

Resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in native maize germplasm

Resistencia a *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en germoplasma nativo de maíz

Guillermo Márquez-Licona, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, Calle CeProBi No. 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731; **Fernando Castillo-González**, Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad, ¹Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; **Mateo Vargas-Hernández**, ²Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; ¹**Carlos De León-García de Alba***; **Alma Rosa Solano-Báez**, Centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 sur No. 1103, Barrio de Santiago, Puebla, Puebla, CP 72410; ²**Santos Gerardo Leyva-Mir**; ¹**Daniel Téliz-Ortíz**. *Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Recibido: 21 de Mayo, 2020.

Aceptado: 20 de Agosto, 2020.

Márquez-Licona G, Castillo-González F, Vargas-Hernández M, De León-García de Alba C, Solano-Báez AR, Leyva-Mir SG and Téliz-Ortíz D. 2021. Resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in native maize germplasm. Mexican Journal of Phytopathology 39(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-5

Primera publicación DOI: 24 de Septiembre, 2020.

First DOI publication: September 24, 2020.

Resumen. El carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) es una enfermedad que se caracteriza porque el patógeno reemplaza las inflorescencias por soros llenos de teliosporas. El objetivo de este estudio fue investigar la respuesta en campo de 55 poblaciones de maíz nativo a

Abstract. Head smut of maize (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) is a disease characterized by the pathogen replacing inflorescences with sori full of teliospores. The objective of this study was to investigate the response of 55 native maize populations to *S. reilianum* infection. Maize populations were collected in the states of Guerrero (13), Oaxaca (13), Puebla (six), Tlaxcala (12) and Estado de México (11). The seed was inoculated with teliospores of the pathogen, using grenetine as adherent. The hybrid Az 41801 was used as a control. The populations were evaluated in Mixquiahuala, Hidalgo, in the 2015 and 2016 plantings. The incidence of the disease was recorded by direct observation of signs and symptoms in the inflorescences. The maximum incidence of the disease in the maize populations was 28.8% and 22.2% in the first and second evaluation,

la infección por *S. reilianum*. Las poblaciones de maíz se colectaron en los estados de Guerrero (13), Oaxaca (13), Puebla (seis), Tlaxcala (12) y Estado de México (11). La semilla fue inoculada con teliosporas del patógeno, usando grenetina como adherente. El híbrido Az 41801 se utilizó como testigo. Las poblaciones fueron evaluadas en Mixquiahuala, Hidalgo, en los ciclos 2015 y 2016. La incidencia de la enfermedad se registró mediante la observación directa de signos y síntomas en las inflorescencias. La incidencia máxima de la enfermedad en las poblaciones de maíz fue de 28.8% y 22.2% en la primera y segunda evaluación, respectivamente, mientras que el testigo (Az 41801) presentó una incidencia de 70.7% y 42.3%. Considerando el origen geográfico, los maíces del Estado de México y Tlaxcala presentaron una menor incidencia de la enfermedad respecto al resto de las poblaciones, lo que indica la presencia de genes de resistencia a la enfermedad.

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

El maíz (*Zea mays* sp. *mays*) presenta una extraordinaria diversidad genética y morfológica, producto de una domesticación múltiple e independiente (Matsuoka *et al.*, 2002). Los estudios iniciales sobre la diversidad del maíz en México indican que existen 64 razas, divididas en 59 nativas y cinco introducidas (Leyva-Madrigal *et al.*, 2020). Las razas de maíz representan un elemento invaluable para estudiar el proceso evolutivo de esta planta; además constituyen un reservorio genético para el desarrollo de variedades con resistencia genética a patógenos (Goodman y Brown, 1988) y a condiciones ambientales adversas (Arteaga *et al.*, 2016).

respectively, while the control (Az 41801) presented an incidence of 70.7% and 42.3%. Considering the geographical origin, the native maize collections from the Estados de Mexico and Tlaxcala, had a lower incidence of the disease compared to the rest of the populations, which indicates the presence of genes for resistance to the disease.

Key words: *Zea mays*, native maize, resistance, incidence, head smut, artificial inoculation.

Maize (*Zea mays* sp. *mays*) has an extraordinary genetic and morphological diversity as a result of multiple and independent domestication (Matsuoka *et al.*, 2002). The initial studies about maize diversity in Mexico indicate that there are 64 races, which are divided into 59 native and five races that were introduced (Leyva-Madrigal *et al.*, 2020). The maize races represent an invaluable element to study the evolutionary process of this plant, and also constitute a genetic reservoir to develop varieties genetically resistant to pathogens (Goodman and Brown, 1988) and adverse environmental conditions (Arteaga *et al.*, 2016).

Maize is one of the crops with highest commercial value of worldwide agriculture, mainly due to its adaptability to different environments, high yield and wide diversity of uses (Bennetzen and Hake, 2009). In Mexico, maize cropping has the first place in agricultural cultivated area (~50%), where rainfed production prevails (>75%). The national average yield in 2018 was 3.8 t ha⁻¹, reaching a total national production of more than 27 million tons annually (SIAP, 2018). In Mexico, 80% of the area sown to maize is still cultivated in subsistence farming systems, where the use of native varieties that traditional producers have conserved, selected, and exchanged for generations predominates (Leyva-Madrigal *et al.*, 2020).

El maíz es uno de los cultivos de mayor valor comercial en la agricultura mundial, principalmente debido a su adaptabilidad a diferentes ambientes, su rendimiento alto y la amplia diversidad de usos (Bennetzen y Hake, 2009). En México, el cultivo de maíz ocupa el primer lugar en superficie agrícola cultivada (~50%), predominado la producción bajo condiciones de temporal (>75%). El rendimiento promedio nacional en 2018 fue de 3.8 t ha⁻¹, alcanzándose una producción nacional total que supera los 27 millones de toneladas anuales (SIAP, 2018). En México, el 80% de la superficie cultivada de maíz aún se produce a través de agricultura de subsistencia, en donde predomina el uso de materiales nativos que los productores tradicionales han conservado, seleccionado e intercambiado por generaciones (Leyva-Madrigal *et al.*, 2020).

El cultivo del maíz, al igual que cualquier otro cultivo, es afectado por factores bióticos y abióticos que limitan su producción. Dentro de los factores bióticos se encuentran las enfermedades fúngicas como el principal problema. Entre ellas destacan, la pudrición de mazorca y tallo causada por diferentes especies del género *Fusarium* (Mendoza *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Rivas-Valencia *et al.*, 2011), entre las enfermedades foliares sobresalen los tizones ocasionados por *Exserohilum turcicum* y/o *Bipolaris maydis*, las royas causadas por *Puccinia sorghi* o *P. polysora*, el complejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Coniothyrium phyllachorae*), la mancha foliar causada por *Cercospora zea-maydis* y el mildiu inducido por *Peronosclerospora sorghi* (De León, 2008). En mazorca y espiga, la principal enfermedad es el carbón de la espiga causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Basidiomycota, Ustilaginaceae) con reportes de incidencias de hasta el 80% (Frederiksen, 1977) y pérdidas en rendimiento del 37.9% (Martínez y Ledezma, 1990). Actualmente, ésta enfermedad está ampliamente

Maize cropping, the same as any other crop, is affected by biotic and abiotic factors that limit its production. Within the biotic factors, fungal diseases are the main problem. Among the diseases, the most important are ear and stem rots caused by different species of the genus *Fusarium* (Mendoza *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2017; Rivas-Valencia *et al.*, 2011); among foliar diseases stand out leaf blights caused by *Exserohilum turcicum* and/or *Bipolaris maydis*; rusts caused by *Puccinia sorghi* or *P. polysora*; tar spot complex (*Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* and *Coniothyrium phyllachorae*); leaf spot caused by *Cercospora zea-maydis*, and downy mildew induced by *Peronosclerospora sorghi* (De León, 2008). In ear and tassel, the main disease is head smut caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Basidiomycota, Ustilaginaceae) with reports of up to 80% incidence (Frederiksen, 1977) and 37.9% yield losses (Martínez and Ledezma, 1990). Currently, this disease is widely distributed across the maize producing areas with subtropical climate in the world (Martinez *et al.*, 2002). In Mexico, head smut was first reported in Amecameca, State of Mexico, where it infected teocintle plants (Borlaug, 1946), but the disease has not been detected again in the region. In 2011, the pathogen was detected in the states of Jalisco, Durango, Hidalgo and Puebla, but its distribution continues to expand (Aquino-Martínez *et al.*, 2011).

Head smut of maize is a systemic disease of edaphic origin (Lübberstedt *et al.*, 1999). The causal agent, *S. reilianum* f. sp. *zeae*, is a dimorphic phytopathogenic fungus with a haploid saprophytic phase and a diploid parasitic phase. The disease cycle starts when teliospores present in ears and tassels are carried by the wind and rain to be finally settled in the soil (Martinez *et al.*, 2001), where they can survive up to five years (Matyac and Kommedahl, 1986). The fungus

distribuida en las zonas productoras de maíz con clima subtropical del mundo (Martinez *et al.*, 2002). En México, la enfermedad fue reportada por primera vez en Amecameca, Edo. de México infectando plantas de teocintle (Borlaug, 1946), aunque no se ha vuelto a observar la enfermedad en esa región. En 2011, el patógeno se reportó en los estados de Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Aguascalientes, pero su distribución continua ampliándose (Aquino-Martínez *et al.*, 2011).

El carbón de la espiga del maíz es una enfermedad sistémica de origen edáfico (Lübberstedt *et al.*, 1999). El agente causal, *S. reilianum* f. sp. *zeae*, es un hongo fitopatógeno dimórfico, que presenta una fase saprofítica haploide y una fase parasítica diplóide. El ciclo de la enfermedad inicia cuando las teliosporas presentes en mazorcas y panojas son diseminadas por el viento y lluvia, para finalmente depositarse en el suelo (Martinez *et al.*, 2001), en donde sobreviven hasta cinco años (Matyac y Kommedahl, 1986). El hongo infecta al maíz únicamente durante la emergencia de las plántulas, por medio de las teliosporas presentes en el suelo (Xu *et al.*, 1999). Bajo condiciones de humedad y temperatura específicas, las teliosporas germinan formando un basidio de cuatro células y de cada una de ellas, se forma un gran número de basidiosporas de aspecto de levadura, que corresponden a la fase saprofítica haploide (Martinez *et al.*, 2002). Posteriormente, mediante el apareamiento de células compatibles, se forma la fase parasítica diplóide (Martinez *et al.*, 1998). El micelio infectivo penetra las raíces de las plántulas de maíz, por esta razón, en etapas tempranas de la infección hay una proliferación de hifas alrededor de la raíz (Martinez *et al.*, 2001). El micelio crece sistémicamente con el meristemo hasta que, después de la esporogénesis, las inflorescencias son remplazadas total o

infects maize only during seedlings emergence through teliospores present in the soil (Xu *et al.*, 1999). Under specific moisture and temperature conditions, the teliospores germinate and form a four-cell basidium, and then each cell produces a great number of yeast-like basidiospores, which correspond to the haploid saprophytic phase (Martinez *et al.*, 2002). Later, through the mating of compatible cells, the diploid parasitic phase takes place (Martinez *et al.*, 1998). The infective mycelium penetrates the maize seedling roots, and this is the reason why hyphae proliferate around the root in the early stages of infection (Martinez *et al.*, 2001). Mycelium grows systemically with the meristem until, after sporogenesis, the inflorescences are totally or partially replaced by black sori filled with teliospores (Xu *et al.*, 1999). Losses caused by head smut can be reduced by modifying the farming practices (Matyac and Kommedahl, 1985) or applying systemic fungicides to seed (Martínez and Ledezma, 1990; Wright *et al.*, 2006). However, for ecological and economic reasons, the development of genetically resistant germplasm is the most recommended method for controlling the disease (Wang *et al.*, 2008), thus being necessary to identify possible sources of resistance. To date, there is no systematic information about the response of native maize populations to infection caused by *S. reilianum* f. sp. *zeae*. Therefore, the objective of this research was to determine the response of native maize germplasm from the states of Guerrero, State of Mexico, Oaxaca, Puebla, and Tlaxcala to *S. reilianum* f. sp. *zeae* infection. The hypothesis of this research is that native maize from the state of Guerrero will show higher susceptibility to the disease, while maize from the highlands will show increased resistance, as a result of a coevolution process.

parcialmente por soros negros llenos de teliosporas (Xu *et al.*, 1999).

Las pérdidas ocasionadas por la enfermedad pueden reducirse modificando las prácticas agrícolas (Matyac y Kommedahl, 1985) o mediante la aplicación de fungicidas sistémicos a la semilla (Martínez y Ledezma, 1990; Wright *et al.*, 2006). Sin embargo, por razones ecológicas y económicas, la generación de germoplasma con resistencia genética a la enfermedad es el método de control más recomendable (Wang *et al.*, 2008), por lo que es necesaria la identificación de posibles fuentes de resistencia. A la fecha, se carece de información sistemática sobre la respuesta de poblaciones de maíz nativas a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae*. Así, el objetivo de la presente investigación fue determinar la respuesta de germoplasma de maíz nativo proveniente de los estados de Guerrero, Estado de México, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae*. La hipótesis de esta investigación es que los maíces nativos del estado de Guerrero mostrarán una mayor susceptibilidad a la enfermedad, mientras que los maíces originarios de valles altos presentarán una mayor resistencia, como producto de un proceso de coevolución.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germoplasma de maíz nativo. Se evaluaron 55 poblaciones de maíz nativo que previamente Briones-Reyes *et al.* (2015) colectaron y caracterizaron, provenientes de 19 localidades ubicadas entre los 1498 y 2520 msnm, de cinco estados: 13 de la región de Montaña de Guerrero, 11 del Sureste del Estado de México, 13 de la Mixteca Alta de Oaxaca, seis de Puebla y 12 de Tlaxcala (Cuadro 1). Las colectas de maíz se mantuvieron en cuarto frío a -4 °C desde la colecta hasta el momento de su uso.

MATERIALS AND METHODS

Native maize germplasm. For this research, 55 native maize populations, previously collected and characterized (Briones-Reyes *et al.* (2015), were evaluated. The populations were collected at 19 sites in five states located between 1498 and 2520 masl: Montaña de Guerrero region (13), southeast State of Mexico (11), Mixteca Alta of Oaxaca (13), Puebla (6) and Tlaxcala (12) (Table 1). The maize collections were kept in a cold room at -4 °C since the date of collection until they were used.

Source of inoculum and seed inoculation. The source of inoculum were teliospores collected in 2014 at a maize lot (hybrid Cardenal, Asgrow®) in the municipality of Tenango del Valle, Mexico. The teliospores were removed from sori, passed through a 117 micron sieve (Mont Inox®), stored in plastic containers with envelopes containing CaCl₂ (J. T. Baker and Macron Fine Chemicals® 94%), and kept at 20 ± 2 °C until they were used. The inoculum was morphologically characterized using the methodology of Vánky (2012), and molecularly characterized based on the methodology proposed by Márquez-Licona *et al.* (2018). The morphological characterization of the inoculum was conducted by observing pathogen's teliospores placed on slides. For this procedure, 100 teliospores were measured and characterized with a 100 X compound microscope (CX31RBSFA, Olympus®). The molecular characterization was performed using monobasidial cultures and amplifying the ITS region (Internal Transcribed Spacer), as well as part of the LSU rDNA region (Large Subunit Ribosomal DNA), using ITS1F/NL4 primers (Gardes and Bruns 1993; O'Donnell *et al.*, 1998).

The extraction of total DNA of the monobasidial cultures was made with the Ultra Clean® Microbial DNA Isolation Kit commercial kit (MoBio

**Cuadro 1. Origen geográfico de las 55 poblaciones de maíz nativo colectadas y caracterizadas por Briones-Reyes *et al.* (2015).
Table 1. Geographical origin of the 55 native maize populations collected and characterized by Briones-Reyes *et al.* (2015).**

| Población | Procedencia geográfica | | | | Altitud (msnm) |
|-----------|---------------------------|-------------|------------------|--|----------------|
| | Localidad | Municipio | Estado | | |
| 1 | El Nuevo Paraíso | Cualác | Guerrero | | 2222 |
| 6 | El Nuevo Paraíso | Cualác | Guerrero | | 2222 |
| 7 | El Nuevo Paraíso | Cualác | Guerrero | | 2222 |
| 20 | El Nuevo Paraíso | Cualác | Guerrero | | 2222 |
| 18 | Almolonga | Tixtla | Guerrero | | 1593 |
| 21 | Ojitos de agua | Tixtla | Guerrero | | 1593 |
| 22 | Ojitos de agua | Tixtla | Guerrero | | 1593 |
| 25 | El Ahuejote | Tixtla | Guerrero | | 1872 |
| 54 | Plan de Guerrero | Tixtla | Guerrero | | 1498 |
| 55 | Chilacachapa | Tixtla | Guerrero | | 1990 |
| 19 | Las Trancas | Zitlala | Guerrero | | 1564 |
| 24 | Las Trancas | Zitlala | Guerrero | | 1564 |
| 23 | El refugio | Chilapa | Guerrero | | 1680 |
| 2 | Sta. Justina | Ixtacuixtla | Tlaxcala | | 2220 |
| 3 | Sta. Justina | Ixtacuixtla | Tlaxcala | | 2220 |
| 4 | Sta. Justina | Ixtacuixtla | Tlaxcala | | 2220 |
| 11 | Sta. Justina | Ixtacuixtla | Tlaxcala | | 2220 |
| 12 | Sta. Justina | Ixtacuixtla | Tlaxcala | | 2220 |
| 13 | Sta. Justina | Ixtacuixtla | Tlaxcala | | 2220 |
| 14 | Sta. Justina | Ixtacuixtla | Tlaxcala | | 2220 |
| 5 | Los reyes Q. | Los Reyes | Tlaxcala | | 2300 |
| 37 | Nanacamilpa | Nanacamilpa | Tlaxcala | | 2720 |
| 39 | Vicente Guerrero | Españita | Tlaxcala | | 2520 |
| 40 | Vicente Guerrero | Españita | Tlaxcala | | 2520 |
| 48 | iTS0 EH | Españita | Tlaxcala | | 2520 |
| 8 | El pueblito Cuecucuatitla | Tepetlixpa | Estado de México | | 2270 |
| 41 | Tlapala 2008 | Chalco | Estado de México | | 2264 |
| 42 | Tlapala 2008 | Chalco | Estado de México | | 2264 |
| 43 | Sel-2009 | Chalco | Estado de México | | 2264 |
| 47 | Tlapala 2009 | Chalco | Estado de México | | 2264 |
| 44 | Ay-09 Sr. Marcelino | Ayapango | Estado de México | | 2452 |
| 46 | Poxtla -09 | Ayapango | Estado de México | | 2452 |
| 52 | Col 21-010 Ayap | Ayapango | Estado de México | | 2452 |
| 53 | Col 24-010 Ayap | Ayapango | Estado de México | | 2452 |
| 45 | ♂ Desespigam-09 | Texcoco | Estado de México | | 2250 |
| 51 | FMH 4A Ancho | Texcoco | Estado de México | | 2250 |
| 9 | Sta. María Tataltepec | Tataltepec | Oaxaca | | 1600 |
| 10 | Sta. María Tayata | Tayata | Oaxaca | | 2144 |
| 17 | Huamelulpan | Huamelulpan | Oaxaca | | 2200 |
| 26 | Sn. M. Huamelulpan | Huamelulpan | Oaxaca | | 2200 |
| 32 | De la unión | Huamelulpan | Oaxaca | | 2200 |
| 33 | De la unión | Huamelulpan | Oaxaca | | 2200 |
| 34 | De la unión | Huamelulpan | Oaxaca | | 2200 |
| 27 | Cuesta Blanca | Tezoatlan | Oaxaca | | 2143 |
| 35 | Cuesta Blanca | Tezoatlan | Oaxaca | | 2143 |
| 28 | El Chamizal | Ticua | Oaxaca | | 2285 |
| 29 | El Chamizal | Ticua | Oaxaca | | 2285 |
| 30 | Fortín de Juárez | Ticua | Oaxaca | | 2287 |
| 31 | El Chamizal | Ticua | Oaxaca | | 2285 |
| 15 | S. J. Morelos | Libres | Puebla | | 2400 |
| 16 | S. J. Morelos | Libres | Puebla | | 2400 |
| 36 | S. J. Morelos | Libres | Puebla | | 2400 |
| 38 | S. J. Morelos | Libres | Puebla | | 2400 |
| 49 | Zoatecpán | Xochitlán | Puebla | | 1610 |
| 50 | Zoatecpán | Xochitlán | Puebla | | 1610 |

Fuente de inóculo e inoculación de semillas.

La fuente de inóculo fueron teliosporas colectadas en 2014 en un lote de maíz (híbrido Cardenal, Asgrow®) en el municipio de Tenango del Valle, Méx. Las teliosporas se retiraron de los soros, se pasaron por un tamiz de 117 micras (Mont Inox®), se almacenaron en envases de plástico con sobres conteniendo CaCl₂ (J. T. Baker y Macron Fine Chemicals® 94%), y se conservaron a 20 ± 2 °C hasta el momento de su uso. El inóculo se caracterizó morfológicamente utilizando la metodología de Vánky (2012) y molecularmente tomando como base la metodología propuesta por Márquez-Licona *et al.* (2018). La caracterización morfológica del inóculo se realizó observando laminillas con teliosporas del patógeno. Para esto, se midieron y caracterizaron 100 teliosporas al microscopio compuesto a 100 X (CX31RBSFA, Olympus®). La caracterización molecular se realizó a partir de cultivos monobasidiales, amplificando la región ITS (Internal Transcribed Spacer) y parte de la región LSU rDNA (Large Subunit Ribosomal DNA) usando los iniciadores ITS1F/NL4 (Gardes y Bruns 1993; O'Donnell *et al.*, 1998).

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

Laboratories Inc). The DNA integrity was verified in 1% agarose gel and the amount of DNA was determined by spectrophotometry at 260 nm absorbance (Nanodrop® ND-1 V 3.2.1). For amplification, a mixture was prepared using 25 µL, buffer My Taq 1X, 10 pm of each primer, 1U MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline Germany) and 100 ng of DNA. The amplification was carried out in a Mastercycler Pro thermocycler (Eppendorf®) at 94 °C initial denaturation temperature for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, plus one cycle at 72 °C for 10 min for the final extension. The amplified fragments were visualized in 1% agarose gel electrophoresis at 120 volts for 30 min. The size of the amplified fragment was estimated with the Pst I marker (Microzone®). Once electrophoresis ended, the gel was analyzed with a Chemi Genius 2 Bio Imaging System photodocumenter (Syngene®). The PCR products were purified as described by Kirby (1965) and sequenced in Macrogen Europe (Amsterdam, The Netherlands). The quality of the sequences was determined by observing the electropherograms with the 4peaks® Nucleobytes software (Griekspoor and Groothuis, 1994), and U GENE (Okonechnikov *et al.*, 2012) for the consensus sequence. The obtained sequences were compared to the records in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Blastn tool (Altschul *et al.*, 1990). The sequences were stored in the same database.

The seed viability was verified before inoculating the seed, as described by Quezada-Salinas *et al.* (2013). For inoculation, the teliospores were adhered to the seed using a 10% aqueous grenetine solution at 20 °C (Márquez-Licona *et al.*, 2018). The seeds (66 of each population, 22 per replication) were immersed in the grenetine solution for 1 min, recovered in a Petri dish and completely covered with teliospores (~40 000 teliospores/seed). The inoculated seeds were dried

de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 120 volts por 30 min. Para estimar el tamaño del fragmento amplificado se utilizó el marcador molecular Pst I (Microzone®). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se analizó con un fotodocumentador Chemi Genius 2 Bio Imaging System (Syngene®). Los productos de PCR se purificaron según lo descrito por Kirby (1965) y se secuenciaron en Macro-gen Europe, Amsterdam, Holanda. La calidad de las secuencias se determinó mediante la observación de los electroferogramas usando el software 4peaks® Nucleobytes (Griekspoor y Groothuis, 1994), mientras que las secuencias consenso hicieron usando el software U GENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), utilizando la herramienta Blastn (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias se dieron de alta en la misma base de datos.

La viabilidad se verificó previo a la inoculación de la semilla como lo describen Quezada-Salinas *et al.* (2013). Para la inoculación, las teliosporas se adhirieron a la semilla usando una solución acuosa de grenetina al 10% a 20 °C (Márquez-Licona *et al.*, 2018). Las semillas (66 por cada población, 22 por repetición) se incorporaron a la solución de grenetina por 1 min, se recuperaron en una caja de Petri y se cubrieron completamente con teliosporas (~ 40 000 teliosporas/semilla). Las semillas inoculadas se secaron por 24 h a 22 °C. Como testigos se usaron semillas de maíz del híbrido Az 41801® inoculadas y sin inocular.

Evaluación de la respuesta de maíz nativo. La respuesta de las poblaciones de maíz nativo a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* se evaluó sembrándolas en un lote en el Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hgo. (20° 11' 24.6" N 99° 14' 35.2"

for 24 h at 22 °C. Seeds of the hybrid Az 41801®, inoculated and non-inoculated, were used as the control.

Evaluation of the response of native maize. The response of native maize populations to *S. reilianum* f. sp. *zeae* infection was evaluated by planting them in a lot at Ejido Cinta Larga, Mixquiahuala, Hidalgo (20° 11' 24.6" N 99° 14' 35.2" W; 2030 masl), with semi-dry and temperate climate, in the 2015 and 2016 spring-summer cycles, using the same randomization. In both evaluations, the native maize populations, the plot where the evaluation was conducted, the source of inoculum and the percent of germinated teliospores were stable. The inoculated seed of each population was sown in 3-m long rows and 0.80 m between rows, at 5 cm depth, separated 13.5 cm between seeds. The experimental unit consisted of one 22-plant row with 3 replications. The experiment was established in a completely randomized design. After planting, flood irrigation was applied to the plot (an irrigation sheet of 140 mm), and subsequent irrigation was applied at stages V5, V7, VT, R2 and R5. The lack of moisture between the first and second irrigation increased the percent of head smut incidence, as reported by Matyac and Kommedahl (1985). As part of the agricultural practices of soil removal after sowing, only one cultivator step was carried out in stage V4. Insect pests and weeds were controlled according to the regional technological package, this is, using chemical products that are sold in the region.

The disease incidence in the populations was recorded 45 days after flowering started. A plant with symptoms in the tassel or the ear, or both, was considered as an infected plant. The disease incidence was determined as the quotient of the number of plants with symptoms and the total of plants in the experimental unit multiplied by 100.

W; 2030 msnm; clima templado semiseco, en los ciclos primavera-verano de 2015 y 2016, bajo la misma aleatorización. En ambas evaluaciones, las poblaciones de maíz nativo evaluadas, el terreno usado en la evaluación, la fuente de inóculo y el porcentaje de germinación de las teliosporas se mantuvieron estables. La semilla inoculada de cada población se sembró en surcos de 3 m de largo y 0.80 m entre surcos, a una profundidad de 5 cm, con separación de 13.5 cm entre semillas. La unidad experimental consistió en un surco con 22 plantas con 3 repeticiones. El diseño experimental fue un Diseño en Bloques Completos al Azar. Después de la siembra, el terreno se regó por inundación (lamina de riego 140 mm), los riegos posteriores se realizaron en las etapas V5, V7, VT, R2 y R5. La escasez de humedad entre el primer y el segundo riego incrementa el porcentaje de incidencia del carbón de la espiga según lo reportado por Matyac y Kommedahl (1985). Dentro de las prácticas agrícolas de remoción del suelo posteriores a la siembra, solo se realizó un paso de cultivadora en etapa V4. El manejo de plagas insectiles y malezas se realizó de acuerdo con el paquete tecnológico regional, mediante el uso de productos químicos comercializados en la región.

La incidencia de la enfermedad en las poblaciones se registró 45 días después del inicio de la floración. Se consideró como planta enferma aquella que presentó síntomas en la espiga, en la mazorca, o ambas. La incidencia de la enfermedad se determinó como el cociente entre plantas con síntomas y el total de plantas en la unidad experimental multiplicado por 100. Considerando los valores de incidencia, las poblaciones se agruparon de acuerdo con la escala propuesta por Quezada-Salinas *et al.* (2017), la cual considera los siguientes rangos 0-10%=altamente resistente, 11-25%= moderadamente resistente, 26-50%= moderadamente susceptible, 51-75%= susceptible y 76-100%= altamente

Based on the incidence values, the populations were grouped according to the scale proposed by Quezada-Salinas *et al.* (2017), which considers the following ranges: 0-10%=highly resistant, 11-25%=moderately resistant, 26-50%=moderately susceptible, 51-75%=susceptible, and 76-100%=highly susceptible. To obtain the disease incidence, a combined analysis of variance of the two years was conducted, where the model also included the State factor, and the genotypes were nested within the State and the year×gen Interaction (state). The base 10 logarithm transformation was applied to the incidence response variable. The tests were conducted under the logarithm transformation to keep the statistical validity of the analysis of variance, but the mean values were expressed in the original units. The comparison of multiple means for years and states was made using the Least Significant Difference method, and Tukey's Honest Significant Difference method to compare multiple means adjusted by minimum squares (lsmeans), considering a level of 5% significance in both cases. The statistical analyses were conducted using SAS® Systems for Windows V 9.4 (SAS Institute Inc., 2013) statistical software.

RESULTS AND DISCUSSION

Source of inoculum and seed inoculation.

When the inoculum was morphologically characterized, teliospore clusters 73 µm in diameter were observed. The teliospores (10-12 x 11-13.5 µm) were globose-to-subglobose, mainly dark brown in color, with ornamentations. The previously described characteristics are in agreement with those reported by Vánky, 2012 for *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* species. In the molecular characterization of the inoculum, the comparison of the sequences obtained in this

susceptible. Para los datos de incidencia de la enfermedad se realizó un análisis de la varianza combinado a través de los dos años incluyendo en el modelo también al factor Estado, los genotipos se anidaron dentro de Estado y la Interacción año×gen (estado). A la variable respuesta incidencia se le aplicó la transformación logaritmo base 10. Las pruebas se hicieron bajo la transformación logaritmo para conservar la validez estadística del análisis de la varianza, sin embargo, los valores de las medias se expresaron en las unidades originales. La comparación múltiple de medias para años y estados se realizó mediante el método de la Diferencia Mínima Significativa y la comparación múltiple de medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsmeans) realizó mediante el método de la Diferencia Significativa Honesta de Tukey, en ambos casos, considerando un nivel de significancia del 5%. Los análisis estadísticos se hicieron usando del software estadístico SAS® Systems for Windows V 9.4 (SAS Institute Inc., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fuente de inóculo e inoculación de semillas. En la caracterización morfológica del inóculo, se observaron aglomeraciones de teliosporas de 73 µm de diámetro. Las teliosporas (10-12 x 11-13.5 µm) fueron de globosas a subglobosas, principalmente de coloración café oscuro, con presencia de ornamentaciones. Las características antes descritas concuerdan con lo reportado por (Vánky, 2012) para la especie *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. En la caracterización molecular del inóculo, la comparación de la secuencias obtenidas en el presente estudio (KY856895, KY856896) mediante la herramienta Blastn (Altschul *et al.*, 1990), mostró 99% de identidad con un fragmento correspondiente a la región ITS del genoma completo de *S. reilianum*

study (KY856895, KY856896) using the Blastn tool (Altschul *et al.*, 1990) showed 99% identity with a fragment corresponding to the ITS region of the full genome of *S. reilianum* f. sp. *zeae* deposited in the GeneBank (NCBI) by Schirawski *et al.* (2010), thus confirming the identity of the inoculated pathogen. Of the teliospores used as a source of inoculum, 48% germinated in acidified PDA medium after 24 h incubation in darkness at 25 °C, thus demonstrating the inoculum viability, which exceeded the viability percent reported in other investigations such as those of Osorio and Frederiksen (1998), Potter (1914) and Quezada-Salinas *et al.* (2013). In this study, the germinated teliospores formed a four-cell septate basidium, and each cell produced a hyaline, unicellular and subglobose basidiospore, which produced a great number of sporidia that then formed yeast-type colonies, cream in color (Figure 1 A-B), which is in agreement with what Márquez-Licona *et al.* (2018) reported.

Evaluation of the response of native maize.

In 2015, from March to September the average temperature value was of 17.7 °C, with average rainfall of 67.5 mm, and average relative humidity of 72.6%. In 2016, during the same period, the temperature average value was of 16.8 °C, average rainfall of 101.2 mm and average relative humidity of 74.8%. Thirty days after sowing, when seedlings infection occurs, the average rainfall was 41 mm higher in 2016 than in the previous year. Forty five days after flowering started, plants of the non-inoculated control remained healthy, thus demonstrating the absence of inoculum in the soil, while the plants from inoculated seed showed formation of sori filled with teliospores which totally or partially replaced the tassel and the ear (Figure 1 C-F), as mentioned by Xu *et al.* (1999), which caused a marked reduction in pollen and

f. sp. *zeae* depositado en el GenBank (NCBI) por Schirawski *et al.* (2010), corroborándose la identidad del patógeno inoculado. Las teliosporas empleadas como fuente de inóculo tuvieron un 48% de germinación después de 24 h, incubadas en oscuridad a 25 °C, en medio de cultivo PDA acidulado, demostrándose así la viabilidad del inóculo, superando el porcentaje de viabilidad reportado en otras investigaciones como Osorio y Frederiksen (1998), Potter (1914) y Quezada-Salinas *et al.* (2013). En el presente estudio, las teliosporas germinadas formaron un basidio septado de cuatro células, cada célula originó una basidiospora hialina, unicelular, subglobosa, a partir de las cuales desarrollaron numerosas esporidias que formaron colonias tipo levadura color crema (Figura 1 A-B), lo que concuerda con lo reportado por Márquez-Licono *et al.* (2018).

Evaluación de la respuesta de maíz nativo. En 2015, el valor promedio de temperatura de marzo a septiembre fue de 17.7 °C, con una precipitación promedio fue de 67.5 mm, y humedad relativa promedio de 72.6%. En 2016, durante el mismo período, el valor promedio de temperatura fue de 16.8 °C, precipitación promedio de 101.2 mm y humedad relativa promedio de 74.8%. En los 30 días posteriores a la siembra, donde ocurre la infección de las plántulas, la precipitación promedio fue 41 mm superior en 2016, respecto al año anterior. Después de 45 días del inicio de la floración, las plantas del testigo no inoculado permanecieron sanas, demostrándose así la ausencia de inóculo en el suelo, mientras que las plantas provenientes de semilla inoculada mostraron formación de soros llenos de teliosporas que remplazaron total o parcialmente la espiga y la mazorca de las plantas (Figura 1 C-F) como lo mencionan Xu *et al.* (1999), observándose una marcada reducción en la producción de polen y grano como lo describen Ghareeb *et al.* (2011).

grain production, as described by Ghareeb *et al.* (2011).

In 2015, 37 of the native maize populations showed head smut symptoms in at least one of the replications, and the disease incidence in the 55 native maize populations ranged from 0 to 28.8%. Of the 55 native maize populations, 72.7% had incidence ranging from 0 to 10%, 21.8% incidence from 11 to 25%, and 5.5% of the collections from 26 to 50% incidence. In the same evaluation, 100 and 83.3% of the native maize populations from the States of Mexico and Tlaxcala, respectively, were highly resistant to *S. reilianum* f. sp. *zeae*, while populations 19 and 21 from Guerrero, and population 30 from Oaxaca, reached a level of incidence higher than 26%, so they were classified as moderately susceptible. For the 2016 cropping cycle, only 21 of the 55 native maize populations showed head smut symptoms in at least one of their replications, and the disease incidence in the 55 native maize populations ranged from 0 to 22.2%. Out of the 55 native maize populations, 94.5% showed incidences ranging from 0 to 10%, and 5.5% from 11 to 25%. In the same evaluation, 100% of the native populations from the States of Mexico, Tlaxcala and Oaxaca were highly resistant to *S. reilianum* f. sp. *zeae*, while populations 19 and 24 from Guerrero and population 16 from Puebla reached a level of incidence ranging from 11 to 25%, so they were classified as moderately resistant (Table 2). In the second evaluation year (2016), the disease incidence in the populations was lower than in the previous year. The same happened to the inoculated control (hybrid AZ 41801®), where the disease incidence decreased by 28.4% between the first and the second evaluation. This may be attributed to a soil humidity increase due to higher rainfall in the second evaluation year. These results suggest that a humidity increase after sowing affected the fungus ability to infect

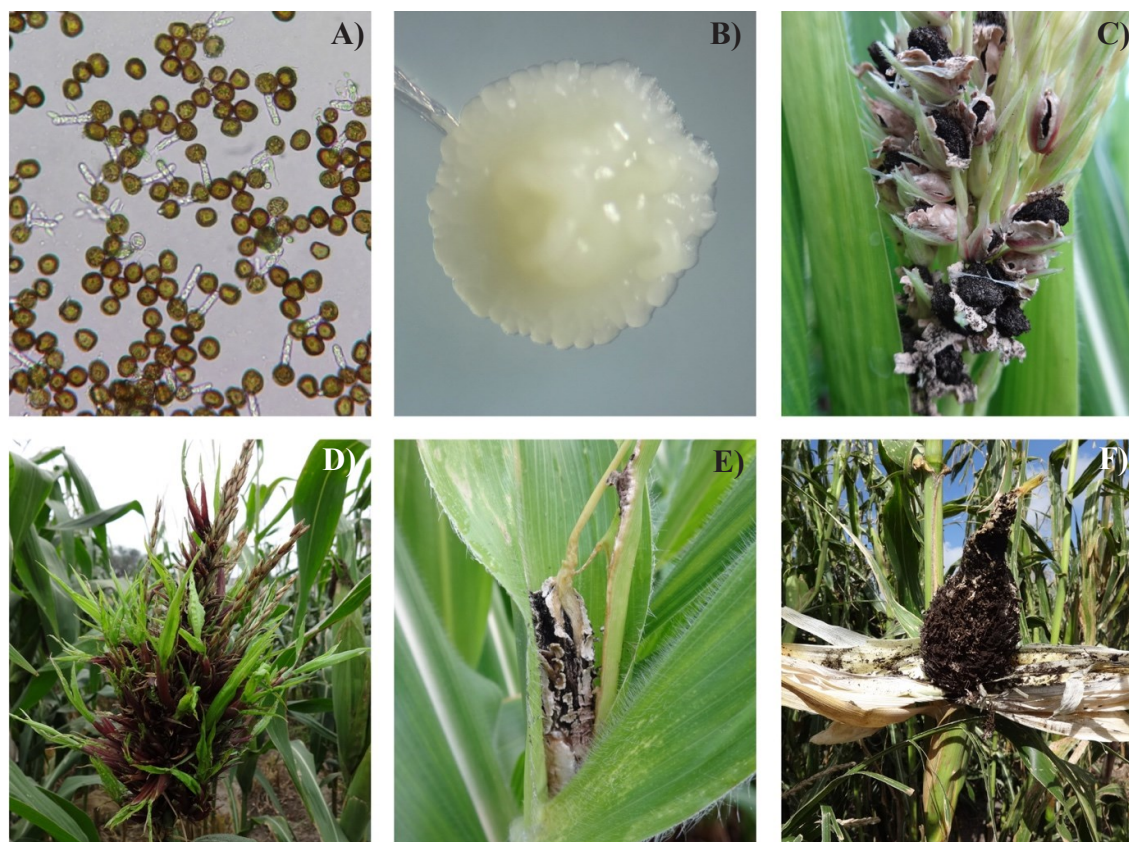


Figura 1. *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*. A) Teliosporas germinadas en PDA 24 h después de la siembra. B) Cultivo monobasidial en PDA 5 días después de la siembra. C) Reemplazo parcial de la inflorescencia masculina. D) Síntomas de filodia en plantas enfermas. E) Atrofia de la inflorescencia masculina. F) Reemplazo total de la mazorca por soros llenos de teliosporas.

Figure 1. *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*. A) Teliospores germinated in PDA 24 h after sowing. B) Monobasidial culture in PDA 5 days after sowing. C) Partial replacement of male inflorescence. D) Symptoms of phyllody in infected plants. E) Male inflorescence atrophy. F) Total replacement of ear by sori filled with teliospores.

En 2015, 37 de las 55 poblaciones de maíz nativo presentaron síntomas del carbón de la espiga en al menos una de las repeticiones y la incidencia de la enfermedad en las 55 poblaciones de maíz nativo varió entre 0 y 28.8%. De las 55 poblaciones de maíz nativo, el 72.7% presentaron incidencias entre 0 y 10%, el 21.8% incidencias entre 11 y 25% y el 5.5% de las colectas presentaron entre el 26 y el 50% de incidencia. En la misma evaluación, se encontró que el 100 y el 83.3% de las poblaciones nativas del Estado de México y Tlaxcala, fueron

maize seedling roots, as mentioned by Matyac and Kommedahl (1985).

The high values of disease incidence in the inoculated hybrid, compared to the incidence recorded for native maize populations, may be due to the fact that no disease resistance genes have been incorporated into the selection process of the hybrid parent lines, while the genetic diversity present in the native maize collections is broader and can express certain levels of resistance, as mentioned by Fehr (1993) and Hallauer *et al.* (2010). For this

altamente resistentes a *S. reilianum* f. sp. *zeae*; mientras que las poblaciones 19 y 21 de Guerrero y la población 30 de Oaxaca alcanzaron incidencias superiores al 26%, clasificándose como moderadamente susceptibles. Para el ciclo 2016, solo 21 de las 55 poblaciones de maíz nativo presentaron síntomas del carbón de la espiga del maíz en al menos una de sus repeticiones y la incidencia de la enfermedad en las 55 poblaciones de maíz nativo fluctuó entre 0 y 22.2%. De las 55 poblaciones de maíz nativo, el 94.5% presentaron incidencias entre 0 y 10% y el 5.5% de las poblaciones presentaron incidencia entre 11 y 25 %. En la misma evaluación, se encontró que el 100% de las poblaciones nativas de los estados de Edo. de México, Tlaxcala y Oaxaca, fueron altamente resistentes a *S. reilianum* f. sp. *zeae*, mientras que las poblaciones 19 y 24 de Guerrero y la población 16 de Puebla alcanzaron

reason, keeping maize genetic diversity is essential for future genetic development, since the lack of genetic diversity may compromise the possibility of developing high-yielding materials better adapted to adverse environmental conditions, as well as the development of disease-resistant germplasm (Giordani *et al.*, 2019).

Regarding the combined analysis of variance of head smut incidence in tassel in 55 maize genotypes evaluated for two years, there were highly significant differences in the main effects of year, state and genotype, but not in the year × genotype interaction (Table 3). The results show that the populations (genotype), the origin and the evaluation year influenced the incidence of head smut in maize tassel. Significant statistical differences of the same type were found by Briones-Reyes *et al.* (2015) when the authors evaluated the

Cuadro 2. Variación de la incidencia del carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) en 55 poblaciones de maíz nativo inoculado (Mixquiahuala, Hidalgo primavera-verano, 2015 y 2016).

Table 2. Variation in the incidence of head smut on maize tassel (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) in 55 populations of native maize inoculated (Mixquiahuala, Hidalgo, spring-summer, 2015 and 2016).

| Estado | Líneas enfermas (2015) | | | | | Líneas enfermas (2016) | | | | |
|-------------------------------|---|--------------|--------------|------------|------------|------------------------|--------------|------------|------------|------------|
| | Incidencia de la enfermedad (%) | | | | | | | | | |
| | 0-10 | 11-25 | 26-50 | 51-75 | 76-100 | 0-10 | 11-25 | 26-50 | 51-75 | 76-100 |
| Tlaxcala (12) ^x | 10 ^y (83.33) ^z | 2 (16.66) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 12 (100) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Guerrero (13) | 6 (46.15) | 5 (38.46) | 2 (15.38) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 10 (76.92) | 3 (23.07) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Puebla (6) | 4 (66.66) | 2 (33.33) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 6 (100) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Oaxaca (13) | 9 (69.23) | 3 (23.07) | 1 (7.69) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 13 (100) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| México (11) | 11 (100) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 11 (100) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |

Escala para la clasificación de poblaciones de maíz nativo: 0-10%=altamente resistente, 11-25%= moderadamente resistente, 26-50%= moderadamente susceptible, 51-75%= susceptible y 76-100%= altamente susceptible. ^x= Número total de poblaciones de maíz nativo evaluadas por estado. ^y= número de poblaciones de maíz nativo enfermas en el rango correspondiente. ^z= Porcentaje de poblaciones de maíz nativo enfermas en el rango correspondiente, respecto al total de líneas evaluadas por estado. / Scale to classify native maize populations: 0-10%=Highly resistant, 11-25%= moderately resistant, 26-50%= moderately susceptible, 51-75%= susceptible, and 76-100%= highly susceptible. ^x=Total number of evaluated native maize populations by state. ^y=number of infected native maize populations in the corresponding range. ^z=Percent of infected native maize populations in the corresponding range compared to the total of evaluated lines by state.

incidencias entre el 11 y el 25%, clasificándose como moderadamente resistentes (Cuadro 2). En el segundo año de evaluación (2016), la incidencia de la enfermedad en las poblaciones fue menor respecto a la evaluación del año anterior. Lo mismo sucedió en el testigo inoculado (híbrido AZ 41801®), en donde se observó una disminución del 28.4% en la incidencia de la enfermedad entre la primera y la segunda evaluación. Lo anterior se puede atribuir a un incremento en la humedad del suelo, esto como resultado de una mayor precipitación en el segundo año de evaluación. Estos resultados sugieren que la condición de alta humedad posterior a la siembra afectó la capacidad del hongo para infectar las raíces de las plántulas de maíz, como lo mencionan Matyac y Kommedahl (1985).

Los valores elevados en la incidencia de la enfermedad en el híbrido inoculado, respecto a la incidencia registrada en las poblaciones de maíz nativo, puede deberse a que no se han incorporado genes de resistencia a la enfermedad dentro del proceso de selección de las líneas parentales del híbrido, mientras que la diversidad genética presente en las colectas de maíz nativo es más amplia y puede expresar ciertos niveles de resistencia como lo mencionan Fehr (1993) y Hallauer *et al.* (2010). Por esta razón, la conservación de la diversidad genética del maíz es crucial para el mejoramiento genético a futuro, debido a que la falta de diversidad genética compromete la posibilidad de generar materiales con mejores rendimientos, la adaptación a condiciones ambientales adversas y el desarrollo de germoplasma resistente a enfermedades (Giordani *et al.*, 2019).

Respecto al análisis de la varianza combinado de la incidencia de carbón de la espiga en 55 genotipos de maíz evaluados durante dos años, se encontró que hubo diferencias altamente significativas para los efectos principales de año, estado y genotipo, pero no hubo efecto de interacción año ×

response of the same native maize populations to ear rot caused by *Fusarium* spp. under natural infection conditions. The differences among the populations and their origin show the phenotypic and genotypic diversity present in the variants of the existing native maize in the states of origin. The significant differences in disease incidence from one evaluation year to another, where the only source of variation was the amount of soil humidity, suggest that there is an inversely proportional relation between soil moisture and disease incidence, which is in agreement with the results obtained by Matyac and Kommedahl (1985).

The comparison of multiple means for years and states, using the Least Minimum Difference test and the logarithm transformation of the variable response to stem head smut incidence, divided the populations into four defined groups (Table 4). The first group included populations from Tlaxcala and the State of Mexico, which had a lower percent of disease incidence. The second group was formed by populations from Oaxaca and Puebla. The third group included only populations from Guerrero, and the last group was the inoculated control, which had the highest incidence mean in the study.

Table 5 shows the results of the comparison of means of the genotypes nested in the states and through the two years. In this analysis, 8 of the 11 populations of native maize from the State of Mexico were not affected by the pathogen in none of their replications, in both evaluations, while 6 of 13 populations from Guerrero had an intermediate incidence equal to or higher than 10%. The resistance of the maize populations from the State of Mexico could be explained by the fact that the disease was first reported in Amecameca (Borlaug, 1946) in teocintle plants and that the maize crops in the region may have been exposed to the pathogen, thus occurring the coevolution between the pathogen and the host. On the other

Cuadro 3. Análisis de la varianza combinado usando el logaritmo base 10 de la incidencia de carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) en 56 genotipos de maíz colectados en diferentes estados de la república mexicana, evaluados durante dos años (2015-2016).

Table 3. Combined analysis of variance using the base 10 logarithm to determine head smut incidence on tassel (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) in 56 maize genotypes collected in different Mexican states, evaluated for two years (2015-2016).

| Fuente variación | Grados de libertad | Cuadrados Medios | Prob. |
|------------------|--------------------|------------------|---------|
| Modelo | 115 | 0.5359 | <0.0001 |
| Año | 1 | 6.9491 | <0.0001 |
| Estado | 5 | 4.4818 | <0.0001 |
| Rep(año) | 4 | 0.3236 | 0.2171 |
| Gen(Estado) | 50 | 0.3309 | 0.0283 |
| Año* Gen(Estado) | 55 | 0.2693 | 0.1705 |
| Error | 219 | 0.2225 | |
| Total | 334 | | |

genotipo (Cuadro 3). Los resultados muestran que las poblaciones (genotipo), el origen y el año de evaluación influyeron en la incidencia del carbón de la espiga del maíz. Diferencias estadísticas significativas del mismo tipo fueron encontradas por Briones-Reyes *et al.* (2015) al evaluar la respuesta de las mismas poblaciones de maíz nativo a la pudrición de mazorca causada por *Fusarium* spp. bajo condiciones de infección natural. Las diferencias entre las poblaciones y el origen de estas muestran la diversidad fenotípica y genotípica presente en las variantes de maíz nativo existente en los estados de origen. Las diferencias significativas entre la incidencia de la enfermedad de un año de evaluación al siguiente, en donde la única fuente de variación fue la cantidad de humedad en el suelo, sugiere una relación inversamente proporcional entre la cantidad de humedad presente en el suelo y la incidencia de la enfermedad, lo que concuerda con lo descrito por Matyac y Kommedahl (1985).

La comparación múltiple de medias para los efectos de años y de estados, usando la prueba de la Diferencia Mínima Significativa y la transformación logaritmo de la variable respuesta incidencia

hand, the maize populations from Guerrero were the most susceptible to the disease, and this result is in agreement with our initial hypothesis, which is based on observations in the field, where a greater disease susceptibility has been detected in hybrids developed using maize lines from the state of Guerrero (Tuxpeño race) (Dr. Fernando Castillo González, personal communication). Conversely, when the same 55 populations were used to evaluate their response to ear rot caused by *Fusarium* spp., the native maize populations from the State of Mexico showed higher susceptibility to ear rot, as reported by Briones-Reyes *et al.* (2015).

Considering the scale used to classify the populations and the mean separation shown in Table 5, it can be observed that 48 of the 56 evaluated genotypes are within the range of 0-10% incidence, and, therefore, they are considered as highly resistant to the disease. Seven of the evaluated genotypes are within the range of 11-25% incidence, so they are considered as moderately resistant to the disease, and only the inoculated control, which was within the range of 51-75% incidence, was classified as susceptible to head smut. Previous results show

Cuadro 4. Comparaciones de medias para años y estados, usando la prueba de la Diferencia Mínima Significativa y la transformación logaritmo de la variable respuesta incidencia de carbón de la espiga.

Table 4. Comparison of means for years and states using the Least Significant Difference and logarithm transformation of the variable incidence response to head smut on tassel.

| Año | Media | N ^y | Estado | Media | N |
|------------------|----------------------|----------------|-------------------|----------|----|
| 2015 | 8.434 A ^x | 168 | Testigo inoculado | 57.100 A | 6 |
| 2016 | 3.208 B | 168 | Guerrero | 9.812 B | 77 |
| DMS ^z | 2.096 | | Oaxaca | 5.270 BC | 78 |
| | | | Puebla | 4.691 BC | 36 |
| | | | Tlaxcala | 2.867 C | 72 |
| | | | Estado de México | 0.954 C | 66 |
| | | | DMS | 5.529 | |

^xMedias por columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes en base a la prueba de Fisher (LSD, p=0.05); ^y número de observaciones; ^zDiferencia Mínima Significativa. / ^xMeans per column with the same letter are not statistically different according to the Fisher's test (LSD, p=0.05); ^ynumber of observations; ^zLeast Significant Difference.

de carbón de la espiga, dividió a las poblaciones en cuatro grupos definidos (Cuadro 4). El primer grupo considera las poblaciones provenientes de Tlaxcala y el Edo. de México, las cuales presentaron los menores porcentajes de incidencia de la enfermedad. El segundo grupo estuvo integrado por las poblaciones de origen en los estados de Oaxaca y Puebla. El tercer grupo lo integraron solo poblaciones originarias de Guerrero y el último grupo fue el testigo inoculado que presentó la incidencia media más alta del estudio.

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de las comparaciones de medias para los genotipos anidados dentro de estados y a través de los dos años. En este análisis, se encontró que ocho de las 11 poblaciones de maíz nativo del Estado de México no fueron afectadas por el patógeno en ninguna de sus repeticiones, en ambas evaluaciones, mientras que seis de las 13 poblaciones de Guerrero tuvieron una incidencia media de la enfermedad igual o superior al 10%. La resistencia observada en las poblaciones de maíz del Estado de México podría

that the diversity present in the evaluated maize populations would allow the selection of disease-resistant germplasm. Similarly, the variation of the response of the evaluated materials to the disease makes it clear that the type of resistance to head smut is quantitative. This is demonstrated by the selection method (S1 recurrent) used by De León (2020) to develop open-pollinated varieties resistant to the disease.

The information obtained in the present study is the first exploration of the presence of disease resistance genes in native maize populations, which will allow the disease resistance improvement programs to exclude the populations with a higher incidence percent in both evaluations. The information obtained in this study is meant to encourage the rescue and use of maize native populations, as well as launching improvement programs to develop maize lines genetically resistant to the disease, as Quezada-Salinas *et al.* (2017) have done, and the subsequent development of high-yielding open-pollinated varieties and

Cuadro 5. Comparaciones de medias ajustadas por mínimos cuadrados (lsmeans), agrupadas por el método de Tukey, para genotipos anidados dentro de estados y a través de los dos años.**Table 5. Comparison of means adjusted by minimum squares (lsmeans) grouped by the Tukey's method for genotypes nested within states and for two years.**

| Genotipo | Estado | Media | Genotipo | Estado | Media |
|----------|-------------------|---------------------|----------|------------------|----------|
| 100 | Testigo inoculado | 57.10A ² | 34 | Oaxaca | 3.70EFGH |
| 19 | Guerrero | 23.03AB | 9 | Oaxaca | 3.58EFGH |
| 23 | Guerrero | 20.10BC | 51 | Estado de México | 3.55EFGH |
| 20 | Guerrero | 15.97BCD | 12 | Tlaxcala | 3.33EFGH |
| 21 | Guerrero | 14.39CDE | 49 | Puebla | 3.12EFGH |
| 30 | Oaxaca | 13.19CDEF | 17 | Oaxaca | 2.42EFGH |
| 24 | Guerrero | 13.04CDEFG | 53 | Estado de México | 2.38FGH |
| 27 | Oaxaca | 11.44CDEFG | 7 | Guerrero | 2.06GH |
| 25 | Guerrero | 10.65CDEFG | 37 | Tlaxcala | 1.85GH |
| 36 | Puebla | 9.40CDEFG | 18 | Guerrero | 1.85GH |
| 22 | Guerrero | 8.70DEFG | 35 | Oaxaca | 1.66GH |
| 50 | Puebla | 8.54DEFGH | 38 | Puebla | 1.51GH |
| 10 | Oaxaca | 6.82DEFGH | 55 | Guerrero | 1.51GH |
| 5 | Tlaxcala | 6.66DEFGH | 13 | Tlaxcala | 1.38GH |
| 26 | Oaxaca | 6.47DEFGH | 11 | Tlaxcala | 1.28GH |
| 1 | Guerrero | 5.90DEFGH | 33 | Oaxaca | 0H |
| 40 | Tlaxcala | 5.55DEFGH | 4 | Tlaxcala | 0H |
| 16 | Puebla | 5.55DEFGH | 52 | Estado de México | 0H |
| 54 | Guerrero | 5.50DEFGH | 14 | Tlaxcala | 0H |
| 6 | Guerrero | 5.42DEFGH | 42 | Estado de México | 0H |
| 28 | Oaxaca | 5.25DEFGH | 41 | Estado de México | 0H |
| 31 | Oaxaca | 5.09DEFGH | 44 | Estado de México | 0H |
| 39 | Tlaxcala | 4.79DEFGH | 45 | Estado de México | 0H |
| 2 | Tlaxcala | 4.78EFGH | 46 | Estado de México | 0H |
| 48 | Tlaxcala | 4.74EFGH | 43 | Estado de México | 0H |
| 29 | Oaxaca | 4.68EFGH | 3 | Tlaxcala | 0H |
| 8 | Estado de México | 4.55EFGH | 47 | Estado de México | 0H |
| 32 | Oaxaca | 4.16EFGH | 15 | Puebla | 0H |

²Medias por columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes en base a la prueba de Tukey (p=0.05). / ²Means per column with the same letter are not statistically different according to Tukey's test (p=0.05).

explicarse considerando que el primer reporte de la enfermedad en México fue en Amecameca, Edo. de México (Borlaug, 1946) en plantas de teocintle, por lo que los maíces de la región habrían estado expuestos al patógeno, ocurriendo así la coevolución entre el patógeno y el hospedante. Por otra parte, las poblaciones de maíz de Guerrero fueron las más susceptibles a la enfermedad, correspondiendo a nuestra hipótesis inicial, generada a partir de observaciones en campo en donde se ha registrado

genetically resistant maize varieties, as the open-pollinated variety CP-Vero1 developed by De León (2020). Finally, it is suggested to continue evaluating native maize germplasm including a greater number of populations classified by race, conducting simultaneous evaluations under different environments, and molecular studies, to ensure the presence of resistance genes in the populations to be used as possible sources of resistance to head smut.

una mayor susceptibilidad a la enfermedad en híbridos generados a partir de líneas provenientes del estado de Guerrero (Raza Tuxpeño) (comunicación personal Dr. Fernando Castillo González). En caso contrario, cuando las mismas 55 poblaciones fueron evaluadas en su respuesta a la pudrición de mazorca por *Fusarium* spp., las poblaciones de maíces nativos provenientes del Edo. de México mostraron una mayor susceptibilidad a la pudrición de mazorca como lo reportaron Briones-Reyes *et al.* (2015).

Considerando la escala empleada para la clasificación de las poblaciones y la separación de medias mostrada en el Cuadro 5 se puede observar que 48 de los 56 genotipos evaluados se encuentran dentro del rango de 0 a 10% de incidencia de la enfermedad, por lo que se consideran altamente resistentes a la enfermedad. Siete de los genotipos evaluados se encuentran en el rango entre el 11 y el 25% de incidencia de la enfermedad, considerándose moderadamente resistentes a la enfermedad y solo el testigo inoculado se ubicó entre el rango de 51 y 75% de incidencia de la enfermedad clasificándose como susceptible al carbón de la espiga del maíz. Los resultados anteriores demuestran que la diversidad presente en las poblaciones de maíz evaluadas permitiría la selección de germoplasma resistente a la enfermedad. De igual forma, la variación en la respuesta a la enfermedad en los materiales evaluados hace evidente que el tipo de resistencia a esta enfermedad es de tipo cuantitativo. Lo anterior se corrobora por el método de selección (S1 recurrente) empleado por De León (2020), para la generación de variedades de polinización libre con resistencia a la enfermedad.

La información obtenida en el presente estudio es la primera exploración sobre la presencia de genes de resistencia a la enfermedad en maíces nativos, que permiten excluir de un programa de mejoramiento para resistencia a la enfermedad a aquellas poblaciones que presentaron un mayor

CONCLUSIONS

There is variation in the response of native maize germplasm to *S. reilianum* f. sp. *zea*. infection depending on its geographical origin. The variation of the populations response to the infection suggests the presence of genes for resistance to the pathogen in the populations that were not affected by the disease. The native maize from Guerrero was more susceptible to the disease, while maize collected in the States of Mexico and Tlaxcala was more resistant. The high-soil humidity levels in the first development stages of the crop reduces the disease incidence.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

porcentaje de incidencia en ambas evaluaciones. La información generada en el presente estudio pretende incentivar el rescate y uso de los materiales nativos de maíz, así como incentivar el inicio de programas de mejoramiento para el desarrollo de líneas con resistencia genética a la enfermedad como lo han hecho Quezada-Salinas *et al.* (2017) y la subsecuente generación de variedades de polinización libre con alto rendimiento y resistencia genética a la enfermedad, como la variedad de polinización libre CP-Vero1 generada por De León (2020). Finalmente, se sugiere continuar la evaluación de germoplasma nativo de maíz considerando un mayor número de poblaciones clasificadas por raza, evaluaciones simultaneas bajo diferentes ambientes y estudios moleculares para asegurar la presencia de genes resistencia en las poblaciones que pretendan usarse como posibles fuentes de resistencia a la enfermedad.

## CONCLUSIONES

Existe variación en la respuesta de germoplasma nativo de maíz a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae*, dependiendo de su origen geográfico. La variación en la respuesta de las poblaciones a la infección sugiere la presencia de genes de resistencia al patógeno en las poblaciones que no fueron afectadas por la enfermedad. Los maíces nativos de Guerrero mostraron una mayor susceptibilidad a la enfermedad, mientras que los maíces colectados en el Estado de México y Tlaxcala presentaron la mayor resistencia. La condición de alta humedad en el suelo en las primeras etapas del desarrollo del cultivo reduce la incidencia de la enfermedad.

## LITERATURA CITADA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A and Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fito patología* 29: 39–49. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092011000100004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000100004)
- Arteaga MC, Moreno-Letelier A, Mastretta-Yanes A, Vázquez-Lobo A, Breña-Ochoa A, Moreno-Estrada A, Eguarte LE and Piñero D. 2016. Genomic variation in recently collected maize landraces from Mexico. *Genomics Data* 7: 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2015.11.002>
- Bennetzen JL and Hake S. 2009. *Handbook of maize: Genetics and genomics*. New York, USA. 798p. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77863-1>
- Borlaug NE. 1946. Diseases of teosinte in Mexico. *Phytopathology* 36: 395. <https://apsjournals.apsnet.org/loi/phyto>
- Briones-Reyes D, Castillo-González F, Chávez-Servia JL, Aguilar-Rincón VH, De León-García de Alba CDL y Ramírez-Hernández A. 2015. Respuesta del maíz nativo del Altiplano mexicano a pudrición de mazorca, bajo infección natural. *Agronomía Mesoamericana* 26(1): 73–85. <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16922>
- De León C. 2008. Enfermedades importantes. Pp: 47–62. In: Rodríguez-Montessoro R. y De León C. (Eds.). *El cultivo del maíz. Temas selectos Vol. 1*. Mundi-Prensa, México D.F., México. 127p. <https://books.google.com.mx/books?id=CrZQYgEACAAJ&dq=El+cultivo+del+ma%C3%ADz.+Temas+selectos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwitiOmwwITpAhVfB60KHR9LDuQQ6AEIJzAA>
- De León-García de Alba C. 2020. CP-Vero 1, white maize (*Zea mays*) synthetic variety resistant to head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) for Mexican highlands. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 170–175. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-2>
- Fehr WR. 1993. *Principles of cultivar development. Theory and technique Vol. 1*. Macmillan, Ames, Iowa. 536 p. [https://lib.dr.iastate.edu/agron\\_books/](https://lib.dr.iastate.edu/agron_books/)
- Frederiksen RA. 1977. Head smuts of corn and sorghum. Pp. 89–105. In: A. S. T. Association. (Ed.). *Proc. Annu. Corn Sorghum Res. Conf. 32nd*. Washington, D.C. <http://eprints.icrisat.ac.in/5708/>
- Gardes M and Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2): 113–118. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
- Ghareeb H, Becker A, Iven T, Feussner I and Schirawski J. 2011. *Sporisorium reilianum* infection changes inflorescence and branching architectures of maize. *Plant Physiology* 156(4): 2037–2052. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179499>
- Giordani W, Scapim CA, Ruas PM, Ruas C de F, Contreras-Soto R, Coan M, Fonseca IC De B and Gonçalves LSA. 2019. Genetic diversity, population structure and AFLP markers associated with maize reaction to southern rust. *Bragantia* 78(2): 183–196. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20180180>
- Goodman MM and Brown WL. 1988. Races of Corn. Pp:33–79. In: *Corn and Corn Improvement-Agronomy Monograph No. 18*, 3rd edition. ASA-CSSA-SSSA. Wisconsin, USA. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr18.3ed.c2>
- Griekspoor, A. and Groothuis, T. 1994. 4Peaks by A. <https://nucleobytes.com/>
- Hallauer AR, Carena MJ and Miranda-Filho JB. 2010. *Quantitative genetics in maize breeding*. Springer (Second Edition). New York, USA. 663p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0766-0>
- Kirby KS. 1965. Isolation and characterization of ribosomal ribonucleic acid. *Biochemical Journal* 96: 266–269. <https://doi.org/10.1042/bj0960266>
- Leyva-Madrigal KY, Báez-Astorga PA, Negrete-Yankelevich S, Núñez-de la Mora A, Amescua-Villela G and Maldonado-Mendoza IE. 2020. Maize genetic diversity in traditionally cultivated polycultures in an isolated rural community in Mexico: implications for management and sustainability. *Plant Ecology and Diversity* 13(1): 15–28. <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1708985>
- Lübberstedt T, Xia XC, Tan G, Liu X and Melchinger AE. 1999. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reilianum* in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 593–598. <https://doi.org/10.1007/s001220051273>
- Márquez-Licona G, Leyva-Mir SG, De León C, Hernández-Vargas M, Téliz-Ortiz D, Kolařík M and Castillo-González F. 2018. Artificial inoculation of maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Maydica* 63: 1–8. <https://journals-crea.4science.it/index.php/maydica/article/view/1593/1096>
- Martínez C, Roux C and Dargent R. 1998. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Biochemistry and Cell Biology* 89(3):

- 247–253. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.3.247>
- Martínez C, Buée M, Jauneau A, Bécard G, Dargent R and Roux C. 2001. Effects of a fraction from maize root exudates on haploid strains of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Plant and Soil* 236: 145–153. <https://doi.org/10.1023/A:1012776919384>
- Martínez C, Roux C, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94(3): 505–514. <https://doi.org/10.2307/3761784>
- Martínez RJL y Ledezma MJ. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint., del maíz en el Valle de Zapopan, Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8: 68–70. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-mexicana-de-fitopatologia/articulo/control-quimico-del-carbon-de-la-espiga-sphacelotheca-reiliana-kuhn-clint-del-maiz-en-el-valle-de-zapopan-jalisco>
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez JG, Buckler E and Doebley J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(9): 6080–6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology* 75: 577–581. <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-577>
- Matyac CA and Kommedahl T. 1986. Survival of teliospores of *Sphacelotheca reiliana* in soil. *Phytopathology* 76: 487–490. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Abstracts/Phyto76\\_487.htm](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Abstracts/Phyto76_487.htm)
- Mendoza JR, Kok CR, Stratton J, Bianchini A, and Hallen-Adams H-E. 2017. Understanding the mycobiota of maize from the highlands of Guatemala, and implications for maize quality and safety. *Crop Protection* 101: 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.009>
- O'Donnell K, Cigelnik E and Nirenberg HI. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465–493. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026933>
- Okonechnikov K, Golosova O and Fursov M. 2012. The UGENE team. *Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit*. *Bioinformatics* 28: 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Osorio JA and Frederiksen RA. 1998. Development of an infection assay for *Sporisorium reilianum*, the head smut pathogen on sorghum. *Plant Disease* 82(11): 1232–1236. <https://doi.org/10.1094/pdis.1998.82.11.1232>
- Pereira GS, Pinho RGV, Pinho EVRV, Pires LPM, Bernardo Junior LAY, Pereira JLA and Melo MP. 2017. Selection of maize inbred lines and gene expression for resistance to ear rot. *Genetics and Molecular Research* 16(3): 1–21. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039415>
- Potter AA. 1914. Head smut of sorghum and maize. *Journal of Agricultural Research* 2(5): 339–380. <https://jar.punjab.gov.pk/>
- Quezada-Salinas A, De León-García de Alba C, Hernández-Anguiano AM and Nava Díaz C. 2013. Evaluation of inoculation methods on maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. *Mexican Journal of Phytopathology* 31(2): 80–90. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1705-2>
- Quezada-Salinas A, Moreno-Velázquez M, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C and Solano-Báez AR. 2017. Genetic resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in selected maize (*Zea mays* L.) lines with white and yellow endosperm. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 534–548. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1705-2>
- Rivas-Valencia P, Virgen-Vargas J, Rojas Martínez I, Cano Salgado A y Ayala Escobar V. 2011. Evaluación de pudrición de mazorca de híbridos de maíz en Valles Altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(6) 845–854. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&id=S2007-09342011000600004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&id=S2007-09342011000600004)
- SAS Institute Inc. 2013. SAS @ 9.4 Statements Reference. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?jsessionid=239E4F5E2E39CF2164C9BAD96900EA01?doi=10.1.1.353.6870&rep=rep1&type=pdf>
- Schirawski J, Mannhaupt G, Münch K, Brefort T, Schipper K, Doehlemann G, Di Stasio M, Rössel N, Mendoza-Mendoza A, Pester D, Müller O, Winterberg B, Meyer E, Ghareeb H, Wollenberg T, Münsterkötter M, Wong P, Walter M, Stukenbrock E, Güldener U and Kahmann R. 2010. Pathogenicity Determinants in Smut. *Science* 330(610): 1546–1548. <https://doi.org/10.1126/science.1195330>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por estado. (Consulta, marzo 2020). [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do)
- Ványk K. 2012. *Smut Fungi of the World*. APS Press. The American Phytopathology Society. Minnesota. USA. 1458p. <https://books.google.com.mx/books?id=pvkmwAACAAJ&dq=Smut+Fungi+of+the+World&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj02MrVw4TpAhVEI6wKHWeZANQ6AEIJzAA>
- Wang ZH, Li XH, Xie CX, Li MS, Hao ZF, George MLC, Xiao MJ, Gao SR and Zhang SH. 2008. Genetic diversity in a collection of chinese maize inbred lines for resistance to head smut caused by *Sporisorium reiliana*. *Maydica* 53: 47–54. [https://www.researchgate.net/publication/287691769\\_Genetic\\_diversity\\_in\\_a\\_collection\\_of\\_Chinese\\_maize\\_inbred\\_lines\\_for\\_resistance\\_to\\_head\\_smut\\_caused\\_by\\_Sporisorium\\_reiliana](https://www.researchgate.net/publication/287691769_Genetic_diversity_in_a_collection_of_Chinese_maize_inbred_lines_for_resistance_to_head_smut_caused_by_Sporisorium_reiliana)
- Wright PJ, Fullerton RA and Koolaard JP. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetcorn (*Zea mays*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34: 23–26. <https://doi.org/10.1080/01140671.2006.9514383>
- Xu ML, Melchinger AE and Lübberstedt T. 1999. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reiliana* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. *Plant Disease* 83: 390–395. <https://doi.org/10.1094/pdis.1999.83.4.390>