalmente y la planta muere, adjudicándose los síntomas al efecto de heladas o sequías (Paliwal *et al.*, 2001).

Este hongo se desarrolla mejor en regiones húmedas, con temperatura de 18 a 27°C y con presencia de moderada a alta humedad relativa durante la época de crecimiento del cultivo (Sartori *et al.*, 2017). La infección secundaria ocurre de planta a planta y de campo a campo por los conidios producidos abundantemente en las lesiones foliares de plantas infectadas (Hurni *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Ciclo biológico de *E. turcicum* (White, 2004).

*E. turcicum* presenta diversas razas, que se definen basándose en sus reacciones fenotípicas cuando se inocula en un set de genotipos de maíz con diferentes genes de resistencia, las cuales se designan de acuerdo a los genes de resistencia que coinciden con su virulencia. Por ejemplo, la raza 0 de *E. turcicum* es ineficaz (no virulenta) en contra de todos los genes Ht, mientras que la raza 1 sólo es efectiva (virulenta) contra Ht1, ambas razas son eficaces contra todos los genotipos de maíz que carecen de genes de resistencia (Leonard *et al.*, 1989).

La enfermedad también causa alteraciones cualitativas de las semillas, lo que resulta en reducción del contenido de azúcar total, baja capacidad de germinación y del valor nutritivo; adicionalmente, cuando las plantas están muy infectadas son más predispuestas a pudriciones del tallo. *Exserohilum turcicum* puede atacar también al sorgo (*Sorghum* spp.), zacate Johnson (*Sorghum halepense*), zacate Sudán (*Sorghum drummondii* Steud) y al teocintle (*Euclyptus mexicana*) (White, 2004).

### **2.6.3. Métodos de control de *E. turcicum***

La principal estrategia para reducir pérdidas en el rendimiento por tizón norteño es la utilización de genotipos que tengan una resistencia genética estable, dado que el hongo está representado en ciertas zonas por una o varias razas, que son diferentes formas genéticas del patógeno, es necesario este tipo de resistencia (Ding *et al.*, 2015).

Otra estrategia de manejo para el control es la rotación de cultivos, evitando el monocultivo de maíz para disminuir la concentración de inóculo en el terreno. También se recomienda la aplicación de fungicida en zonas con ataques frecuentes y severos, cuando los híbridos sembrados son susceptibles y en lotes con alto potencial de rendimiento (Sartori *et al.*, 2015).

## **2.7. Mecanismos de defensa de la planta a *Exserohilum turcicum***

Existen tres estrategias de defensa por parte de las plantas hacia los patógenos: evasión, resistencia y tolerancia. En la agricultura, la estrategia más empleada, confiable e importante es la resistencia (Niks *et al*, 2014).

### **2.7.1. Resistencia**

Es la capacidad de la planta para reducir el crecimiento y desarrollo del patógeno después de que ha habido contacto entre el hospedante y el patógeno, o después que este ha iniciado su desarrollo o se ha establecido (Parveliet *et al.*, 1993). La teoría del gen por gen, propuesta por Flor en 1955 señala que, “por cada gen que condiciona la resistencia en el hospedante, existe un gen específico que condiciona la virulencia en el patógeno”. El resultado de la interacción es un tipo de infección, que puede ser leve o incompatible, grave o compatible.

Los patógenos de las plantas han desarrollado numerosas estrategias para obtener materiales nutritivos de su huésped, y las plantas a su vez han evolucionado barreras físicas y químicas, así como un sofisticado sistema inmune para combatir los ataques de patógenos. Genéticamente, la resistencia a las enfermedades causadas por los patógenos puede dividirse en una resistencia cualitativa y cuantitativa, condicionada por genes mayores y múltiples genes con efectos menores respectivamente (Zhang *et al.*, 2013).

La resistencia genética si es controlada por un gen o pocos genes, recibe el nombre de resistencia cualitativa, monogénica u oligogénica, mientras que si es controlada por múltiples genes se denomina resistencia cuantitativa. Puede denominarse vertical (específica), cuando aplica para alguna raza del patógeno, u horizontal (no específica) cuando aplica a diversas razas del patógeno (Vanderplank, 1984).

La resistencia es una característica heredable y es controlada principalmente por genes nucleares y en algunos casos por citoplasmáticos, por unidades hereditarias que se supone están ubicadas dentro de los cloroplastos y la mitocondria (Smith y White, 1988). Los genes de resistencia en el hospedante se comportan como dominantes y los genes de virulencia en el patógeno como recesivos (Agrios, 2008).

La resistencia genética es el medio más eficiente y ampliamente utilizado para controlar las enfermedades del maíz (Ding *et al.*, 2015). Sin embargo, los genotipos resistentes a una enfermedad en un ambiente determinado pueden no ser eficientes en otro donde hay una fuerte presión de la enfermedad u otra raza del patógeno. Se pueden encontrar altos niveles de resistencia, pero rara vez un genotipo es altamente resistente a todas las enfermedades (Paliwal *et al.*, 2001).

#### **2.7.1.1. Resistencia a *Exserohilum turcicum* en maíz**

En tizón norteño, la resistencia cualitativa típicamente confiere un alto nivel de resistencia, usualmente a una raza específica, y está basada en la acción de genes simples o de acción dominante, mientras que la resistencia cuantitativa es típicamente parcial y a un conjunto de razas no específicas, con herencia oligogénica o poligénica y condicionada por genes aditivos o parcialmente dominantes (Van Inghelandt *et al.*, 2012).

Los medios más eficientes, eficaces, seguros para el ambiente y económicos para controlar el tizón foliar, es mediante el uso de genotipos resistentes, siendo el uso de la resistencia cuantitativa el más empleado. Los diversos genes que operan el carácter cualitativo de la resistencia son llamados comúnmente Ht1, Ht2, Ht3 y HtN (Gevers 1975; Hooker 1977) y en su combinación favorecen la resistencia cuantitativa.

En la resistencia a razas no específicas o resistencia poligénica, múltiples genes actúan en conjunto para generar resistencia al tizón. Esta resistencia no es específica a razas individuales, sino que es igualmente efectiva contra diferentes razas. Este tipo de

resistencia es considerada durable a través del tiempo con respecto a la resistencia monogénica. En este caso, la resistencia parece ser aditiva o complementaria pero no es absoluta, por lo cual no otorga inmunidad total al tizón (Llacer *et al*, 2000).

Es característico en la resistencia poligénica que el desarrollo de la enfermedad sea más lento, con menor cantidad de lesiones y de menor tamaño. La resistencia poligénica, también llamada horizontal, se caracteriza por su estabilidad, la cual está dada también por la estabilidad de los patotipos del patógeno. La selección estabilizadora favorece los patotipos de agresividad media y actúa contra las variantes extremas (Robinson, 1987).

El mejoramiento en busca de resistencia vertical, o monogénica se realiza a través de líneas puras con uno o varios genes incluidos de resistencia a la enfermedad; mientras que la resistencia horizontal se efectúa mediante multilíneas, donde un genotipo del cultivo está formado por varios patotipos verticales que reúnen un grupo de genes de resistencia a la enfermedad. Dentro de los métodos de mejora para la resistencia a enfermedades los más utilizados son la selección y la hibridación (Wastie, 1991).

La selección se utiliza cuando los genes de resistencia se encuentran en variedades. Si el carácter a utilizar es monogénico de tipo dominante se emplea la selección individual, si es de tipo recesivo la selección masal; en cambio si el carácter es poligénico en plantas autógamas se emplea la selección individual y en alógamas la selección recurrente (Cornide *et al.*, 1993).

#### **2.7.1.2. Resistencia cualitativa a *Exserohilum turcicum***

La resistencia monogénica se caracteriza porque ocurre la formación de lesiones cloróticas, un retraso en la aparición de necrosis, y una reducción marcada en la esporulación. Las razas de *E. turcicum* se definen en función de sus reacciones fenotípicas cuando se inoculan en un conjunto de líneas diferenciales de maíz.

En este sistema cualitativo, las razas de *E. turcicum* se asignan de acuerdo con la presencia de genes de virulencia a maíz, por ejemplo, *E. turcicum* raza 0 es ineficaz (avirulenta) en contra de todos los genes Ht que se ha descrito, mientras que la raza 1 sólo es efectiva (virulenta) contra Ht1. Ambas razas son eficaces contra los genotipos de maíz que carecen de todos los genes de resistencia (Harlapur *et al.*, 2007).

### **2.7.1.3. Resistencia cuantitativa a *Exserohilum turcicum***

La resistencia parcial se expresa como una reducción en el desarrollo de la enfermedad y en el porcentaje de área foliar infectada, y por consecuencia puede resultar de la expresión de varios componentes, incluido el período de incubación, período de latencia, tamaño de la lesión, número de lesiones, la velocidad y la intensidad de la esporulación. El aumento en latencia o período de incubación es el componente más relacionado con el desarrollo de la enfermedad en plantas adultas, y se expresa de manera diferente en un rango de condiciones de temperatura y de luz (Cardwell *et al.*, 1997; Agrios, 2008).

Cuantitativamente, los rangos de resistencia parcial van de un nivel alto con pocas y pequeñas lesiones, a un nivel bajo, con muchas lesiones, grandes y con esporulación abundante. La resistencia parcial es condicionada por relativamente pocos genes en algunos casos, pero en otros esta es controlada por muchos genes con efectos mayores (Fisher *et al.*, 1976).

La resistencia parcial del maíz a NLB se hereda de forma poligénica con la mayoría de genes expresando acción génica aditiva. Al respecto, estudios de mapeo utilizando translocaciones recíprocas y marcadores moleculares indican que los *loci* de rasgos cuantitativos (QTL) de los 10 cromosomas de maíz pueden estar involucrados (Welz y Geiger, 2000; Huang *et al.*, 2002; Ogliari *et al.*, 2005; Wisser *et al.*, 2006. La resistencia poligénica parcial se considera que es más duradera ya que en el caso de un solo gen de resistencia, este puede ser vulnerable al desarrollo de nuevas razas (Leonard *et al.*, 1989).

### **2.7.2. Tolerancia**

La tolerancia al tizón foliar ocurre después de la infección de las plantas por el hongo. Las plantas tolerantes tienen la capacidad de producir una buena cosecha aun cuando estén infectadas. Evidentemente, las plantas tolerantes son susceptibles al patógeno pero no son destruidas por el mismo y, en general muestran poco daño. Para cuantificar la tolerancia es necesario determinar la cantidad de infección y la reducción del rendimiento como consecuencia de la infección del patógeno.

### **2.7.3. Evasión**

La evasión reduce la probabilidad de contacto entre el hospedante ante un posible atacante, usualmente es el resultado de una morfología especial, fenología u aroma del posible hospedero potencial. Los mecanismos de evasión actúan antes del establecimiento del contacto íntimo entre el hospedante y el parásito. La arquitectura de la planta, puede conducir a la evasión de hongos patógenos (Llacer, 2000). Por ejemplo, se ha demostrado que en plantas con hojas erectas, son pocas las esporas depositadas en comparación con plantas con hojas horizontales, en donde se ha encontrado una mayor cantidad de inóculo (Niks *et al.*, 2014).

La evasión es resultado de características determinadas genéticamente por la planta, aunque puede confundirse con escape, el cual no es causado por características propias (genéticas) de la planta, sino, que obedece a condiciones ambientales, manejo del cultivo, baja densidad de inóculo; y es un término utilizado para referirse a las plantas que no están infectadas o están menos infectadas debido al azar (Niks *et al.* 2014).

Un ejemplo de escape, ocurre cuando las plantas no son infectadas, es decir no hay contacto entre el patógeno y el huésped, puesto que los tres factores necesarios para el desarrollo de la enfermedad (hospedante, patógeno y ambiente) no coinciden o no interactúan en el momento oportuno o éste no tiene una suficiente duración. Un

ejemplo de escape se presenta en el cambio en fechas de siembra, permitiendo que una especie pueda desarrollarse y ser cosechada antes de que la temperatura y humedad relativa sean favorables para que algún patógeno la infecte en alguna etapa de su ciclo (Llacer *et al.*, 2000).

#### **2.7.4. Evaluación de la resistencia a tizón foliar**

Severidad de la enfermedad, incidencia de la enfermedad, densidad de lesiones, tamaño de lesión y área bajo la curva del progreso de la enfermedad, son los parámetros comúnmente utilizados para la evaluación de la resistencia en maíz a tizón foliar (Adipala, 1994).

La variable utilizada para la evaluación de la resistencia a tizón en plantas de maíz es la severidad de la enfermedad, la cual es común cuantificarla por medio de escalas porcentuales como: 0, 2, 5, 10, 25 y 50, para los respectivos grados de severidad alcanzados en cada evaluación, hasta lograr porcentajes de 50 o más (Pedroza, 1995).

Para medir la severidad causada por *E. turcicum* en maíz, se determina el área afectada (hojas) por la enfermedad en relación con el total de la lámina foliar. En este caso, se evalúan tres hojas de cada planta: hoja de la mazorca (HM), hoja inmediata inferior a la mazorca (HM-1) y hoja inmediata superior a la mazorca (HM+1). De lo cual, se obtiene un promedio mediante evaluaciones visuales, para determinar el porcentaje de área foliar afectada (Bleicher, 1988).

Durante las evaluaciones, se puede apreciar un aumento de la severidad del tizón foliar, esto se debe a la expansión de las lesiones existentes y a la aparición de nuevas lesiones. Dicha severidad, depende de la densidad de inóculo, condiciones ambientales y el grado de resistencia genética de los materiales cultivados. Por lo que se deben tomar varias mediciones, para medir el progreso de la enfermedad.

#### **2.7.4.1. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad**

El patrón de comportamiento de una enfermedad en términos del número de lesiones, la cantidad de tejido dañado o el número de plantas enfermas, se puede representar por una curva que muestra el avance de la epidemia a través del tiempo. Esta curva se conoce como curva de progreso de la enfermedad, donde la medición corresponde al área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), y es el resultado de graficar la cantidad de enfermedad en una población de plantas contra el tiempo (López, 2000).

Raymundo y Hooker (1981) encontraron que el modelo del área bajo la curva del progreso de la enfermedad, explica la relación entre la severidad de la enfermedad (tizón foliar) y la pérdida de rendimiento. El área bajo la curva es mayor en híbridos que no poseen genes de resistencia a tizón foliar, que en híbridos que si los tienen (Perkins y Pedersen, 1987).

### **2.8. Rendimiento**

El rendimiento de grano es la consideración fundamental en la producción de maíz. La capacidad del maíz híbrido para producir rendimientos superiores es la principal razón de que los híbridos hayan sustituido en forma tan rápida a las variedades de polinización libre en muchos lugares.

El rendimiento de grano es la característica más compleja con que trabaja el fitomejorador del maíz. El rendimiento básicamente está determinado por la acción de numerosos genes, muchos de los cuales afectan a procesos vitales dentro de la planta, como la nutrición, la fotosíntesis, la transpiración, la translocación y el almacenamiento de los principios nutritivos. También afectan directa o indirectamente al rendimiento, la precocidad, la resistencia al acame, la resistencia a insectos y a las enfermedades, y a la interacción del genotipo de los individuos con el ambiente.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Descripción de la zona de estudio**

El trabajo experimental de evaluación de los materiales se desarrolló en dos localidades localizadas en los Valles Altos, bajo 3 fechas de siembra distintas. La primera fecha fue el 03 de junio de 2016 en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del INIFAP en Santa Lucía de Prías, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México; la segunda fecha ocurrió el día 06 de junio de 2016 en el campo experimental de las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) de la UNAM, en Cuautitlán Izcalli, Estado de México, y la tercera fecha se realizó también en el CEVAMEX el día 24 de junio de 2016.

##### **3.1.1. Condiciones edafoclimáticas de la localidad Cuautitlán**

Esta localidad se encuentra a 19° 42' LN y 99° 11' de LO, a una altitud de 2254 msnm. Presenta un clima Cbw<sub>o</sub> (w) (i') g; lo que es un clima templado, el más seco de los subhúmedos, con régimen de lluvias en verano e invierno seco (menos del 5% de la precipitación anual) con verano largo y fresco, con temperatura extremosa respecto a la oscilación. La temperatura media anual es de 15.7°C (García, 2004). Los suelos presentan una textura fina, son suelos franco arcillosos.

##### **3.1.2. Condiciones edafoclimáticas de la localidad Texcoco**

Esta localidad fue el CEVAMEX que se encuentra en Santa Lucía de Prías, Coatlinchán, Texcoco, ubicada a 19°27'LN, 98°51'LO, y a una altitud de 2240 msnm, la cual tiene un clima Cbw<sub>o</sub> (w) (i') g; esto es un clima templado, el más seco de los subhúmedos, con régimen de lluvias en verano e invierno seco (menos del 5% de la precipitación anual) con verano largo y fresco, con temperatura media anual de 15°C; la oscilación anual de las temperaturas medias mensuales es de 5 a 7°C (García, 2004). Los suelos son de textura franco arenosa.

### 3.2. Material genético

El material genético evaluado consistió de 10 híbridos experimentales de maíz, 5 de ellos en su versión androestéril y fértil, más 10 testigos comerciales, de los cuales 4 son androestériles y 6 son de fertilidad normal. Los 20 genotipos estuvieron bajo dos tratamientos que consistieron en la inoculación con el patógeno *Exserohilum turcicum* y sin inoculación del mismo. La información de los materiales genéticos se presenta en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Híbridos de maíz evaluados para rendimiento y resistencia a tizón foliar en tres ambientes distintos. Ciclo primavera – Verano 2016.

No.	Hibrido	Origen
1	H1 AE	INIFAP-UNAM
2	H1 F	INIFAP-UNAM
3	H2 AE	INIFAP-UNAM
4	H2 F	INIFAP-UNAM
5	H3 AE	INIFAP-UNAM
6	H3 F	INIFAP-UNAM
7	H4 AE	INIFAP-UNAM
8	H4 F	INIFAP-UNAM
9	H5 AE	INIFAP-UNAM
10	H5 F	INIFAP-UNAM
11	H-47 AE	INIFAP-UNAM
12	H-49 AE	INIFAP-UNAM
13	H-53 AE	INIFAP-UNAM
14	H-51 AE	INIFAP
15	H-50 F	INIFAP
16	H-70 F	INIFAP
17	TSIRI PUMA F	UNAM
18	CIMARRON F	MONSANTO
19	ASPROS 823 F	ASPROS
20	P3368W F	PIONNER

AE=androestéril, F= fértil

### **3.3. Diseño experimental**

Los materiales de los dos tratamientos de inoculación se evaluaron en un diseño experimental de bloques completos al azar, estos dos tratamientos se utilizaron en cada uno de los ambientes, se utilizó un bloque para cada tratamiento, debido a la dificultad de la inoculación y para evitar la contaminación en el tratamiento sin inocular.

Se utilizaron 20 híbridos con tres repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental consistió de un surco de cinco metros de largo, con 28 plantas por surco, con una densidad de 70,000 plantas por hectárea, de acuerdo con las recomendaciones técnicas para Valles Altos (Espinosa *et al.*, 2010).

#### **3.3.1. Análisis estadísticos de los datos**

El análisis estadístico, se llevó a cabo con los datos registrados para cada una de las variables agronómicas, se realizó un análisis de varianza considerando los factores: ambientes, tratamientos, genotipos y las interacciones entre ellos. Cuando los valores de F fueron significativos se realizó la prueba de Tukey para comparar las medias de los factores, a un nivel de significancia de 5%.

### **3.4. Aislamiento e identificación del agente causal del tizón foliar**

#### **3.4.1. Colecta de muestras de tizón foliar (*Exserohilum turcicum*)**

Para realizar las evaluaciones de la resistencia a tizón foliar en los 20 genotipos de maíz, en el mes de mayo de 2016 en los municipios de Cuautitlán y Texcoco, Estado de México, se colectaron muestras para la identificación y aislamiento del agente causal de esta enfermedad. Dichas muestras fueron tomadas de siembras de maíz adelantadas al temporal de la zona, que se encontraban alrededor del área donde se establecieron posteriormente los ensayos experimentales.

Se realizó un muestreo en los bordes y centro de los campos sembrados con maíz en las localidades de Cuautitlán y Texcoco; y se seleccionaron hojas de plantas de 2 meses de edad, las cuales presentaban síntomas de tizón foliar, esto es, manchas necróticas en formas alargadas y ovaladas, de color verde-grisáceo o café (Hooker, 1977; De León, 1984), las hojas se colocaron en bolsas de papel y se trasladaron a laboratorio.

Cada una de las hojas se desinfectó durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 1%; posteriormente se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se colocaron en medio de papel secante estéril para eliminar el exceso de humedad.

### **3.4.2. Aislamiento y obtención de cultivos monoconidiales**

De las zonas de avance de la enfermedad, se seleccionaron porciones de  $\frac{1}{2}$  cm<sup>2</sup> de tejido vegetal, las que se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo V8 (300 mL de jugo V8 Herdez®, 19 g de agar, 4 g de CaCO<sub>3</sub> y 700 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril). Las cajas se colocaron durante cinco días con luz normal para el crecimiento del hongo, a temperatura de laboratorio de 25°C.

Una vez transcurrido este tiempo, se observó crecimiento de micelio en las cajas de Petri, por lo que se tomó porciones de medio V8 colonizado y se transfirió en medio V8 nuevo. Las nuevas siembras se colocaron bajo las mismas condiciones que las anteriores durante 10 días, hasta observarse mediante un microscopio estereoscópico SZ2-ILST (Olympus, Japón) la formación de conidios.

Posteriormente, para la obtención de cultivos monoconidiales, se realizó un raspado de micelio en las cajas de Petri y se le agregó agua destilada estéril, agitando constantemente con un asa de siembra, para obtener la mayor cantidad posible de conidios en la suspensión, de la cual se tomó 1 mL y se llevó a un tubo de ensayo con 9 mL de agua estéril, para preparar la solución madre.

Se realizó diluciones seriadas, hasta la  $10^{-4}$ , y se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo agar-agua (17 g de agar y 1000 mL de H<sub>2</sub>O destilada esteril), cinco días posteriores a la siembra se observó la germinación y crecimiento de conidios, los que se transfirieron de forma individual a cajas Petri con medio V8 para el crecimiento del hongo. Las cajas se incubaron durante 10 días a luz normal, hasta observar la colonización casi total del medio de cultivo.

### **3.4.3. Identificación del hongo**

Cada una de las muestras obtenidas se conservó en glicerol al 30% y se mantuvo a -80°C. Posteriormente se procedió a la identificación del patógeno mediante la observación de la morfología y análisis del DNA. El método molecular fue el determinante para la identificación del patógeno, sin embargo, la morfología del patógeno, sirvió como referencia para la identificación del agente causal del tizón foliar.

#### **3.4.3.1. Características morfológicas**

Las características morfológicas se observaron mediante preparaciones microscópicas temporales, tomando una porción de micelio de 12 días de crecimiento, las preparaciones se observaron con un microscopio CX31RBSFA (Olympus, Japón) a 40X, con base en la morfología de sus conidios y conidióforos siguiendo las descripciones de las claves dicotómicas morfológicas de Barnett y Hunter (1998).

#### **3.4.3.2. Estudios moleculares**

##### **3.4.3.2.1. Extracción de DNA de *Exserohilum turcicum***

Se realizó la extracción de DNA con el protocolo de CTAB al 2% (Doyle and Doyle, 1990) con ligeras modificaciones (procedimiento desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas, Colegio de Postgraduados). Para lo cual, en tubos Eppendorf de 2 mL se colocó 1 mL de CTAB al 2% precalentado a 80°C en baño

maría, se agregó una porción de micelio del hongo en estudio, los tubos se incubaron en baño maría a 96°C por 60 min, con agitación cada 10 min utilizando un vortex.

Posteriormente los tubos se centrifugaron a 11500 xg por 5 min, y el sobrenadante se transfirió a tubos de 2 mL con 500 uL de cloroformo-alcohol Isoamílico (24:1), se agitaron por inversión durante 10 min, para centrifugar a 11500 xg por 10 min, donde después se extrajo la fase acuosa y se colocó en tubos de 2 mL cada uno con 700 uL de cloroformo-alcohol Isoamílico (24:1), los tubos se agitaron por inversión durante 10 min, y se centrifugaron a 11500 xg por 10 min.

Una vez realizado lo anterior, de cada tubo se transfirió la fase acuosa a otro de 1.5 mL con 950 uL de Etanol absoluto al 100% previamente enfriado a -20°C, se mezclaron suavemente por inversión al menos 10 veces y se incubaron a -20°C por al menos dos horas. Posteriormente se centrifugaron a 11500 xg durante 30 min y se decantó cada uno evitando perder la pastilla, la cual se resuspendió en 400 uL de agua HPLC y se incubaron a 55°C por 15 min. A cada tubo se añadió 34 uL de NaOAc 3M y 1 mL de etanol al 95%, se mezclaron por inversión 2 veces, y se colocaron a -20 °C por 1 hora.

Después se centrifugaron a 11500 xg durante 5 min y se decantó el sobrenadante. Se hizo un lavado con 600 uL de Isopropanol al 70% y se centrifugaron por 10 min a 11500 xg. Cada pastilla se dejó secar por al menos 1 hora, sin necesidad de realizarse más lavados. Cada pastilla se resuspendió con 40 uL de agua HPLC y se incubaron a 80 °C en baño María durante 10 min para posteriormente realizar la cuantificación de DNA.

#### **3.4.3.2.2. Cuantificación de DNA**

La cuantificación del DNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific, USA), se colocó 1 µL de la muestra a cuantificar, en donde la cuantificación de ácidos nucleicos se determina por la capacidad que tiene la molécula de DNA de absorber la luz ultravioleta

#### **3.4.3.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Mediante la técnica de PCR se realizó la amplificación del *loci* ribosomal de la región correspondiente al Espacio Transcrito Interno (ITS, por sus siglas en inglés) del rDNA, se utilizaron los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') que amplifica un fragmento de aproximadamente 550 pares de bases (bp).

Se utilizó una concentración de 20 ng/μL para la PCR. La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 15 μL conteniendo 7.86 μL de H<sub>2</sub>O estéril, 3 μL de Buffer 5X, 0.6 μL de dNTPs, 0.18 μL de cada *primer*, 0.18 de GoTaq DNA Polimerasa y 3 μL de DNA genómico.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador C100 Touch (BIORAD, USA). Las condiciones de amplificación fue un ciclo inicial de desnaturalización de 4 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de. 1 min a 95°C para desnaturalización, 1 min a 58°C para alineamiento y 2 min a 72°C para extensión; y un ciclo final de desnaturalización de 10 min a 72°C.

#### **3.4.3.2.4. Electroforesis**

Se verificó la calidad y el tamaño del fragmento amplificado por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, al cual se le agrego 4 uL de Gelred (Biotim, USA) para visualizar la corrida de las bandas en el gel. Se cargó cada una de las muestras (3 uL de producto de PCR con un buffer 6X) en cada uno de los pozos del gel, realizando la corrida electroforética a 110 volts constantes por aproximadamente 90 minutos. Posteriormente, se visualizó la presencia de bandas utilizando un transiluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX (Vilber Lourmat, Alemania).

#### **3.4.3.2.5 Limpieza de producto PCR**

Los productos de PCR se purificaron mediante una reacción enzimática con ExoSAP-IT® (Affymetrix, USA). Se mezclaron 5 µL del producto de PCR con 2 µL de ExoSAP, obteniendo un volumen final de 7 µL; para posteriormente incubarlo en un termociclador (BIORAD, MEX) a 37°C por 15 min para que las enzimas de ExoSAP degraden el remanente de iniciadores y nucleótidos no utilizados en la reacción de PCR. Finalmente se inactivaron las enzimas de ExoSAP a 80°C por 15 min.

#### **3.4.3.2.6. Secuenciación**

Para calcular la cantidad correcta del templado (producto de PCR) a usar en una reacción de secuenciación se realizó la cuantificación del producto de PCR purificado con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

Para cada una de las reacciones, se colocaron 18 µL del buffer BigDye® Terminator v3.1 (1X) (Applied Biosystems, USA) más 2 µL de cada una de las muestras en los pozos de la placa de secuenciación. Posteriormente se colocó la placa en el termociclador (BIORAD, MEX) con el siguiente programa: un ciclo inicial de 1 min a 96°C, seguido de 25 ciclos de. 10 s a 96°C, 50 s a 50°C y 4 min a 60°C; y un ciclo final de tiempo indeterminado a 4°C.

Los productos de secuenciación se precipitaron con etanol/EDTA, y la placa se colocó en el Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA). Se secuenciaron las dos hebras de DNA.

#### **3.4.3.2.7. Análisis bioinformático y comparación**

Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia se compiló en un archivo fasta y se alineó con el *profile* mode del Clustal W

1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa MEGA7 (Tamura *et al.*, 2017). Estas secuencias, se compararon con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN (Zhang *et al.*, 2000).

### **3.5. Producción del inóculo**

Se realizaron incrementos en cajas de Petri con medio de cultivo V8, incubándose durante 15 días, a luz normal y a una temperatura aproximada de 25°C, para obtener una buena colonización y esporulación del patógeno y asegurar la obtención de conidios para la inoculación en campo.

El inóculo se preparó en las cajas Petri, a partir de la mezcla de los aislamientos que coincidieron con la misma cepa, mediante la frotación de la superficie del micelio con agua destilada estéril, utilizando manta de cielo como colador para evitar impurezas y recogiendo las esporas en un recipiente estéril. Posteriormente, con ayuda de la cámara de Neubauer la concentración de conidios en cada suspensión se ajustó a  $4 \times 10^5$  conidios por mL (Rajeshwar *et al.*, 2013).

### **3.6. Inoculación**

La inoculación de las plantas con el patógeno se llevó a cabo cuando ocurrió el 50% de la floración femenina en cada parcela, identificando el estado fenológico R1 del maíz (emergencia de estigmas) (Perkins y Pedersen, 1987), y a los siete días se llevó a cabo otra inoculación, y a partir de este momento se realizaron las primeras evaluaciones visuales, determinando incidencia y severidad de la enfermedad, para esta última variable se utilizó área foliar afectada mediante la escala de Elliot y Jenkis (1946) modificada por Muiru (2007).

Los surcos sembrados con cada uno de los híbridos para el tratamiento de inoculación se asperjaron con la suspensión preparada de conidios, mediante una

bomba de aspersión motorizada a los 65 días después de la siembra y después de 16:00 horas (Harlapur, 2005), para asegurar la presencia del inóculo en el ensayo. Mientras que los surcos con el tratamiento sin inoculación, no fueron inoculados.

### **3.7. Manejo agronómico**

En cada una de las localidades se preparó el terreno de forma mecánica, que consistió en pasar una vez el arado, un rastreo, la nivelación y el surcado a 80 cm entre surcos. La siembra se realizó depositando 3 semillas cada 25 cm, y posteriormente haciendo un aclareo a los 30 días, para obtener la densidad de población deseada. En cada ensayo experimental se aplicó un riego de auxilio a los 20 días después de la siembra.

Para el control de malezas se efectuaron aplicaciones de herbicida un día después de la siembra, utilizando una mezcla de 2 L de Hierbamina® (2,4 D amina) y 3 kg de Gesaprim® calibre 90 (atrazina), por hectárea. Treinta días después a la siembra, se aplicó una mezcla de 3 L de Sansón 4SC® (nicosulfurón), 3 L de Hierbamina® y 3 kg de Gesaprim® calibre 90, por hectárea.

Se tuvo constante vigilancia durante el desarrollo del cultivo, y se etiquetó cada material para su identificación. Se tomaron variables como floraciones, alturas, entre otras. La cosecha se efectuó de forma manual, colectando todas las mazorcas, incluyendo las dañadas.

### **3.8. Variables evaluadas**

**Floración masculina.** Se registró el número de días transcurridos desde la siembra hasta que apareció el 50% de las espigas, para cada uno de los surcos de cada genotipo.

**Floración femenina.** Se registró el número de días transcurridos, desde la siembra hasta la aparición del 50% de los estigmas, para cada uno de los surcos de cada genotipo.

**Altura de planta.** Se tomaron al azar 5 plantas en cada parcela, las cuales se midieron desde la base de la planta o punto de inserción de las raíces, hasta el inicio de la panoja o donde la espiga comienza a dividirse, y se registró el promedio de las cinco plantas.

**Altura de la mazorca.** Se tomaron al azar 5 plantas en cada parcela, en las cuales se midió la longitud desde la base de la planta hasta el nudo donde se inserta la mazorca más alta, el promedio de las cinco plantas se tomó como dato final.

**Peso volumétrico.** Se tomó una muestra de 5 mazorcas en cada parcela y se desgranaron, se pesó el grano en una balanza hectolítrica para obtener la relación de la muestra a un litro, y se expresó  $\text{kg hL}^{-1}$ .

**Peso de 200 granos.** Se tomó una muestra de 5 mazorcas de cada parcela y se desgranaron. Se contaron 200 granos, se pesaron y el valor se expresó en gramos.

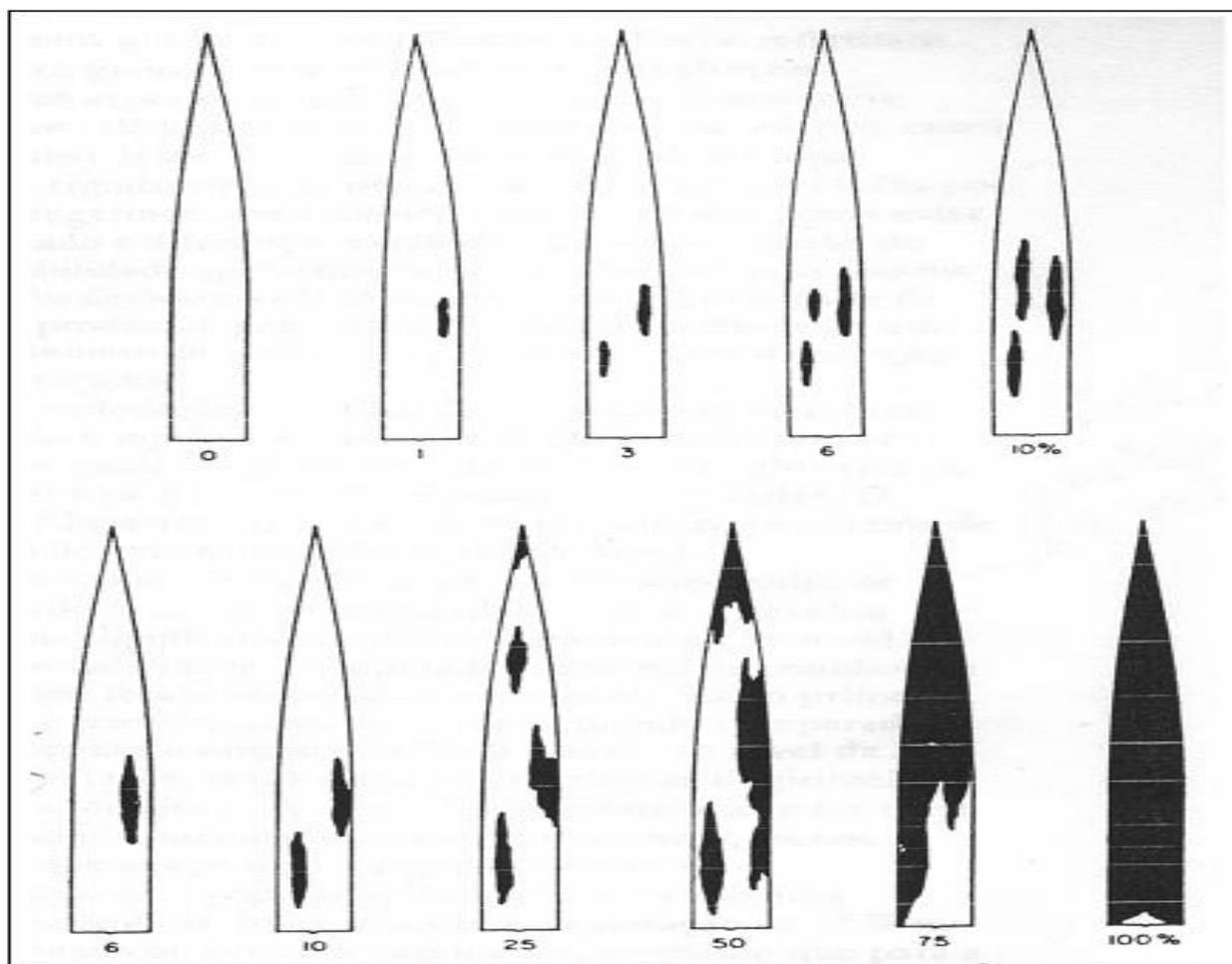
**% de grano.** Resultó de la relación entre el peso del grano y el peso total de la muestra que se obtuvo y se multiplicó por 100.

$$\% \text{ grano} = (\text{peso sin olote} / \text{peso con olote}) \times 100$$

**Incidencia,** el porcentaje de individuos infectados con el patógeno, respecto al total de plantas en la parcela experimental.

**Porcentaje de severidad de tizón foliar,** la severidad de tizón norteño en maíz fue evaluada visualmente en rangos desde 0 a 100% de área foliar infectada en cada parcela, para lo cual se realizaron mediciones visuales utilizando la escala de Elliot y Jenkis (1946) modificada por Muiru (2007) (Cuadro 4) auxiliándose con la escala diagramática propuesta por Bleicher (1998). (Figura 2), desde los siete días posteriores

a la inoculación y hasta cuando la planta entró a la madurez fisiológica, dado que una vez que las plantas entran en senescencia, la evaluación de las hojas ya no es confiable por lo tanto las calificaciones se detienen (Balint *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Escala diagramática para evaluación de porcentaje de tejido foliar dañado por *E. turcicum* (Pass.) Leonard y Suggs. Elaborada por Bleicher (1988).

**Cuadro 4.** Escala para evaluar severidad de tizón norteño de la hoja en maíz, realizada por Elliot y Jenkis (1946) modificada por Muiru (2007).

Valor	Área infectada de la hoja (%)	Nivel de resistencia
0	No síntomas	Inmune
0.5	Muy poca infección, una o dos lesiones restringidas a hojas inferiores. (<5%)	Altamente resistente
1.0	Infección leve, unas pocas lesiones (3-8) en hojas inferiores (6-10).	Resistente
2.0	Infección ligera, moderado número de lesiones (9-15) en hojas inferiores (11-25%).	Moderadamente resistente
3.0	Infección moderada, abundantes lesiones (>16) en hojas inferiores y unas pocas en hojas intermedias (26-50%).	Moderadamente susceptible
4.0	Infección fuerte, lesiones abundantes en hojas inferiores e intermedias y extendiéndose a hojas superiores (51-75%).	Susceptible
5.0	Infección muy fuerte, lesiones abundantes en todas las hojas y la planta podría secarse (> 75%).	Altamente susceptible

**Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)**, se calculó integrando los rectángulos formados por el punto medio de la intensidad de la enfermedad (% de severidad) alcanzada entre los tiempos en que se realizó una medición y otra, se obtuvo con la siguiente ecuación (Toley y Grau, 1984):

$$ADCPE = \sum_{i=1}^n \left( \frac{x_{i+1} + x_i}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Donde

$x_i$ = severidad de la enfermedad en la medición  $i$  u medición inicial.

$t_i$ = tiempo en días en la  $i$  medición

$n$ = número total de observaciones.

**Rendimiento**, es la productividad de grano que presenta cada uno de los genotipos de maíz en evaluación, se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = (\text{P.C.} * \% \text{M.S.} * \% \text{G} * \text{F.C.}) / 8600$$

Dónde:

- P.C.= peso de campo de la totalidad de las mazorcas cosechadas de cada parcela expresada en kilogramos.
- % M.S.= porcentaje de materia seca de la muestra de grano de cinco mazorcas.
- % G.= porcentaje de grano, que se obtuvo del cociente del peso de la muestra de cinco mazorcas sin olote y el peso de la muestra de las cinco mazorcas con olote multiplicado por 100.
- F.C.= factor de conversión para obtener rendimiento por hectárea, que se obtuvo al dividir 10 000 m<sup>2</sup> entre el tamaño de la parcela útil en m<sup>2</sup>.
- 8600 = constante para estimar el rendimiento con una humedad comercial del 14%.

El resultado obtenido se expresó en kg ha<sup>-1</sup>.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Aislamiento e identificación del agente causal

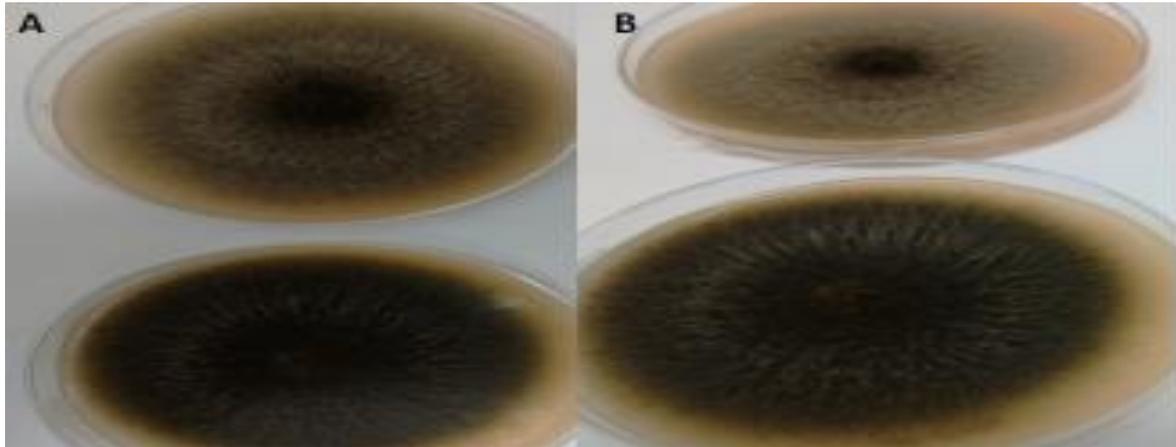
#### 4.1.1. Aislamientos

De plantas de maíz de dos meses de edad se obtuvieron porciones de tejido vivo con síntomas de tizón foliar, esto es, manchas necróticas en formas alargadas y ovaladas, de color verde-grisáceo o café, en las localidades de Cuautitlán y Texcoco, del tejido foliar se cultivó la zona de avance de la enfermedad en medio V8 y se obtuvieron 20 aislamientos del hongo en estudio.

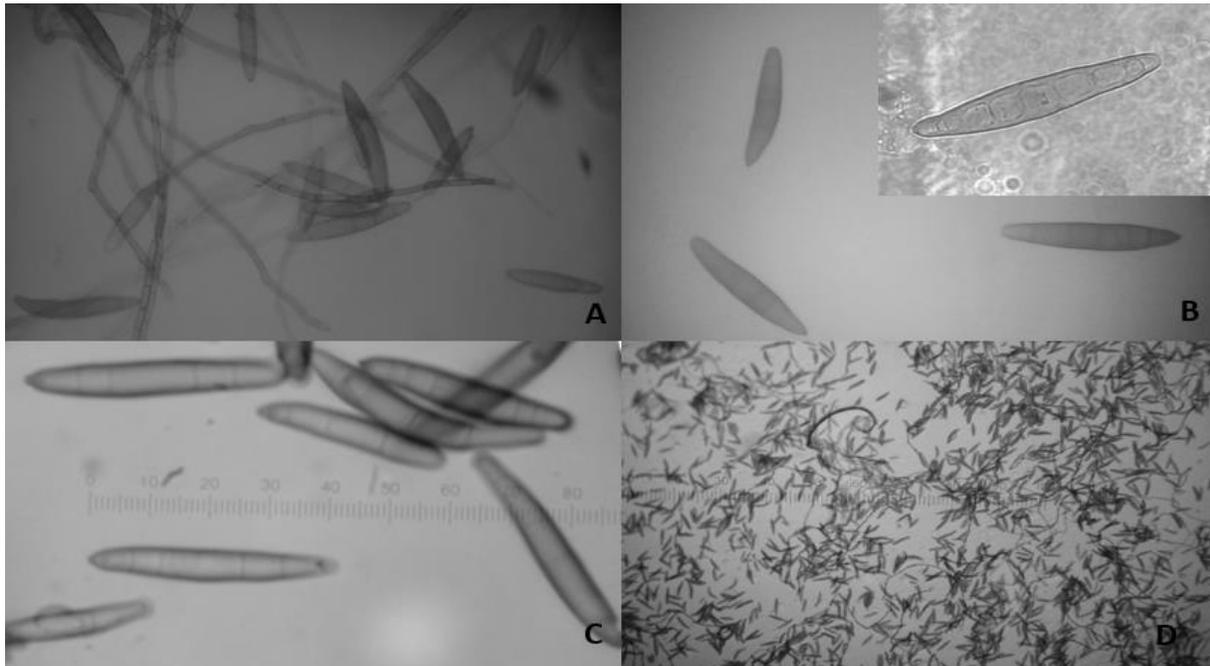


**Figura 3.** (A) plantas de maíz de dos meses de edad de donde fueron colectadas muestras del patógeno. (B) y (C) Hojas de maíz con presencia de síntomas de tizón foliar.

#### 4.1.2. Morfología



**Figura 4.** Aislamientos de *Exserohilum turcicum*. (A) y (B) crecimiento micelial del hongo en medio de cultivo V8, con crecimiento radial color café oscuro, y presencia de micelio aéreo color gris.



**Figura 5.** (A) Conidios y micelio en aislamientos de *Exserohilum turcicum* observados a 40X. (B) y (C) Conidios de *Exserohilum turcicum* observados a 40X. (D) Conidios de *Exserohilum turcicum* observados en la suspensión de inoculación a 10X. Imágenes observadas con microscopio electrónico CX31RBSFA (Olympus, Japón).

En campo se observaron en las hojas del maíz en el estado fenológico R1 (emergencia de estigmas), una semana después de la inoculación, pocas lesiones ovaladas y ligeramente alargadas paralelas a la nervadura central, bien definidas de color gris-olivo-verdoso o café oscuro con bordes ligeramente amarillentos (sin formar un halo clorótico) que dieron lugar a áreas necróticas, dichas regiones fueron más visibles en las hojas del tercio inferior de las plantas en los primeros 15 días posteriores a la inoculación.

La longitud de las lesiones varió de 0.5 hasta 6 cm y un ancho de 0.5 a 3 cm aproximadamente, las cuales no estaban delimitadas por ninguna nervadura y en algunos casos se observó que las lesiones se fusionaron. Las primeras fusiones, se observaron en el tercio inferior de la planta, y aparecieron pocas lesiones en el tercio medio, y unas cuantas en el tercio superior de las plantas (hacia la panícula), todo esto sucedió alrededor de los 30 días posteriores a la inoculación.

Se tomaron porciones de tejido vivo asintomático, asociado al tizón foliar del maíz, y se llevaron a laboratorio, donde crecieron en forma radial e irregular en el medio de cultivo V8; su color en este medio de cultivo fue de café-olivo y gris-olivo. Los crecimientos se observaron en microscopio estereoscópico SZ2-ILST (Olympus, Japón), contándose de uno a tres conidios unidos a los conidióforos y coincidiendo con las claves dicotómicas de Barnett y Hunter (1998) hasta llegar al género *Helminthosporium*.

Se observó el desarrollo de conidios rectos y ligeramente curvos de forma elipsoidal, los cuales presentaron un hilum no tan prominente, pero si visible; esto es una característica distintiva para la identificación del genero *Exserohilum* y se observó micelio septado, lo cual coincide con las características reportadas por White (2004).

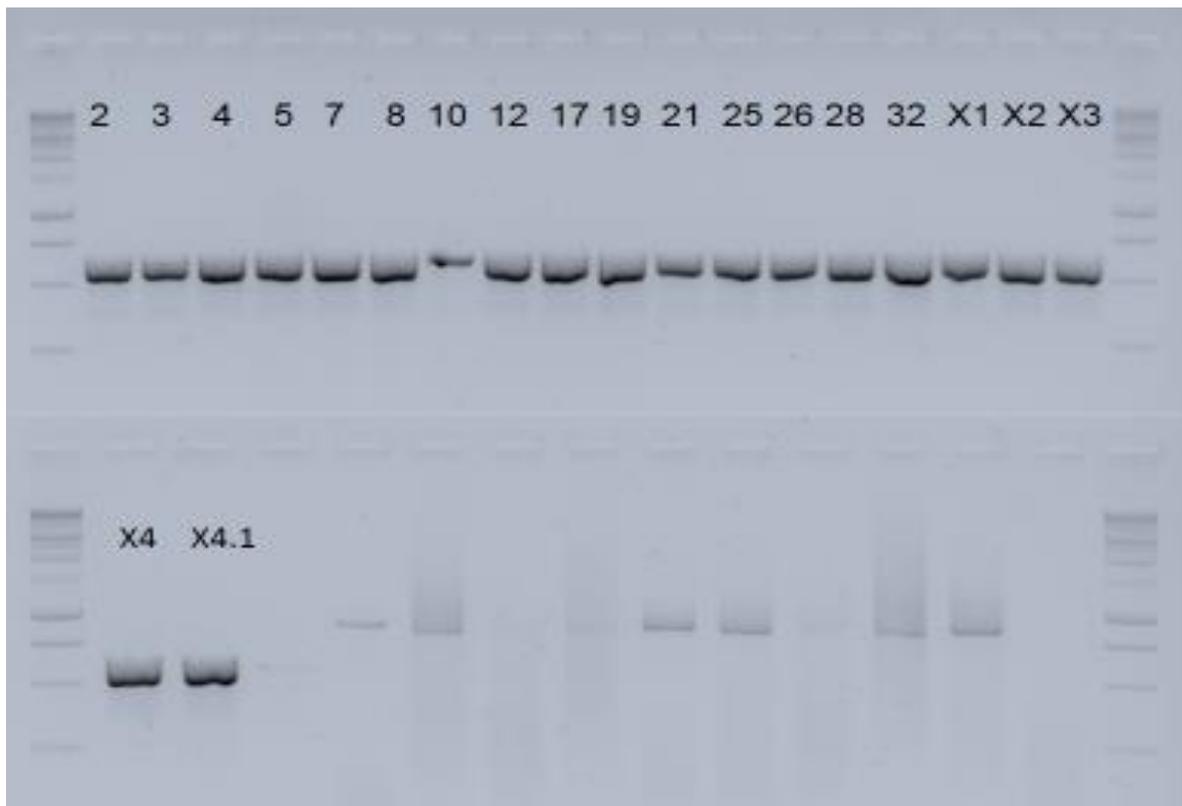
De acuerdo con las características morfológicas observadas en las colonias miceliales y las preparaciones temporales de aislados del patógeno asociado al tizón foliar del maíz, estas coincidieron con las descritas en estudios previos (Hooker, 1977;

Leonard, 1989; White, 2004), lo que permitió identificar a dicho organismo como *Helminthosporium* (*Exserohilum turcicum*) presente en las siembras de maíz en los municipios de Cuautitlán y Texcoco).

## 4.2. Análisis molecular

### 4.2.1. Amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS)

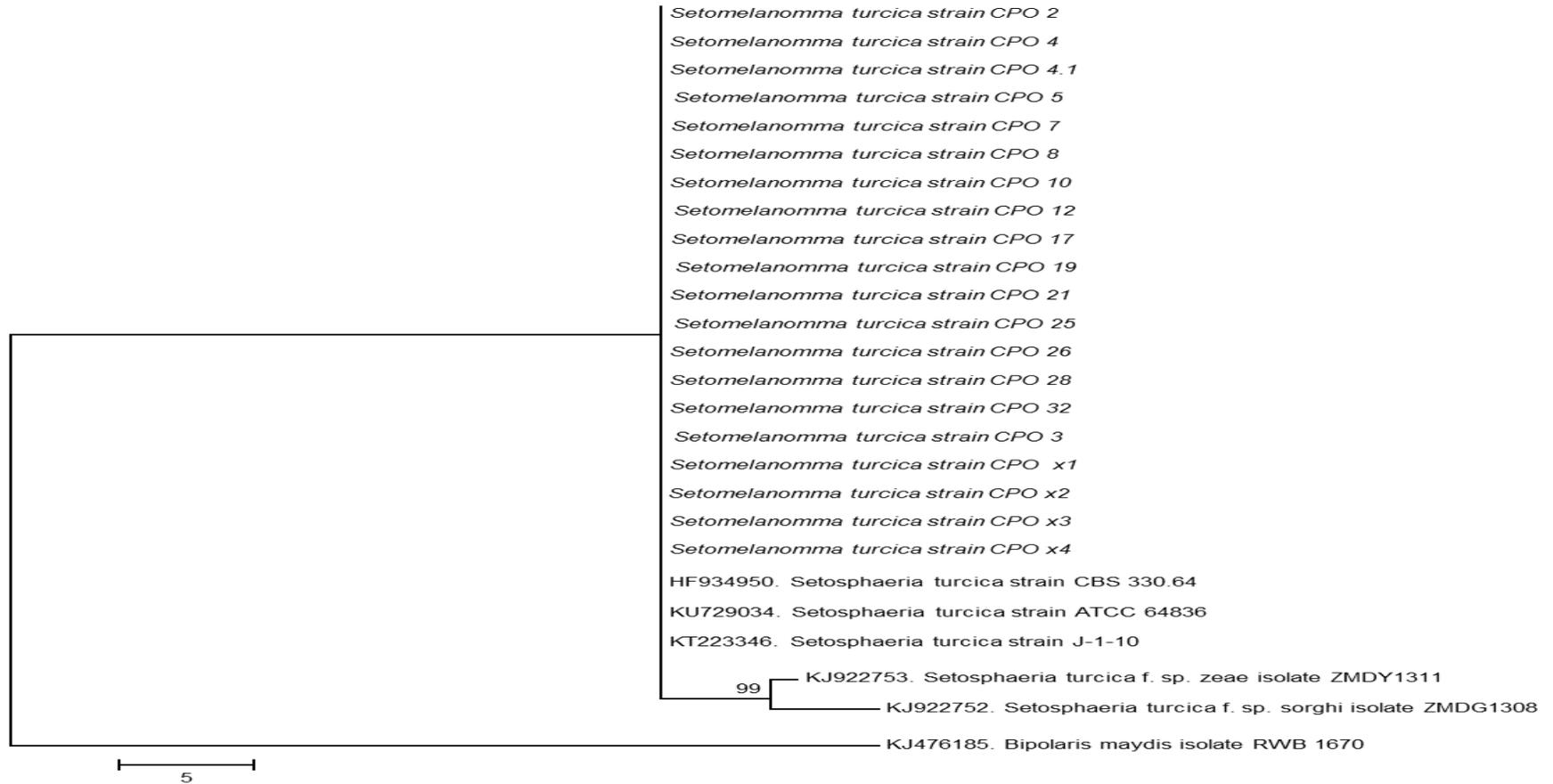
Para los 20 aislamientos del hongo se realizó la extracción de DNA y se amplificó la región ITS (Figura 6).



**Figura 6.** Amplificación por PCR del Espacio Transcrito Interno del rDNA de los 20 aislamientos del hongo obtenido de muestras de maíz, con un tamaño de banda esperado de ~550 bp.

#### 4.2.2. Construcción del árbol filogenético

El árbol filogenético se construyó con secuencias de 550 bp de longitud obtenidas de la amplificación de la región del ITS (Figura 7).



**Figura 7.** Árbol filogenético de *Exserohilum turcicum*

Los análisis de las secuencias de DNA para la identificación molecular de *Exserohilum* mostraron alto porcentaje de identidad, comparadas con muestras ya depositadas en el GENBANK del NCBI. Se formó un clado con las secuencias de los aislamientos obtenidos y con tres cepas de referencia. Se obtuvieron tres cepas diferentes de los 20 aislamientos del patógeno estas fueron: CBS, ATCC y J-1-10,

Las cepas de los aislamientos 2, 3, 4, 7, 10, 21, 26, 32, X2, X3 y X4 presentaron máxima identidad (100%) con la cepa número HF934950 la cual fue aislada en Estados Unidos, publicada el 14 de mayo de 2015 donde el patógeno identificado es *Setosphaeria turcica*, estas cepas se utilizaron para la producción del inóculo que se utilizó en campo.

Las cepas de los aislamientos 4.1 y 17 presentaron máxima identidad (100%) con la cepa número KU729034 la cual fue aislada en Carolina del Sur, Estados Unidos, publicada el 14 de junio de 2016 donde el patógeno identificado es *Setosphaeria turcica*.

Las cepas de los aislamientos 5, 8, 12, 19, 25, 28 y X1 presentaron máxima identidad (100%) con la cepa número KT223346 la cual fue aislada en Canadá, publicada el 28 de noviembre de 2015 donde el patógeno identificado es *Setosphaeria turcica*.

De acuerdo a Martin y Rygiewicz (2005), la identificación y caracterización de patógenos fúngicos, antes solamente se basaba en rasgos morfológicos. Hoy en día, las herramientas moleculares, como la secuenciación del rRNA, permiten mayor precisión en la identificación de especies. En este caso de *Exserohilum turcicum*, se pudo avanzar en la presente investigación con la seguridad de que se estaba trabajando con el agente causal del tizón norteño del maíz, situación que no hubiese sido posible utilizando solamente métodos morfológicos.

### 4.3. Rendimiento y resistencia

El análisis de varianza combinado detectó significancia ( $p < 0.01$ ) entre ambientes para todas las variables, excepto para área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y severidad final (SF), en las cuales no hubo significancia estadística. Entre tratamientos de inoculación se detectaron diferencias altamente significativas para las variables rendimiento, ABCPE, SF y peso volumétrico, no así para las otras variables. En el factor de variación genotipos hubo significancia ( $p < 0.01$ ) para todas las variables (Cuadro 4).

Este resultado indica que los ambientes fueron contrastantes en los valores de las variables de rendimiento y agronómicas evaluadas de los materiales, pero también que este factor de variación tuvo un comportamiento consistente en los valores para variables de la enfermedad tizón, como la ABCPE y SF en los tres ambientes.

En el factor de variación, interacción AMBIENTES\*TRATAMIENTOS no se detectaron diferencias significativas para ninguna variable, en cambio en el factor de variación de la interacción AMBIENTE\*GENOTIPOS el análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas para las variables: rendimiento, ABCPE, SF, floración masculina y femenina, altura de planta, así como significancia ( $p < 0.05$ ) para altura de mazorca, peso de 200 granos, peso volumétrico y porcentaje de grano.

Estos resultados sugieren por un lado que los tratamientos de inoculación tuvieron valores consistentes a través de los ambientes para cada variable, y por el otro indican que los genotipos tuvieron valores contrastantes a través de ambientes, tanto para variables agronómicas como de la enfermedad tizón norteño del maíz.

En el caso de la interacción TRATAMIENTOS\*GENOTIPOS, esta resultó significativa ( $p < 0.01$ ) para las variables rendimiento, ABCPE, SF y significativa con  $p < 0.05$  para altura de mazorca y altura de planta, lo cual puede interpretarse como un comportamiento diferente de los genotipos a través de los tratamientos de inoculación,

lo que da idea de que hubo un efecto realizar la inoculación o no, sobre las variables medidas en cada material genético.

Los coeficientes de variación resultaron de magnitud aceptable (menos de 20%), con valores de 2.16 a 14.96, lo que significa que se tuvo un control adecuado de la variación experimental y que los datos obtenidos para las variables de esta investigación son confiables (Cuadro 4).

Es importante mencionar que el rendimiento de grano se utilizó para evaluar la capacidad productiva y de tolerancia de los diferentes genotipos de maíz, y que dicha variable tuvo alta significancia entre ambientes, entre tratamientos de inoculación y entre los genotipos.

Por otra parte, para la evaluación de la resistencia a tizón foliar en la planta de maíz, las variables utilizadas fueron: ABCPE y severidad final, y estas resultaron significativas solamente entre tratamientos y entre genotipos. Además, estas tres variables también resultaron significativas en las interacciones AMBIENTE\*GENOTIPOS y TRATAMIENTOS\*GENOTIPOS.

**Cuadro 5.** Cuadrados medios y significancia estadística en el análisis de varianza combinado para diversas variables evaluadas en 20 híbridos de maíz, sometidos a inoculación y sin inoculación de tizón foliar (*Exserohilum turcicum*), en 3 ambientes diferentes de Valles Altos. Ciclo Primavera-Verano 2016.

<b>FV</b>	<b>G L</b>	<b>REND</b>	<b>ABCPE</b>	<b>SF</b>	<b>FM</b>	<b>FF</b>	<b>AP</b>	<b>AM</b>	<b>200G</b>	<b>PV</b>	<b>%G</b>
<b>A</b>	2	307242581 **	20398.84	25.28	195.98* *	236.74* *	69553.30 **	3615.87* *	14143.25 **	151.81* *	56.29* *
<b>R/A</b>	6	996514	20542.19	20.07	14.28	13.96	186.63	18.55	19.8	43.34	3.58
<b>TRA</b>	1	7563399**	3365450.15 **	2586.74* *	12.1	11.38	245.05	41.34	42.03	177.80* *	3.72
<b>GEN</b>	19	107174892 **	260778.49**	163.67**	128.51* *	140.23* *	3532.97**	930.84**	458.35**	45.63**	15.15* *
<b>A*TRA</b>	2	1359532	1085.75	3.61	12.78	16	273.43	12.67	61.23	63.12	0.24
<b>A*GEN</b>	38	5495553**	41519.09**	23.74**	25.51**	27.41**	516.58**	160.35*	103.44*	30.15*	5.30*
<b>TRA*GEN</b>	19	3371383**	70893.53**	35.42**	7.91	8.75	209.53*	188.70*	57.94	9.53	5.04
<b>CV</b>		12.44	10.78	14.96	3.33	3.35	4.57	9.11	11.67	4.63	2.16

\*, \*\* Valores significativos y altamente significativos al 0.05 y 0.01 de probabilidad. A= ambiente, R= repetición, TRA= tratamiento, GEN= genotipo, CV= coeficiente de variación, GL= grados de libertad, REND= rendimiento, ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad, SF= severidad final, FM= floración masculina, FF= floración femenina, AP= altura de planta, AM= altura de mazorca, 200 G = peso de 200 granos, PV= peso volumétrico, %G= porcentaje de grano.

La comparación de medias entre ambientes detectó diferencias para todas las variables, excepto ABCPE y SF. Las variables rendimiento, floración masculina, altura de planta, altura de mazorca y peso de 200 granos; se agruparon en tres clases diferentes, mientras que floración femenina, peso volumétrico y porcentaje de grano; se agruparon en solo dos clases (Cuadro 5).

Para la variable rendimiento de grano se definieron tres grupos de significancia, donde el mayor rendimiento se produjo en el ambiente FESC (9573 kg ha<sup>-1</sup>), seguido por CEVAMEX 1 (7923 kg ha<sup>-1</sup>) y por último CEVAMEX 2 (6374 kg ha<sup>-1</sup>), cada uno en un grupo diferente. Las variables ABCPE y SF, se comportaron estadísticamente de manera similar en los tres ambientes, agrupándose dentro de la misma clase.

Es importante mencionar que el rendimiento de grano, es una de las consideraciones relevantes en la productividad del cultivo de maíz, donde intervienen diferentes factores, en este caso a pesar de presentarse al parecer ciertas condiciones edafoclimáticas similares en los 3 ambientes, el tipo de suelo y el manejo agronómico diferente entre los ambientes pudo influir en el desarrollo de los genotipos de maíz y por tanto en su rendimiento, podría haber influido que se tuvo mayor vigilancia y cuidado del ensayo en la localidad FESC Cuautitlán y por tanto el desempeño de este experimento resultó ser el mejor.

Los promedios de la variable ABCPE no mostraron diferencias significativas en la comparación de medias entre ambientes, sin embargo, el mayor valor se obtuvo en la localidad CEVAMEX 1 (1242), seguido por FESC (1229) y CEVAMEX 2 (1216). Es importante mencionar que el clima en estas localidades es similar en cuanto a precipitación, temperatura y humedad relativa.

En cuanto a la variable Severidad Final, no se presentaron agrupamientos distintos, pero la mayor expresión del daño por tizón foliar en hoja de maíz se presentó en el ambiente FESC, con una severidad final promedio de 23%. Cabe señalar que en esta

comparación de medias, se están tomando en cuenta el promedio de los dos tratamientos aplicados a los experimentos.

Una de las posibles explicaciones del porque ABCPE y Severidad Final no presentaron diferencias significativas entre ambientes, puede obedecer a que las condiciones climáticas presentes en cada uno de los ambientes evaluados son similares por encontrarse dentro del área de influencia de los Valles Altos, y la única diferencia que se presenta es la textura del suelo, aunque esta parece no influir en las variables para cuantificación de la enfermedad.

Por otro lado, es importante recordar que las variables ABCPE y SF dependen de la presencia del patógeno, y la inoculación artificial que se realizó en cada ambiente fue de igual manera, por lo tanto la cantidad de inóculo presente en cada fecha de siembra fue la misma, lo cual puede también explicar porque no hubo diferencias entre ambientes evaluados en cuanto a estas dos variables.

**Cuadro 6.** Comparación de medias de ambientes en Valles Altos, para las variables evaluadas considerando la media de 20 híbridos de maíz, sometidos a inoculación y sin inoculación de tizón foliar (*Exserohilum turcicum*. Ciclo Primavera-Verano 2016).

<b>AMBIENTE</b>	<b>REND (kg/ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>ABCPE (u)</b>	<b>SF (%)</b>	<b>FM (días)</b>	<b>FF (días)</b>	<b>AP (cms.)</b>	<b>AM (cms.)</b>	<b>200G (g)</b>	<b>PV (kg/hL<sup>-1</sup>)</b>	<b>%G</b>
<b>FESC</b>	9573 a	1229 a	23 a	78 b	80 a	219 c	106 c	82 a	75 a	85 a
<b>CEVAMEX 1</b>	7923 b	1242 a	22 a	79 a	80 a	267 a	117 a	65 b	74 a	85 a
<b>CEVAMEX 2</b>	6374 c	1216 a	22 a	77 c	78 b	243 b	113 b	62 c	72 b	84 b
<b>MEDIA GENERAL</b>	7957	1229	22	78	79	243	112	70	74	85
<b>DMS (0.05)</b>	301	40	1.01	0.78	0.81	3.4	3.1	2.5	1.04	0.56

Las medias con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \geq 0.05$ ). DMS= diferencia mínima significativa, REND= rendimiento, ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad, SF= severidad final, FM= floración masculina, FF= floración femenina, AP= altura de planta, AM= altura de mazorca, 200 G = peso de 200 granos, PV= peso volumétrico, %G= porcentaje de grano.

El análisis de comparación de medias entre tratamientos de inoculación, detectó agrupamientos en diferentes clases para las variables, rendimiento, ABCPE, SF y peso volumétrico. El tratamiento 1 (inoculación), como era de esperarse, presentó el mayor valor para ABCPE y SF con respecto al tratamiento 2 (sin inoculación). Por otro lado, la variable rendimiento presentó un valor más alto en el tratamiento 2, lo cual también concuerda con lo esperado, pues las plantas sin inocular fueron más sanas y rindieron más (Cuadro 6).

El tratamiento 1 (inoculación artificial) permitió asegurar la presencia del patógeno en los genotipos evaluados, sin embargo, los valores de severidad final observados fueron bajos (20%-40%), mientras que en las parcelas no inoculadas (inoculación natural), el porcentaje de infección producido de forma natural se presentó entre 15 y 25 %, lo cual dificultó la selección de materiales con diferente grado de resistencia.

Lo anterior puede explicarse debido a que no se presentaron las condiciones ambientales idóneas, como temperaturas y humedad relativa, para que hubiese mayor presencia de la enfermedad, o bien que la enfermedad aún no se presenta de manera importante en los Valles Altos de México, especialmente en las localidades de Texcoco y Cuautitlan, Estado de México, aunque en los últimos ciclos agrícolas en algunas parcelas su presencia ha sido más notoria, y como efecto del cambio climático, en ciclos posteriores podría representar un problema fitosanitario.

Un ejemplo de lo anterior, se presenta en el caso del estado de Puebla, en donde desde el año 2014, el tizón foliar es la tercer línea de acción en los programas de manejo fitosanitario del maíz, ejecutados por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal, especialmente en los distritos de desarrollo rural de los municipios de Teziutlán y Libres, en donde la incidencia del tizón norteño comienza a ser una preocupación en el cultivo del maíz.

Aunque la incidencia de tizón norteño, no solo está limitada a Valles Altos o altitudes similares, puesto que en 2015, Orduño *et al* reportaron que durante el ciclo agrícola

2013-2014 se incrementó el número de predios de maíz afectados por el tizón foliar, en algunos de ellos se realizaron hasta 4 aplicaciones con fungicidas sistémicos, y que las temperaturas y humedad relativa óptimas para el desarrollo del tizón foliar del maíz, se han incrementado en los últimos dos años en zonas cercanas a las costa en el Norte de Sinaloa.

En otros lugares como en Córdoba, Argentina, *Exserohilum turcicum* en últimos años ha aumentado su presencia, presentándose cada año con diferentes grados de severidad, y esto obedece a que las condiciones climáticas como temperaturas entre 18 y 25°C, y humedad relativa mayores a 50% se presentan durante las etapas de crecimiento vegetativo del maíz (Sartori *et al.*, 2017).

En diversos estudios recientes (Nwanosike *et al.*, 2015) se ha demostrado que el aumento de las temperaturas máximas, disminución de temperaturas mínimas y humedad relativa, reducen la infección del maíz por *Exserohilum turcicum*. Sin embargo, temperaturas máximas bajas, el incremento de temperaturas mínimas y humedad relativa, favorecen la infección del tizón norteño de la hoja, donde generalmente, el tizón es favorecido por temperaturas máximas de 24.1-24.9 °C, temperaturas mínimas de 13.7-15.9 °C, humedad relativa de 67-85.6% y rangos de precipitación de 325.3-679.2 mm durante la etapa de crecimiento del cultivo.

La incidencia y severidad de tizón norteño, han sido reportadas en tierras altas y áreas con climas húmedos esto es, climas frescos, alta humedad relativa, altitudes medias y condiciones de clima nublado (Levic *et al.*, 2008; Harlapur *et al.*, 2000; Ogliari *et al.*, 2005). En el caso de Valles Altos, en los campos de producción de maíz, ya sea para semilla o grano, regularmente estas áreas se encuentran en tierras con riego o temporal favorable, donde los periodos de alta humedad relativa y temperaturas algo fresca (15–25°C) son importantes para el desarrollo del tizón norteño (Levy y Pataky, 1992; White, 2004), por lo tanto, debe prestarse atención al monitoreo de esta enfermedad.

Al realizar la comparación de los tratamientos de genotipos inoculados vs no inoculados, considerando el promedio de los tres ambientes experimentales, el análisis de varianza y la comparación de medias mostraron que la severidad del tizón foliar fue significativamente mayor en aquellas parcelas inoculadas artificialmente, al producir un porcentaje de daño de hasta 40 % en cada ambiente, mientras que las parcelas de la condición natural, o no inoculados, llegaron a presentar un daño de hasta 25 %.

El bajo porcentaje de severidad final observado en los genotipos de maíz, puede deberse a diversos factores como la cantidad de inóculo aplicada y las condiciones ambientales presentes durante el desarrollo de los experimentos, esto aunado también a los diferentes grados de resistencia intrínseca entre los genotipos al patógeno.

**Cuadro 7.** Comparación de medias entre tratamientos para las diversas variables evaluadas considerando la media de 20 híbridos de maíz, sembrados en 3 ambientes distintos de Valles Altos. Ciclo Primavera-Verano 2016.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>REND</b> <b>(kg/ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>ABCPE</b> <b>(u)</b>	<b>SF</b> <b>(%)</b>	<b>FM</b> <b>(días)</b>	<b>FF</b> <b>(días)</b>	<b>AP</b> <b>(cm.)</b>	<b>AM</b> <b>(cm.)</b>	<b>200G</b> <b>(g)</b>	<b>PV</b> <b>(kg/hL<sup>-1</sup>)</b>	<b>%G</b>
<b>1</b>	7812 b	1326 a	25 a	78 a	79 a	244 a	112 a	69 a	73 b	84 a
<b>(INOCULACIÓN)</b>										
<b>2 (SIN</b>	8102 a	1132 b	20 b	78 a	79 a	243 a	111 a	69 a	74 a	84 a
<b>INOCULAR)</b>										
<b>DSH</b>	205.36	27.50	0.69	0.53	0.55	2.30	2.10	1.70	0.70	0.40

Las medias con la misma letra dentro de cada columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \geq 0.05$ ). DMS= diferencia mínima significativa, REND= rendimiento, ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad, SF= severidad final, FM= floración masculina, FF= floración femenina, AP= altura de planta, AM= altura de mazorca, 200 G = peso de 200 granos, PV= peso volumétrico, %G= porcentaje de grano.

La comparación de medias entre genotipos de maíz indica que todas las variables evaluadas presentaron agrupamientos diferentes, lo cual confirma la significancia entre genotipos que mostró el análisis de varianza combinado, aunque diversos materiales son estadísticamente iguales al encontrarse dentro del mismo grupo (Cuadro 7).

En el caso de rendimiento de grano de maíz los híbridos comerciales de fertilidad normal, pertenecientes a empresas privadas, tuvieron el mejor desempeño en campo, siendo el mejor Cimarrón (12835 kg ha<sup>-1</sup>), seguido por Aspros 823 (12156 kg ha<sup>-1</sup>) y P3368W (12090 kg ha<sup>-1</sup>), los cuales se agruparon en el mismo grupo en la comparación de medias. Es importante señalar que estos materiales son utilizados en su mayoría por productores de áreas tecnificadas y que cuentan con capital para invertir, puesto que un saco de semilla híbrida de estas casas comerciales cuesta por lo menos 3000 pesos mexicanos.

Con respecto a los materiales experimentales, un híbrido en su versión fértil y otro androestéril ya liberado, ambos producto de investigación conjunta entre la UNAM y el INIFAP, se ubicaron en un segundo agrupamiento, estos fueron H3 F (10681 kg ha<sup>-1</sup>) y H-53 AE (10442 kg ha<sup>-1</sup>) respectivamente, los cuales presentaron rendimientos superiores a la media del experimento 7957 kg ha<sup>-1</sup>. Más abajo en el siguiente agrupamiento, se encontraron tanto híbridos androfértiles como androestériles, como H-49 AE (8518 kg/ha<sup>-1</sup>), TSIRI F (8248 kg/ha<sup>-1</sup>), H1 F (8238 kg/ha<sup>-1</sup>) y H1 AE (7611 kg/ha<sup>-1</sup>), con rendimientos por encima del promedio de la región, pero que estadísticamente difieren de los dos grupos anteriores, aunque los últimos tres genotipos resultaron estadísticamente iguales a los materiales del siguiente agrupamiento inferior.

En cuanto a rendimiento se refiere, los materiales que presentaron el menor valor y que estadísticamente resultaron ser diferentes a todos los demás fueron H-70 F (5350 kg/ha<sup>-1</sup>), H-47 AE (5228 kg/ha<sup>-1</sup>) y H3 AE (4830 kg/ha<sup>-1</sup>). En este grupo se encontraron dos materiales androestériles y uno fértil, que a pesar de presentar rendimientos muy bajos con respecto a los demás genotipos utilizados en los experimentos, su

productividad de grano de maíz resultó por lo menos 50 % superior a la productividad media de los Valles Altos. Esto es benéfico, ya que los materiales de maíz producidos en colaboración por la UNAM e INIFAP se producen por pequeñas empresas semilleras que realizan la transferencia de tecnología hacia los productores, y que ofertan semillas a precios mucho más económicos que las empresas trasnacionales.

En la comparación de la capacidad productiva de las versiones androestéril y fértil de los cinco genotipos experimentales, el rendimiento fue similar en ambas versiones para los híbridos H1, H2, H4 y H5, agrupándose dentro de la misma clase en la comparación de medias, mientras que únicamente el híbrido H3 mostró diferencia significativa entre sus versiones, resultando más productiva la versión fértil con rendimiento de 10681 kg/ha<sup>-1</sup>, con respecto a 4830 kg/ha<sup>-1</sup> de la versión androestéril.

En el caso de la evaluación de la resistencia a tizón foliar, los valores más elevados de severidad final y el ABCPE los mostró el genotipo H3 F, pues en daño de lámina foliar presentó en promedio 27 % de severidad final y un ABCPE de 1439, siendo estadísticamente diferente a los demás genotipos en la comparación de medias.

En el siguiente agrupamiento de ABCPE se presentaron tanto materiales fértiles como androestériles, estos fueron H2 F (1401), H3 AE (1385), H-47 AE (1349), H-50 F (1324) y H-70 F (1282), donde los últimos tres genotipos resultaron estadísticamente iguales al agrupamiento siguiente en orden descendente en el cuadro de comparación de medias (Cuadro 7). Conviene tener presente que H 50 y H 70 son híbridos recomendados para los Valles Altos (Espinosa *et al.*, 2004), el primero de ellos con uso por más de 19 años, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo, orientan sobre alternativas para sustituir a este material por parte de los productores de maíz, así como los productores de semillas.

Los materiales que presentaron menor ABCPE y que estadísticamente fueron diferentes a los demás agrupamientos fueron Cimarrón F (1037), Aspros 823 F (1037) y P3368W F (1035), aunque en este grupo también se ubicaron el H1 F (1179), H-53 AE

(1170) y TSIRI F (1061), pero donde estos últimos fueron estadísticamente iguales al agrupamiento que les antecede en la comparación.

En cuanto a severidad final, los materiales que mayor daño presentaron fueron H3 F (27 %), H3 AE (27 %), H-47 AE (26 %), H2 F (25 %) y H-50 F (25 %). Mientras que los de menor daño resultaron ser TSIRI F (18 %), Cimarrón F (18 %), Aspros 823 F (18 %) y P3368W F (18 %). Lo anterior es importante y podría evaluarse nuevamente para confirmar la susceptibilidad y menor incidencia de la enfermedad, lo que aportaría elementos para recomendaciones de híbridos con mayor certidumbre para Valles Altos.

En la variable Severidad Final el comportamiento de los cinco materiales experimentales (H1, H2, H3, H4 y H5) fue similar tanto en su versión fértil como androestéril, puesto que en la comparación de medias las dos versiones quedaron agrupadas estadísticamente en la misma clase, mientras que para ABCPE, solo cuatro genotipos (H1, H3, H4 y H5) mostraron esa misma tendencia.

El híbrido experimental 2 mostró diferencia significativa en ABCPE, pues la versión fértil presentó 1401 u, mientras que la versión androestéril presentó 1223 u. Con respecto a severidad final en este material, la versión fértil resultó con 25 % comparado con 22 % de la versión androestéril, y estadísticamente resultaron ser iguales. En cuanto a rendimiento, el material 2 expresó mejor capacidad productiva en la versión androestéril con 7230 kg/ha<sup>-1</sup>, mientras que su versión fértil produjo 6638 kg/ha<sup>-1</sup>, valores que estadísticamente no son diferentes.

En el caso del material experimental 3, la versión fértil fue más productiva que la versión androestéril en cuanto a rendimiento (10681 y 4830 kg/ha<sup>-1</sup> respectivamente), pero las variables ABCPE y severidad final en ambas versiones no fueron diferentes estadísticamente, dado que la primera mostró 1439 u y 27 % respectivamente, y la segunda presentó 1385 u y 26 %.

Estos resultados muestran que el rendimiento de grano, al menos en estos genotipos, no depende de la versión fértil o androestéril, y que tampoco la resistencia a la enfermedad está regulada o en relación con las dos versiones productivas de los materiales; más bien ambas características son resultado del factor genotipo, ambiente, patogenicidad y las interacciones entre ellos.

**Cuadro 8.** Comparación de medias entre genotipos híbridos de maíz para 3 variables evaluadas, considerando el promedio de tres ambientes distintos y dos tratamientos diferentes. Ciclo Primavera-Verano 2016.

<b>Rendimiento</b> <b>(Kg/ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>ABCPE</b> <b>(u)</b>	<b>SF (%)</b>
Cimarrón 12835 a	1037 g	18 g
Aspros 823 12156 a	1037 g	18 g
P3368W 12091 a	1035 g	18 g
H3 F 10681 b	1439 a	27 a
H-53 AE 10442 b	1170 efg	21 efg
H-49 AE 8518 c	1195 def	21 defg
Tsiri 8248 cd	1061 fg	18 fg
H1 F 8238 cd	1179 efg	21 efg
H1 AE 7611 cde	1234 cde	22 cde
H2 AE 7230 de	1223 de	22 cde
H4 F 7177 de	1236 cde	23 bcde
H4 AE 6951 ef	1219 def	23 bcde
H2 F 6638 efg	1401 ab	25 abcd
H5 F 6624 efg	1279 bcde	24 abcde
H-50 6556 efg	1324 abcde	25 abcd
H-51AE 5971 fgh	1264 bcde	24 abcde
H5 AE 5758 gh	1236 cde	23 bcde
H-70 5350 h	1282 abcde	24 abcde
H-47 AE 5228 h	1349 abcd	26 abc
H3 AE 4830 h	1385 abc	26 ab
<b>DSH</b> 1180.7	158.15	3.98

Las medias con la misma letra dentro de cada columna son iguales estadísticamente (Tukey,  $p \geq 0.05$ ). DMS= diferencia mínima significativa.

En el caso de las interacciones del análisis combinado, en AMBIENTES\*TRATAMIENTOS, no se tuvo significancia para rendimiento, ABCPE y SF. Esto quiere decir que los tratamientos presentaron un efecto similar en los tres ambientes, aunado a que en el análisis se toma el promedio de todos los genotipos, y aunque individualmente es probable que existan diferencias, estas no fueron tan marcadas para que en el análisis combinado resultaran significativas.

Las interacciones AMBIENTES\*GENOTIPOS y TRATAMIENTOS\*GENOTIPOS sí presentaron significancia para las tres principales variables evaluadas (rendimiento, ABCPE y SF). En esto se puede entender que los genotipos no se comportaron de manera similar en cada uno de los tres ambientes, y además que se desarrollaron o no tuvieron un efecto diferente bajo cada tratamiento de inoculación que recibieron.

Para un análisis más detallado que permite encontrar las diferencias entre genotipos y tratamientos de forma particular, se presenta el análisis individual del ambiente FESC (Cuadro 8), dado que este fue el ensayo en el que los genotipos de maíz se desarrollaron de mejor forma, comparado con las dos fechas de CEVAMEX.

Así también, se analiza el ambiente FESC dado que presentó las variables evaluadas con mejores valores, y esto permite encontrar diferencias entre genotipos que pudieron no haber sido tan marcadas en el análisis combinado, y tomando en cuenta que el comportamiento de los datos obtenidos siguió la misma tendencia en cada uno de los ambientes evaluados en el experimento.

El análisis de varianza detectó significancia ( $p < 0.01$ ) entre tratamientos de inoculación para las variables ABCPE, SF, y significancia con  $p < 0.05$  para las variables rendimiento y peso volumétrico. Entre genotipos de maíz hubo significancia ( $p < 0.01$ ) para las variables rendimiento, ABCPE, SF, altura de planta, altura de mazorca y peso volumétrico, y significancia con  $p < 0.05$  para floración masculina, peso de 200 granos y porcentaje de grano.

En el ambiente FESC los coeficientes de variación resultaron de magnitud aceptable (menos de 20%), con valores de 2.0 a 13.8, lo que significa que se tuvo un control adecuado de la variación experimental y que los datos obtenidos para las variables de esta investigación son confiables (Cuadro 8).

**Cuadro 9.** Cuadrados medios y significancia estadística en el análisis de varianza para diversas variables evaluadas en 20 híbridos de maíz sometidos a inoculación y sin inoculación de tizón foliar (*Exserohilum turcicum*), en el ambiente de Cuautitlán, Estado de México. Ciclo Primavera-Verano 2016.

	<b>GL</b>	<b>REND</b> (kg/ha <sup>-1</sup> )	<b>ABCPE</b> (u)	<b>SF</b> (%)	<b>FM</b> (días)	<b>FF</b> (días)	<b>AP</b> (cms.)	<b>AM</b> (cms.)	<b>200G</b> (g)	<b>PV</b> (kg/hL <sup>-1</sup> )	<b>%G</b>
<b>TRA</b>	1	8271573*	761374**	992**	4	7	952	77	126	26*	0.31
<b>GEN</b>	19	48065007**	88356**	75**	25*	24	2175**	543**	134*	15**	5.8*
<b>REP</b>	2	256605	13186	33	23	21	40	18	49	35	1.38
<b>TRA*GEN</b>	19	6713069**	38505**	19*	14	14	339	232	83	4	3.28
<b>Media</b>		9573	1082	23	78	80	215	103	82	72	84
<b>CV</b>		8.5	8.6	13.8	4.8	4.7	7.8	13.4	9.7	3.4	2.0

\*, \*\* Valores significativos y altamente significativos al 0.05 y 0.01 de probabilidad. TRA= tratamiento, GEN= genotipo, REP= repetición, CV= coeficiente de variación, GL= grados de libertad, REND= rendimiento, ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad, SF= severidad final, FM= floración masculina, FF= floración femenina, AP= altura de planta, AM= altura de mazorca, 200 G = peso de 200 granos, PV= peso volumétrico, %G= porcentaje de grano.

En la localidad Cuautitlán (Cuadro 9), los genotipos de maíz mostraron un mejor rendimiento en promedio bajo las condiciones del tratamiento 2 (sin inoculación del patógeno), mientras que las variables ABCPE y Severidad Final presentaron su mayor expresión bajo el efecto del tratamiento 1 (inoculación del patógeno). En cuanto a la variable peso volumétrico, esta mostró ligeramente su mejor expresión bajo las condiciones del tratamiento 1.

En cuanto a floraciones masculina y femenina, hubo un día de diferencia entre ambos tratamientos, sin que estos resultaran significativamente diferentes. Mientras que en altura de planta y de mazorca, la diferencia fue de poca magnitud (6 y 2 cm, respectivamente), presentándose alturas mayores numéricamente bajo el tratamiento 1, aunque ambos tratamientos resultaron estadísticamente iguales.

En el caso del rendimiento, era de esperarse que los genotipos bajo el tratamiento 2, expresaran una mejor capacidad productiva, dado que no estuvieron sometidos a un ataque intencional del patógeno *Exserohilum turcicum*, y por lo tanto, el poco daño que se presentó en las hojas se debió a la presencia natural de la enfermedad en la zona de los Valles Altos, la cual en el ciclo agrícola de evaluación presentó visualmente una baja incidencia.

Por otro lado, mientras en el tratamiento 1 los genotipos fueron expuestos a una mayor presión de la enfermedad, y esta logró causarles daño en la lámina foliar de las hojas de la mazorca, por lo que la producción y translocación de fotoasimilados para el llenado de grano, no fue la misma como cuando la presencia del patógeno es nula o ausente, o se encuentra en el ambiente pero sin afectar las plantas.

Derivado de lo descrito arriba, en los genotipos del tratamiento 1 se presentó el mayor porcentaje de severidad final y de ABCPE, puesto que la cantidad de inóculo presente fue más alta que en condiciones naturales o sin inocular, así también, el hecho de asperjar mediante una motomochila, puede favorecer la presencia de lesiones, y esto propicia una entrada más fácil del patógeno a la planta.

**Cuadro 10.** Comparación de medias entre tratamientos para las diversas variables evaluadas considerando la media de 20 híbridos de maíz, sembrados en el ambiente Cuautitlán, Estado de México. Ciclo P-V 2016.

TRATAMIENTO	REND (kg/ha <sup>-1</sup> )	ABCPE (u)	SF (%)	FM (días)	FF (días)	AP (cms.)	AM (cms.)	200G (g)	PV (kg/hL <sup>-1</sup> )	%G
<b>1 (INOC.)</b>	9311 b	1162 a	26 a	78 a	80 a	218 a	104 a	83 a	73 b	84 a
<b>2 (SIN INOC.)</b>	9836 a	1003 b	20 b	77 a	79 a	212 a	102 a	81 a	72 a	84 a
<b>DSH</b>	492.23	43.66	1.25	1.35	1.36	6.17	5.09	2.95	0.86	0.6

Las medias con la misma letra dentro de cada columna son iguales estadísticamente (Tukey,  $p \geq 0.05$ ). DMS= diferencia mínima significativa, REND= rendimiento, ABCPE= área bajo la curva del progreso de la enfermedad, SF= severidad final, FM= floración masculina, FF= floración femenina, AP= altura de planta, AM= altura de mazorca, 200 G = peso de 200 granos, PV= peso volumétrico, %G= porcentaje de grano.

La comparación de medias entre genotipos en la localidad Cuautitlán (Cuadro 10), indica para la variable rendimiento que el mejor desempeño lo mostró el híbrido Cimarrón con  $15794 \text{ kg/ha}^{-1}$ , y el que mostró la capacidad productiva más baja fue el material experimental 3 en su versión androestéril (H3 AE) con  $5080 \text{ kg/ha}^{-1}$ , resultando una media general en la localidad de  $9573 \text{ kg/ha}^{-1}$ . Estos resultados son similares a los presentados en la comparación de medias entre genotipos para rendimiento del análisis combinado de los tres ambientes (Cuadro 7).

Para las variables ABCPE y severidad final, el material con más daño ocasionado por el tizón foliar fue el híbrido experimental 3 en su versión fértil (H3 F), mientras que el genotipo con menor daño resultó ser el híbrido P3368W en las dos variables, sin embargo, este último fue significativamente igual a otros materiales como Tsiri, Cimarrón y Aspros 823. Al igual que en el párrafo anterior, los resultados son similares a los presentados en la comparación de medias entre genotipos del análisis combinado de los tres ambientes (Cuadro 7).

En el caso de la comparación entre versiones fértiles y androestériles de los cinco genotipos de maíz experimentales utilizados, en cuatro casos (H1, H3, H4 y H5) la versión fértil resultó ser más productiva que la versión androestéril, y solo en un caso (H2) el resultado fue invertido. Aunque únicamente en dos casos, el H3 y el H4, la versión fértil fue significativamente diferente a la versión androestéril.

Para las variables ABCPE y SF, el comportamiento de los genotipos fue similar en versiones fértiles y androestériles, aunque el único material que mostró diferencia significativa fue el H2, con valores mayores en las variables ABCPE y SF para la versión fértil con respecto a la versión androestéril.

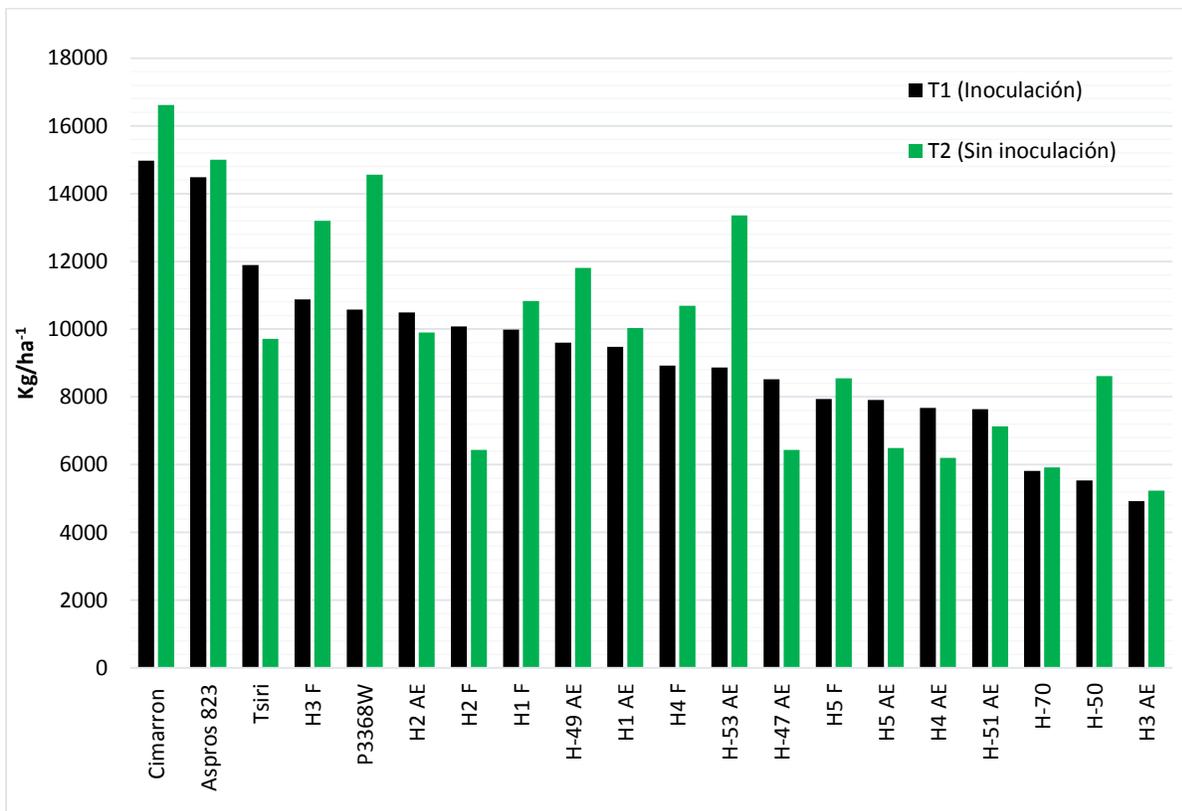
**Cuadro 11.** Comparación de medias entre genotipos híbridos de maíz para 3 variables evaluadas, considerando el promedio de dos tratamientos diferentes, sembrados en el ambiente Cuautitlán, Estado de México. Ciclo P-V 2016.

<b>Rendimiento (Kg/ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>ABCPE (u)</b>	<b>SF (%)</b>
CIMARRON 15794 a	908 c	18 c
ASPROS823 14744 ab	908 c	18 c
P3368W 12567 bc	902 c	18 c
H3 F 12037 bc	1358 a	30 a
H-53 AE 11115 cd	1043 c	22 bc
TSIRI 10806 cde	925 c	18 c
H-49 AE 10702 cde	1113 abc	23 abc
H1 F 10411 cde	1055 c	21 bc
H2 AE 10192 cdef	1069 c	22 bc
H4 F 9807 cdefg	1092 c	23 abc
H1 AE 97568 cdefgh	1103 bc	23 abc
H2 F 8258 defghi	1352 ab	29 a
H5 F 8246 efghi	1112 abc	24 abc
H-47 AE 7477fghij	1129 abc	25 ab
H-51 AE 7383 fghij	1075 c	23 abc
H5 AE 7201 ghij	1098 bc	23 abc
H-50 7076 ghij	1083 c	23 abc
H4 AE 6940 hij	133 abc	26 ab
H-70 5866 ij	1025 c	23 abc
H3 AE 5080 j	1133 abc	26 ab
9573	1082	23
<b>DSH 2857.8</b>	<b>253.5</b>	<b>7.23</b>

Las medias con la misma letra dentro de cada columna son iguales estadísticamente (Tukey,  $p \geq 0.05$ ).

Para identificar los mejores genotipos en cuanto a rendimiento y resistencia a tizón foliar, se realizó un análisis comparativo de genotipos, para cada una de las tres variables más importantes (rendimiento, ABCPE y SF) en cada tratamiento, para el ambiente FESC.

En la Figura 8 se puede observar que para el tratamiento 2 el mejor genotipo fue Cimarrón, seguido por Aspros 823, P3368W y H-53 AE, en orden descendente. Los híbridos que mostraron menor desempeño en la producción de grano fueron H3 AE, H-70, H4 AE, H2 F y H-47 AE, respectivamente en orden ascendente. Para el tratamiento 1, Cimarrón también tuvo la mayor productividad, seguido por Aspros 823, Tsiri y H4 F, mientras que los menos productivos resultaron ser H5 AE, H-50, H-70 y H-51 AE, de abajo hacia arriba.



**Figura 8.** Rendimiento de grano de 20 genotipos de maíz, bajo 2 tratamientos distintos de inoculación de *Exserohilum turcicum*.

Para conocer el comportamiento de la epidemia a lo largo del ciclo del cultivo, se realizó una gráfica que muestra el comportamiento de la severidad y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, mediante mediciones visuales tomadas desde la aparición de los primeros síntomas de tizón foliar posterior a la inoculación y hasta la senescencia de las hojas evaluadas de la mazorca, en la localidad Cuautitlán.

La Figura 8 muestra los resultados para el tratamiento 1, ahí se observaron valores más elevados de porcentaje de severidad causado por el patógeno y el ABCPE más grande, esto debido a que la enfermedad fue inducida artificialmente por inoculación. En el tratamiento 2 (bajo condiciones naturales o sin inoculación), los valores fueron más bajos, pero siguieron la misma tendencia que en el primer tratamiento para ambas variables (Figuras 9 y 10).

En cuanto a la variable ABCPE, el híbrido que mayor valor mostró fue H3 F con 1651 u y 37 % de severidad final, seguido por H2 F con 1649 u y también 37 % de severidad final. En la parte media de la gráfica aparecen el H3 AE con 1212 u y 30 %, seguido por H-49 AE con 1194 u y 27 %, y H5 F con 1192 u pero con 28 % de severidad final. En la parte inferior aparecen los híbridos que menor daño presentaron; en este caso el híbrido P3368W resultó ser el mejor con 986 u y 20 %, más arriba aparecen Cimarrón y Aspros 823 con 998 u y 20 % cada uno, ligeramente más arriba aparece Tsiri con 1030 u y 20 %, seguido de H-53 AE con 1031 u y 22 %.

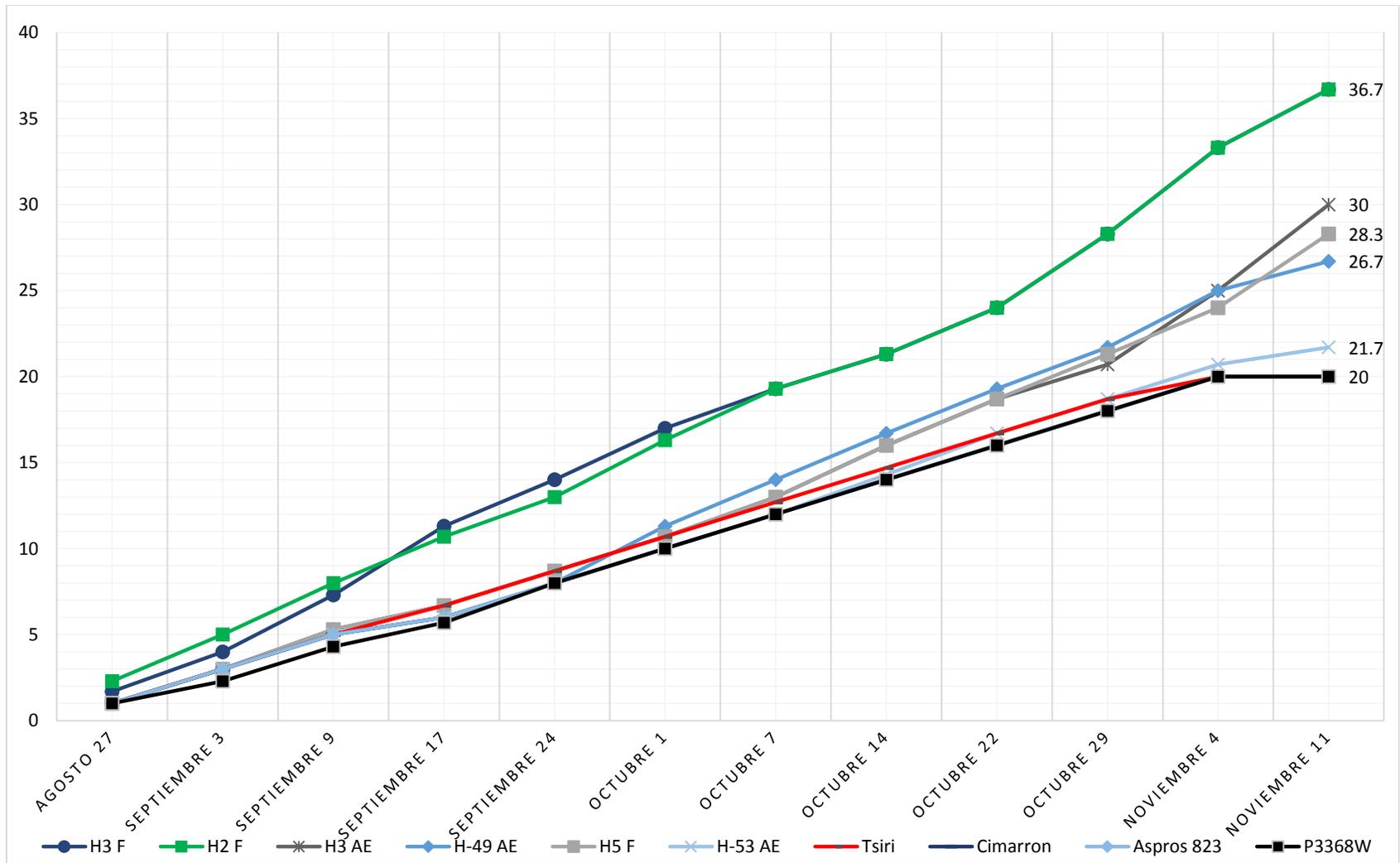
En el caso de la comparación de ABCPE y SF entre los materiales H-49 AE, con 1194 u y 27 %, y H5 F con 1192 u y 28 %, respectivamente, se puede explicar que un genotipo puede presentar un mayor porcentaje de severidad final, a pesar de tener un ABCPE baja, debido a que si el porcentaje de severidad incrementa después de cierto tiempo, esto puede deberse al tipo de infección policíclica que presenta el patógeno tizón foliar del maíz.

Una mayor cantidad de ABCPE, se relaciona directamente con la duración del periodo de incubación del patógeno, lo cual indica que los periodos de incubación

cortos, generalmente presentan una mayor tasa de ABCPE (Muiru *et al.*,2010). Aunque es importante considerar otros parámetros de evaluación como tasa de expansión de lesión, dado que una mayor tasa de expansión de la lesión pero con periodos de incubación relativamente largos puede afectar el ABCPE, pero enmascarar a una raza del patógeno con alta agresividad.

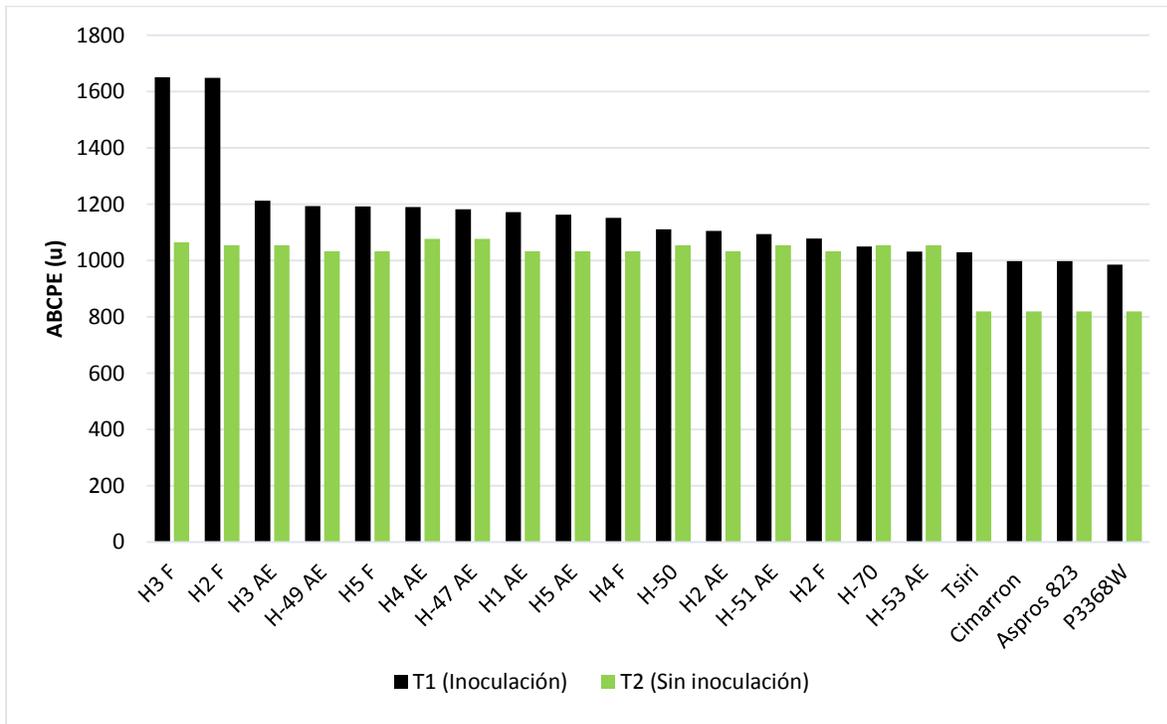
La severidad es indudablemente el parámetro más sensible para la evaluación de genotipos de maíz basándose en los niveles de resistencia que presentan al tizón norteño. Por lo cual, en ocasiones es difícil realizar evaluaciones visuales, en este caso se utilizó la escala de Elliot y Jenkis (1946), pero sus diagramas representan la planta entera, que puede a veces limitar su uso debido a la ocurrencia simultánea de diferentes enfermedades foliares.

Otras escalas diagramáticas son por ejemplo, la publicada y desarrollada por Pataky (1992), que tiene diagramas que representan la gravedad por niveles en hojas con incrementos porcentuales y depende del grado de apreciación visual de cada evaluador, por lo que también tiene desventajas, así como la de Bleicher (1998) y la modificada por Muiru (2007), y algunas nuevas en proceso de aceptación como la de Vieira *et al* (2014).

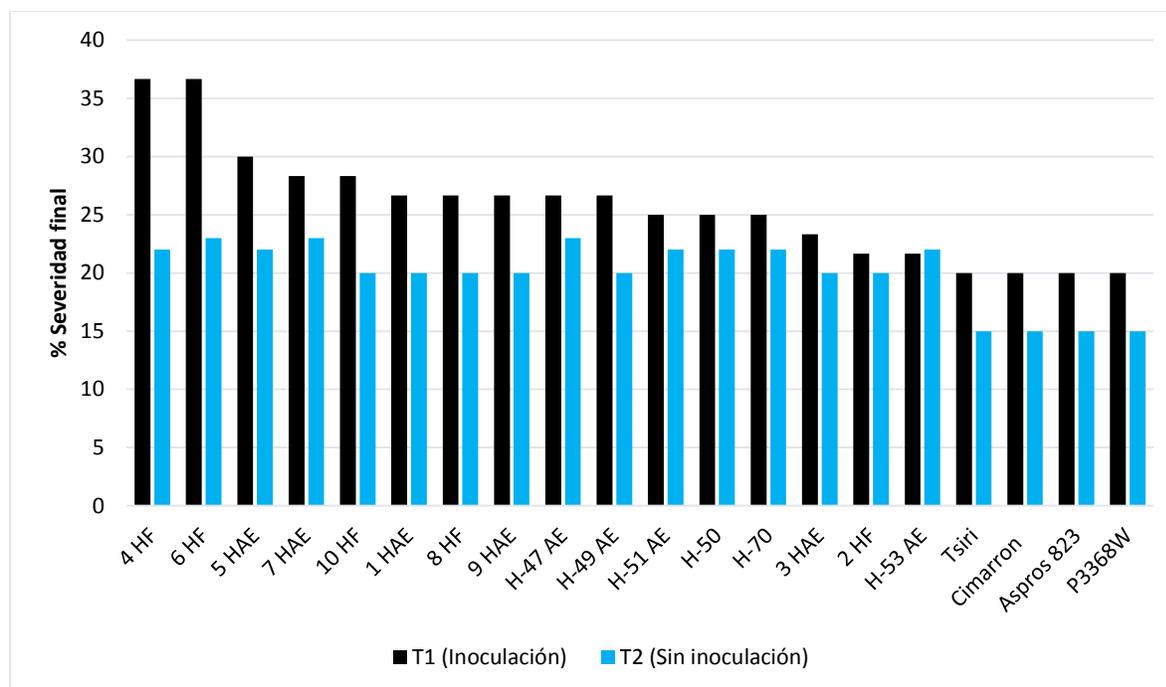


**Figura 9.** Porcentaje de severidad final alcanzado y ABCPE de genotipos de maíz, evaluados bajo el tratamiento 1 (inoculación con *Exserohilum turcicum*).

En el maíz, la resistencia al tizon foliar es condicionada por factores cuantitativos y cualitativos (Hooker, 1981, Ogliari *et al.*, 2007). La resistencia cuantitativa se caracteriza por pocas lesiones, área de lesión pequeña con tipos de lesiones necróticas típicas, así como reducidos valores de severidad y área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE); Mientras que la resistencia cualitativa es caracterizada por pequeñas lesiones rodeadas por un halo clorótico. En este estudio, las plantas resistentes presentaron una resistencia cuantitativa típica a tizón foliar.



**Figura 10.** Comparación del ABCPE de 20 híbridos de maíz bajo 2 tratamientos diferentes de inoculación con *E. turcicum*.



**Figura 11.** Comparación del porcentaje de Severidad final alcanzado de 20 híbridos de maíz bajo 2 tratamientos diferentes de inoculación con *E. turcicum*.

Las regiones de altitud media en los trópicos, alrededor de 900-1600 m sobre el nivel del mar, tienen un clima particularmente favorable para la enfermedad, ya que los períodos de rocío son largos y las temperaturas moderadas. Tales condiciones prevalecen sobre millones de hectáreas de tierra de cultivo en el Este y Sureste de África, Latinoamérica, China y la India (Renfro y Ullstrup1976), lo cual es de considerarse ante posibles apariciones más frecuentes y agresivas de tizon foliar en Valles Altos de México.

A pesar de que el tizón foliar ocurre en todo el mundo, en algunas regiones es raramente una importante enfermedad del maíz. Se han registrado pérdidas de rendimiento de hasta el 70% debido a esta patología, sin embargo, típicamente las pérdidas de rendimiento varían de 15 a 30% (Dan Shing *et al.*, 2017).

En el presente trabajo, la severidad y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad y la reducción del rendimiento (pérdidas de rendimiento relativas) se

determinaron por la resistencia genética de cada híbrido. Las pérdidas medias de rendimiento calculadas para todas las variedades de maíz híbrido revelaron que presentó la pérdida de rendimiento relativa más alta () y presentó la pérdida de rendimiento relativa más baja () (). Similarmente Raymundo y Hooker (1981) observaron una reducción del rendimiento del orden de 63, 43 y 17% para el híbrido susceptible a maduración temprana, susceptible, y un híbrido con resistencia poligénica.

En el maíz, la resistencia al tizon norteño de la hoja eta condicionada por mecanismos cualitativos y cuantitativos (Hooker, 1981; Ogliari *et al.*, 2007). Donde la resistencia cuantitativa es caracterizada por bajo número de lesiones, lesiones pequeñas, así como valores reducidos de severidad y ABCPE, mientras que la resistencia cualitativa es caracterizada por lesiones pequeñas rodeadas por un halo clorótico.

En este trabajo, la resistencia mostrada en los diferentes genotipos de maíz hace referencia a la del tipo cuantitativo, esto es sustentado al obtenerse resultados intermedios de severidad de la enfermedad

Como consecuencia de la severidad del tizón, la pérdida de tejido fotosintético puede resultar en un menor rendimiento, e incluso la calidad del ensilado puede verse afectada. Las prácticas de manejo eficaces que reducen el impacto de NLB incluyen el uso de híbridos resistentes, la reducción de residuos de maíz, la plantación oportuna y la aplicación de fungicidas foliares.

## 5. CONCLUSIONES

La baja incidencia y severidad de tizón foliar en este ensayo pudo haber impedido detectar diferencias en el comportamiento respecto a esta enfermedad en los híbridos evaluados, y por lo tanto los diferentes niveles de resistencia observados pueden tener comportamientos distintos en los genotipos evaluados.

El rendimiento de grano que mostraron los genotipos fértiles de maíz respecto al de los genotipos androestériles, fue estadísticamente similar, lo que se explica ya que son materiales considerados isogénicos.

La resistencia a tizón foliar, se expresa de forma similar tanto en los híbridos androestériles como en los fértiles, puesto que son materiales isogénicos y su única diferencia es la incorporación o no de la androesterilidad.

El rendimiento, es la capacidad productiva de grano de un genotipo de maíz, y es una característica cuantitativa la cual es el resultado del genotipo, el ambiente y la interacción de ambos, en este caso, las condiciones de los ambientes y la presencia o ausencia del tizón foliar, en niveles considerados bajos no fue una determinante que incidió sobre el rendimiento.

Es necesario realizar análisis genéticos con marcadores moleculares para identificar y seleccionar con precisión fuentes de resistencia a esta enfermedad, así como tipos de androesterilidad, usando tanto marcadores moleculares para genes mayores, como para genes menores.

## 6. LITERATURA CITADA.

- Adipala, E. 1994. Reaction of 13 maize genotypes to *E. turcicum* in different agro-ecological zones of Uganda. East. Afr. Agric. For. J. 59: 213-218.
- Agrios, G. 2008. Fitopatología. Segunda Edición. Editorial Limusa. Grupo Noriega. México. D. F. 838 p.
- Airy, J. M., Tatum, L. A. y Sorenson, J. W. 1978. La Producción de semillas, producción de semilla híbrida de maíz y sorgo para grano. Anuario estadístico de semillas. Trad. de la 4ª ed. en inglés por Antonio Marino y Pánfilo Rodríguez. Editorial CECSA. México. 274-285 pp.
- Allard, R. W. 1967. Principios de la mejora genética de las plantas. Ediciones Omega. Barcelona, España. 498 p.
- Balint, K. P. J., Yang, J., Van, E. G., Jung, J. and Smith, E. M. 2010. Use of a maize advanced intercross line for mapping of QTL for Northern Leaf Blight Resistance and multiple disease resistance. Crop Science 50: 458-466.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4<sup>th</sup> edition. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Bentolila, S., Guitton, C., Bouvet, N., Saillan, A., Nyzaka, S. and Freyssinet, G. 1991. Identification of an RFLP marker tightly linked to the *Ht1* gene in maize. Theoretical and Applied Genetics 82: 393-398.
- Bleicher, J. 1988. Níveis de resistência a *Helminthosporium turcicum* Pass. Em três ciclos de seleção em milho pipoca (*Zea mays* L.). Piracicaba. Tese (Doutorado) ESALQ. Sao Paulo, Brasil. 130 p.

- Bohra, A., Jha, U. C., Adhimoolam, P., Bisht, D. and Singh, N. P. 2016. Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. *Plant Cell Rep.* 35: 967-993.
- Borchardt, D., Welz, H. and Geiger, H. 1998. Molecular marker analysis of European *Setosphaeria turcica* populations. *Plant Pathology* 104: 611–617.
- Campaña, A. and Pataky, J. 2005. Frequency of the Ht1 Gene in populations of sweet corn selected for resistance to *Exserohilum turcicum* Race 1. *Phytopathology* 95: 85-91.
- Cardwell, K., Schulthess, R., Ndemah, R. and Ngoko, Z. 1997. A system approach to assess crop health and maize yield losses due to pests and diseases in Cameroon. *Agric. Ecosyst. Environ* 65: 33-47.
- Carson, M. 2006. Response of a maize synthetic to selection for component resistance to *Exserohilum turcicum*. *Plant Disease* 90 (7): 910-914.
- CIMMYT. (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). 2014. Turning research into impact. Annual Report 2014. *In turcicum* leaf blight (extended information). Internal report of CIMMYT maize program. México, D. F. 48 p.
- Cornide, M. T., Lima, H. y Surli, J. 1993. La resistencia genética de las plantas cultivadas. Ed. Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 195 p.
- De León, C. 1984. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. CIMMYT. México, D. F. 114 pp.
- Ding, J., Ali, F., Chen, G., Li, H., Mahuku, G., Yang, N., Narro, L., Magorokosho, C., Makumbi, D. and Yan, J. 2015. Genome-wide association mapping reveals

novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. *BMC Plant Biology* 15: 206.

Espinosa, C. A., Tadeo, R. M. y Tapia, N. A. 2000. Variedades no convencionales como opción para elevar la productividad de maíces locales en Valles Altos de México. *Agronomía Mesoamericana* 11 (1): 159-161.

Espinosa, C. A., Sierra, M. y Gómez, N. 2003. Producción y tecnología de semillas mejoradas de maíz por el INIFAP en el escenario sin la PRONASE. *Agronomía Mesoamericana* 14 (1): 117-121.

Espinosa, C. A., Tadeo, R. M., Lothrop, J., Azpíroz, R. S., Tut y Couoh, C. y Salinas, M. Y. 2003. H-50, híbrido de maíz de temporal para los valles altos de México (2200 a 2600 msnm). *Agricultura Técnica en México* 29 (1): 89-92.

Espinosa, C. A., Tadeo, R. M., Turrent, F. A., Gómez, M. N., Sierra, M. M., Palafox, C. A., Caballero, H. F., Valdivia, B. R. y Rodríguez, F. 2008. El potencial de las variedades nativas y mejoradas de maíz. *Ciencias. Revista de Difusión de la Facultad de Ciencias de la UNAM*: 118-125.

Espinosa, C. A., Tadeo, R. M., Gómez, N., Sierra, M., Virgen, J., Palafox, A., Caballero, F., Vázquez, G., Rodríguez, F. y Valdivia, B. R. 2010. V-54 A, nueva variedad de maíz de grano amarillo para siembras de temporal retrasado en los Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(4): 677-680.

Espinosa, C. A., Tadeo, R. M., Virgen, V. J., Rojas, M. I., Gómez, M. N., Sierra, M. M., Palafox, C. A., Vázquez, C. G., Rodríguez, M. F., Zamudio, G. B., Arteaga, E. I., Canales, I. E. I., Martínez, Y. B. y Valdivia, B. R. 2012. H-51 AE, híbrido de maíz para áreas de humedad residual, buen temporal y riego en Valles Altos del Centro de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 347-349.

- Fernández, S. R., Morales, Ch. L. A. y Gálvez, M. A. 2013. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 Suplemento 3-A: 275-283.
- Fisher, D., Hooker, A., Lim, S., and Smith, D. 1976. Leaf infection and yield loss caused by four *Helminthosporium* leaf diseases of corn. *Phytopathology* 66. 942-944 pp.
- Flaherty J. E. and Dunkle L. D. 2005. Identification and expression analysis of regulatory genes induced during conidiation in *Exserohilum turcicum*. *Fungal Genetics and Biology* 42 (5). 471–481 pp.
- Flor, H. 1956. The complementary genic Systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8: 29-54.
- García, S. J. A. y Ramírez, J. R. 2014. El mercado de semilla mejorada de maíz (*Zea mays* L.) en México: un análisis del saldo comercial por entidad federativa. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37 (1): 69-77.
- García, E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto Nacional de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 246 p.
- Gevers, H. O. 1975. A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight of maize. *Plant disease Reporter* 59: 296-299.
- Grogan, C. O., Francis, C. A., and Sarvella, P. A. 1971. Influence of cytoplasmic male sterility on dry matter accumulation in maize. *Rev. Crop Science* 5: 365-367.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.

- Harlapur, S. I., Wali, M. C., Anahosur, K. H. and Muralikrishna, S. 2000. A report on survey and surveillance of maize diseases in northern Karnataka. Karnataka Journal of Agricultural Sciences 13: 750-751.
- Harlapur, S. I., Kulkarni, M. S., Yeshoda, H. y Kulkarni, S. 2007. Variability in *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard and Suggs., causal agent of leaf blight of maize. Karnataka Journal of Agricultural Sciences 3 (20): 665-666.
- Hooker, A. 1977. A second major gene locus in corn chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. Crop Sci. 17: 132-135.
- Huang, L. J., Xiang, D. Q., Yang, J. P. and Dai J. R. 2002. Construction the RFLP linkage map and location the NCLB QTL of maize. Acta genetica Sinica 29 (12): 1100-1104.
- Hurni, S., Scheuermann, D., Krattinger, S. G., Kessel, B., Wicker, T., Herren, G., Fitze, M. N., Breen, J., Presterl, T., Ouzunova, M. and Keller, B. 2015. The maize disease resistance gene Htn1 against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. 112 (28): 8780-8785.
- Kato, Y. T. A. 2009. Origen y diversificación del maíz. En Kato, Y. T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A. y Bye, R. A. 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, DF. 116 p.
- Kohls, S., Stamp, P. y Knaak, C. 2011. QTL involved in the partial restoration of male fertility of C-type cytoplasmic male sterility in maize. Theor. Appl. Genet. 123: 327-338.
- Jugenheimer, R.W. 1981. Maíz: variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semilla. Ed. Limusa. México. 841 p.

- Llacer, G., López, M., Trapero, A. y Bello, A. 2000. Patología Vegetal. Tomo II. Ed. Mundi Prensa. México. 701-995 pp.
- López, A. H. 2000. Descripción cuantitativa de las epidemias de las plantas. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía de Medellín 1 (53): 941-968.
- Leonard, K. J., Levy, Y. and Smith, D. R. 1989. Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. Plant Diseases 73: 776-777.
- Levy, Y. and Pataky, J. 1992. Epidemiology of northern leaf blight on sweet corn. Phytoparasitica 20: 53-66.
- Levic, J., Stankovic, S. and Petrovic, T. 2008. The determination of *Exserohilum turcicum* virulence factors in Serbia. Genetika 40 (3): 271-281.
- Luna, M. B. M., Hinojosa, R. M. A., Ayala, G. O. J., Castillo, G. F. y Mejía, C. J. A. 2012. Perspectivas de desarrollo de la industria semillera de maíz en México. Revista Fitotecnia Mexicana 35 (1): 1-7.
- Martin, K. J. and Rygiewicz, T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC microbiology 5: 28.
- Miranda, C. S. 1966. Discusión sobre el origen y la evolución del maíz. Memorias del Segundo Congreso Nacional de Fitogenética. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. Monterrey, N. L., México. 233-251 pp.
- Muiru, W. M., Mutitu, E. W. and Kimenju, J. W. 2007. Reaction of some Kenyan maize genotypes to *Exserohilum turcicum* leaf blight under greenhouse and field conditions. Plant Science 6 (8): 1190-1196.

- Muiru, W. M., Koopmann, B., Tiedemann, A. V., Mutitu, E. W. and Kimenju, J. W. 2010. Race typing and evaluation of aggressiveness of *Exserohilum turcicum* isolates of Kenyan, German and Austrian origin. *World Journal of Agricultural Sciences* 6 (3): 277-284.
- Niks, R. E., Parlevliet, J. E., Lindhout, P. and Bai, Y. 2014. Breeding crops with resistance to diseases and pests. Wageningen Academic Publishers. Netherlands. 197 p.
- Ogliari, J. B., Guimaraes, M. A. and Geraldi, I. O. 2005. New genes in the *Zea mays-Exserohilum turcicum* pathosystem. *Genetics and Molecular Biology* 28: 435-439.
- Ogliari, J. B., Guimaraes, M. A. and Camargo, L. E. A. 2007. Chromosomal locations of the maize (*Zea mays* L.) HtP and rt genes that confer resistance to *Exserohilum turcicum*. *Genet. Mol. Biol.* 30 (3): 630- 634.
- Orduño, C. F. J., Montiel, G. M. A., Herrera, R. G., Ruíz, G. A. G., Espinoza, C. D. F. y De Campo, P. T. 2015. Distribución, incidencia, severidad y control del tizón foliar del maíz en el norte de Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33 Suplemento 2015: 64-65.
- Ortiz, C. J., Ortega, P. R., Molina, G. J. D., Mendoza, R. M., Mendoza, C. C., Castillo, G. F., Muñoz, O. A., Turrent, F. A. y Kato, Y. T. A. 2007. Análisis de la problemática de la producción nacional de maíz y propuesta de acción. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas (COLPOS). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Chapingo, Estado de México. 29 p.
- Paliwal, R. L. 2001. Mejoramiento para resistencia a enfermedades. En Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R. y Violic D. A. *El maíz en los trópicos: Mejoramiento*

- y producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia .165-168 pp.
- Pataky, J. K. 1992. Relationships between yield of sweet corn and northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum*. *Phytopathology* 82: 370-375.
- Pataky, J. K. and Ledencan, T. 2006. Resistance conferred by the Ht1 gene in sweet corn infected by mixtures of virulent and avirulent *Exserohilum turcicum*. *Plant Diseases* 90: 771-776.
- Parlevliet, J. 1993. What is durable resistance? A general outline. In: *Durability of disease resistance*. NL: Kluwer Academic Publishers.
- Pedroza, S. A. 1995. *Epidemiología agrícola. Principios y aplicaciones*. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, UACH. Bermegillo, Dgo. México. 104 p.
- Perales, H. y Golicher, D. 2014. Mapping the diversity of maize races in Mexico. *PLoS One* 9: 12.
- Perkins, J. M. and Pedersen, W. L. 1987. Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn. *Plant Disease* 71: 940-943.
- Poehlman, J. M. 2003. *Mejoramiento Genético de las Cosechas*. Limusa. México. 511 p.
- Rajeshwar, T., Narayan, P., Ranga, R. and Sokka, S. 2013. Management of Turcicum leaf blight of maize caused by *Exserohilum turcicum* in maize. *International Journal of Scientific and Research Publications* 3: 10.
- Raymundo, A. D. and Hooker, A. L. 1981. Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses. *Plant Diseases* 65: 325-327.

- Renfro, B. L and Ullstrup, A. J. 1976. A comparison of maize diseases in temperate and in tropical environments. Pest Artic. New Summ. 22: 491-498.
- Reyes, C., P. 1990. El maíz y su Cultivo. AGT Editor S. A. México. D. F. 460 p.
- Robert, A. L. and Findley, W. R. 1952. Diseased corn leaves as a source of infection and natural epidemics of *Helminthosporium turcicum*. Plant Diseases. Report 36: 9-10.
- Robinson, R. 1987. Manejo genético del hospedante en patosistemas agrícolas. Traducido por. García E. R. Colegio de Posgraduados. Montecillos, Mexico. 281 p.
- Sartori, M., Nesci, A., Formento, A. and Etcheverry, M. 2015. Selection of potential biological control of *Exserohilum turcicum* with epiphytic microorganisms from maize. Revista Argentina de Microbiología 47 (1): 62-71.
- Sartori, M., Nesci, A., García, J., Passone, M. A., Montemarani, A. and Etcheverry M. 2017. Efficacy of epiphytic bacteria to prevent northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* in maize. Revista Argentina de Microbiología 49 (1): 75-82.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. Producción anual de cultivos año agrícola 2016 en México. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>. Consultado mayo, 2017.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). 2016. Estadísticas de variedades vegetales. Precios, Existencias y Estadísticas de producción de semilla. Disponible en <http://snics.sagarpa.gob.mx/dov/Paginas/estadisticas-dov.aspx> Consultado abril, 2017.

- Sillón, M. 2008. Enfermedades del cultivo de maíz. En: Satorre, L. Producción de maíz. Buenos Aires, Argentina. 132 p.
- Smith, D.R. and White, D.G. 1988. Diseases of corn. In Corn and Corn Improvement. Agronomy Series 18 .3rd Ed. (Sprague, C.F. and Dudley, J.W.) ASA-CSSA-SSSA, Madison, USA. 701-766 pp.
- Tadeo, R. M., Espinosa, C. A., Solano, A. M. y Martínez, M. R. 2001. Esterilidad masculina para producir semilla híbrida de maíz. Ciencia y Desarrollo. UNAM. 157: 64-75.
- Tadeo, R. M., Espinosa, C. A., Serrano, R. J., Sierra, M. M., Caballero, H. F., Valdivia, B. R., Gómez, M. N., Palafox, C. A., Rodríguez, M. F. A. y Zamudio, G. B. 2010. Productividad de diferentes combinaciones de semilla androestéril y fértil en dos híbridos de maíz. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 1 (3): 273-287.
- Tadeo, R. M., Espinosa, C. A., García, Z. J. J., Lobato, O. R., Gómez, M. N. O., Sierra, M. M. y Valdivia, B. R. 2015. Productividad de híbridos androestériles y fértiles de maíz en cuatro ambientes de evaluación. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8 (6): 1857-1866.
- Tadeo, R. M., Espinosa, C. A., García, Z. J. J., Lobato, O. R., Gómez, M. N. O., Sierra, M. M., Valdivia, B. R., Zamudio, G. B., Martínez, Y. B., López, L. C., Mora, G. K. Y., Canales, I. E. I., Cárdenas, M. A. L., Zaragoza, E. J. y Alcántar, L: H. J. 2016. Tsiri Puma, híbrido de maíz para Valles Altos con esquema de androesterilidad para producción de semillas. Revista Fitotecnia Mexicana 39 (3): 331-333.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Toley, P. W. and Grau, C. R. 1984. Field characterization of rate-reducing resistance to *Phytophthora magasperma* f. sp. *Glycinea* in soybean. *Phytopathology* 74: 1201-1208.
- Turrent, F A. 2009. El potencial productivo del maíz. *Revista de Difusión de la Facultad de Ciencias de la UNAM* 92:126-129.
- Vasal, S. K. y Gonzalez, F. 1999. Non-conventional maize hybrids and their seed production. *Advanced Seed Production Course in Maize, ICAR-CIMMYT Collaborative Program, and Hyderabad, India. 8-12 March, 1999.* 16 pp.
- Vanderplank, J. E. 1984. *Disease Resistance in Plants.* Academic Press, N. Y. 2ª Ed. USA. 194 p.
- Van Inghelandt, D., Melchinger, A. E., Martinant, J. P. and Stich, B. 2012. Genome-wide association mapping of flowering time and northern corn leaf blight (*Setosphaeria turcica*) resistance in a vast commercial maize germplasm set. *BMC Plant biology* 12: 56.
- Vieira, A. R., Mesquini, M. R., Silva, N. C., Hata, T. F., Tessmann, J. D. and Scapim, A. C. 2014. A new diagrammatic scale for the assessment of northern corn leaf blight. *Crop Protection* 56: 55-57.
- Wastie, R. 1991. Breeding for resistance: *Phytophthora infestans*, The cause of late blight of potato. *Adv. Plant. Pathol.* 7: 193-223.
- Welz, H. G. and Geiger, H. H. 2000. Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. *Plant Breeding* 119: 1-14.

- White, G. D. 2004. *Plagas y Enfermedades del Maíz*. 3° Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid-Barcelona-México. 78 p.
- Wisser, R.J., Balint, K. P. J. and Nelson, R. J. 2006. The genetic architecture of disease resistance in maize: A synthesis of published studies. *Phytopathology* 96: 120–129.
- Wych, R.D. 1988. Production of hybrid seed corn In: *Corn and Corn Improvement*. Ed. Sprague G.F. American Society of Agronomy. Madison, USA. 565–607 pp.
- Yongzhong, W., Tim, W. F., Mary, R. T., Lijuan, W., Rui-ju, X., Cigan, A. M., Huffman, G. A., Garnaat, C. W., Howard, H. and Albersten, M. C. 2016. Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. *Plant Biotechnology Journal* 14: 1046-1054.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational Biology* 7: 203-214.
- Zhang, Y., Lubberstedt, T. and Xu, M. 2013. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics* 40: 23-35.