

EL MAÍZ Y FRIJOL EN MÉXICO: ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO

EDITORES:

Dra. Norma Ávila Alistac

Dra. Patricia Rivas Valencia

Dr. Alejandro Espinosa Calderón



EL MAÍZ Y FRIJOL EN MÉXICO: ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO

EDITORES:

Dra. Norma Ávila Alistac

Dra. Patricia Rivas Valencia

Dr. Alejandro Espinosa Calderón

Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C.

EL MAÍZ Y FRIJOL EN MÉXICO: ETIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO



ISBN: En tramite

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2024-1>

CONACOFI, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México

Publicado por la Sociedad Mexicana de Fitopatología y financiado por CONAHCYT

Primera Edición 2023

Parte de este libro puede ser editado, reproducido, almacenado o transmitir en cualquier medio electrónico con previo aviso de la autorización de los autores y la SMF.

Descripción de portada: Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y maíz (*Zea mays*) en la primera etapa vegetativa e integradas por el factor edáfico, resaltando la diversidad microbiológica. Dos de los cultivos representantes de la agricultura mesoamericana. En segundo plano **Xilonen** Diosa del maíz tierno o jilote (Xil: Jilote; Onen: Poseedora) y **Cincootl** Deidad máxima del maíz (Sintli: Mazorca de maíz; Teotl: Dios o deidad) ofrendando al teozintle (*Zea mays* subsp. *mexicana*) como precursor de maíz. En el fondo: maíz comercial híbrido.

Creditos: Mora-Aguilera G, Gonzalez-Cruces A, Acevedo-Sánchez G, Ávila-Alistac N y Flores-Colorado OE.

INDICE GENERAL

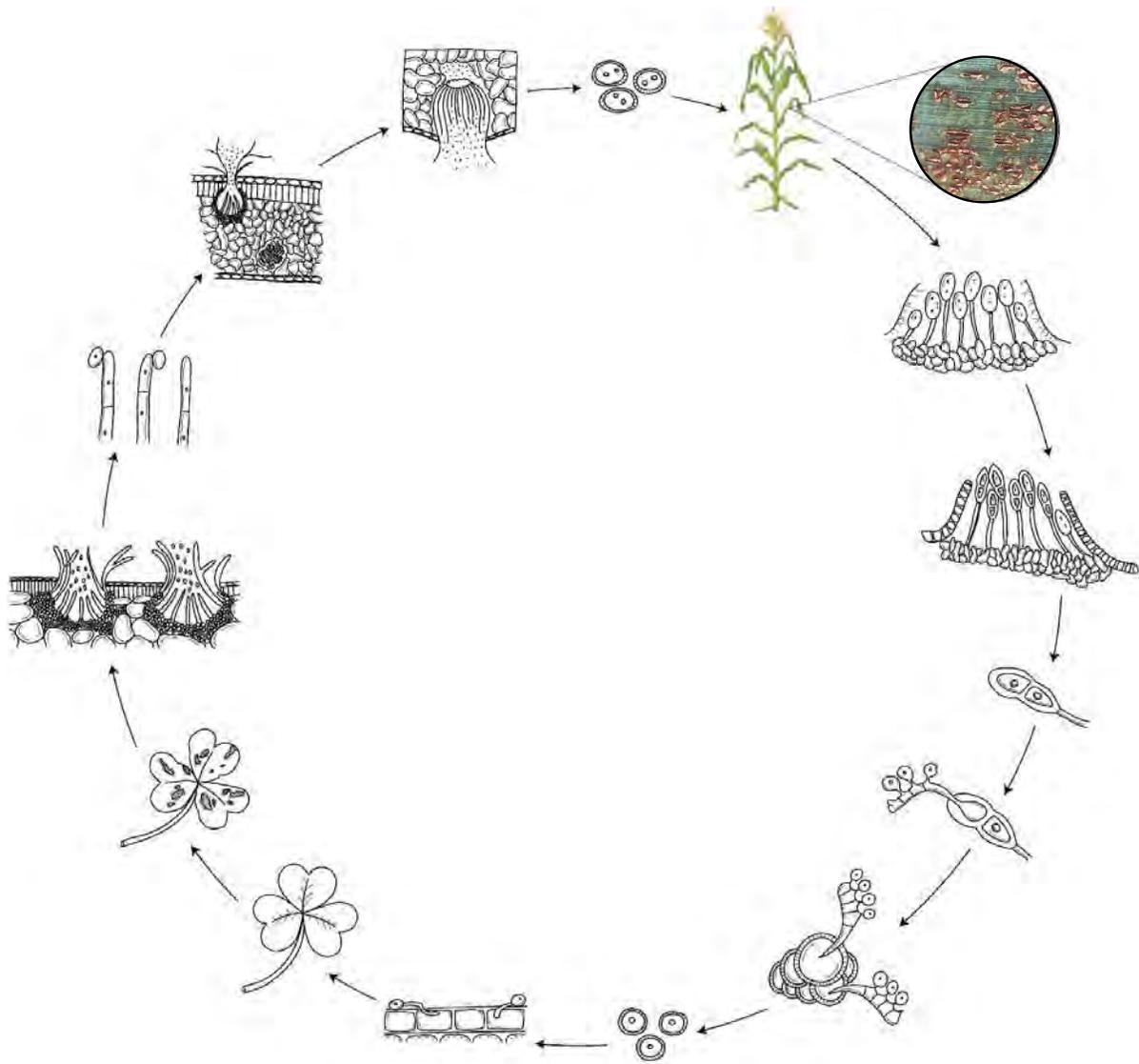
1	PRIMERA PARTE: EL MAÍZ
3	Capítulo 1. Etiología de las principales enfermedades
4	1.1 Principales enfermedades del maíz en México
55	1.2 El Género <i>Aspergillus</i> y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas
81	1.3 Evaluación de Métodos de Inoculación de Semillas de Maíz con <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zeae</i>
95	1.4 Confirmación de la identidad de <i>Exserohilum turcicum</i> , agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa
105	1.5 Germinación de esclerocios y formación de ascoporas de <i>Claviceps gigantea</i>
121	1.6 Bacterias antagonistas contra <i>Fusarium</i> spp. aisladas de esclerocios de <i>Claviceps gigantea</i> en maíz (<i>Zea mays</i>)
141	1.7 Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía
159	Capítulo 2. Epidemiología de las enfermedades
160	2.1 Escala Diagramática de Severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del Maíz
169	2.2 Incidencia y efecto de la enfermedad “mano de chango” en la producción de 29 genotipos de maíz

177	2.3 Incidencia de la mano de chango en germoplasma de maíz (<i>Zea mays</i>) en diferentes localidades de México
185	Capítulo 3. Retos del fitomejoramiento para la sanidad del maíz
186	3.1 Enfermedades de maíz en el Noreste
199	3.2 Enfermedades del maíz en la Región Pacífico Centro
209	3.3 Enfermedades del maíz en el área tropical del Sureste
227	3.4 Mancha de asfalto, opciones para su atención derivadas de mejoramiento genético en maíz en Guerrero
235	3.5 Carbón de la espiga en el Bajío y zona de transición y tizón foliar en Valles Altos
253	3.6 Ganancia en ciclos de selección recurrente para rendimiento y resistencia a carbón de la espiga en maíz
265	3.7 Resistencia a <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zear</i> en germoplasma nativo de maíz
283	3.8 Resistencia genética a <i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zear</i> en líneas seleccionadas de maíz (<i>Zea mays</i> L.) con endospermo blanco y amarillo
297	3.9 Inducción de resistencia a <i>Puccinia sorghi</i> y complejo mancha de asfalto (<i>Phyllachora maydis</i> y otros) en maíz (<i>Zea mays</i>)
309	3.10 CP-Elvia 3, nuevo maíz blanco resistente al complejo de la mancha de asfalto para subtrópico de México
315	3.11 CP-Vero 1, variedad sintética de maíz (<i>Zea mays</i>) blanco, resistente a carbón de la espiga (<i>Sporisorium reilianum</i> f. sp. <i>zear</i>) para el altiplano de México

-
- 321** 3.12 CP-Hilda 2, nueva variedad sintética de maíz (*Zea mays*) de grano amarillo y resistente al diente de caballo (*Claviceps gigantea*) para el altiplano de México
- 327** 3.13 CP-Tania 5, variedad de maíz blanco resistente al diente de caballo (*Claviceps gigantea*) para el altiplano de México
- 333** SEGUNDA PARTE: EL FRIJOL
- 335** Capítulo 1: Etiología de enfermedades del frijol
- 336** 1.1. Hongos asociados a la marchitez del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Costa Rica
- 349** Capítulo 2. Epidemiología de enfermedades del frijol
- 350** 2.1. Etiología y epidemiología de putativos síntomas virales y fungoso en el frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)
- 381** 2.2. Efecto inhibitorio de bacterias antagonistas contra *Sclerotium rolfsii*, agente causal del tizón sureño del frijol
- 391** Capítulo 3. Retos del fitomejoramiento para la sanidad del frijol
- 392** 3.1. Innovación en acervos genéticos del INIFAP para la reducción de pérdidas por factores bióticos y abióticos en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en el Sureste de México

Primera parte

El Maíz



Capítulo 1

Etiología de las principales enfermedades

1.1. Principales enfermedades del maíz en México

Carlos De León-García de Alba Fitopatología-Fitosanidad, Colegio de Postgraduados- Campus Montecillo, Edo. de México

México es el centro de origen y biodiversidad del maíz (*Zea mays*) (Reyes, 1990). El cultivo es afectado por varias enfermedades de origen biótico y abiótico. Dentro de los primeros se incluyen royas y tizones foliares, pudriciones de mazorca y de tallo, que causan pérdidas significativas en el rendimiento. (White, 1999). Se estima que, en promedio, a nivel mundial, la pérdida en el rendimiento de maíz causadas por enfermedades es de aproximadamente 13% (Oerke, 2006). Considerando que en 2021 se produjeron en México 27 millones de toneladas (Mt) de éste cereal (SADER, 2023), la pérdida por enfermedades fue equivalente a 3.51 Mt.

El tema de enfermedades del maíz se ha descrito por varios autores en diferentes publicaciones. Aún con la información disponible en varias publicaciones, es común el desconocimiento por estudiantes y muchos profesionistas en agricultura que consideran que las enfermedades en maíz representan un área nebulosa. El presente documento pretende dar una versión con una orientación práctica sobre las enfermedades con mayor importancia en el cultivo de maíz en México.

Estadísticas recientes indican que, a nivel mundial, en 2010 el maíz superó en producción a los cultivos de trigo y arroz, sembrándose en un total de 153 Mha (CGIAR, 2019). Dentro del Reino Vegetal, el maíz posee características muy distintivas con respecto a otras plantas siendo una planta alógama (de polinización libre o cruzada) y, como muy pocas plantas, con un amplio rango de adaptación, ya que puede cultivarse en altitudes desde nivel del mar hasta los 3 200 msnm y en latitudes del ecuador hasta los 50° Norte y Sur. En éste rango de condiciones climáticas, se incluyen localidades con climas del cálido-húmedo o tropical, a zonas intermedias con clima templado y hasta zonas frías, en condiciones de diferentes suelos y, normalmente, en condiciones de ambientes limitantes para los cultivos, ya que las tierras productivas se destinan para siembra de cultivos con mayor renumeración.

En regiones tropicales, se han reportado más de 132 enfermedades (Wellman, 1972), a las que deben añadirse las enfermedades que se presentan en regiones de clima templado y enfermedades cuyos agentes causales han sido identificados posteriormente. Entre las enfermedades del maíz, se incluyen enfermedades de origen biótico o enfermedades infecciosas causadas por bacterias, mollicutes, hongos, oomicetos, nematodos y virus. Todos estos agentes afectan el rendimiento de grano del cultivo, causando diferente grado de pérdidas.

Aun cuando se ha considerado que en algunas localidades se presentan enfermedades muy específicas, en este documento, se describirá lo que se considera las enfermedades más importantes del maíz presentes en México, las condiciones climáticas en que se presentan, esquemas de sus ciclos de vida y recomendaciones para su control que se consideren factibles, incluyendo los métodos de exclusión, culturales, químicos y genéticos, aunque se hará énfasis en el control por métodos genéticos ya que, dado el modesto valor que tiene éste cereal, este último método es el más económico y apropiado. Las enfermedades que se cubren en este trabajo son:

1. Enfermedades causadas por bacterias
2. Enfermedades causadas por mollicutes
3. Enfermedades causadas por virus
4. Pudriciones de semilla y enfermedades de plántulas
5. Pudriciones de raíz y tallo
6. Enfermedades foliares (oomicetos y ascomicetos)
7. Royas
8. Carbones
9. Pudriciones de tallo y mazorca y micotoxinas producidas

Enfermedades causadas por bacterias

En México se presentan varias enfermedades bacterianas en maíz, causando daño en forma localizada en siembras en regiones templadas, subtropicales y tropicales. Sin embargo, la experiencia indica que las principales enfermedades bacterianas que se presentan con mayor incidencia y con cierta regularidad en regiones templadas y subtropicales es la pudrición de tallo causada por la bacteria fitopatógena del género *Erwinia* y, en condiciones de trópico húmedo, se presenta el rayado foliar (*Acidovorax avenae*).

Pudrición de tallo

Agente causal. *Erwinia carotovora*, *E. chrysanthemii*

Condiciones climáticas requeridas. Los dos patógenos causan pérdidas severas en cultivos sembrados en clima subtropical o templado, tierras inundadas y especialmente cuando se usa riego por aspersión o por pivote.

Manejo. Estas dos especies de *Erwinia* ocasionan pudrición de tallo, especialmente en siembras en las que se utiliza riego por aspersión o de pivote. La alta humedad ambiental y encharcamientos que se generan favorecen el desarrollo de este tipo de pudrición, principalmente cuando están en desarrollo activo (“plantas rodilleras”). Para identificar las plantas dañadas por la bacteria, se observa en el cogollo la pudrición del tejido anexo al meristemo, debido a la multiplicación de las bacterias. Al desprender las hojas recién formadas, se puede observar la destrucción del tejido foliar y la generación de un olor fétido característico, causado por acción de enzimas que destruyen el tejido y fermenta los azúcares de la planta (Figura 1).



Figura 1. Síntomas asociados a *E. carotovora* en el cultivo de maíz. A) Marchitamiento de hojas; B) pudrición del cogollo.

Para evitar esta enfermedad, aun cuando la siembra de maíz sea para riego con aspersión o pivote, se debe consultar con las instituciones productoras de semillas y asegurar que el germoplasma adquirido tenga cierto grado de resistencia a éstas bacterias. También, se debe planear eficientemente el riego por aspersión para reducir al máximo este problema potencial. En sistemas de riego por inundación, se debe tener cuidado en no permitir encharcamientos por largos periodos de tiempo que favorecen estas bacterias.

Rayado foliar bacteriano

Agente causal. *Acidovorax avenae*

Condiciones ambientales requeridas. Esta enfermedad se presenta en condiciones de trópico húmedo con alta humedad relativa.

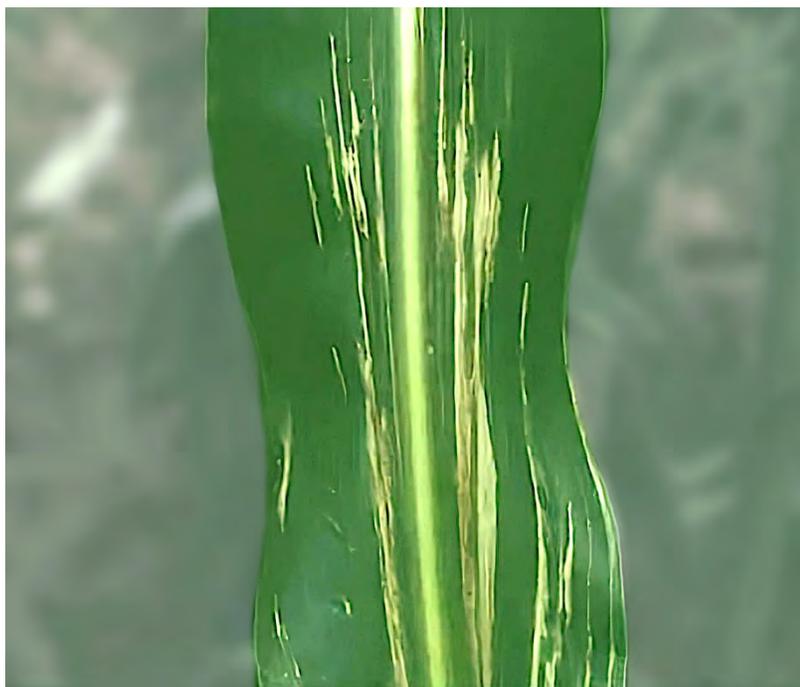


Figura 2. Rayado bacteriano en hojas de maíz causado por *Acidovorax avenae*.

Manejo. Para su control, no se recomienda el uso de bactericidas que son costosos y que, en caso de aplicarse, debe ser como un método preventivo. En caso de sembrar semilla de híbridos comerciales, para prevenir su presencia, se debe consultar con las agencias semilleras y tener información garantizada

que el germoplasma seleccionado no tenga progenitores de origen Caribe, ya que estos han mostrado ser susceptibles a ésta enfermedad.

2. Enfermedades causadas por Mollicutes

La clase Mollicutes incluye a los procariontes. A diferencia de las bacterias, que tienen una pared celular relativamente dura constituida de celulosa y glucanos, los organismos del grupo Mollicutes (lat. mollicutes=piel suave), están cubiertos solamente por una membrana, por lo que no tienen una forma definida (pleomorfos). Dentro de los mollicutes fitopatógenos se encuentran los géneros *Spiroplasma* y los denominados *Candidatus* Fitoplasma. Los fitopatógenos del género *Spiroplasma* son cultivables en medios sintéticos, mientras que aquellos del género *Candidatus* Fitoplasma incluyen organismos del grupo de los fitoplasmas, que aún no pueden ser cultivados en medios sintéticos y, por lo tanto, no pueden multiplicarse para su estudio y clasificación taxonómica.

Achaparramiento y enanismo arbustivo

Agente causal. *Spiroplasma kunkelii* y *Candidatus* *Phytoplasma asteris* (*Maize bushy stunt phytoplasma* - MBSP)

Condiciones climáticas requeridas. El achaparramiento del maíz, causado por *S. kunkelii*, se presenta en regiones tropicales y subtropicales con alta humedad relativa; mientras que el enanismo arbustivo del maíz, causado por *Ca. P. asteris*, se encuentra especialmente en regiones frescas, templadas como del Altiplano de México (Alcántara *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 1973). Los síntomas del enanismo arbustivo del maíz, son enrojecimiento y/o amarillamiento de las hojas que puede confundirse con infecciones virales, enanismo de la planta y poco desarrollo de la planta (Figura 3) (Pérez-López *et al.*, 2017). Ambas enfermedades son transmitidas por al menos tres especies de cicadélidos *Dalbulus maidis*, *D. elimatus* y *D. guevarai* (Ramírez-Choza *et al.*, 1975; Bascopé, 1977).

Manejo. Los patógenos antes descritos pueden ser transmitidos por cicadélidos vectores en estados iniciales de crecimiento de las plántulas de maíz, por lo que es conveniente hacer revisiones frecuentes de la siembra, en estados iniciales de desarrollo de las plántulas para observar el desarrollo de la población de los vectores. En caso de que la población se incremente, se deben realizar



Figura 3. Síntomas asociados a mollicutes en maíz. A) Achaparramiento (CSD) de maíz causado por *Ca. P. asteris*; B) Enanismo arbustivo (MBSD) causado por *S. kunkelii*.

prácticas de control químico o biológico otros disponibles en el mercado. Otra alternativa de manejo de la enfermedad es cambiar la fecha de siembra a una época temprana para evitar el desarrollo de altas poblaciones de los vectores. Sin embargo, la experiencia indica que la forma con mayor eficiencia para controlar ésta enfermedad es utilizando germoplasma de maíz que tenga un nivel apropiado de resistencia genética a la enfermedad (De León, 1983). Germoplasma resistente a ésta enfermedad ha sido derivado de maíces nativos de Cuba y República Dominicana.

3. Enfermedades causadas por virus

Similar a lo mencionado con los dos grupos de patógenos anteriores, en México se han reportado varias enfermedades causadas por virus. En esta presentación se discutirán solamente dos de las enfermedades virales más importantes en México, incluyendo el rayado fino del maíz (MRFV) y el mosaico de la caña de azúcar (SCMV).

Rayado fino del maíz

Agente causal. *Maize rayado fino virus*-MRFV

El MRFV pertenece al género *Marafivirus*, con estructura esférica o isométricos. Su información genética está constituida por una cadena sencilla de

ARN de sentido positivo y no segmentada. El virus no se transmite de forma mecánica, ni por semilla, solo es transmitido a través de cicadélidos (Banttari *et al.*, 1995).

Condiciones climáticas requeridas. La enfermedad se encuentra en todas las zonas maiceras del país, incluyendo trópicos, subtrópicos y altiplano. Dependiendo de la incidencia, la pérdida en producción puede variar de insignificante a severa.

Manejo. La enfermedad presenta un rayado muy fino a lo largo de las venas secundarias en la lámina de las hojas (Figura 4).



Figura 4. Síntoma característico ocasionado por la infección de MRFV.

Debido a que éste virus es también transmitido por el *D. maidis*, que también transmite el achaparramiento, los métodos de manejo son similares en ambas enfermedades.

Mosaico de caña de azúcar

Agente causal. *Sugarcane mosaic virus- SCMV*

El virus SCMV es un potyvirus de estructura alargada y flexible. El virus se transmite mecánicamente y por varias especies de áfidos (pulgones) del género *Aphis* spp., que lo transmiten directamente con sus estiletes contaminados. Este virus está relacionado con el que inicialmente se reportó como *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV).

Condiciones climáticas. El virus se presenta en condiciones variables, desde clima tropical húmedo, en áreas productoras de maíz y caña de azúcar, en alturas intermedias con condiciones de alta humedad y poca incidencia en los valles altos de México, con bajas poblaciones de áfidos.

Manejo. La enfermedad se manifiesta con un característico mosaico (variación en colores) en todo el follaje de las plantas infectadas (Programa de Maíz, 2004) (Figura 5).



Figura 5. Mosaico por *Sugarcane mosaic virus* en maíz

Siendo un patógeno de transmisión mecánica, la enfermedad se puede prevenir controlando la población de pulgones vectores del virus mediante moléculas químicas o entomopatógenos. El virus infecta también varias plantas, incluyendo pasto Johnson y sorgo, que es conveniente eliminar para evitar la

fuente de inóculo y su diseminación. A la fecha, en México no se tiene información sobre resistencia genética en cultivares de maíz comercial disponible.

4. Pudrición de semilla y plántulas

Pudrición de semilla

Agentes causales. *Pythium irregulare*, *P. debaryanum*, *P. ultimum*, *P. rostratum*, *P. vexans*.

Anamorfo: *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* “*Graminearum*” (Sin. *F. graminearum*).
Teleomorfo: *Gibberella zeae*. Anamorfo: *Fusarium verticillioides* [Sin. *F. moniliforme*];
Teleomorfo: *Gibberella moniliforme* [Sin. *G. fujikuroi*].

Condiciones climáticas requeridas. Las pudriciones de la raíz y plántulas las favorecen el clima frío y suelo húmedo durante la germinación. Las raíces muestran pudrición en las puntas con lesiones acuosas, oscuras. La marchitez se muestra en las puntas de las hojas, con amarillamiento de las hojas, enanismo y finalmente muerte de la plántula (Figura 6).



Figura 6. Síntomas de marchitamiento de plántula ocasionada por *Fusarium* spp.

Manejo. Para control de las pudriciones de plántulas debe evitarse la siembra en lugares con alta humedad y sombreados. Para selección de plántulas se recomienda:

Selección de resistencia genética. La germinación en frío se ha utilizado para identificar genotipos resistentes, poniendo semilla en contacto con tierra de campo húmeda, enrollando la semilla con la tierra en toallas de papel, por 10 días en un ambiente a 25-30 °C por aproximadamente 20 días y se determina su viabilidad. El contacto del suelo húmedo con la semilla es una técnica utilizada para inocular patógenos del suelo, especialmente *Pythium* spp. y *Fusarium* spp. Para control de enfermedades de plántulas y durante la germinación se ha recomendado el tratar la semilla con fungicidas de contacto de amplio espectro. Desafortunadamente, estudios recientes prueban que éste tipo de tratamientos de semilla no son efectivos en controlar infecciones por hongos y oomicetos presentes en suelos tropicales, pero si han probado cierta eficiencia en controlar patógenos presentes en suelos en climas templados o fríos.

Para evitar el incremento de los patógenos en el suelo es recomendable evitar acumulaciones de agua para lo que es necesario drenar los terrenos. Esto también puede evitar el incremento de pudriciones bacterianas de raíz en plántulas. Es necesario tener conocimiento de un posible control genético, para lo que es conviene conocer los siguientes aspectos:

- a. Existe variación entre semillas de diferentes mazorcas del mismo genotipo.
- b. Las semillas tienen tejidos con diferente genotipo en endospermo, pericarpio y embrión, lo que explica la variación entre semillas del mismo lote.
- c. La germinación a baja temperatura parece estar relacionada con la resistencia a estas enfermedades (Johann and Holbert, 1928).
- d. Semillas con endospermo duro generalmente son más resistentes que las de endospermo suave o dulce.

Manejo genético. A continuación, se enlistan las características genéticas a considerar para los patógenos involucrados:

- a. En *P. debaryanum*, la herencia de la resistencia parece ser compleja con muchos genes involucrados entre los que se han reportado efectos maternos. En cruza simples, la reacción de embriones resultantes ha sido correlacionada con la reacción de los padres.

b. *F. graminearum* (sin. *F. roseum*). Se sabe que la resistencia es cuantitativa. En algunas cruces, la resistencia parece ser dominante, pero los resultados no han sido consistentes.

c. *F. verticillioides* (sin. *F. moniliforme*): La acción aditiva es más importante que la dominancia.

5. Pudriciones de raíz, pudriciones de tallo

Las pudriciones de tallo normalmente son resultado de afecciones de la raíz que se manifiestan como pudriciones del tallo (Carmona *et al.*, 2006; Shaner and Scott, 1998).

Agentes causales: Anamorfo: *Fusarium verticillioides* (sin. *F. moniliforme*)

Teleomorfo: *Gibberella fujikuroi*

Anamorfo: *Fusarium graminearum*

Teleomorfo: *Gibberella zeae*

Anamorfo: *Stenocarpella maydis* (sin. *Diplodia maydis*)

Pudrición de carbón: *Macrophomina phaseolina*.

Condiciones climáticas. Las condiciones climáticas varían de acuerdo al patógeno que se presente. *F. verticillioides* y *S. maydis* se presentan en climas tropicales con alta humedad y alta temperatura, mientras que *F. graminearum* se presenta en localidades de clima templado, con temperaturas más bajas y alta humedad. *M. phaseolina* es común en áreas con condiciones de trópico seco.

Manejo. En el caso de presencia de *Fusarium*, las plantas afectadas aparecen como plantas tiradas en el suelo causado por la pudrición de la raíz que resultan en la pérdida de mazorcas y grano. En condiciones de alta humedad en el suelo, los granos en las mazorcas germinan y se pudren. Dentro de los tallos afectados por *F. verticillioides* se observa micelio blanco o rosado que destruye totalmente el tejido suave parenquimatoso, quedando solamente los haces vasculares (Figura 7A) Los tallos infectados por *F. graminearum* muestran un micelio color rosado o violáceo intenso con destrucción del tejido del parénquima quedando solamente los haces vasculares como fibras sueltas (Figura 7B).



Figura 7. Síntomas asociados a la pudrición de tallo del maíz causado por A) *F. graminearum* y B) *F. verticillioides*.

Dentro de los tallos infectados por *Stenocarpella* spp. (Sin. *Diplodia* spp.) desarrolla crecimiento de micelio blanco, algodonoso, que destruye el tejido parenquimatoso dejando una masa de hebras sin estructura (Figura 8).



Figura 8.
Pudrición de tallo de maíz ocasionada por *S. maydis*

Otra de las pudriciones de tallo que provoca un mayor daño es la pudrición de carbón, causada por el hongo *Macrophomina phaseolina*. La sintomatología típica es una pudrición seca y quebrado del tallo (Figura 9). Al interior de los tallos, se presenta la desintegración del tejido parenquimatoso suave, que se torna de color gris oscuro en el que se forman numerosos esclerocios negros del hongo. Estos esclerocios son cuerpos pequeños que pueden verse a simple vista. Este patógeno infecta plantas de maíz, sorgo y varias leguminosas en condiciones de altas temperaturas y ambiente seco. Los esclerocios permanecen en el suelo y son la fuente del inóculo que producirá la infección en el siguiente ciclo.

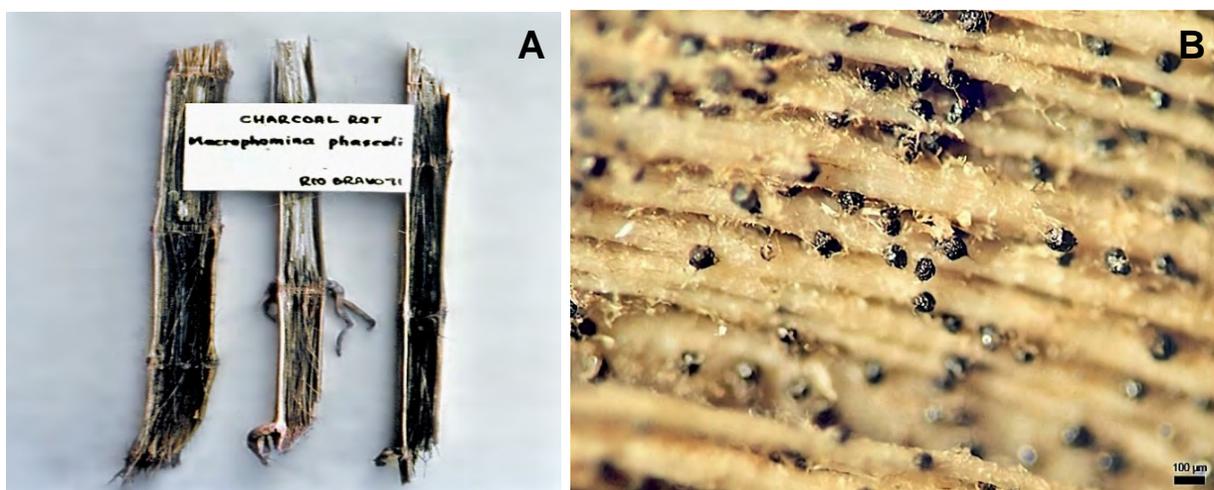


Figura 9. A) Tallos de maíz con pudrición de carbón ocasionada por *M. phaseolina*. B) Microesclerocios de *M. phaseolina* en tallo con pudrición de carbón.

Para prevenir y evitar estas pudriciones de tallo se recomienda el uso de cultivares que tengan el carácter de “stay green” en donde las plantas permanecen con los tallos y hojas verdes hasta que llega a un estado cercano a la cosecha, carácter por el cual, además de conferir resistencia a pudriciones de tallo, prolonga la vida activa de la planta.

Se debe tomar en consideración la posible rotación de cultivos (Frederickson, 1977), evitar la siembra repetida de gramíneas u hospedantes susceptibles y mantener una población de plantas y un nivel de humedad adecuado, especialmente en una etapa cercana a floración (Robertson and Munkvold, 2009). Actualmente, el control de la enfermedad con agroquímicos ha dado buen resultado.

6. Enfermedades foliares

Tizón foliar por *Turcicum*

Agente causal. Anamorfo: *Exserohilum turcicum* [Sin. *Helminthosporium turcicum*]

Bipolaris turcicum [Sin. *Dreschlera turcica*].

Teleomorfo: *Trichometasphaeria turcica* Luttrell [sin. *Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard & Suggs] (Luttrell, 1958).

En países de habla hispana, esta enfermedad es erróneamente llamada “Tizón norteño del maíz” por su traducción literal del inglés “Northern leaf blight” ya que ésta se presenta en la región Norte del Continente Americano, con condiciones de clima fresco y alta humedad. En el presente trabajo ésta enfermedad se denominará como Tizón foliar por turcium (“turcium leaf blight”).

El género *Exserohilum* (lat. *Exsero*: grande + *hilum*: cicatriz en la célula basal del conidio) se determinó recientemente al reportar la presencia de un hilum protuberante en conidios de *Helminthosporium turcicum* (Leonard y Suggs, 1974; Hernández-Restrepo *et al.*, 2018).

Condiciones climáticas requeridas. Esta enfermedad es de distribución cosmopolita (Raymundo and Hooker, 1981). En México, la enfermedad se observa con diferentes niveles de incidencia y severidad. Se presenta en forma severa en germoplasma susceptible en el altiplano de México con clima fresco y alta humedad relativa necesaria para la formación de rocío y germinación de los conidios. La temperatura óptima para la formación de los apresorios e iniciar la infección es de 20-25 °C (Levy and Cohen, 1983). En áreas tropicales del Golfo de México, se presenta en siembras de otoño-invierno cuando se presentan los “Nortes”, vientos con temperaturas inferiores a 24-25 °C y alta humedad relativa, óptimas para el desarrollo del hongo. En 2014, se reportaron pérdidas causadas por ésta enfermedad en 15 000 ha de 12 municipios del oriente del estado de Puebla (SAGARPA, 2014). Recientemente se ha reportado una alta incidencia de ésta enfermedad en siembras de híbridos comerciales en la zona de Los Mochis, Sin. (Gastelum *et al.*, 2018).

La enfermedad se presenta en regiones con noches de alta humedad relativa, templadas o frescas, en que se presenta formación de rocío, apareciendo

como lesiones necróticas, alargadas, que inician en las hojas inferiores y avanzan hacia las superiores conforme desarrolla la planta (Figura 10).

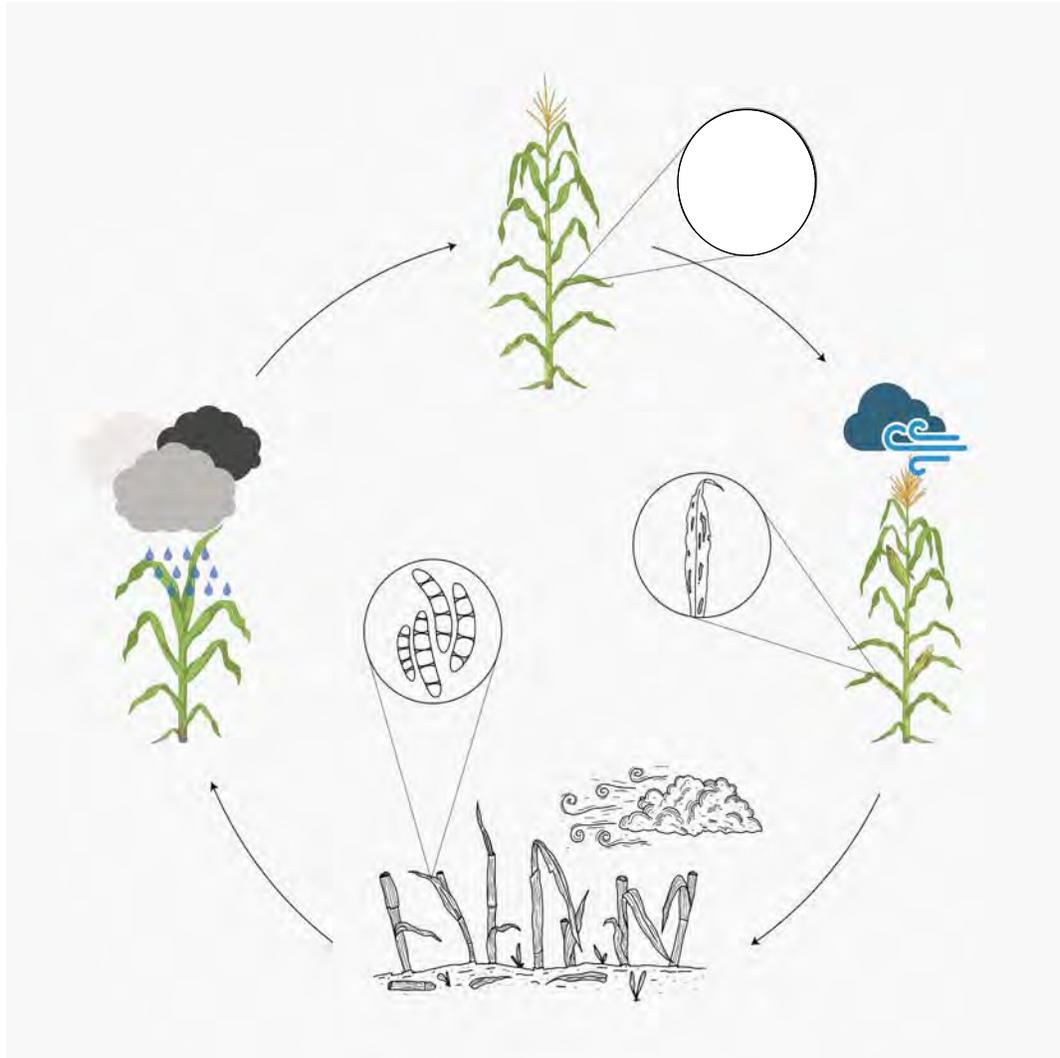


Figura 10. Ciclo del tizón foliar por turcicum.

Ciclo de la enfermedad

Manejo. La aspersión de algunos fungicidas de contacto como ditiocarbamatos o sistémicos controlan eficientemente la enfermedad.

La enfermedad se puede controlar con aspersión de 2-3 aspersiones de fungicidas de acción en multisitios, no selectivos ej. ditiocarbamatos de zinc,

manganeso, cobre, etc., que además de controlar la enfermedad ejercen un efecto de fertilizante foliar en el cultivo contribuyendo en el incremento de rendimiento de grano. La aplicación de éstos fungicidas debe iniciarse en estado V6, V7 (a la formación de la 6ª o 7ª hoja) y especialmente cuando empiezan a aparecer los estigmas o cabellos del jilote (floración femenina) (F1 o F2), que es el estado que más afecta la producción de grano de la planta. También, se puede obtener buen control con aplicaciones de fungicidas sistémicos que pueden aplicarse en 1-2 ocasiones, pero presentan el problema de favorecer resistencia en el hongo. Sin embargo, costos y dificultades involucrados en su aplicación hacen inconveniente este método de control.

Definitivamente, el método de control más eficiente y barato de la enfermedad es el uso de cultivares con resistencia genética. La selección de resistencia se puede hacer por diferentes procedimientos:

- El método de inoculación es colectando hojas infectadas con lesiones características. Se seleccionan las áreas con lesiones, se secan al aire, se muelen en molino y se guardan en latas cerradas en condiciones frescas. Este inóculo se deposita en los cogollos de plántulas de maíz cuando éstas llegan a la altura de la rodilla. Normalmente se necesitan 3-4 inoculaciones en condiciones de alta humedad, para evaluar genotipos en cuanto a su tolerancia a la enfermedad.
- Otro método con mayor precisión, es aislando el hongo en medio PDA acidulado, incrementándolo en medio de cultivo o en medios naturales esterilizados (P.e. granos de avena con glumas o sorgo esterilizados). Cuando el hongo ha formado buen micelio, los cultivos se secan al aire, se muelen y ponen en agua. La suspensión de esporas se filtra por manta de cielo. Las esporas ($75\ 000\ \text{mL}^{-1}$) se asperjan en el cogollo de plántulas cuando llegan a la altura de la rodilla. Esta aspersión se puede repetir 2-3 veces alternando con el inóculo de hojas secas mencionado con anterioridad.

La reciente aparición de nuevas razas fisiológicas y el rompimiento de monogenes de resistencia hacen necesario el uso de germoplasma con resistencia genética horizontal a la enfermedad.

Se conocen dos tipos de resistencia (Hooker, 1977):

- Cuantitativa, poligénica, horizontal, no específica a razas, o de no lesión clorótica: Se debe a la expresión de varios genes (poligénica) que se expresa en número y tamaño de lesiones en la planta (Figura 11). A diferencia de la

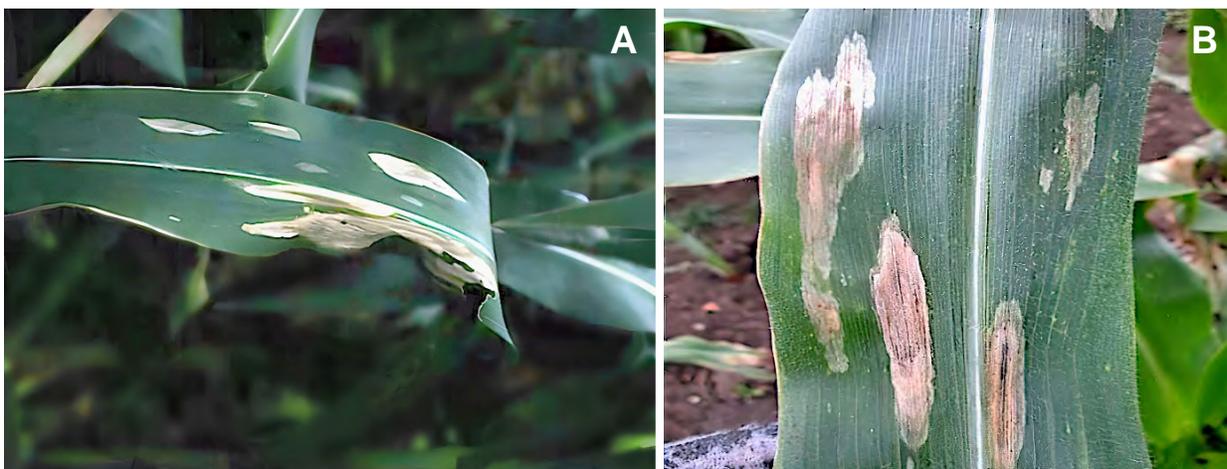


Figura 11. Lesiones de tizón foliar causado por la raza 1 de *E. turcicum*.

resistencia monogénica o vertical, la resistencia horizontal opera contra todas las razas de un patógeno, incluyendo a las de mayor patogenicidad, es estable debido al efecto amortiguador del sistema poligénico que se caracteriza por desarrollar menos lesiones, a veces más pequeñas con un prolongado periodo de incubación, pero no una esporulación reducida (Ullstrup, 1977).

- Cualitativa, monogénica, vertical, específica a razas, o de lesión clorótica: Normalmente es monogénica dominante, que se manifiesta con lesiones cloróticas rodeadas por un margen clorótico en plántulas y plantas adultas, reduciendo la esporulación y la diseminación de la enfermedad (Figura 12). Esta resistencia es debida a compuestos químicos, como las fitoalexinas (DIMBOA) que inhiben el crecimiento y diseminación del hongo. También, se ha reportado que *E. turcicum* produce una fitotoxina no específica llamada monocerina (Robeson and Strobel, 1982; Zhang *et al.*, 2007). Las hojas de maíz infectadas con cepas del hongo productoras de monocerina desarrollan una necrosis que se disemina por todo el sistema vascular, provocando la inhibición de la síntesis de clorofila y reduciendo el crecimiento de raíces en genotipos susceptibles (Cuq *et al.*, 1993; Bashan *et al.*, 1995; Zang *et al.*, 2007).

Hasta la fecha, en todo el mundo se han reportado 13 razas fisiológicas de *E. turcicum* (0, 1, 2, 3, N, 1.2, 1.3, 2.3, 2.3.N, 1.2.3.N, 2.N, 1.2.N y 3.N), pero las más frecuentes son las primeras siete (Bergquist and Masias, 1974; Thakur *et al.*, 1989; Gianasi *et al.*, 1996; Muiru *et al.*, 2010). Estas razas se denomi-



Figura 12. Síntoma de lesión clorótica en presencia de monogenes de resistencia *Ht*.

nan por los monogenes resistentes *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3*) (Hooker, 1978; Gevers, 1975; Robbins and Warren, 1993).

El gene homocigótico dominante *Ht* se identificó en la línea GE440 y después en la variedad Ladyfinger. Se han identificado diferentes genes de resistencia *Ht* (*Ht1A*, *Ht1B*, *HtBw* y *HtMo1*). El gene *Ht* es resistente a la raza 1, la más común en el mundo. En 1972, una nueva raza 2 apareció en Hawaii, virulenta al gene *Ht* pero no al *Ht2*. La línea NN14B, de Australia, probó ser la primera línea resistente a las razas 1 y 2. En 1976, la raza 3 se presentó en Carolina del Sur virulenta a los genes *Ht2* y *Ht3* pero no al *Ht*. *Ht3* se encontró en un segmento de cromosoma de la crucea *Zea mays* x *Tripsacum floridanum*. No hay diferencias visibles entre las lesiones cloróticas que se presentan por reacción de resistencia de los genes *Ht1*, *Ht2* o *Ht3*. El gene *HtN* (= *Ht1n*) se encontró en Sudáfrica en maíz de la raza Pepitilla y en la línea Gto. 59, que no muestran lesión clorótica y que retrasa la formación de lesiones hasta por 4 semanas (Gevers, 1975).

Recientemente, se han identificado los monogenes dominantes *HtP* (Ogliari *et al.*, 2005) y *Htm1* (Robbins y Warren, 1993) y el recesivo *ht4* (Carson, 1994; Wang *et al.*, 2010) con resistencia a *E. turcicum*.

El principal inconveniente de la resistencia vertical es que ésta no es durable ya que se puede perder fácilmente con la aparición de nuevas razas más virulentas del patógeno que hacen necesario un mejoramiento genético continuo del cultivo (Niks and Lindhout, 2004).

Finalmente, Vanderplank (2012) señala que ambos tipos de resistencia, vertical y horizontal, pueden estar presentes y que la resistencia de cualquier planta puede ser una mezcla de ambos tipos en diferentes proporciones.

Las fórmulas de virulencia del patógeno son (Leonard *et al.*, 1989):

Raza 1: Ht Ht2 HT3 / 0= no virulenta a genes *HT1*, *HT2*, *HT3*.

Raza 2: Ht2 Ht3 / Ht= no virulenta a *Ht2*, *Ht3*, virulenta a *Ht1*.

Raza 3: Ht / HT2 Ht3= no virulenta a *Ht1*, virulenta a *Ht2*, *Ht3*.

Todos éstos monogenes de resistencia están localizados en diferentes loci.

En regiones subtropicales y templadas, el hongo sobrevive como micelio y conidios en restos de maíz infectados (Figura 6.1). En el siguiente ciclo, en condiciones favorables, se producen conidios, o inóculo primario, que se dispersan por la lluvia o el viento para infectar nuevas plantas y repetir esta infección en varias ocasiones. *E. turcicum* puede atacar también al sorgo (*Sorghum* spp.), zacate Johnson (*Sorghum halepense*), zacate Sudán (*Sorghum x drummondii* (Steud)) Millsp. & Chase= *S. vulgare* var. *sudanense*) y teocintle (*Euclaena mexicana*), pero los aislamientos de estos hospedantes no atacan al maíz (Donald, 2004).

Tizón foliar por maydis

En países de habla hispana, esta enfermedad es erróneamente llamada “Tizón sureño del maíz” por su traducción literaria del inglés “Southern leaf blight” ya que se presenta en la región Sur de países del hemisferio norte con clima más caliente que en el norte. En el presente trabajo la enfermedad se denominará como “Tizón foliar por maydis” (“Maydis leaf blight”)

Agente causal. Anamorfo: *Bipolaris maydis*), *Dreschlera maydis* (and Jain. Teleomorfo: *Cochliobolus heterostrophus*)

Condiciones climáticas requeridas. Presente en zonas de trópico húmedo. La raza común 0 produce lesiones rectangulares, color café, a lo largo de las ner-

vaduras secundarias (Figura 13). Este tizón foliar raza rara vez ataca la mazorca aun en epifitias severas.

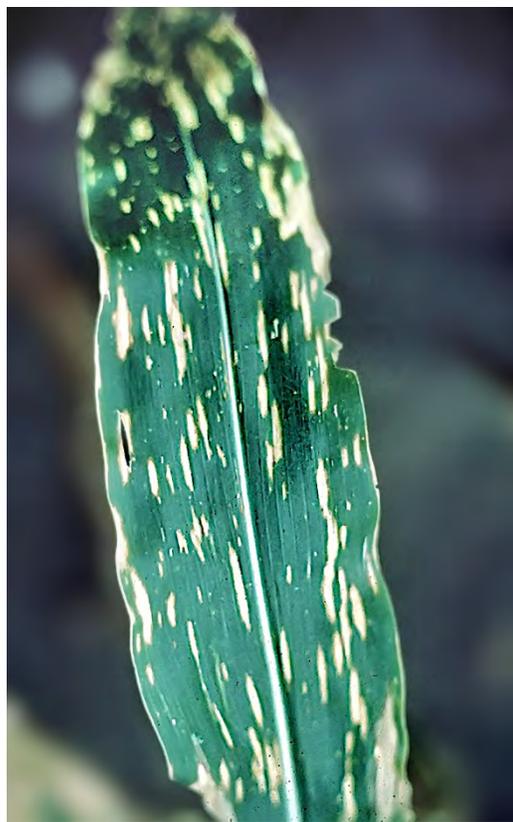


Figura 13. Lesiones por *B. maydis* raza 0.

La raza T de *B. maydis*, en maíces con citoplasma con androesterilidad de Texas (*Tcms* = Texas cytoplasm male sterile) se reportó por primera vez en Filipinas en 1961 (Mercado and Lantican, 1961). Esta raza produce lesiones más grandes que la raza 0, son ligeramente alargadas, irregulares, con un halo clorótico y puede atacar todas las partes aéreas de la planta, incluyendo vainas de las hojas, brácteas y grano (Figura 14A y B). Las lesiones que causa en citoplasma normal (N) son más pequeñas.

Ciclo de la enfermedad. Mismo que el del tizón foliar por *Turcicum*.

Manejo. La enfermedad se puede controlar sembrando en época de invierno cuando se presentan temperaturas bajas que en la temporada normal. También, se pueden aplicar fungicidas como los recomendados para el control de *E. turcicum*. Sin embargo, el método de control más eficiente y barato es el uso de variedades resistentes a la enfermedad. Para esto, es necesario considerar que se conocen 2 tipos de resistencia genética:

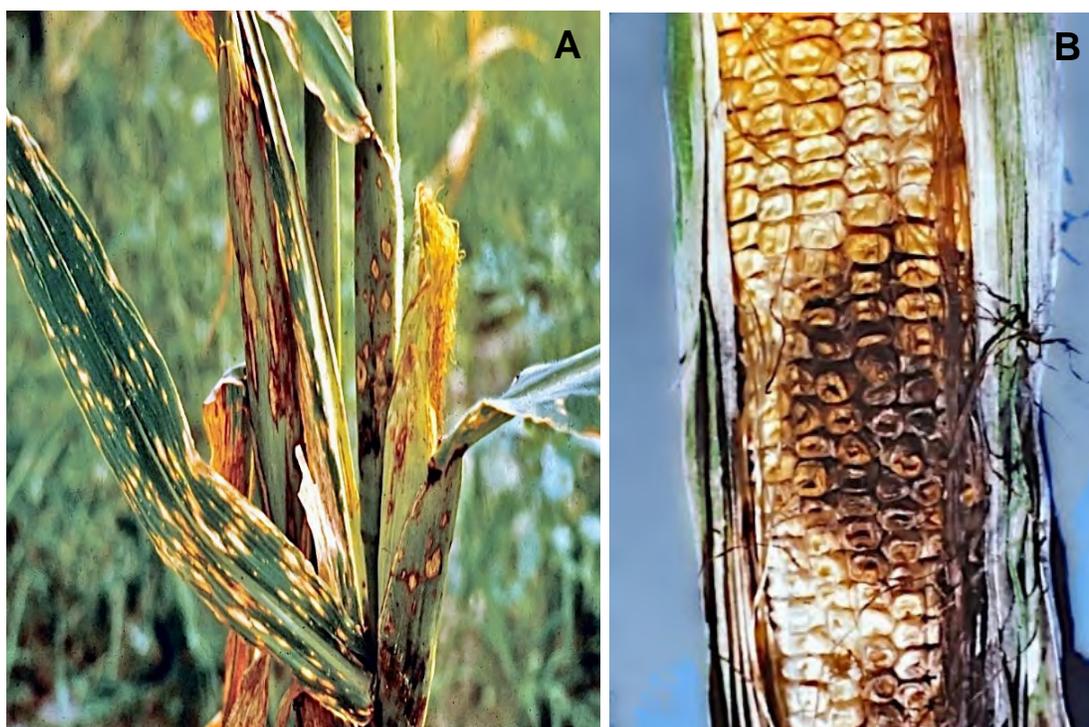


Figura 14. Síntomas ocasionados por *B. maydis* A) Lesiones foliares y vainas raza T en germoplasma Tcms y B) Lesiones en mazorca por *B. maydis* raza T en germoplasma Tcms.

a. Cuantitativa o poligénica: Se expresa en tamaño y número de lesiones, es parcialmente dominante a susceptibilidad y se involucran pocos genes. La resistencia existe en varios materiales de polinización libre, pero es necesario hacer selección de plantas individuales.

b. Cualitativa o monogénica: Produce reacción de lesiones cloróticas. Se detectó en algunas líneas de Nigeria por la formación de un área clorótica rodeando el punto de infección con inhibición de esporulación del hongo. Como fuentes de resistencia se han usado líneas de Nigeria en las que se encontró ésta resistencia homocigótica recesiva (*rh_m rh_m*) que ha sido incorporada en otros materiales genéticos (Thompson and Bergquist, 1984).

Condiciones climáticas requeridas. Similares a las de *B. maydis* antes descritas.

Manejo. La resistencia a la raza T se debe a factores citoplásmicos y genes nucleares, la primera siendo la más importante. Causa poco daño a plantas con resistencia citoplásmica.

Varias fuentes de androesterilidad son resistentes a la raza T, incluyendo los citoplasmas de androesterilidad cms-B, C, CA, D, EK, F, G, H, I, IA, S, K, L, M, ME, MY, PS, R, RB, S, SD, TA, VG, W y otros. Sin embargo, el método más eficiente y barato de controlar la enfermedad es volviendo al uso de germoplasma normal, sin androesterilidad.

Mancha o Peca del maíz

Agente causal: *Physoderma maydis*

Condiciones climáticas requeridas. La enfermedad se presenta en trópico húmedo y zonas subtropicales húmedas. Produce manchas redondas, negruzcas, de 1-1.5 cm de diámetro, que se forman en bandas en la nervadura central de las hojas, vainas de las hojas y brácteas de la mazorca (Robertson *et al.*, 2015). En la lámina foliar solamente se forman pequeñas manchas cloróticas. Puede causar pérdidas severas por pudrición de tallo (Figura 15 A-D).



Figura 15. Síntomas ocasionados por *P. maydis*. A y B) Pecas en bandas en hojas de maíz; C) Pecas en vainas de hojas de maíz; D) Lesiones por *P. maydis* en tallo.

Ciclo de la enfermedad

Manejo. Este patógeno produce esporangios redondos que, en condiciones apropiadas de temperatura y humedad, produce zoosporas biflageladas que, con la humedad sobre las hojas, se mueven hacia la lígula en donde germinan e inician la infección. El daño serio de ésta enfermedad no es el daño foliar que causa, sino que el hongo desarrolla y penetra de las lígulas infectadas al tejido del tallo, el cual pudre causando acame de las plantas infectadas (Figura 16).



Figura 16. Ciclo de vida de *Physoderma maydis* que ocasiona la mancha o peca del maíz.

Para inocular éste patógeno es necesario colectar restos de tallos infectados del ciclo anterior, secarlos, molerlos y guardarlos para usar como fuente de inóculo en el ciclo siguiente. El método de inoculación más utilizado es inyectando o asperjando esporangios secos en el cogollo de plantas de 40-50 cm de altura. Este método es más eficiente cuando las plantas se mantienen húmedas después de inocular con riego por aspersión o lluvia. Los síntomas de infección se observan hasta después de floración. Otro método de control es utilizando germoplasma con resistencia genética que está disponible en germoplasma de EEUU e India. No se conocen razas fisiológicas del hongo. La herencia es cuantitativa con importantes efectos génicos aditivos. Se menciona que un mínimo de 4 genes independientes está involucrado en la resistencia.

Mildius

Agente causal. *Peronosclerospora* spp. (Sin. *Sclerospora* spp.), *P. sorghi*, *P. philippinensis*, *P. sacchari*, *P. maydis*, *P. miscanthii*, *P. spontanea*, *Sclerospora graminicola*, *Sclerophthora macrospora*, *S. rayssiae* var. *zeae*

De estos, en México solamente están presentes *Sclerospora* sp., *Peronosclerospora sorghi* y *Sclerophthora macrospora*.

Condiciones climáticas requeridas. Estas especies desarrollan su infección en forma sistémica causando un daño severo en las plantas infectadas que llegan a ser totalmente improductivas. El hongo puede infectar maíz, sorgo y pasto Johnson en los que muestra los primeros síntomas de infección como “media hoja” (Figura 17A) que continúa su desarrollo dentro de la planta infectada hasta formar una vellosidad en tejido foliar (Figura 17B) donde forma oosporas, especialmente en tejido infectado de sorgo y pasto Johnson (Figura 17C). Las oosporas permanecen en el suelo y germinan cuando se inicia la germinación de la semilla del nuevo cultivo susceptible. El hongo continúa su desarrollo dentro del tejido de la planta hasta llegar a la espiga que desarrolla una filodia, o abundante formación de hojas conocida como “punta loca” (Figura 17D y 18).

Ciclo de la enfermedad

Manejo. Actualmente, se ha logrado un exitoso control de ésta enfermedad aplicando los 4 métodos de control conocidos:



Figura 17. A) Síntoma de media hoja por *P. sorghi*; B) Vellosoidad sobre las hojas causada por *P. sorghi*; C) Oosporas de *P. sorghi* y D) Punta loca por *P. sorghi* en maíz.

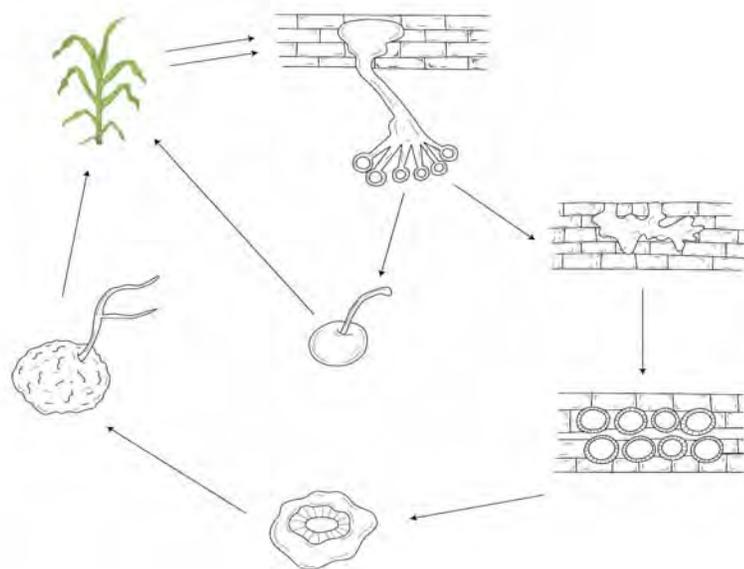


Figura 18. Ciclo del mildiú del maíz

Prevención: Evitando, por métodos legales, la introducción de germoplasma de maíz susceptible o producido en países donde están reportadas éstas enfermedades,

Erradicación: En muchas localidades en que se encontraban plantas de hospedantes enfermas, se recomendó la eliminación y destrucción de esas plantas, Control cultural: Se recomendó el tratamiento de semilla de maíz y sorgo con dosis bajas de fungicidas. Más tarde, para evitar el desarrollo de resistencia del patógeno se recomendó el tratamiento de semilla con un fungicida de acción multisitio, como son los dithiocarbamatos.

Resistencia genética: Se hizo disponible germoplasma desarrollado con resistencia genética poligénica, estable (Chang, 1972).

El proceso de selección de resistencia se puede lograr utilizando la siguiente tecnología:

- a. Sembrando en terrenos donde hubo sorgo infectado.
- b. Por diseminación de conidias, inoculando surcos dispersores sembrados con una variedad susceptible. Estos surcos se siembran e inoculan previo a la siembra del material por evaluar y seleccionar.
- c. Inoculación repetida con inóculo colectado de variedades susceptibles. El material por seleccionar se asperja con el inóculo en horas tempranas (1-3 AM) con surfactante ya que los conidios son fotosensibles. Oscuridad y temperaturas de 20-24 °C favorecen la germinación de conidios, penetración y desarrollo de la enfermedad.

Resistencia poligénica: Las fuentes de resistencia más estables se encuentran en variedades de Filipinas e Indonesia. La mayoría de éstas fuentes son agrónomicamente malas, sin embargo, las variedades Suwan 1, Suwan 2, Suwan 3 (de Tailandia) y TLWD, TIWF, TYFD (de CIMMYT) (De León, *et al.*, 1993), tienen buenos niveles de resistencia y buenos caracteres agronómicos.

- Existen trabajos que reportan la presencia de un gene sencillo dominante (Dmr) que controla la resistencia a *P. sacchari*. Este gene se incorporó en líneas de Taiwan. Sin embargo, esta resistencia no es estable para otras especies de mildius.

- Resistencia a *P. sorghi*, *P. philippinensis* y *P. maydis* es cuantitativa con herencia poligénica y genes aditivos (Kim and Brewbaker, 1977). Trabajos en Tailandia

sugieren que la resistencia a *P. sorghi* es controlada por 3 genes dominantes (Kaneko and Aday, 1980).

Complejo de la Mancha de asfalto

Agente causal. Infección simultánea de *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Conithyrium phyllachorae*

Condiciones ambientales requeridas. En México, esta enfermedad se presenta en ambientes muy contrastantes, desde trópico húmedo hasta regiones templadas en el altiplano de México con clima fresco-húmedo, con alta humedad relativa, en localidades de 0-2600 msnm (Gómez *et al.*, 2008). Se manifiesta como manchas negras, abultadas, brillosas, que inician su formación en la superficie de las hojas inferiores (Hock *et al.*, 1989). El patógeno *P. maydis* es un ascomiceto que forma estructuras negras (estromas o cípeos) (Maublanc, 1904), que coalescen con el tiempo llegando a quemar completamente el follaje (Bajet *et al.*, 1994). En los estromas se encuentran abundantes peritecios con ascas con 8 ascosporas, redondas, unicelulares, negras (Dittrich *et al.*, 1991; Müller, 1984; Parbery, 1966) (Figura 19).

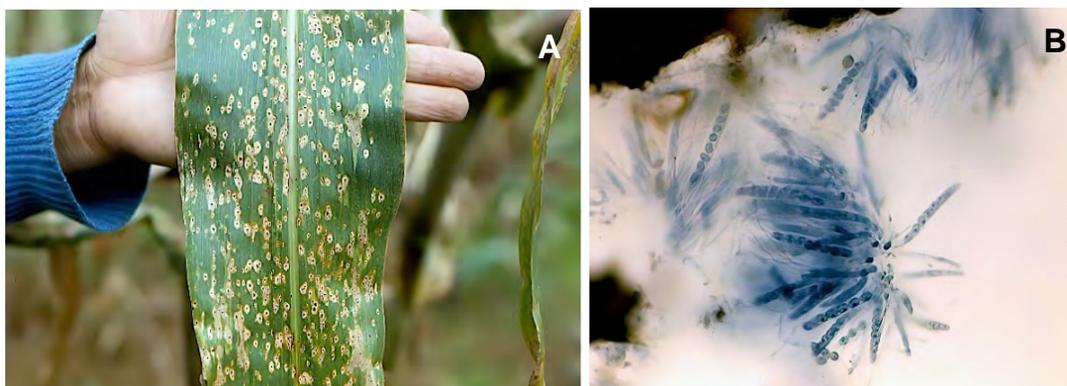


Figura 19. A) Lesiones foliares por *P. maydis*; B) Ascas con ascosporas de *P. maydis*.

Una vez que se presentan las manchas negras en las hojas inferiores de la planta, se inicia la infección del ascomiceto hiperparásito *Monographella maydis* y poco tiempo más tarde aparece la infección de un segundo hiperparásito *Conithyrium phyllachorae*. La infección simultánea de los tres hongos causa el quemado y atizonamiento del follaje de las plantas de maíz. Este quemado del

follaje es severo pero el daño principal puede verse en las mazorcas afectadas cuando la infección combinada de los tres hongos es en época de formación de estigmas, necrosándolos y evitando la fecundación de los ovarios. Los granos que se forman, especialmente en las puntas de las mazorcas, son defectuosos y pregerminados con nulo valor comercial (Figura 20).



Figura 20. Mazorca producida en planta dañada por complejo mancha de asfalto.

Manejo. En áreas muy afectadas por la enfermedad se recomienda eliminar y quemar los restos de plantas dañadas. En algunas localidades se recomienda adelantar la fecha de siembra, especialmente cuando se hace una segunda siembra en un año, para evitar bajas temperaturas y alta humedad que se presentan a principios de año. En varias localidades se ha tenido buen control de la mancha de asfalto haciendo 3 aspersiones de fungicidas de contacto de acción en multisitio iniciando 2-3 semanas antes de floración, durante floración femenina y dos semanas después. El uso de estos fungicidas de contacto ha probado su eficiencia en el control de la enfermedad debido a su bajo costo y el efecto de fertilización que incrementa el rendimiento de grano. Otros productos que han mostrado un control eficiente son los fungicidas sistémicos en dosis bajas, con tres aplicaciones similar a las anteriores. El control de la enfermedad con fungicidas puede ser utilizado considerando la costeabilidad de las aplicaciones y los inconvenientes asociados a estas.

Como en las enfermedades anteriores, la experiencia indica que el método de control más eficiente es utilizando cultivares con resistencia genética a la enfermedad (Ceballos and Deutsch, 1992; González *et al.*, 1992). En México, existe germoplasma con resistencia genética en cultivares de endospermo blanco o amarillo adaptados a regiones tropicales y subtropicales (Gómez *et al.*, 1993).

A la fecha no se ha reportado un método de inoculación eficiente.

7. Royas

Roya común

Agente causal. *Puccinia sorghi*

Condiciones ambientales requeridas. La enfermedad es causada por el basidiomiceto *Puccinia sorghi*, que se presenta en zonas templadas, con alta humedad. La germinación e infección por las urediosporas se realiza cuando existe rocío en las hojas. La lesión se presenta como pústulas errumpentes con polvo café, redondas o alargadas (uredias con uredosporas) que se forman en ambas superficies de las hojas (Figura 21).

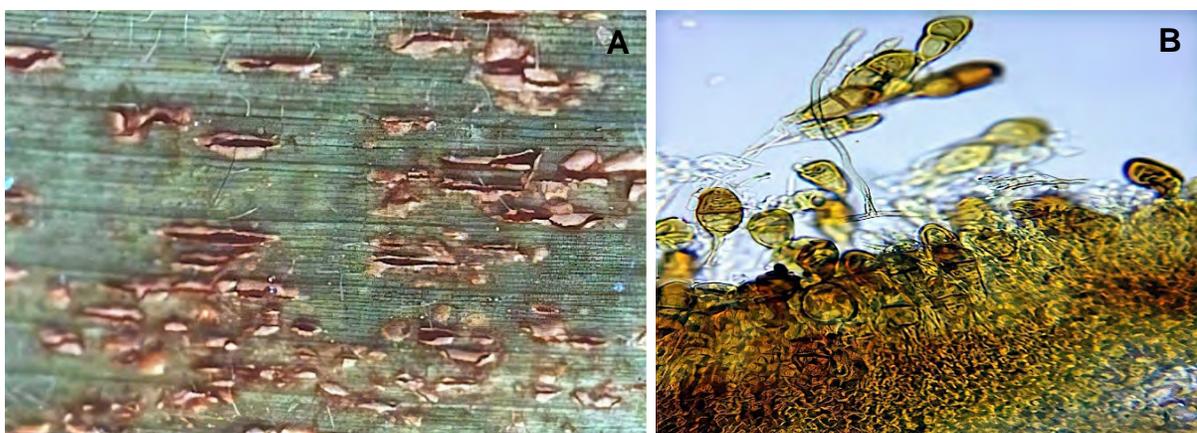


Figura 21. A) Formación de uredias con telias con teliosporas en hojas de maíz, B) Formación de urediosporas.

Esta es la fase infectiva del patógeno en maíz. Más tarde, las pústulas toman color negro al formarse las telias con teliosporas. Después de ésta fase, se forman estructuras (picnias con picniosporas), no visibles en condiciones

naturales que infectan al hospedante alternativo (*Oxalis* spp., conocidos como “agritos”) en cuyas hojas se forma un polvo anaranjado (aecias con aeciosporas) en el envés de las hojas (Figura 22). En esta planta, se inicia la nueva formación de urediosporas que infectan plantas de maíz en el siguiente ciclo de siembra (Figura 23).



Figura 22. Formación de aecias con aeciosporas por *P. sorghi* en el hospedante alternativo *Oxalis* sp.

Ciclo de la enfermedad

Manejo. El patógeno es un parásito obligado ya que solamente crece en tejido vivo. Las urediosporas son viables por un año o más cuando se liofilizan y guardan en vacío a 2-10 °C. Para seleccionar resistencia genética, plántulas a la altura de la rodilla, se pueden inocular inyectando o poniendo suspensiones de urediosporas en el cogollo en las tardes, cuando el clima es más fresco y húmedo. Las urediosporas se pueden diluir y usar como inóculo con agua, talco o aceite mineral, para ser espolvoreadas o asperjadas (100 000 urediosporas mL⁻¹) con surfactante o espolvoreadas en las plantas. En el campo, se recomienda sembrar surcos dispersores con material susceptible que pueden inocularse artificialmente.

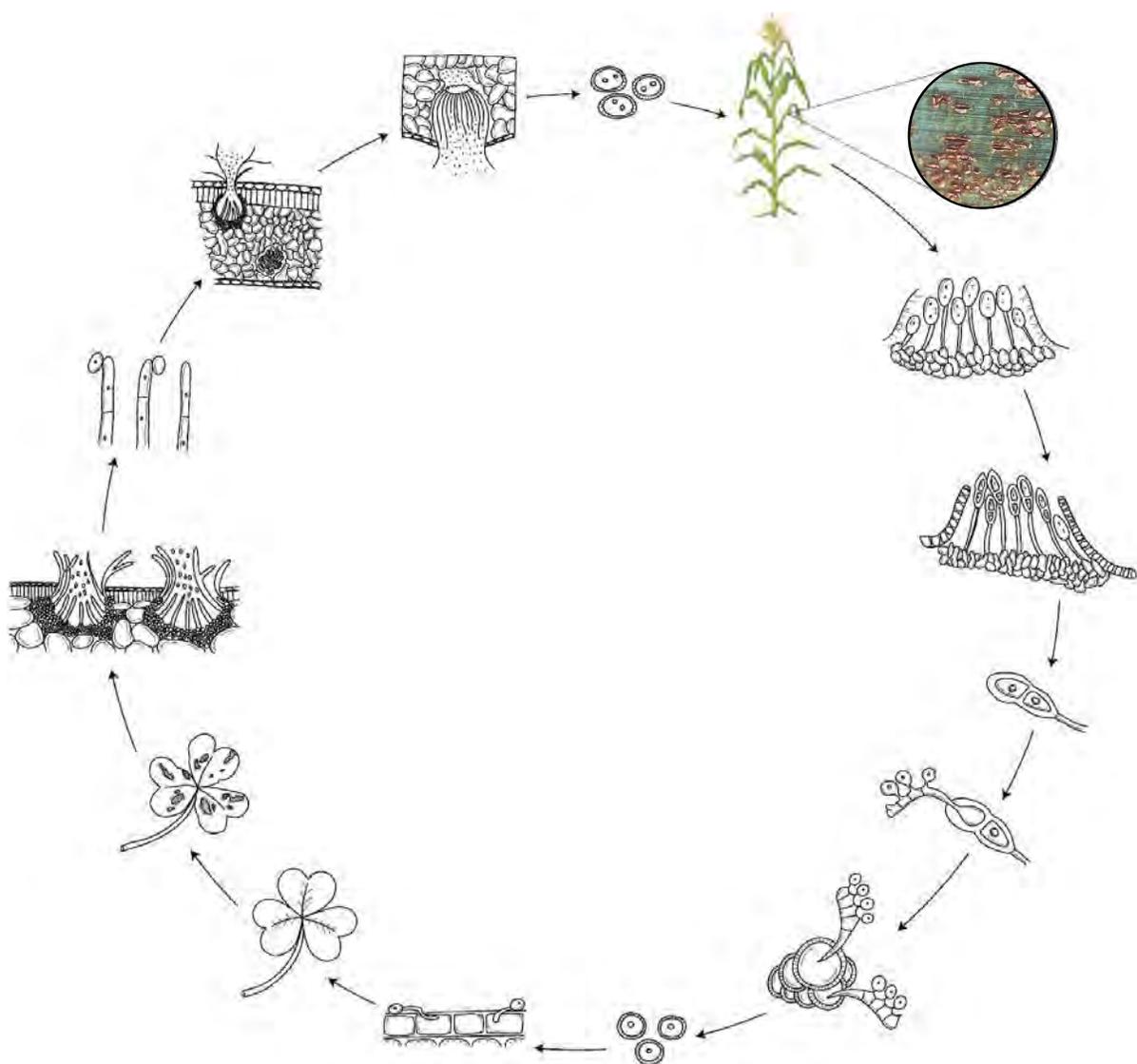


Figura 23. Ciclo de la roya común del maíz por *Puccinia sorghi*

La enfermedad se puede manejar principalmente con el uso de germoplasma resistente. Para esto, se conocen dos tipos de resistencia:

La resistencia general, poligénica, horizontal o No específica a razas que se observa en el campo en plantas adultas (“resistencia de planta adulta”) con un número reducido de pústulas y necrosis. La reacción varía de resistencia con pocas pústulas a altamente susceptible con lesiones cubriendo gran parte del follaje. Aun cuando se sabe poco de su heredabilidad, se sabe que es fácil

acumular resistencia en un programa de mejoramiento. En esta resistencia se involucran pocos genes en la que existen varias fuentes de resistencia originaria de diferentes países, incluyendo las razas Palomero Toluqueño y Comiteco de México.

La resistencia específica, monogénica, vertical o específica a razas, es conferida por un gene dominante que es específico a razas del patógeno y que se manifiesta en plántulas o plantas adultas como manchitas cloróticas o necróticas o pequeñas pústulas rodeadas de tejido clorótico. Una variedad puede ser resistente en un continente, pero no en otro.

Una de las principales fuentes de resistencia a la mayoría de los biotipos del patógeno es la variedad Cuzco de Perú. En ésta, el “factor Cuzco”, en el locus Rp es resistente a todos los aislamientos del hongo. El locus Rp, incluyendo el locus Rp1 en el cromosoma 10, tiene aproximadamente 11 alelos ligados a resistencia. El gene Rp1Td transferido de *Tripsacum dactyloides* a maíz, también está localizado en el cromosoma 10. La resistencia específica también puede ser debida a 1, 2 o 3 genes recesivos y la segregación transgresiva para resistencia a *P. sorghi* no es común en planta adulta.

Roya por *Polysora*

Agente causal. *Puccinia polysora*

Condiciones climáticas requeridas. Como la roya común, el patógeno causante de ésta roya es un parásito obligado en el grupo de la uredinales, pero este patógeno se presenta en condiciones de trópico húmedo. Hasta 1949, la enfermedad estuvo restringida a América cuando se identificó en países de África oriental. Sus síntomas y signos son similares a los de *P. sorghi*, excepto que las uredias son más pequeñas y redondas, con un color café amarillento (Figura 24). En el caso de *P. polysora* no se conoce el hospedante alterno.

Ciclo de la enfermedad. Mismo que para roya común del maíz, pero en *P. polysora* aún se desconoce el hospedante alterno.

Manejo. Los mismos métodos descritos para *P. sorghi*. Las urediosporas almacenadas pierden su viabilidad en 10-14 días.



Figura 24. Uredias con urediosporas de *P. polyspora* en maíz tropical.

Como método de control se puede usar la aplicación de fungicidas, incluyendo la aplicación de ditiocarbamatos. Así, el único método eficiente es el control genético de la enfermedad, que incluye:

-Resistencia de planta adulta: conocida en variedades tropicales es estable y evita pérdidas al mínimo con plantas mostrando un número reducido de pústulas. Fuentes de resistencia son disponibles en germoplasma de varios países incluyendo varios tipos de Tuxpeños de México y ETO y Caquetá, de Colombia.

Las razas fisiológicas conocidas del hongo son EA.1, EA.2, EA.3, PP3 a PP9, NPP1 y NPP2. Se considera que esta roya, que repentinamente apareció en África oriental, perdió importancia debido a la resistencia de los maíces nativos y a una pérdida de virulencia del patógeno.

- Resistencia monogénica, específica: Se sabe que existe resistencia específica a una o más razas del patógeno conferida por monogenes dominantes. Fuentes de resistencia disponibles son también originarias de diferentes países incluyendo ETO Amarillo, ETO Amarillo x SLP41 de Colombia, Australia, Kenia y EEUU.

Monogenes dominantes conocidos con esta resistencia son *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp9*, *Rpp10* y *Rpp11*. Se asume que existen otros genes involucrados. El gene sencillo dominante *Rpp1* (en AFRO29 y 70-2/Q6199) es resistente a la raza EA.1 pero no a EA.2. El gene *Rpp2* (en AFRO. 24 y 71/Q6190) tiene dominancia incompleta y es resistente a las razas EA.1 y EA.2 (Scott *et al.*, 1989).

Ambos genes *Rpp1* y *Rpp2* (en la línea 67-1/Q6200) dan resistencia a las razas EA.1 y EA.2. El gene *Rpp9* (en 69Q/Q10736) es dominante y resistente a raza Rpp9 del hongo (Scott *et al.*, 1984). La raza EA.3, virulenta a los genes *Rpp1* y *Rpp2* se identificó en Kenia. Dos genes independientes *Rpp10* y *Rpp11* dan resistencia a EA.3. El gene *Rpp10* (en 69Q/Q10739, de la raza Andaquí) es dominante y el gene *Rpp11* (de Zapalote Chico) es independiente. Lo anterior indica la inestabilidad de la resistencia monogénica ante la continua aparición de nuevas razas fisiológicas del patógeno.

- Resistencia poligénica, no específica: Las plantas casi no muestran síntomas de infección. Se sabe poco como se hereda.

8. Carbones

Carbón común

Agente causal. *Ustilago maydis*

Síntomas. La enfermedad es causada por un basidiomiceto en el grupo de los Ustilaginales que tiene una distribución cosmopolita y que se presenta especialmente en regiones templadas con alta humedad relativa. La infección está limitada a tejidos meristemáticos (tejido en desarrollo activo) formando agallas (soros) en las mazorcas, hojas, tallos y espigas (Figura 25). En época de maduración del cultivo, las agallas forman un polvo negro que contiene las teliosporas negras que caen al suelo para iniciar la infección en el ciclo siguiente (Figura 26).

En México, la enfermedad es conocida como “cuitlacoche” (náhuatl: cuitlacoचितl= excremento seco), cuya presencia es controversial ya que puede ser bienvenida siendo que este hongo se consume por mucha de la población del país y llega a producirse para exportación a varios países en donde se le considera como “la trufa mexicana” (Pataký, 1991; Valverde *et al.*, 2015). En caso se considere como una plaga será necesario aplicar los métodos de manejo que se describen a continuación.



Figura 25. A) Infección ocasionada por *U. maydis* en mazorcas de maíz; B) Agallas de *U. maydis* en tallos maíz.

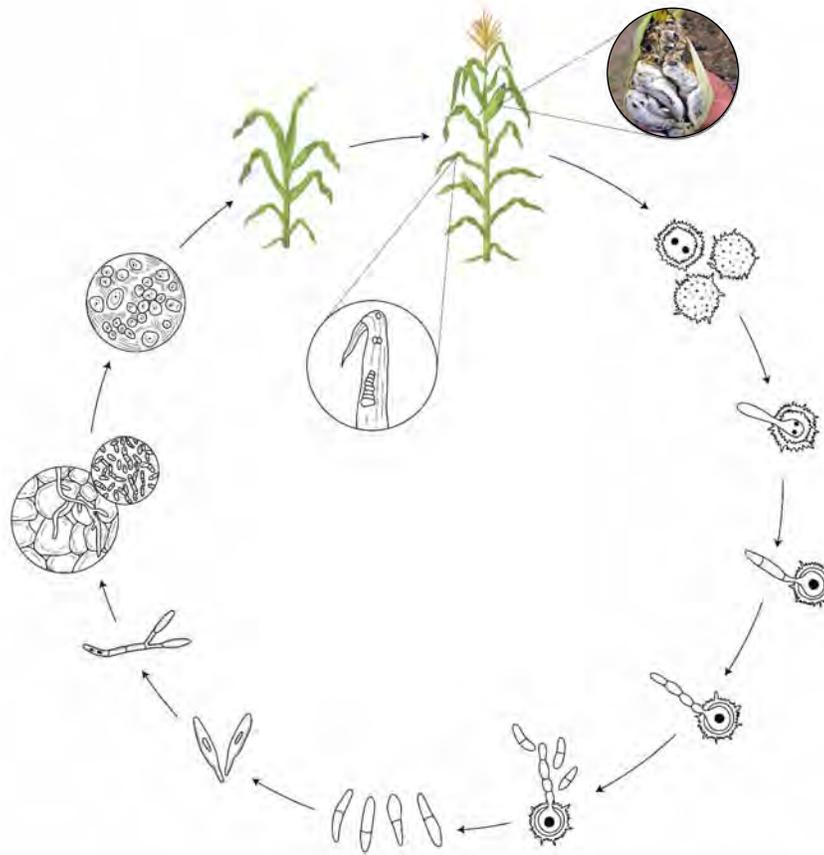


Figura 26. Ciclo del carbón común del maíz por *Ustilago maydis*

Inoculación

1. **Inoculación de plántulas:** Cuando la semilla inicia su germinación y los coleóptilos tienen 1 cm de crecimiento se inyectan con una suspensión de teliosporas. Los síntomas aparecen 1-3 semanas más tarde.
2. **Método de inyección:** Plántulas de maíz de una semana se inoculan con una suspensión de teliosporas ($100\ 000\ \text{mL}^{-1}$) inyectándolas en el meristemo. Las agallas se forman en 2-3 semanas.
3. **Método de gota:** Buena para medir reacción en campo. Una suspensión de teliosporas se deposita en el cogollo de plántulas con 2-5 hojas por 3 días sucesivos. La adición de un surfactante incrementa el porcentaje de infección. Espolvoreando teliosporas secas reportan bajo porcentaje de infección.
4. **Método de vacío parcial:** El inóculo se aplica en el cogollo de plántulas que se someten a presión reducida por 15 min. Este vacío fuerza el inóculo a penetrar los tejidos produciendo infecciones severas.

El concepto de la edad de la planta de maíz y su susceptibilidad utilizando ciertos métodos de inoculación es conflictivo.

Ciclo de la enfermedad

Manejo. Se han desarrollado varios métodos de manejo para controlar el carbón común. Se incluyen rotación de cultivos (cuestionable, porque las esporas sobreviven por varios años), tratamiento de semilla con fungicidas se recomienda como preventivo (protección solamente en las primeras semanas), modificación de la fertilidad del suelo y control biológico (Kealey *et al.*, 1981).

Sin embargo, solamente el uso de variedades resistentes es lo más práctico y efectivo para controlar de la enfermedad.

No existen líneas de maíz inmunes a la infección de éste patógeno y es conocido que las líneas de maíces dulces tienden a ser más susceptibles.

Además del control genético no se conoce otro método para controlar ésta enfermedad. La resistencia se basa en características morfológicas y fisiológicas de la planta. La localización de la agalla es un carácter hereditario.

Resistencia de campo y de invernadero puede variar si las plántulas se inoculan por heridas. Algunas líneas de maíz son resistentes a infección por heridas o por suspensión de teliosporas en las hojas.

Fuentes de resistencia se han reportado en líneas de Hungría, Sudáfrica y EEUU (Bojanowsky, 1969).

Existen resultados controversiales en cuanto a densidad de siembra e incidencia de la enfermedad.

8.2. Carbón de la espiga

Agente causal. *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* [sin. *Sphacelotheca reiliana*]

Síntomas. La enfermedad es causada por un basidiomiceto en el grupo de los Ustilaginales. Tiene una distribución cosmopolita y se presenta en condiciones subtropicales con baja humedad relativa y baja humedad en el suelo. Los síntomas más característicos de la enfermedad se presentan en las estructuras florales del maíz. En México, la enfermedad se encuentra actualmente en los estados de Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Zacatecas, Durango, Hidalgo y Edo. de México, en localidades a aproximadamente 1400-1800 y hasta 2600 msnm.

El patógeno desarrolla en forma sistémica dentro de la planta cuando el hongo penetra por las raicillas y su micelio crece dentro de los haces vasculares del hospedante que, al llegar a las estructuras florales desarrolla en forma de agallas, o soros, que contienen abundantes teliosporas. Estas agallas, pueden formarse remplazando a la mazorca y las estructuras florales de la espiga (Unamuno, 1941). Cuando maduran, las brácteas de las mazorcas y espigas se abren exponiendo un polvo negro con las teliosporas del hongo (Figura 27). Es común encontrar plantas con síntomas de agallas tanto en la mazorca como en la espiga o solamente en una de éstas estructuras florales.

Los síntomas característicos de la infección sistémica del hongo se pueden ver claramente en época de floración; sin embargo, observando con atención, se pueden ver los síntomas de la infección sistémica en hojas de plantas de 1-2 meses en forma de pequeñas manchas cloróticas de 2-3 mm (Matyac and Kommendahl, 1985a; Matyac and Kommendahl, 1985b).



Figura 27. A) Formación de agallas de carbón en mazorcas de maíz; B) Formación de agallas de carbón en espigas de maíz por infección de *S. reilianum*.

Inoculación. El método que ha probado mayor eficiencia en infección es cubriendo la semilla de maíz con una suspensión de carboximetilcelulosa de sodio (Na-CMC) en que se mezclan 1×10^8 teliosporas del hongo (Quezada *et al.*, 2013). También se han obtenido buenos resultados cubriendo la semilla a inocular con teliosporas en una suspensión de Resistol® diluido 1:50 con agua (Díaz-Ramírez *et al.*, 2021).

Se ha especulado sobre la posible transmisión y diseminación de la enfermedad por semilla contaminada (Halisky and Smeltzer, 1961; Paulus *et al.*, 1975), pero ésta posibilidad quedó eliminada por trabajos de otros investigadores (Christensen, 1926; Zehner and Humphrey, 1929).

Ciclo del patógeno. El ciclo del patógeno causante del carbón de la espiga es similar al del carbón común (*Ustilago maydis*) con la diferencia de que las telias y las teliosporas germinan y penetran por las raicillas cuando la semilla inicia el proceso de germinación (Pope and McCarter, 1992). Una vez establecida la infección, el micelio desarrolla en el tejido del tallo y avanza en forma sistémica hacia tejido de la mazorca y la espiga (Aquino-Martínez *et al.*, 2011).

Manejo. Debido al desconocimiento sobre la diseminación de la enfermedad por medio de las teliosporas, los agricultores “limpian” sus siembras de maíz eliminando las plantas enfermas con carbón, pero tirando las espigas y plantas infectadas al suelo sin saber que las agallas que desarrollan en las espigas y mazorcas están cargadas de teliosporas del hongo. Esas teliosporas van al suelo y servirán de inóculo primario para iniciar un nuevo ciclo de infección en la siguiente siembra de maíz. Por esto, es recomendable la eliminación de plantas con síntomas de la enfermedad quemándolas o enterrándolas en diques. Ullstrup (1977) menciona la alternativa de tratamiento de semilla con fungicidas, pero los resultados reportados son inconsistentes. Sin embargo, el método de control más económico y que tiene mejores posibilidades de éxito es la selección y uso de resistencia genética (Pandey and Gardner, 1992).

9. Pudriciones de grano y mazorca - micotoxinas producidas

Agente causal. *Fusarium graminearum* (sin. *F. roseum*); Teleomorfo: *Gibberella zeae*.

F. verticillioides (sin. *F. moniliforme*); Teleomorfo: *G. fujikuroi*

Stenocarpella maydis (sin. *Diplodia maydis*)

Aspergillus flavus y *A. parasiticus*

Penicillium oxalicum, *P. glaucum* y *P. chrysogenum*

Síntomas por *Fusarium* spp. Las dos especies de *Fusarium* de importancia como fitopatógenas en maíz son *F. verticillioides* y *F. graminearum*. La primera se encuentra causando pudriciones de tallo y de mazorca en clima cálido y húmedo y la segunda en condiciones templadas, más frescas y con alta humedad.

En mazorcas, *F. verticillioides* causa una pudrición zonal de granos en áreas pequeñas o regulares, produciendo un micelio abundante, blanco o rosado (Figura 28A) en el que se forman microconidios ovoides en cadenas muy características (Figura 28B), de ahí que el hongo estuviera clasificado como *F. moniliforme* (lat. *monilia*= cadena + *forme*= forma).

En el caso de *F. graminearum*, la pudrición de tallo y mazorca que causa se presenta inicialmente en granos en la punta de la mazorca con un micelio color rojo oscuro o violeta, formando microconidios ovales y macroconidios alargados, con varias septas, con forma de “lancha india” (Figura 29).



Figura 28. A) Infección de mazorca por *F. verticillioides*, B) Microconidios de *F. verticillioides*.



Figura 29. A) Infección de mazorca por *F. graminearum*; B); Macroconidios de *F. graminearum*

F. verticillioides sintetiza micotóxicas bastante inestables que se destruyen durante el proceso de nixtamalización conocidas como “fumonisinas”. Entre éstas se encuentran el ácido fusárico, fusarinas, fusariosinas, giberelinas, moniliformina, zearalenona y dentro de los tricotecenos se encuentran el diacetoxiscirpenol, desoxinivalenol o vomitoxina y la toxina T-2, compuestos con estructura química parecida a la progesterona, la hormona femenina en mamí-

feros, por lo que su consumo induce abortos en hembras preñadas, vómitos y diarrea.

F. graminearum produce micotoxinas más estables que no se destruyen durante la nixtamalización, incluyendo ácido 4-acetamido-2-butenico, butenolida, fusarenona X, zearalenona (ZEA), y entre los tricotecenos se producen desoxinivalenol o vomitoxina (DON), toxinas T-2 y H-2, diacetato desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol (DAS), 3,15-dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-eno-8-ona, monoacetoxiscirpenol, neosolaniol, nivalenol y 3-acetildesoxinivalenol (Carvajal y De León, 2015), que, como las anteriores inducen abortos, diarrea y vómitos en mamíferos que las consumen.

Síntomas por *Stenocarpella* spp. La pudrición de mazorcas causada por *Stenocarpella* puede ser debida a 3 especies: *S. maydis*, *S. macrospora* y *S. frumentii*, siendo la primera la más común. *S. maydis* forma conidios pequeños, bicelulares, color negrusco, mientras que *S. macrospora* forma conidios más grandes con 2, 3 o 4 células de color sepia (Figura 30).

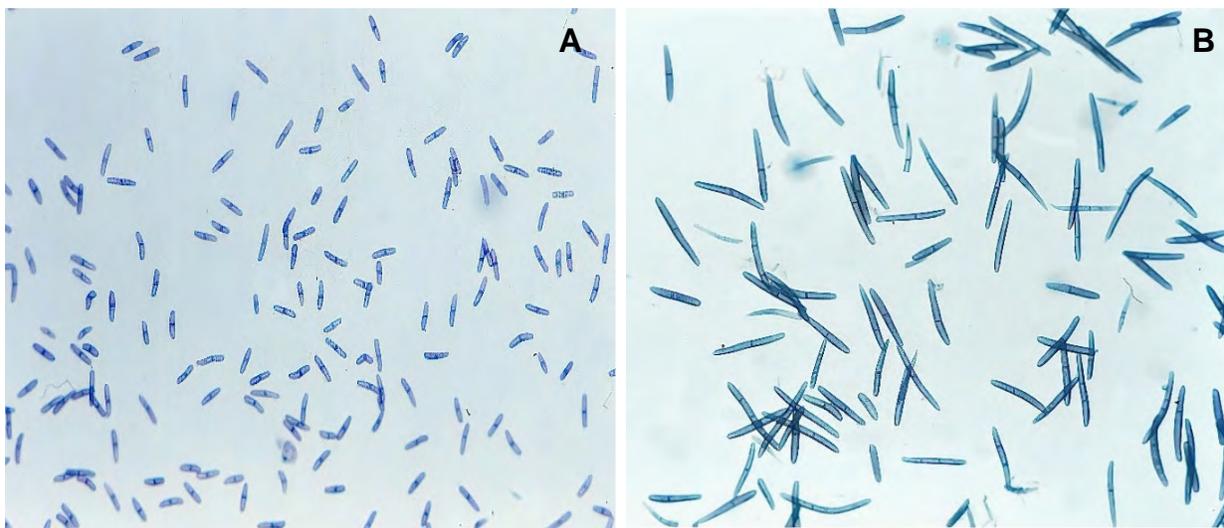


Figura 30. A) Conidios de *S. maydis*; y B) Conidios de *S. macrospora*.

La pudrición por *S. maydis* se presenta principalmente en regiones cálidas, húmedas, en donde las mazorcas infectadas pierden peso, son ligeras y desarrollan un micelio blanco, abundante, que crece entre las semillas cubriendo totalmente la mazorca. En estado avanzado, el patógeno se puede reconocer

cuando, al partir el raquis (olote), se observa una abundante formación de pequeños cuerpos fructíferos negros del hongo (picnidios), en los que se forman conidios bicelulares, pequeños, negros (Figura 31).



Figura 31. A) Infección de mazorca por *S. maydis*; B) y Formación de picnidios en el raquis.

La infección por *S. macrospora* se presenta en menor frecuencia que la anterior. Las mazorcas infectadas se pueden distinguir de la anterior por un menor desarrollo de micelio entre los granos y el color del micelio es color sepia o café claro. Al partir del raquis de las mazorcas infectadas por *S. macrospora* se observa escasa formación de picnidios y los conidios son alargados, con 2, 3 y hasta 4 células, color sepia o café claro. En condiciones tropicales es frecuente encontrar infección foliar en maíz por *S. macrospora* que forma estrías largas que se pueden confundir con lesiones causadas por *E. turcicum* (Figura 32).

Especies en el género *Stenocarpella* producen potentes micotoxinas, como son diplodiol, diplodiatoxina y chaetoglobocina K (Carvajal y De León, 2015).

Síntomas por *Aspergillus* spp. La infección de mazorcas por especies del género *Aspergillus* es severa presentándose en condiciones de clima cálido y alta humedad relativa. Contrario a lo que se pensaba para infección de granos por

Aspergillus y *Penicillium*, que se consideraban como hongos de almacén, estos dos hongos inician su infección en campo por lo que vienen infectados al almacén y prosperan en esas condiciones, debido a la alta humedad que trae el grano del campo y la alta temperatura que se crea en el almacén.

Las dos especies de *Aspergillus* que se conocen como productoras de potentes micotoxinas incluyen *A. flavus* y *A. parasiticus* (Barry *et al.* 1992; Gorman *et al.*, 1992; Wallin, 1991) (Figura 33). Las toxinas que sintetizan son conocidas como aflatoxinas (A= *Aspergillus* + fla= flavus + toxina) reportadas como metabolitos que bajo luz ultravioleta fluorescen en color azul (B) o verde (G), que se acumulan en productos animales como leche, carne, huevo, etc., que son carcinogénicas en mamíferos e inductoras de daños genéticos en otros animales. De acuerdo con el producto animal en que se encuentran, éstas aflatoxinas se han incluido en grupos B, G, M, P, Q, etc. con al menos 20 aflatoxinas reportadas (Carvajal y De León, 2015).

Síntomas por *Penicillium* spp. Mazorcas y granos infectados especialmente por las especies *P. oxalicum*, *P. glaucum* y *P. chysogenum* se presentan en condiciones



Figura 32. Lesiones foliares causadas por *S. macrospora*.



Figura 33. Infección de mazorca por *A. flavus*.

de clima templado o cálido con alta humedad relativa. Las mazorcas infectadas especialmente por *P. oxalicum*, presentan un desarrollo micelial verdoso en el raquis y entre los granos (Figura 34). Al desgranar la mazorca, el raquis muestra un abundante crecimiento micelial verde oscuro en toda su superficie. Los granos presentan estrías blanquecinas en el pericarpio que les hace perder valor comercial.



Figura 34. Infección de mazorca por *P. ochraceus*

Granos infectados por este hongo producen micotoxinas conocidas como ocratoxinas que causan vómitos y diarrea en animales que consumen grano dañado por el hongo.

Inoculación

Inoculación de *Fusarium* sp. Los conidios de *Fusarium* spp. ($5 \text{ millones mL}^{-1}$) se inyectan en las mazorcas cuando se inicia la aparición de los estigmas. Para estas inoculaciones se usa una jeringa automática (de veterinario) (De León and Pandey, 1989) (Figura 35).

Inoculación de *Stenocarpella* sp. Conidios de *Stenocarpella* (125 000 mL^{-1}) se asperjan en los estigmas aproximadamente 10 días después de polinización (Figura 36).



Figura 35. Inoculación de mazorca con *Fusarium* sp.



Figura 36. Inoculación de mazorca con *Stenocarpela* sp.

Inoculación de *Penicillium* y *Aspergillus* sp. No existen reportes que describan un método eficiente de inocular mazorcas con ninguno de éstos patógenos.

Manejo. Para manejo eficiente de éstas enfermedades en mazorca, se recomienda la selección y uso de variedades en las que las mazorcas queden bien cubiertas por las brácteas y, así, evitar la penetración del inóculo por aperturas en la punta de la mazorca.

A la fecha no se conoce un método eficiente de descontaminación de toxinas producidas por ninguno de los hongos anteriormente descritos (Zuber *et al.*, 1987).

Para la detoxificación de granos dañados por *Aspergillus*, se han reportado varios métodos que eliminan las aflatoxinas, incluyendo tratamiento de los granos con aluminosilicatos de calcio y sodio, carbón activado, talco y otros adsorbentes como amoniaco, pero el tratamiento con éste último va asociado a daño colateral en los granos ya que elimina la aflatoxina pero da al grano un color café y sabor que lo hace indeseable al ganado (Campuzano, 2014). De igual manera, el uso de caolina adsorbe y elimina el efecto tóxico de (Carvajal y De León, 2015; Piñeiro *et al.* 2020).

LITERATURA CITADA

- Alcántara-Mendoza S, Téliz-Ortiz D, De León C, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Anguiano AM, Mejía-Sánchez D y De la Torre-Almaraz R. 2010. Detección y evaluación del fitoplasma Maize Bushy Stunt en el Estado de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1): 34-43. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a4.pdf>
- Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A y Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29(1):39-49. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n1/v29n1a4.pdf>
- Bajet BN, Renfro BL and Valdez CJ. 1994. Control of tar spot of maize and its effect on yield. *International Journal of Pest Management* 40: 121-125. <https://doi.org/10.1080/09670879409371868>
- Barry D, Widstrom NW and Darrah LL. 1992. Maize ear damage by insects in relation to genotype and aflatoxin contamination in preharvest maize grain. *Journal Economic Entomology* 85: 2492-2495. <https://doi.org/10.1093/jee/85.6.2492>
- Bascopé QB. 1977. Agente causal de la llamada "Raza Mesa Central" del achaparramiento del maíz. Tesis Maestría en Ciencias. Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Banttari EE, Zeyen RJ, Gámez R. 1995. Marafiviruses. In: Singh RP, Singh US, Kohmoto K, eds. *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases*. Vol. III. Viruses and Viroids. UK: Pergamon, 51-62.
- Bashan B, Levy RS, Cojocarú M and Levy Y. 1995. Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exserohilum turcicum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47(4): 225-235. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1995.1054>

- Bergquist, R.R. y Masias OR. 1974. Physiologic specialization in *Trichometasphaeria turcica* f. sp. Zeae and *T. turcica* f. sp. *Sorghii* in Hawaii. *Phytopathol.* 64: 645-49.
- Bojanowski J. 1969. Studies of inheritance of reaction to common smut in corn. *Theoretical Applied Genetics* 39: 32-42. <https://doi.org/10.1007/BF00283082>
- Campuzano A. 2014. "Micotoxinas"/uso de sus atrapantes en la alimentación animal. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador. 83 p.
- Carmona M, Reis EM y Gally M. 2006. Pudriciones de tallo y raíces en el cultivo de maíz, *Rev. Maíz en siembra directa.* AAPRESID. p. 86-89.
- Carson ML, and Van Dyke CG. 1994. Effect of light and temperature on expression of partial resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. *Plant Disease* 78: 519-522. <https://doi.org/10.1094/PD-78-0519>.
- Carvajal MM y De León C. 2015. Aflatoxinas, fumonisinas, y otras micotoxinas en maíz. p.126-155. En: Rodríguez RM. y De León C.(Eds.). *El cultivo del maíz: Temas selectos Vol. 2.* Edit. Mundi Prensa. 220 p.
- Ceballos H and Deutsch JA. 1992. Inheritance of resistance to tar spot complex in maize. *Phytopathology* 82: 505-512. <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-505>.
- CGIAR. 2019. Disponible en <https://maize.org/projects-cimmyt-and-iita-2/>
- Chang SC. 1972. Breeding for sugarcane downy mildew resistance to corn in Taiwan. p: 114-115. In: *Proc. 8th InterAsian Corn Improvement Workshop.* New Delhi, India.
- Christensen JJ. 1963. Corn Smut caused by *Ustilago maydis* Cda. *The American Phytopathological Society. Department of Plant Pathology and Botany. Institute of Agriculture, University of Minnesota.* 2:41.
- Cuq F, Petitprez M, Herrmann-Gorline S, Kläbe A, and Rossignol M. 1993. Monocerin in *Exserohilum turcicum* isolates from maize and a study of its phytotoxicity. *Phytochemistry* 34(5): 1265-1270. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)80013-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80013-Q)
- Davis RE. 1973. Occurrence of a Spiroplasma in corn-stunt infected plants in Mexico. *Plant Disease Reporter* 57(4): 333-337.
- De León C. 1983. Conceptos fitopatológicos en el mejoramiento de poblaciones de maíz. In: *Proc. 10th Reunión de Especialistas en maíz en la Zona Andina.* Santa Cruz, Bolivia.
- De León C, Ahuja VP, Capiro RE, and Mukherjee BK. 1993. Genetics of resistance to Philippine downy mildew in three maize populations. *Indian Journal of Genetics and Plant Genetics* 53(4): 406-410. <https://www.isgpb.org/journal/index.php/IJGPB/article/view/2802>
- De León C, and Pandey S. 1989. Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. *Crop Science* 29 12-17. <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900010003x>
- Díaz-Ramírez G, De León-García de Alba C, Nieto-Ángel D and Mendoza-Castillo MC. 2021. Gains in cycles of recurrent selection for grain yield and resistance to head smut in maize. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(1): 61-74. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2008-1>
- Dittrich U, Hock J, and Kranz J. 1991. Germination of *Phyllachora maydis* ascospores and conidia of *Monographella maydis*. *Cryptogamic Botany* 2/3: 214-218.
- Donald G. 2004. *Plagas y enfermedades del maíz.* (3^a ed.). Mundi-Prensa. España.
- Fredericksen RA. 1977. Head smut of corn and sorghum. p. 89-105. In: HD Loden and D. Wilkinson eds. *Proc. 32nd Annual Corn and Sorghum research Conference.* ASTA. Chicago, IL. Washington DC.
- Gastelum RF, Lizárraga-Sánchez GJ, Maldonado-Mendoza IE, Leyva-Madrigal KY, Herrera-Rodríguez G y Espinoza-Matías S. 2018. Confirmación de la identidad de *Exserohilum turcicum* agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36: 468-478. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1803-1>
- Gevers H. O. 1975. A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight of maize. *Plant Dis. Rep.* 59 296-299.
- Gianasi L, Castro HA, de Silva HP (1996) Raças fisiológicas de *Exserohilum turcicum* identificadas em regiões produtoras de milho no Brasil, Safra 93/94. *Summa Phytopathologica* 22:214-217

- Gómez MN, Cañedo JC, Cantú MA y RS. 1993. VS-535, nueva variedad sintética de maíz para regiones cálidas de Guerrero y áreas similares. INIFAP. Folleto Técnico 3. Iguala, Guerrero, México. 12 p.
- González CM, Gómez MN, Pereyda HJ, y Muñiz EJ. 2008. Obtención de híbridos de maíz elotero tolerantes al complejo mancha de asfalto en el estado de Guerrero. INIFAP. Folleto Técnico 17. Iguala, Gro., México. 27 p.
- González FC, Vasal SK, Srinivasan G, and Eaton DL. 1972. Progress from selection for Tarspot resistance in four CIMMYT maize populations. Internatl. Crop Science Congress I. Ames, IO. USA.
- Halisky PM., and Smeltzer DG. 1961. Head smut established in California. Calif. Agric. 15:10-12.
- Hernández-Restrepo M, Madrid W, Tan YP, da Cunha KC, Gené S, Guarro J, and Crous PN. 2018. Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. *Persoonia* 41: 71-108. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.05>.
- Hock J, Kranz J y Renfro BL. 1989. El “complejo mancha de asfalto” de maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7(2): 129-135.
- Kaneko K and Aday BA. 1980. Inheritance of resistance to Philippine downy mildew of maize, *Peronosclerospora philippinensis*. *Crop Science* 20: 590-594. <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.2135/cropsci1980.001183X002000050011x>
- Kealey KS, Kosikowski FV. and Gray WD. 1981. Corn smut as a food source: perspective on biology, composition and nutrition. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15: 321-351. <https://doi.org/10.1080/10408398109527320>
- Hooker AL. 1977. A second major gene locus in corn for chlorotic lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Science* 17(1): 132-135. <https://doi.org/10.2135/cropsci1977.001183X001700010035x>
- Hooker AL. 1978. Genetics of disease resistance in maize. p. 319-332. In: BD Walden, ed. *Maize breeding and genetics*. JWiley and Sons. New York, NY. USA.
- INEGI. 2014. Encuesta nacional agropecuaria. En: inegi.org.mx/programas/ena/doc/ena2014_pres (consultado Ene. 2020).
- Johann H and Holbert JR. 1928. A *Pythium* seedling blight and root rot of dent corn. *Journal Agricultural Research* 37 (8): 443-464.
- Leonard KJ, Levy Y and Smith DR. 1989. Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. *Plant Disease* 73: 776-777.
- Leonard KJ and Suggs EG. 1974. *Setosphaeria prolata*, the ascigerous state of *Exserohilum prolatum*. *Mycologia* 66:281-297.
- Levy Y and Cohen Y. 1983. Biotic and environmental factors affecting infection of sweet corn with *Exserohilum turcicum*. *Phytopathology* 73: 722-725.
- Luttrell ES. 1958. The perfect stage of *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology* 48: 281-287.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985a. Factors affecting the development of head smut caused *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology* 75: 577-581.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985 b. Occurrence of chlorotic spots on corn seedling infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. *Plant Disease* 69: 251-254
- Maublanc A. 1904. Espèces nouvelles de Champignons inferius. *Bulletin Societe Mycologie Francaise* 20: 72.
- Mercado AC, and Lantican JK. 1961. The susceptibility of cytoplasmic male sterile lines of corn to *Helminthosporium maydis* Nisikado & Miv. *Philippine Agriculture* 45: 235-243.
- Muiru WM, Koopmann B, Tiedemann AV, Mutitu EW, and Kimenju JW. 2010. Race typing and evaluation of Aggressiveness of *Exserohilum turcicum* isolates of Kenyan, German and Austrian origin. *World Journal of Agricultural Sciences* 6: 277-284.
- Müller E and Samuels JG. 1984. *Monographella maydis*: sp.nov. and its connection to the tar-spot disease of *Zea mays*. *Nova Hedwigia* 40: 113-121.
- Niks RE and Lindhout WH. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia durable a patógenos especializados. Universidad de Wageningen, Wageningen, Holanda.
- Oerke EC. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Sciences* 144: 31-43.

- Ogliari JB, Guimaraes MA, Geraldi IO and Camargo LEA. 2005. New resistance genes in the *Zea mays* - *Exserohilum turcicum* pathosystem. Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto, v. 28, p. 435-439.
- Pandey S and Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. Advances in Agronomy 28:1-87.
- Parbery DG. 1967. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Nke. Australian Journal of Botany 15: 271-375.
- Pataky JK. 1991. Production of huitlacoche (*Ustilago maydis* (DS) Corda) on sweet corn. HortScience 26: 1374-1377.
- Paulus JM. 1975. Platelet Size in Man. Blood. 46(3): 321-336.
- Pérez-López E, Adame-García J y Luna Rodríguez M. 2017. Conociendo los fitoplasmas, el caso del maíz nativo. Ciencia UALN 20(84). <https://cienciauanl.uanl.mx/?p=7240>
- Piñeiro M, Nagler M, Coker R, Nicolaidis L, Wareing R y Myhara R. 2020. Control de alimentos y los plaguicidas. FAO y OIEA. 35p.
- Programa de Maíz. CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo. 4ª edición. CIMMYT. El Barán, México.119 p.
- Quezada-Salinas A, De León-García de Alba C, Hernández-Anguiano AM, y Nava-Díaz C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zaae* (Kuhn) Langdon & Fullerton. Revista Mexicana de Fitopatología. 31: 80-90.
- Ramírez-Choza JL. 1975. *Dalbulus guevarai* (De L.) nuevo vector del achaparramiento del maíz en México. Incidencia de la enfermedad y su relación con el vector *Dalbulus maidis* (De L. and W.) en Muna, Yucatán, México. Agrociencia 22: 39-49.
- Raymundo AD, Hooker AL. 1981. Mesuring he Relationship Between Northern Corn Leaf Blight and Yield Losses. Plant Disease. 65: 325-327.
- Reyes CP. 1990. El maíz y su cultivo. AGT Editor SA. México. 460 p.
- Robertson AE, Jesse L., Munkvold G, Salaa R.E, and Mueller DS. 2015. Physoderma brown spot and stalk rot of corn caused by *Physoderma maydis* in Iowa. Plant Health Progress. Doi:10.1094/PHP-BR-15-0003.
- Robeson DJ, and Strobel GA. 1982. Monocerin, a phytotoxin from *Exserohilum turcicum* (= *Drechslera turcica*). Agricultural and Biological Chemistry 46: 2681-2683.
- Robbins WA, Warren H.L. 1993. Inheritance of resistance to *Exserohilum turcicum* in PI 209135, 'Mayorbela' variety of maize. Maydica. 38:209-213.
- SAGARPA. 2014. Infectadas 15 mil hectáreas de maíz con tizón norteño en Puebla. Consultado en mayo del 2018. <http://www.milenio.com/estados/infectadas-15-mil-hectareas-maiz-tizon-norteno-puebla>
- SADER 2023. Maíz, cultivo de México. 10 de marzo de 2023. Consultado en noviembre de 2023. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/maiz-cultivo-de-mexico>
- Scott GE, King SB, and Armour JW. 1984. Inheritance of resistance to southern corn rust in maize populations. Crop Science 24: 265-267.
- Shaner GE, and Scott DH. 1998. Stalk rots of corn. Purdue University. West Lafayette, Cooperative Extension Service; 1998. Extension Sheet BP-59. Available from: <http://www.ces.purdue.edu/extmedia/BP/BP-59.pm65.pdf>.
- Thankur RP and Jones KJ. 1989. Characterization of a new race of *Exserohilum turcicum* virulent corn with resistance gene HtN. Plant. Dis.73: 151-55.
- Thompson DL and Bregquist RR. 1984. Inheritance of mature plant resistance to *Helminthosporium maydis* race 0 in maize. Crop Science 24: 807-811.
- Ullstrup AJ. 1977. Diseases of corn. p. 391-500. In: GF Sprage edit. Corn and corn improvement. American Society of Agronomy. Madison, WI.USA.
- Unamuno LM. 1941. Notas micológicas XIV. Contribución al estudio de los Uredinales y Ustilaginales de la flora española. Boletín Soc. Española de Historia Natural 38: 19-36.
- Valverde ME, Paredes-López O, Pataky JK and Guevara-Lara F. 1995. Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source. Biology, composition, and production. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 35: 191-229.

- Vanderplank JE. 2012. Disease resistance in plants. Academic Press. Elsevier.
- Wallin JR, Widstrom NW, and Fortnum WA. 1992. Maize population with resistance to field contamination by aflatoxin B-1. *Journal Scientific Food and Agriculture* 54: 235-238.
- Wang H, Li H, Zhu Z, and Wang X. 2010. Expression of Ht2-related genes in response to the HTToxin of *Exserohilum turcicum* in maize. *Annals of applied biology* 156: 111-120.
- Wellman FL, 1972. Tropical Am (neotropical phytopathology problems). The Scarecrow Press. NJ, USA.
- White DG (edit).1999. Compendium of corn diseases. 1999. 3rd ed. APS Press. 78 p.
- Zehner, M.G., Humphrey, H.B. 1929. Smuts and rusts produced in cereals by hypodermic injection of inoculum. *J. Agri. Res.* 38(11), 623-627.
- Zhang LH, Dong JG, Wang CH, and Li ZP. 2007. Purification and structural analysis of a selective toxin fraction produced by the plant pathogen *Setosphaeria turcica*. *Agricultural Sciences in China* 6: 452-457.
- Zuber MS, Lillehoj EB and Renfro BL. (edits). 1987. Aflatoxin in Maize: A proceedings of the Workshop. CIMMYT, El Batán. México. April 7-11, 1986. 389 p.



1.2. El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas

Hadassa Yuef Martínez Padrón, Sanjuana Hernández Delgado, Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, CP 88710, México; César Augusto Reyes Méndez y Gricelda Vázquez Carrillo, Campos Experimentales Río Bravo y Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). *Autor de correspondencia: hadassayuf@gmail.com

Resumen

El maíz es el cultivo más importante de México de acuerdo con la superficie cultivada anualmente y su consumo per cápita. Las pérdidas en la producción del grano se asocian con su manipulación durante la cosecha en el campo, almacenaje, transporte y procesamiento para el consumo humano o animal. El grano de maíz posee una microbiota particular de bacterias, insectos y hongos que pueden causarle daños. Entre ellos, el género fúngico *Aspergillus* y, de éste, las especies *A. flavus* y *A. parasiticus* son las más importantes porque producen aflatoxinas que provocan gran variedad de efectos tóxicos en seres vivos expuestos al grano contaminado. Actualmente, las regulaciones mexicanas establecen límites permisibles sólo para aflatoxinas en cereales y sus productos, excluyendo otras micotoxinas. Las condiciones de producción de maíz en climas tropicales y subtropicales, particularmente en el noreste de México, favorecen las infecciones por hongos toxígenos. Por ello, es necesario la identificación e implementación de estrategias que reduzcan la contaminación en el grano. Entre ellas, destacan el uso de híbridos de maíz con resistencia a sequía, plagas, enfermedades y altos rendimientos de grano (H-436, 437, 439, 443A); manejo integrado de insectos y hongos mediante tratamiento químico, cultural o biológico y la modificación del procesamiento del grano para consumo humano (nixtamalización). Dichas medidas, individualmente o en conjunto, reducirán paulatinamente los daños causados por hongos potencialmente toxígenos en la planta de maíz y el consumidor final en México. En este trabajo presentamos una perspectiva de la investigación actual en el tema de los hongos aflatoxigénicos en maíz con énfasis en México, sus implicaciones en salud humana y del ganado, las herramientas (fitopatológicas, genéticas del

hospedante y el patógeno, bioquímicas, entre otras) de estudio del problema, así como las estrategias de manejo integrado utilizadas, para actualizar y ponderar la información generada a la fecha, y establecer puntos esenciales para futuras investigaciones.

Palabras clave: Aflatoxinas, Estrategias de Manejo Integrado, Hongos Aflatoxigénicos, *Zea mays*.

El maíz (*Zea mays*) es una planta nativa de México que actualmente se destina para la alimentación humana y del ganado, además de su aprovechamiento industrial. El consumo per cápita de maíz es de aproximadamente 160 g por día en forma de tortillas, principalmente (ASERCA, 2012). En el 2012 se produjeron en México más de 22 millones de toneladas de maíz (SIAP, 2014). Sin embargo, los volúmenes y la calidad de la producción de maíz en nuestro país son limitados debido principalmente a la incidencia de plagas y enfermedades, y por factores abióticos como altas y bajas temperaturas, la salinidad de los suelos, la deficiencia de nutrimentos en los suelos y la sequía (Moreno y González, 2011).

Los hongos que comúnmente atacan al maíz tanto en campo como en almacén pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*; estos organismos son productores potenciales de micotoxinas (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). El crecimiento de *Aspergillus* y la contaminación de los productos alimenticios con aflatoxinas son consecuencia de la interacción entre el hongo, el hospedero y el ambiente. La interacción de dichos factores determina la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y la cantidad de las aflatoxinas producidas (García y Heredia, 2006).

La producción de aflatoxinas es favorecida tanto por factores que ocurren en campo como en almacén (Devreese *et al.*, 2013). En campo, la producción de aflatoxinas se incrementa con el estrés hídrico, las altas temperaturas y los daños a la planta hospedante producidos por insectos de la mazorca pertenecientes a los géneros *Heliothis* y *Spodoptera* (Rodríguez *et al.*, 2010; Kebede *et al.*, 2012). Aunado a lo anterior, la incidencia de aflatoxinas se ve favorecida por el ataque de plagas insectiles que se desarrollan bajo condiciones específicas como la fecha de siembra, altas densidades de siembra y alta incidencia de malezas (Rodríguez, 1996). En almacén, las condiciones de alta temperatura y

humedad, aireación e inóculo primario proveniente del campo también son determinantes en el incremento de la síntesis de aflatoxinas en el grano de maíz (Hernández *et al.*, 2007).

En este trabajo se presenta una revisión respecto al estudio de la contaminación con aflatoxinas en el cultivo de maíz, sus implicaciones en salud humana y animal, estrategias de control y de manejo integrado, con el objetivo de actualizar y ponderar la información generada a la fecha, que marque la pauta en la búsqueda de soluciones para disminuir la incidencia y prevalencia de las aflatoxinas en dicho cultivo particularmente para el caso de México, donde el cultivo del maíz es de importancia capital desde los puntos de vista ecológico, económico, social y cultural.

Aspergillus **sección Flavi.** La mayoría de las especies del género *Aspergillus* son hongos filamentosos saprófitos que desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente; se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas. Para su crecimiento, *Aspergillus* requiere de una humedad relativa entre el 70 y 90 %, contenido de agua en la semilla entre 15 y 20 % y un rango de temperatura amplio (0 a 45 °C) (Klich, 2002).

Una de las particularidades de las especies de *Aspergillus* es su capacidad para producir micotoxinas, en este caso, aflatoxinas (AF). La estructura básica de las aflatoxinas consiste en un anillo dihidro-difurano o tetrahidro-difurano unido a una cumarina con un anillo de cinco o seis átomos de carbono. Las difuranocumarinas ciclopentanonas de AF de las series B, M, P y Q son las AFB₁, AFB₂, AFB_{2a}, AFM₁, AFM₂, AFM_{2a}, AFQ₁, AFP₁ y AFL. El segundo subgrupo corresponde a las lactonas difuranocumarinas de la serie G como son AFG₁, AFG₂, AFG_{2a}. Hay alrededor de 20 diferentes tipos de AF, las más importantes por su alto potencial cancerígeno, mutágeno y teratógeno son: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁), M₂ (AFM₂), P₁ (AFP₁), Q₁ (AFQ₁) y D (AFD), éste último derivado del tratamiento de la AFB₁ con amonio. Otro metabolito muy tóxico de la AFB₁ es el aflatoxicol (AFL). Sólo las AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂ se sintetizan naturalmente de la AFB₁; las otras AF (M₁, M₂, P₁, Q₁, G_{2a}, B_{2a} y AFL) son hidroxilados producto del metabolismo animal o microbiano. La AFB₁ es la más peligrosa y

tóxica de todas (Carvajal, 2013) y es producida por *A. flavus* y *A. parasiticus*. Las aflatoxinas G_1 y G_2 se producen por *A. parasiticus* y *A. nomius*, exclusivamente; aunque Novas y Cabral (2002) reportaron la producción de AFG1 en algunas cepas Africanas y Argentinas de *A. flavus* var. *parvisclerotigenus*. Las especies *A. flavus*, *A. pseudotamarii* y algunas cepas de *A. caelatus* producen AFB₁ y AFB₂ (Peterson *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). AFB₂ y AFG₂ son inactivas biológicamente, pero se activan *in vivo* por oxidación a AFB₁ y AFG₁. Las aflatoxinas M₁ y M₂ son formas hidroxiladas de AFB₁ y AFB₂ respectivamente; mientras que AFB_{2a} y AFG_{2a} son productos 8- y 9-hidratados de B₁ y G_{1,4} (Moudgil *et al.*, 2013). La AFB₁ exhibe toxicidad aguda, seguida de AFB₂, AFG1 y AFG₂ (Madrigal *et al.*, 2011; Mejía *et al.*, 2011). Algunos precursores de aflatoxinas son hidroxiantraquinonas tales como el ácido norsolorínico, averufina, versicolorina A y averantina (Moudgil *et al.*, 2013).

Cabe notar que la capacidad de síntesis de aflatoxinas es característica de la cepa, no de la especie. Otra toxina producida por *A. flavus* es el ácido ciclopiazónico, que no ha aflatoxinas (Abbas *et al.*, 2011a). Hongos del género *Aspergillus* también inhiben la germinación de la semilla y producen cambios de color, temperatura (calentamiento), enmohecimiento, ‘apelmazamiento’ y pudrición. En contraste, especies como *A. niger* y *A. oryzae* son de interés industrial y se utilizan en la fermentación de alimentos (Kozakiewicz, 1989; Klich, 2002).

La especie productora de aflatoxinas que causa mayores contaminaciones es *A. flavus*, dentro de la cual se han definido dos morfotipos, denominados L y S. Cotty (1989) indicó que los aislamientos L no producen o producen pocos esclerocios mayores a 400 μm y grandes cantidades de conidios; por su parte las cepas S producen numerosos esclerocios con un diámetro menor a 400 μm y pocos conidios. La producción de aflatoxinas en aislamientos L es muy variable con algunos aislamientos altamente toxígenos y otros atoxigénicos, mientras que los aislamientos S producen altas y consistentes concentraciones de aflatoxinas (hasta 10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Probst *et al.*, 2010). En Kenia se reportó recientemente alta incidencia del morfotipo S ocasionando problemas de alta incidencia de aflatoxinas G en maíz cultivado en dicho país. Sin embargo, el análisis filogenético de cepas Africanas (Kenia, Nigeria), así como de América (EUA, Argentina), Australia y Asia (Filipinas, Tailandia) indicó que las cepas Africanas son genéticamente más cercanas a la nueva

especie nombrada como *A. minisclerotigenes* en comparación con cepas de *A. flavus* y, además, producen exclusivamente aflatoxinas B debido a la ocurrencia de una delección en el gen *crypA* (Probst *et al.*, 2012).

En 2005 se liberó la secuencia del genoma de *A. flavus* por el Instituto de Investigación Genómica de Estados Unidos y en 2010 se actualizó dicha secuencia (Cleveland *et al.*, 2009; Payne y Yu, 2010). Posteriormente, se generaron 7218 etiquetas de secuencia expresada (ESTs) únicas de *A. flavus*. El tamaño del genoma de *A. flavus* y de *A. oryzae* es de cerca de 37 Mb distribuidos en ocho cromosomas y que codifican para más de 12 mil genes funcionales (Chang y Ehrlich, 2010; Payne y Yu, 2010). El genoma de *A. flavus* es ligeramente mayor que el de *A. fumigatus* (aproximadamente 30 Mb), *A. terreus* (30 Mb), *A. niger* (34 Mb) y *A. nidulans* (31 Mb). A pesar de esta variación en los tamaños de los genomas, todas las especies de *Aspergillus* tienen ocho cromosomas. Un aspecto importante es que *A. flavus* y *A. oryzae* tienen copias extra de genes específicos al linaje. Esas extracopias se localizan por lo general en bloques no sinténicos. Aunque no se han secuenciado sus genomas, con base en estudios cariotípicos se ha sugerido similitud en el tamaño del genoma de *A. parasiticus* y *A. sojae* con respecto a *A. flavus* (Amaiike y Keller, 2011).

Producción de aflatoxinas. A pesar de que México es el centro de origen y de diversidad del maíz (Ortega, 2003), dicha diversidad no se ha analizado exhaustiva o consistentemente para identificar genotipos más tolerantes a la contaminación por aflatoxinas. Dado que el maíz es un alimento de importancia mundial, es necesario el monitoreo de la calidad sanitaria, desde el uso de semillas libres de patógenos durante cada una de las etapas del cultivo, hasta la cosecha, e incluso, durante la pos-cosecha (Plasencia, 2004). Es importante señalar que en México la mayor proporción del maíz se cultiva en condiciones de temporal (60 %) (SIAP, 2014) que, en general, es deficiente y errático y que frecuentemente redundante en la coincidencia de estrés hídrico y altas temperaturas durante la fase fenológica reproductiva, lo que finalmente favorece la infección de *Aspergillus* en campo (Rodríguez, 1996; Cotty y Jaime-García, 2007).

El efecto toxígeno de las aflatoxinas producidas por *Aspergillus* varía desde los carcinogénicos, teratogénicos o mutagénicos hasta la producción de desórdenes hormonales o inmunosupresores; lo que a su vez depende de la aflatoxina, dosis, tiempo de exposición u organismo expuesto (Carvajal, 2013). El pro-

blema principal reside en que las aflatoxinas son acumulativas de modo que una vez que contaminan el grano o el producto agrícola en campo o almacén persisten a la digestión, al calor de la cocción o al congelamiento. Las aflatoxinas son ingeridas por los seres humanos no sólo a través de granos, semillas o frutos; también se presentan en la leche o la carne de animales criados con alimentos contaminados (Requena *et al.*, 2005).

En México la mayoría de los estudios se han limitado a registrar la incidencia de *Aspergillus* y la cuantificación de las aflatoxinas, así como la identificación a nivel de género de los hongos presentes en el grano de maíz (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009). Particularmente en el norte del estado de Tamaulipas, una de las zonas maiceras más importantes de México, se llegaron a cultivar más de 230 mil ha al año y en la última década en promedio se siembran anualmente unas 100 mil ha con maíz (Reyes y Cantú, 2006). En esa región, la incidencia de *Aspergillus* es frecuente y en ocasiones de tal intensidad que ha llevado a replantear la tecnología del cultivo del maíz en la región basada en el desarrollo o la adecuación de estrategias para su manejo (Reyes y Cantú, 2006; Díaz-Franco y Montes-García, 2008). El género *Aspergillus* ocurre con mayor frecuencia en maíz almacenado para consumo, mientras que en campo la mayor incidencia la presenta *Fusarium* (Hernández *et al.*, 2007). Por su parte, Montes *et al.* (2009) identificaron a *A. flavus* y *A. niger* en híbridos con grano blanco o amarillo, donde éstos últimos exhibieron mayores porcentajes de infección. Alvarado *et al.* (2010) detectaron alta concentración de aflatoxinas en siembras con una alta densidad de población de maíz (siembra en camas y concentraciones de 20.8 µg/kg); sin embargo, el riego por goteo redujo casi a la mitad las infecciones por *A. flavus* (concentraciones de aflatoxinas de 11.1 µg/kg). En la ciudad de Monterrey se analizaron muestras de maíz tomadas de diferentes puntos de distribución y se detectó a AFB₁ en un rango de 5.03 a 465.31 ng/g y AFG₁ en concentraciones de 1.59 a 57.1 ng/g. De las 41 muestras analizadas, 87.8 % estaban contaminadas con aflatoxinas y 58.5 % contenía niveles por encima de los límites legales permitidos en México (Torres *et al.*, 1995). Por su parte, Bucio *et al.* (2001) analizaron maíz almacenado en Guanajuato y concluyeron que la contaminación por aflatoxinas no se asocia con las condiciones del cultivo sino con las condiciones inadecuadas de almacenamiento del grano. En el estado de Sonora, México, de 66 muestras de maíz almacenadas siete registraron concentraciones de AFB₁ menores a las permitidas la NOM 247-SSA1-2008 (Ochoa *et al.*, 1989) y en 111 muestras de ‘pozol’ de mercados locales de Chiapas se detectaron 19 muestras con AFB₂

con niveles de 0.5 a 21µg/kg, así como trazas de AFB₁ (Méndez *et al.*, 2004). A pesar de la consistencia en la detección de aflatoxinas en muestras vegetales o semi-procesadas de maíz, las concentraciones son variables dependiendo del origen de la muestra, condiciones de almacenamiento o ambientales, germoplasma, etc. (Jaime-García y Cotty, 2010). No obstante, no se puede soslayar que la acumulación de aflatoxinas y sus efectos nocivos en el consumidor final permanecen latentes (Carvajal, 2013).

Modos de acción de las aflatoxinas. Biológicamente, las aflatoxinas se comportan como inmunosupresores que inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica e interrumpen la formación del DNA, RNA y las proteínas en el ribosoma (Carvajal, 2013). Por tal razón, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, IARC (2013) por sus siglas en inglés, en 1988 clasificó a las aflatoxinas en el grupo 1 de micotoxinas que incluye sustancias o mezclas de ellas con alto poder cancerígeno en humanos.

Cuando se ingiere un alimento contaminado con aflatoxina B₁, ésta primero se absorbe en el intestino delgado y luego es transportada en la sangre, donde los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas la conducen hacia el hígado. En las células hepáticas la toxina se metaboliza en el retículo endoplasmático para transformarse en las aflatoxinas P₁, M₁, Q₁ debido a que la molécula se hidroxila. En dicha reacción se forma paralelamente la toxina B1-8,9- epóxido que puede detoxificarse por una transferasa formando un conjugado con el glutatión en su forma tiólica (GSH). Las aflatoxinas son mutagénicas debido a que su estructura es afín a los ácidos nucleicos y proteínas y se une a ellos mediante enlaces covalentes. Estos enlaces ocasionan interrupciones en la transcripción y traducción y generan la formación de un aducto de DNA llamado aflatoxina B1-guanina y peroxidación de lípidos. Por tal razón las aflatoxinas, a nivel celular, ocasionan la inhibición del DNA, RNA, mitosis, alteraciones cromosómicas, que a su vez redundan en efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos (Carvajal, 2013; Moudgil *et al.*, 2013).

Las aflatoxinas se sintetizan por la ruta metabólica de los policétidos mediante reacciones de condensación, oxidación, reducción, alquilación y halogenación, que permiten formar una molécula que consiste en un anillo cumarín unido a una unidad bis-dihidrofurano y a una ciclopentanona (Guzmán-de Peña, 2007; Carvajal, 2013). Guzmán-de Peña (2007) señala que las aflatoxinas se forman por la condensación de la acetil-coenzima A y la

malonil-coenzima A, produciendo la acetil-S coenzima A, molécula iniciadora de la AFB₁. Dentro de la ruta biosintética, la formación de la versicolorina A es particularmente relevante, ya que es la primera molécula en la vía de la AFB₁ y que contiene un doble enlace en la posición 8,9 de la molécula del bis-furano. Este doble enlace es el blanco para la activación de una molécula altamente reactiva. Durante la síntesis ocurren al menos 23 reacciones enzimáticas y 15 intermediarios. A nivel molecular se ven involucrados 25 genes en los pasos de inter conversión, los cuales han sido secuenciados, confirmados por disrupción génica y por estudios enzimáticos y están agrupados en una región del DNA de 70 kb.

A nivel molecular, más de 25 genes conglomerados en una región de 70 kb codifican las enzimas y proteínas reguladoras de la síntesis de aflatoxinas en *A. flavus* y *A. parasiticus*. Entre ellos, los genes *hexA*, *hexB* y *pksA* son mayores a 5 kb y codifican la subunidad alfa de la sintasa de ácidos grasos (de 5.8 kb); la subunidad beta de la misma sintasa (de 5.1kb) y la sintasa de poliquétidos (de 6.6 kb), respectivamente. Por su parte, los 22 genes involucrados tienen un tamaño promedio de 2 kb. Una región de aproximadamente 2 kb sin marco de lectura abierto identificable presumiblemente determina el inicio del conglomerado de genes (Ehrlich *et al.*, 2005; Amare y Keller, 2014).

La biosíntesis de las aflatoxinas es afectada por factores genéticos y ambientales. El gen *aflR* es positivamente regulado y codifica una proteína acoplada a DNA con secuencia específica de ‘dedos de zinc’; dicho gen es requerido para la transcripción de la mayoría de los genes estructurales de aflatoxinas (Bhatnagar *et al.*, 2006). Luego, el gen regulador *aflJ* (o *aflS*), adyacente a *aflR*, se asocia con la expresión de *pksA*, *nor1*, *ver1* y *omtA* (Chang, 2003; Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna y Payne, 2009; Yu *et al.*, 2009; Amare y Keller, 2014). Adicionalmente, la ubicación en el cromosoma y algunos factores de transcripción global mediados por nitrógeno, carbono o regulados por pH también afectan la expresión de los genes estructurales de aflatoxinas. Las fuentes de nitrógeno y carbono, el pH, la temperatura, la disponibilidad y actividad del agua y metabolitos de las plantas afectan la síntesis de aflatoxinas (Bhatnagar *et al.*, 2006) y están directamente asociadas en las rutas metabólicas correspondientes, pues cuando el hongo se sujeta a condiciones de estrés por calor o humedad, las aflatoxinas se sintetizan pero en cantidades mínimas; bajo combinaciones favorables de ambos factores ambientales se incrementa la síntesis y los perfiles de expresión de los genes directamente asociados a dicha síntesis, dado que la

relación de expresión entre *aflR/aflJ* se correlaciona con el incremento en la biosíntesis de las aflatoxinas (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009).

Recientes estudios con microarreglos revelan que el genoma de *A. flavus* contiene 56 conglomerados metabólicos secundarios (Georgianna *et al.*, 2010), además del conglomerado de ácido kójico (Marui *et al.*, 2011). Estudios bioinformáticos basados en el algoritmo para la detección *de novo* de motivos independientes (MIDDAS- M) permitieron identificar conglomerados adicionales a los reportados por Georgianna *et al.* (2010) (Umemura *et al.*, 2013). Del total de conglomerados, cuyo número completo aún se desconoce, al menos ocho se han caracterizado parcial o completamente, tales como el de los genes de biosíntesis de aflatoxinas, que se localiza entre los conglomerados de genes de utilización de azúcares y del ácido ciclopiazónico (Amare y Keller, 2014).

Por otra parte, la pérdida de toxicidad se basa en la presencia de mutaciones puntuales o deleciones en el conglomerado de genes descrito (Chang *et al.*, 2005). Por ejemplo, la cepa atoxigénica AF36 muestra un reemplazo de G por A en el sitio nt591 del gen de sintasa de poliquétido, introduciendo un codón de terminación en la posición 176 del gen, deteniendo la síntesis enzimática y acumulación de aflatoxinas (Ehrlich y Cotty, 2004). A su vez, la cepa NRRL21882 presenta una deleción en el conglomerado de genes completo desde la región codificadora de *hexA* en el grupo de genes de utilización de azúcares a la región telomérica (Chang *et al.*, 2005). Finalmente, Criseo *et al.* (2008) observaron cepas de *A. flavus* no toxigénicas con todo el grupo de genes que presentan las cepas toxigénicas. En este caso, la atoxigenicidad se explicó debido a defectos a nivel molecular como modificaciones post-transcripcionales o proteínicas, aunque aún no se tienen los elementos completos al respecto.

Las aflatoxinas exhiben baja solubilidad en agua, pero son solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metano, acetonitrilo o acetona, debido a que los cristales de aflatoxinas no tienen las mismas propiedades de la aflatoxinas naturales. Además, son relativamente inestables a la luz y al aire en estado puro y susceptibles a la hidrólisis alcalina; son afectadas por amoníaco o hipoclorito de sodio (pH>10.5); termo-resistentes y estables en un rango de pH entre 3 y 10; inodoras, incoloras e insípidas; así como químicamente, estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales y de difícil eliminación una vez que se producen (Guzmán-De Peña, 2007; Carvajal, 2013).

Implicaciones en salud humana y animal. Las aflatoxinas se encuentran principalmente en productos agrícolas como las materias primas para la preparación de alimentos balanceados para ganado en forma de contaminantes o bien, como residuos tóxicos de los productos de dicha explotación zootécnica como la leche, huevo o carne (Requena *et al.*, 2005).

La incidencia de las aflatoxinas en alimentos para humanos y para ganado se ha estudiado en diversos países (Robledo *et al.*, 2001; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; Hong y Yusof, 2010; Nazari *et al.*, 2013; Stojanovska-Dimzoska *et al.*, 2013) y, en general, se asocian con el desarrollo de cáncer de hígado y de pulmón en humanos (Liu y Wu, 2010; Wild y Gong, 2010; Carvajal, 2013; Aliabadi *et al.*, 2013; Magnussen y Parsi, 2013; Moudgil *et al.*, 2013). Liu y Wu (2010) analizaron entre 550 y 600 mil casos a nivel mundial de pacientes con cáncer de hígado principalmente reportados en África sub-Sahariana, Sureste Asiático y China, determinaron que entre 4.6 y 28.2 % de dichos casos se asocian directamente con la sobre-exposición a las aflatoxinas (25-155 mil casos). En México, la investigación de las implicaciones y efectos de las aflatoxinas cobró mayor importancia a partir de la década de 1990 debido a que el consumo de alimentos contaminados con AFM₁ por animales productores de leche representa un riesgo potencial a la salud pública, particularmente en la población infantil. En 40 hatos lecheros del estado de Jalisco se detectaron 92 % de raciones alimenticias contaminadas con aflatoxinas totales (entre 4.82 y 24.89 µg/kg) y el 80 % de leche cruda producida por los mismos estaban contaminados con aflatoxina M₁ (de 0.006 a 0.065 µg/L de leche) (Reyes *et al.*, 2009). En 35 muestras de alimento para perros y gatos de 12 marcas diferentes en México se detectaron siete aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ y P₁) con concentraciones altas en dos muestras (72.4 y 597 µg/kg de alimento). La aflatoxina B₁ se encontró en 100 % de las muestras de alimento para gatos y 79 % para perros. Las muestras con mayor cantidad de AFB₁ y AFM₁ utilizaban maíz como principal ingrediente en la formulación (Sharma y Márquez, 2001).

La asociación de las mutaciones en el codón 249 del gen *p53* (Moudgil *et al.*, 2013) se evaluó en células de carcinomas hepáticos humanos de pacientes en Monterrey, México, detectándose los antígenos de hepatitis B y/o C y la mutación, en 3 de 16 casos, del gen *p53* y concentraciones de 0.54 a 4.64 pmol de AFB₁-lisina/mg de albúmina. Los antígenos para el virus de la hepatitis B y/o C fueron positivos en 12 de 20 casos. En estas condiciones aún las concentra-

ciones relativamente bajas de AFB₁ pueden resultar en una situación de alto riesgo dada la exposición diaria (Soini *et al.*, 1996). Resultados semejantes a nivel molecular se reportan en pacientes de Senegal (Coursaget *et al.*, 1993), Estados Unidos, Tailandia y China (Aguilar *et al.*, 1994) y China (Jackson *et al.*, 2003). Carvajal *et al.* (2012) comprobaron la asociación de las aflatoxinas con el VPH (virus del papiloma humano) de los tipos 16 y 18 en cáncer cérvico-uterino; además verificaron la presencia de tumores cancerígenos (hígado, colon, pulmón y páncreas) y la orina de enfermos con cirrosis viral, hepatitis B y C y concluyeron que las aflatoxinas actúan como cofactores que potencian la incidencia de enfermedades en los organismos.

Regulaciones sanitarias. En México se han desarrollado normatividades para regular la incidencia de aflatoxinas en cereales. En 2008 se emitió la Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008 que indica que el límite máximo permisible de aflatoxinas en cereales es de 20 µg/kg tanto para el consumo humano como de animales; además, aporta información relativa a las especificaciones sanitarias de transporte y almacenamiento de cereales e indica que el límite máximo de aflatoxinas en harina de maíz nixtamalizado y masa para tortillas es de 12 µg/kg (NOM- 247-SSA1-2008). Sin embargo, es notable observar que no existe una regulación similar a la de las aflatoxinas para otras micotoxinas comúnmente presentes en productos agrícolas tales como las fumonisinas y las ocratoxinas (Li *et al.*, 2011); así como para aflatoxinas específicas como la B₁, la más tóxica, o la M₁ en productos lácteos. Esto indica que es indispensable la implementación de estudios para generar conocimiento relativo a estas micotoxinas para así desarrollar y validar nuevas medidas para el manejo de las mismas, además de la legislación reguladora pertinente. A la fecha se han establecido los límites de aflatoxinas permisibles en los países importadores y exportadores de productos agropecuarios en el mundo. Por ejemplo, en Estados Unidos de América se permiten 20 µg/kg en alimentos, 0.5 µg/kg de aflatoxina M₁ en leche (FDA-USA, 2012); en la Unión Europea, sólo se permiten máximo 20 µg/kg de aflatoxina B₁ (UE-EFSA, 2002). El Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (2012) indica que sólo deben permitirse hasta 5 µg/kg de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y/o G₂ en alimentos y hasta 0.05 µg/kg de M₁ en leche.

Estrategias de manejo integrado. En la actualidad son escasos, particularmente en México, los programas que incluyan un manejo integral para la disminución de las aflatoxinas y de los hongos productores de las mismas. En el estado

de Tamaulipas se tomaron medidas para el control de la contaminación por aflatoxinas a partir de las fuertes contaminaciones en el grano (alrededor del 90 %) y los altos niveles de aflatoxinas (concentraciones entre 63 y 167 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Moreno y Gil, 1991; Carvajal y Arroyo, 1997) ocurridas en el maíz cultivado en la región durante 1989 y 1990; lo que se asoció con la presencia de temperaturas altas y el ataque severo de plagas en la etapa reproductiva del cultivo, así como factores favorecedores del drástico incremento de la contaminación del grano en los almacenes regionales (alta humedad y temperatura).

En el caso del campo, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) desarrolló un paquete tecnológico para el cultivo del maíz en la región norte de Tamaulipas. Estas medidas incluyen la fecha de siembra temprana, la densidad adecuada de siembra, una adecuada irrigación (tres riegos de auxilio) y el monitoreo estricto de insectos plaga favorecedores de la infección por hongos aflatoxigénicos en la mazorca (Rodríguez *et al.*, 1995; Reyes y Cantú, 2006; Cantú-Almaguer *et al.*, 2010). Para 1991 el grano contaminado se redujo al 20 % como resultado del desarrollo y aplicación del paquete tecnológico. Adicionalmente, el INIFAP liberó en 1992 el híbrido HV-1, un maíz con grano blanco semi-dentado tolerante a condiciones de siembra en suelos de segunda clase (Reyes y Cantú, 2003; 2004). Por su parte, Martínez *et al.* (2003) reportaron que las concentraciones de aflatoxinas en más del 70 % de los maíces cultivados o almacenados en los municipios Tamaulipecos de Camargo, Gustavo Díaz Ordaz, Matamoros, Reynosa, Río Bravo, San Fernando y Valle Hermoso en 1998 exhibieron valores mayores a los máximos aceptados por las normas nacionales y de otros países para la comercialización del grano, desde 20 hasta 233 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Posteriormente, y en respuesta al problema de la poca disponibilidad de agua para riego, el programa de mejoramiento genético del INIFAP orientó la investigación a la formulación de maíces tolerantes a las altas temperaturas y sequía. En 2003 se liberaron los híbridos trilineales H-437 y H-439, mismos que produjeron en promedio 3.7 toneladas por hectárea (Reyes y Cantú, 2003, 2004). Los híbridos H-436 y H-437 tuvieron los menores porcentajes de contaminación por hongos de los géneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. (Hernández *et al.*, 2007); por su parte, en el híbrido de grano amarillo H-443A se detectó 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxinas mientras que siete híbridos de grano amarillo ampliamente sembrados en el norte de Tamaulipas presentaron de 36 a 218 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en la semilla (Reyes *et al.*, 2009).

De once genotipos de maíz comúnmente cultivados en México, Popcorn, C-526, Garst 8366, AS910 y 30G40 fueron resistentes a la colonización por *A. flavus* y la acumulación de aflatoxinas; mientras que fueron susceptibles los híbridos 3002W, 30R39, Creole, C-922, HV313 y P3028W. Las concentraciones mayores correspondieron a AFB₁ (26.1 mg/kg ± 14.7), mientras que AFB₂, AFG₁ and AFG₂ presentaron concentraciones residuales. Los resultados indican que hay respuesta diferenciada a la infección y acumulación de aflatoxinas y hace necesario el desarrollo de germoplasma resistente a este problema fitosanitario (De Luna-López *et al.*, 2013).

Lo anterior ofrece una perspectiva de la recurrente gravedad de la incidencia de hongos aflatoxigénicos en la región norte de Tamaulipas y fronteriza con EUA desde fines del siglo XX. También, hace notar el hecho que los relativos éxitos en el control del hongo y de sus aflatoxinas no se han obtenido directamente, sino que, indirectamente y a través de la liberación de germoplasma con resistencias individuales o combinadas a factores favorecedores de la infección (plagas, sequía) se logran reducciones significativas. Este punto es de importancia: debe proponerse la estandarización de técnicas de evaluación y selección de germoplasma promisorio que conlleve el desarrollo de programas de mejoramiento genético enfocados en la evaluación, selección, cruzamiento y liberación de germoplasma resistente al patógeno y sus metabolitos. De igual forma, debe ponerse atención, a la par del mejoramiento como tal, en el mapeo de genes de resistencia y generación de mapas de ligamiento que faciliten la selección de progenitores y los programas de hibridación (Cary *et al.*, 2011). De igual forma, las condiciones climáticas en campo y almacén también motivan cambios en las estrategias, así como la aparición de nuevas cepas toxigénicas en las regiones maiceras y que afectan la estructura genética de las comunidades de *Aspergillus* (Cotty y Jaime-García, 2007; Jaime-García y Cotty, 2010). Ello motiva a la constante modificación del patrón de cultivos en la región como medida urgente y radical para reducir la incidencia de dichos hongos, así como la constante búsqueda y definición de nuevas estrategias de manejo integrado del problema (Jaime-García y Cotty, 2010).

Medidas de control en campo y almacén. El control de *Aspergillus* o sus toxinas en la planta de maíz ha consistido en la utilización de productos químicos para su erradicación. Sin embargo, esta estrategia es relativamente costosa. Los insectos que podrían actuar como vectores al facilitar la entrada de conidios dentro de la mazorca han generado resistencia a los insecticidas. Aunado

a lo anterior existen restricciones en el uso de plaguicidas dadas las regulaciones ambientales. En México se han identificado algunos coleópteros presentes en maíz como *Carpophilus fremani*, *Carthartus quadricollis* y *Sitophilus zeamais*; de ellos, *Sitophilus* se asocia con 90 % de las infecciones por *A. flavus* en campo (García *et al.*, 2003). En cuanto al control biológico se ha comprobado la reducción del crecimiento o de la producción de aflatoxinas o incluso la modificación de las estructuras de las aflatoxinas debido a la acción de bacterias y hongos tales como *A. niger*, *Rhodococcus corynebacterioides* (*Nocardia corynebacterioides*), *Candida parapsilosis*, *Myxococcus fulvus*, *Mucor ambiguus* y *Trichoderma viride*. No obstante, la mayoría de esos estudios se ha realizado en condiciones de laboratorio (Suárez *et al.*, 2007; Tejada-Castañeda *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Aliabadi *et al.*, 2013; Devreese *et al.*, 2013). Las bacterias del género *Bacillus* muestran actividad anti-fúngica contra *A. flavus* (Moyne *et al.*, 2001; Taylor y Draughon, 2001). Palumbo *et al.* (2006) informaron que *Bacillus* ofrece un efectivo antagonista al crecimiento de *A. flavus* en almendras. Por su parte, Gao *et al.* (2011) observaron que una cepa de *B. subtilis* obtenida de intestinos de peces fue capaz de detoxificar las toxinas y de degradar las aflatoxinas B₁, M₁ y G₁ en un 80, 60 y 80 %, respectivamente. Entre los mecanismos utilizados por los microorganismos antes señalados para reducir el crecimiento de *Aspergillus* o la producción de las aflatoxinas están la competencia por espacio y/o nutrientes, antibiosis vía la síntesis de enzimas degradadoras, parasitismo, o bien, la unión de las moléculas de la aflatoxina a las paredes celulares del microorganismo biocontrolador en virtud de su marcada hidrofobicidad (Niknejad *et al.*, 2012). Ello lleva a considerar esta estrategia como una alternativa promisoriosa en el manejo de aflatoxinas.

Los compuestos Butil-hidroxianisol (BHA), Butil-Hidroxi-tolueno (BHT) y Propil-parabeno (PP) controlan el crecimiento y la síntesis de aflatoxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Thompson, 1992) en granos almacenados. Moreno y Vázquez (2000) evaluaron la efectividad de los propionatos de amonio, de calcio y de sodio en la reducción de la incidencia de *A. flavus* y sus aflatoxinas en maíz de Tamaulipas. Los tres propionatos redujeron la incidencia de aflatoxinas por debajo de los 20 µg/kg; sin embargo, se observó fitototoxicidad de los fungistatos en la germinación del grano de maíz pues la germinación del grano tratado con las cuatro dosis del propionato de amonio fue cercana a cero. Otros compuestos reducen el crecimiento del hongo y la consiguiente contaminación del hospedante (Lira, 2003). Tequida *et al.* (2002) reportaron que

extractos alcohólicos metanólicos y/o etanólicos de ‘gobernadora’ (*L. tridentata*) inhibieron el crecimiento de *A. flavus* y *A. niger* en un rango de 40 hasta 100 %. Rocha-Vilela *et al.* (2009) determinaron que el compuesto 1,8-cineolo aislado de *Eucalyptus globulus* inhibió el crecimiento y la producción de aflatoxina B₁ de *A. flavus* y *A. parasiticus*. Por su parte, Moreno y González (2011) indicaron que los extractos alcohólicos de ‘gobernadora’ (3 a 7 mg/mL de concentración) inhibieron hasta 100 % el crecimiento de *A. flavus*. El-Nagerabi *et al.* (2013) evaluaron extractos de hoja, resinas y aceites esenciales de *Boswellia sacra* para el control de *A. flavus* y *A. parasiticus*; la resina y el aceite esencial inhibieron, entre 40 y 90 %, el crecimiento y la secreción de aflatoxinas de ambos géneros fúngicos. Los extractos de plantas u otros agentes biocontroladores usualmente contienen sustancias que muestran un efecto directo en la reducción o total inhibición del crecimiento de *Aspergillus*, vía degradación de componentes estructurales de pared y membrana y organelos (Nogueira *et al.*, 2010). Por ejemplo, se reportan ácido guaiarético, ácido linoléico, quinonas, terpenos, cumarinas, precocenos, glicósidos, ácido carnósico, etc. (Tequida *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2010; Moreno y González *et al.*, 2011). Los resultados de estos trabajos con extractos de plantas son promisorios en virtud de que debe ponerse énfasis en la caracterización y detección de compuestos con utilidad para el manejo de hongos toxígenos del grano de maíz.

Otro método consiste en el uso de bolsas de silo fabricadas con poliestireno y filtro de rayos ultravioleta. El tamaño más utilizado es de 60-75 m de largo y 2.7 m de ancho. Cada bolsa puede almacenar unas 200 ton de grano. Dicho método es económicamente costeable ya que proporciona una forma eficiente de preservar el grano (Fornieles, 2001).

La estrategia de manejo que ha mostrado ser efectiva en la reducción de la contaminación de aflatoxinas en pre y post cosecha del maíz consiste en el uso de razas atoxigénicas (que no producen toxinas) de *A. flavus*, mismas que por competencia por los mismos sustratos para el crecimiento y desarrollo desplazan a las poblaciones de hongos toxigénicos (Yin *et al.*, 2008; Degola *et al.*, 2011). Esta medida de control biológico se utiliza en el sur de Estados Unidos (Arizona, California, Texas) en cultivos como maíz, algodónero, cacahuete y pistache, donde la incidencia de aflatoxinas se reduce del 70 hasta 90 % (Pitt y Hocking, 2006; Dorner, 2008; Abbas *et al.*, 2011a). Para que la exclusión competitiva sea eficaz, las cepas no toxigénicas factibles para aplicarse a manera de biocontrol deben ser predominantes en los entornos agrícolas cuando los

cultivos son susceptibles de ser infectados por las cepas toxigénicas. Algunas características de dichas cepas son su capacidad de crecimiento y esporulación, su estabilidad genética, capacidad para adaptarse a ambientes desfavorables y control de la síntesis de aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y fumonisinas (Abbas *et al.*, 2011b). Las cepas que mejores resultados han mostrado en campo y almacén son AF36, NRRL21882 (Alfa Guard®), CT3 y K49 de *A. flavus* y NRRL21369 de *A. parasiticus*, entre otras mismas que han promovido reducciones variables en la síntesis de aflatoxinas, ácido ciclopiazónico y fumonisinas en maíz y otros cultivos, que van desde un 20 a un 90 % en comparación con plantas no tratadas (Abbas *et al.*, 2006; 2011a; 2011b). Nuevas estrategias de biocontrol, aún en evaluación en campo, consisten en aplicar la cepa atoxigénica de *A. flavus* mezclada con sustratos bioplásticos. Por ejemplo, se está probando la mezcla de los conidios de la cepa atoxigénica con un bioplástico basado en almidón (Mater-Bi®) (Accinelli *et al.*, 2009; 2012); así como la aplicación de la cepa a la mazorca (más eficaz que al aplicarse en el suelo) mezclada en gránulos dispersables en agua basados en arcilla, igualmente con resultados de control promisorios (Abbas *et al.*, 2011b).

Medidas para descontaminar el grano. El proceso de descontaminación ideal debe ser barato, sencillo y que no produzca compuestos secundarios tóxicos o que altere las características nutrimentales y de palatabilidad durante o después de su utilización (Elias *et al.*, 2002). En México se han utilizado principalmente métodos físicos como la nixtamalización, extrusión y eliminación por adsorbentes. De acuerdo con Guzmán *et al.* (1995) y Anguiano *et al.* (2005), el proceso de nixtamalización destruye del 95 al 100 % de las aflatoxinas del maíz. En este sentido, también Pérez-Flores *et al.* (2011) reportaron que un método modificado para fabricar tortillas basado en el uso de microondas redujo entre 68 y 84 % la incidencia de aflatoxinas B₁ y B₂; Torres *et al.* (2001) encontraron reducciones de 52, 85 y 79 % de aflatoxinas en tortillas, totopos y frituras, respectivamente. Mientras que la nixtamalización redujo los niveles de AFB₁, AFM₁ y AFB₁ 8-9 dihidrodiol en 94, 90 y 93 % respectivamente en muestras con altos niveles de contaminación, la extrusión del grano de maíz con agua conteniendo 0.3 % de cal y 1.5 % de peróxido de hidrógeno redujo al 100 %; además, la cal y el peróxido de hidrógeno no afectaron el aroma y el sabor de las tortillas. Diversas modificaciones de la nixtamalización, la extrusión y la combinación de ambas se han evaluado con base en sus efectos en la eliminación de contaminantes y la calidad de la tortilla, aunque algunos resultan costosos o requieren más energía. La mayoría de estos procesos no se

han utilizado comercialmente para descontaminar maíz, aunque su estudio podría tener aplicaciones y resultados promisorios en el corto plazo (Comunicación Personal. Dr. Juan De Dios Figueroa-Cárdenas. CINVESTAV-IPN Unidad Querétaro. Querétaro, México. 2012). Así mismo, el uso de sustancias descontaminantes naturales o sintéticas denominadas ‘secuestrantes’ (arcillas, zeolitas, bentonitas, carbón activado, aluminosilicatos, polímeros y productos de la pared celular de levaduras) pueden contrarrestar la toxicidad de las aflatoxinas (Ramos y Hernández, 1997; Boudergue *et al.*, 2009; Tapia-Salazar *et al.*, 2010); a diferencia de México, éstas estrategias se han evaluado experimentalmente en ganado en Europa (Devreese *et al.*, 2013).

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El maíz es el alimento más importante en la República Mexicana, por lo que es necesario optimizar su producción y conservación de manera inocua. El ataque de diversos patógenos en el campo y el almacén causan daños a la producción; no obstante, no se utilizan de manera generalizada medidas de control directas y efectivas para reducir o anular la infección por hongos toxígenos de la mazorca, salvo medidas preventivas que desfavorecen la infección o la producción de dichas toxinas. Una de estas medidas consiste en la modificación de las fechas de siembra de modo que la fase sensible del ciclo biológico del maíz, la reproductiva, no coincida con las condiciones ambientales favorables o al estrés ambiental o a la alta incidencia e infección de hongos aflatoxigénicos. Esta medida se aplica en conjunto con el uso de híbridos con tolerancia a factores de estrés, como las altas temperaturas y el déficit hídrico (Reyes y Cantú, 2006). La alta incidencia de hongos toxígenos en maíz y la ocurrencia de sus micotoxinas contaminantes son particularmente preocupantes en el maíz producido en regiones como el noreste de México, así como a nivel mundial en Europa, América y África. Esto es de vital importancia si la producción se destina mayormente al consumo humano como ocurre en África y América Latina.

Los impactos agronómicos que han experimentado los Estados Unidos de América debido a la pérdida de granos en campo y almacén evidenció la necesidad de generar propuestas efectivas para minimizar la incidencia de hongos aflatoxigénicos. Los esfuerzos se han dirigido al desarrollo o adecuación de las prácticas de cultivo como la labranza, fertilización, densidad de siembra,

irrigación, control de insectos y fechas de siembra, mejoramiento genético y mapeo de genes de resistencia (Cary *et al.*, 2011; Devreese *et al.*, 2013; Magnussen y Parsi, 2013), entre otras. En México sucedió algo similar, particularmente en las zonas maiceras del norte del país, se desarrollaron estudios que generaron paquetes tecnológicos, particularmente por el INIFAP, que trataron de minimizar la contaminación por aflatoxinas en la mazorca, la tolerancia al estrés ambiental y maximizando el potencial de rendimiento de grano del cultivo (Reyes y Cantú, 2006). A pesar de esto, las afectaciones por los hongos aflatoxigénicos son recurrentes y, en ocasiones, significativas.

Lo anterior propone algunas líneas de investigación que deberían seguirse en el mediano y largo plazos al menos con marcado énfasis en las regiones maiceras de México donde *Aspergillus* y sus aflatoxinas son importantes. Debe continuarse el diagnóstico y la evaluación oportuna de los daños por hongos y plagas, identificar asociaciones, medir respuestas y generar paquetes tecnológicos que permitan paulatinamente reducir o inhibir por completo a los hongos aflatoxigénicos, la contaminación por aflatoxinas y una producción de maíz con alta calidad sanitaria, nutrimental y rentable en aquellas regiones productoras que presentan daños recurrentes por hongos aflatoxigénicos. Un nicho de oportunidad, consiste en la evaluación consistente y sistemática de cepas no toxígenas en el germoplasma de maíz con grano blanco o amarillo, adaptado a cada región agroecológica, de modo que se valide su pertinencia en el control de los hongos y sus aflatoxinas en México, particularmente en el mediano y largo plazo en el contexto del cambio climático global y con la integración de grupos de investigación multidisciplinarios (agronomos, biólogos moleculares, mejoradores, fitopatólogos, meteorólogos, etc.) (Paterson y Lima, 2010; 2011). Otro nicho de oportunidad se basa en el desarrollo de investigación básica y aplicada de *Aspergillus* y sus aflatoxinas en México, pues es escaso el estudio a nivel genético-molecular en cepas Mexicanas del hongo y de sus aflatoxinas, así como del estudio integrativo del patosistema maíz-*Aspergillus*-aflatoxinas. Poco se sabe del análisis a nivel genético, de estructura genética de poblaciones, distribución de morfotipos, interacciones morfotipos-genotipos de maíz, etc. Tampoco se conducen estudios consistentes relativos a la genómica funcional de los componentes del patosistema ni de su interacción, bajo condiciones ambientales particulares como estrés por sequía y/o altas temperaturas, lo que se agrupa en el mecanismo denominado ‘quorum-sensing’ y el ‘complejo Velvet’ identificados en *A. flavus* y sus implicaciones en las rutas del

metabolismo secundario (Cleveland *et al.*, 2009; Georgianna y Payne, 2009; Amaike y Keller, 2011; Amare y Keller, 2014).

Es necesario, además, mantener los cuidados previos a la cosecha para evitar la contaminación por hongos. En campo, proveer buenos niveles de humedad y evitar el estrés hídrico, así como suelos con buena fertilidad o suplementado con los niveles de nutrimentos recomendados para el cultivo. Una vez verificada la cosecha, debe procurarse que las condiciones de humedad en el almacén sean bajas, proporcionar aireación para evitar la formación de ‘puntos calientes’ en los almacenes o silos (Bucio *et al.*, 2001; Magan y Aldred, 2007). Otra opción es el uso de sustancias como los ácidos orgánicos que inhiben el crecimiento de los hongos o bien, enzimas que degradan selectivamente las aflatoxinas (Magan y Aldred, 2007).

Una nueva alternativa se basa en la liberación experimental y en siembra piloto de germoplasma de maíz transgénico o genéticamente modificado con resistencias individuales o ‘apiladas’ a herbicidas (glifosato, glufosinato de amonio), plagas de lepidópteros, plagas de raíces y tallos que, al menos en el norte de Tamaulipas, muestran resistencia a plagas de lepidópteros de la mazorca y menores niveles de infección por hongos potencialmente toxígenos en la mazorca (SENASICA, 2014). Sin embargo, la investigación está en proceso y aún no se tienen resultados concluyentes y, adicionalmente, están los resultados previos de Reddy *et al.* (2007) quienes concluyeron que el uso de germoplasma de maíz con resistencia a glifosato y que permite el control de malezas con dicho herbicida, mostró incrementos en la incidencia de *A. flavus* en el suelo tratado con el herbicida, aunque no incrementos en la presencia de aflatoxinas y fumonisinas en el grano. Aparentemente, el glifosato se une a la matriz coloidal del suelo dejando menor proporción de material biodisponible para interferir con el crecimiento del hongo aflatoxigénico o, incluso, con cepas no aflatoxigénicas usadas como biocontrol (Accinelli *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

El estado actual del estudio de *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz ha mostrado avances importantes en fechas recientes en México, de modo que las altas incidencias y daños observados en décadas pasadas se han reducido significativamente. Sin embargo, el problema persiste debido a que se pueden

presentar los factores que propician la incidencia de hongos toxigénicos en campo y almacén, generando pérdidas millonarias en el sector agrícola. Por ello, es imperativo continuar con el diagnóstico y análisis de la incidencia y daños por aflatoxinas en el cultivo del maíz en México. Por ello se considera necesario establecer programas de prevención que incluyan los siguientes puntos: 1) divulgación de los problemas económicos y de salud causados por la contaminación con aflatoxinas, 2) utilización de programas de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de los Sistemas de Control ('Hazard Analysis Critical Control Point Systems', HACCP), 3) desarrollar y consolidar la evaluación de las nuevas estrategias de tipo químico, cultural y/o biológico de la incidencia de hongos aflatoxigénicos y sus aflatoxinas; 4) mantener el mejoramiento genético del maíz por resistencia a plagas de insectos, factores de estrés ambiental como sequía y altas temperaturas y sentar las bases para el mejoramiento genético consistente enfocado a la caracterización genética e identificación de progenitores, su cruce y selección y mapeo de genes de resistencia a la infección por hongos aflatoxigénicos o inhibitorios de la síntesis de aflatoxinas y 5) establecer y mantener programas de salud epidemiológica y de diagnóstico tanto en humanos como en animales, conjuntamente con la creación de normas oficiales y métodos de diagnóstico y cuantificación específicos baratos, reproducibles, rápidos, sensibles y confiables para las aflatoxinas en el maíz producido en México.

Agradecimientos

La primera autora agradece el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (beca número 421712) y del programa PIFI beca número B110668 del Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento de sus estudios de posgrado en el CBG-IPN. Los costos de publicación de este trabajo son financiados por la Fundación PRODUCE Tamaulipas (proyectos 2009- 1750 y 2012-2112) y el Instituto Politécnico Nacional.

LITERATURA CITADA

- Abbas HK, Zablotowicz RM, Bruns HA, and Abel CA. 2006. Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology* 16:437-449.
- Abbas HK, Zablotowicz RM, Horn BW, Phillips NA, Johnson BJ, Jin X, and Abel CA. 2011a. Comparison of major biocontrol strains of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* for the reduction of aflatoxins and cyclopiazonic acid in maize. *Food Additives and Contaminants* 28:198-208.

- Abbas HK, Weaver MA, Horn BW, Carbone I, Monacell JT, and Shier WT. 2011b. Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews* 30:59-70.
- Accinelli C, Koskinen WC, Seebinger JD, Vicari A, and Sadowsky MJ. 2005. Effects of incorporated corn residues on glyphosate mineralization and sorption in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4110-4117.
- Accinelli C, Saccà ML, Abbas HK, Zablutowicz RM, and Wilkinson JR. 2009. Use of a granular bioplastic formulation for carrying conidia of a non-aflatoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Bioresource Technology* 100:3997-4004.
- Accinelli C, Mencarelli M, Saccà ML, Vicari A, and Abbas HK. 2012. Managing and monitoring of *Aspergillus flavus* in corn using bioplastic-based formulations. *Crop Protection* 32:30-35.
- Aguilar F, Harris CC, Sun T, Hollstein M, and Cerutti P. 1994. Geographic variation of p53 mutational profile in non-malignant human liver. *Science* 264:1317-1319.
- Aliabadi MA, Alikhani FE, Mohammadi M, and Darsanaki RK. 2013. Biological control of aflatoxins. *European Journal of Experimental Biology* 3:162-166.
- Alvarado CM, Díaz FA, Delgado AE, and Montes GN. 2010. Impact of corn agronomic management on aflatoxin (*Aspergillus flavus*) contamination and charcoal stalk rot (*Macrophomina phaseolina*) incidence. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12:575-582. 32 p.
- Amaike S and Keller NP. 2011. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 49:107-133.
- Amare MG and Keller NP. 2014. Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology* (in press). <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.008>
- Anguiano RGL, Verver A, Vargas C y Guzmán-De Peña D. 2005. Inactivación de aflatoxina B₁ y aflatoxicol por nixtamalización tradicional del maíz y su regeneración por acidificación de la masa. *Salud Pública de México* 47:369-375.
- ASERCA, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. 2012. Boletín ASERCA Regional Peninsular 2012: La Industrialización del Maíz. 56/12. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Mérida, México. 32 p.
- Boudergue C, Burel C, Dragacci S, Favrot MC, Fremy JM, Massimi C, Prigent P, Debongnie P, Pussemier L, Boudra H, Morgavi D, Oswald I, Perez A, and Avantaggiato G. 2009. Review of mycotoxin - detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Scientific Report CFP/EFSA/FEEDAP/2009/1. European Food Safety Authority (EFSA). Parma, Italy. 192 p.
- Bhatnagar D, Cary JW, Ehrlich K, Yu J, and Cleveland TE. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 162:155-166.
- Bucio VCM, Guzmán ODA, and Peña CJJ. 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 18:83-87.
- Cantú-Almaguer MA, Reyes-Méndez CA y Rodríguez del Bosque LA. 2010. La Fecha de Siembra: Una alternativa para Incrementar la Producción de Maíz. Folleto Técnico no. 44. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP-SAGARPA. Río Bravo, México. 40 p.
- Carvajal M. 2013. Transformación de la aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerígeno humano aducto AFB₁-ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico- Biológicas UNAM* 16:109-120.
- Carvajal M y Arroyo G. 1997. Management of aflatoxin contaminated maize in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 22:327-350.
- Carvajal M, Berumen J, and Guardado EM. 2012. The presence of aflatoxin B₁-FAPY adduct and human papilloma virus in cervical smears from cancer patients in Mexico. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 29:258-268.
- Cary JW, Rajasekaran K, Brown RL, Luo M, Chen ZY, and Bhatnagar D. 2011. Developing resistance to aflatoxin in maize and cottonseed. *Toxin* 3:678-696.
- Chang PK. 2003. The *Aspergillus parasiticus* protein *afII* interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator *afIR*. *Molecular and General Genetics* 268:711-719.
- Chang PK and Ehrlich KC. 2010. What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*?. *International Journal of Food Microbiology* 138:189-199.

- Chang PK, Horn BW, and Dorner JW. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology* 42:914-923.
- Cleveland TE, Yu J, Fedorova N, Bhatnagar D, Payne GA, Nierman WC, and Bennett JW. 2009. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 27:151-157.
- Cotty JW. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79:808-814.
- Cotty PJ and Jaime-García R. 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology* 119:107-115.
- Coursaget N, Depril M, Chabaud R, Nandi V, Mayelo P, and LeCann B. 1993. High prevalence of mutations at codon 249 of the p53 gene in hepatocellular carcinomas. *British Journal of Cancer* 67:1395-1397.
- Criseo G, Racco C, and Romeo O. 2008. High genetic variability in non-aflatoxigenic *A. flavus* strains by using Quadruplex. *International Journal of Food Microbiology* 125:341-343.
- De Luna-López MC, Valdivia-Flores AG, Jaramillo-Juárez F, Reyes JL, Ortiz-Martínez R, and Quezada-Tristán T. 2013. Association between *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin production in immature grains of maize genotypes. *Journal of Food Science and Engineering* 3:688-698.
- Degola F, Berni E, and Restivo FM. 2011. Laboratory test for assessing efficacy of atoxigenic *Aspergillus flavus* strains as biocontrol agents. *International Journal of Food Microbiology* 146: 235-243.
- Devreese M, de Backer P, and Croubels S. 2013. Different methods to counteract mycotoxin production and its impact on animal health. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82:181-190.
- Díaz-Franco A y Montes-García N. 2008. La fitopatología en la región semiárida de Tamaulipas, México: Reseña histórica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 62-70.
- Dorner JW. 2008 Management and prevention of mycotoxins in peanuts. *Food Additives & Contaminants* 25:203-208.
- Ehrlich KC and Cotty PJ. 2004. An isolate *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 65:473-478.
- Ehrlich KC, Yu J, and Cotty PJ. 2005. Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology* 99:518-527.
- Elias OR, Castellanos NA, Gaytan MM, Figueroa CJD, and Loarca PG. 2002. Comparison of nixtamalization and extrusion process for reduction in aflatoxin content. *Food Additives & Contaminants* 19:878-885.
- El-Nagerabi SAF, Elshafie AE, Alkhanjari SS, Al-Bahry S, and Elamin MR. 2013. Biological activities of *Boswellia sacra* extracts on the growth and aflatoxins secretion of two aflatoxigenic species of *Aspergillus* species. *Food Control* 34:763-769.
- FDA (Food and Drugs Administration). 2012. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ChemicalContaminantsandPesticides/ucm077969.htm (consulta, mayo 2012).
- Fornieles J. 2001. Almacenaje de granos en silos bolsa. Una alternativa, INTA. www.Inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/posco/granos/Fornieles.pdf (consulta, mayo 2012).
- García AG, Martínez FR y Melgarejo HJ. 2003 Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en el estado de Sonora durante el año 1998. Informe Técnico. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica, Universidad Nacional Autónoma de México* 72:187-193.
- García S and Heredia N. 2006. Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia* 162:255-264.
- Gao X, Ma Q, Zhao L, Lei Y, Shan Y, and Ji C. 2011. Isolation of *Bacillus subtilis*: screening for aflatoxins B₁, M₁, and G₁ detoxification. *European Food Research Technology* 232:957-962.
- Georgianna DR and Payne GA. 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology* 46:113-125.

- Georgianna DR, Fedorova ND, BurrohugsJL, Dolezal AL, Bok JW, Horowitz-Brown S, Woloshuk CP, Yu J, Keller NP, and Payne GA. 2010. Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Molecular Plant Pathology* 11: 213-226.
- Guzmán-De Peña D. 2007. La exposición a la aflatoxina B₁ en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud Pública de México* 49:227-235.
- Guzmán ODA, Trudel L, and Wogan GN. 1995. Corn “nixtamalización” and the fate of radiolabelled aflatoxin B₁ in the tortilla making process. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55:85- 864.
- Hernández DS, Reyes LA, Reyes MCA, García OJG y Mayek PN. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:127-133.
- Hong LS and Yusof NIM. 2010. Determination of aflatoxins B₁ and B₂ in peanut and corn based products. *Sains Malay-siana* 39:731-735.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. 2013. <http://www.iarc.fr/index.php> (consulta, febrero 2013).
- Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT, and Goto T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*. *Mycological Research* 105:233-239.
- Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Muñoz A, and Kensler TW. 2003. Prospective detection of codon 249 mutation in p53 in plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Carcinogenesis* 10:1657-1663.
- Jaime-García R and Cotty PJ. 2010. Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1842-1847.
- Kebede H, Abbas HK, Fisher DK and Bellaloui N. 2012. Relationship between aflatoxin contamination and physiological responses of corn plants under drought and heat stress. *Toxins* 4:1385-1403.
- Klich MA. 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. First edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. 166p.
- Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- Li P, Zhang Q, Zhang D, Guan DX, Liu DX, Fang S, Wang X, and Zhang W. 2011. Aflatoxin measurement and analysis. pp. 183-208. In: Torres-Pacheco I (ed.). *Aflatoxins -Detection, Measurement, and Control*. Intech. Rijeka, Croatia. 364 p.
- Lira SRH. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (D. C.), Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:214-221.
- Liu Y and Wu F. 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 118:818-824.
- Madrigal BE, Madrigal SO, Ailvarez GI, and Morales GJA. 2011. Aflatoxin B₁ - Prevention of Its Genetic Damage by Means of Chemical Agents. Pp: 251-282. In: Torres PI. (ed.). *Aflatoxins - Detection, Measurement and Control*. InTech Europe. 364 p.
- Magan N and Aldred D. 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119:131- 139.
- Magnussen A and Parsi MA. 2013. Aflatoxin, hepatocellular carcinoma and public health. *World Journal of Gastroenterology* 19:1508-1512.
- Martínez FR, García AG y Melgarejo HJ. 2003. Inspección de aflatoxinas en maíz cultivado, almacenado y transportado en Tamaulipas, México, en 1998. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* 74:313-321.
- Marui J, Yamane N, Ohashi-Kunihiro S, Ando T, Terabayashi Y, Sano M, Ohashi S, Ohshima E, Tachibana K, Higa Y, Nishimura M, Koike H, and Machida M. 2011. Kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae* is regulated by a Zn(II)(2)Cis(6) transcriptional activator and induced by kojic acid at the transcriptional level. *Journal of Biosciences and Bioengineering*. 112:40-43.
- Mejía TL, Chapa OAM, Vazquez CMA, Torres PI, and Guevara GRG. 2011. Aflatoxins Biochemistry and Molecular Biology - Biotechnological Approaches for Control in Crops. Pp: 317-354. In: Torres PI. (ed.). *Aflatoxins-Detection, Measurement and Control*. InTech Europe. 364 p.

- Méndez AJA, Arámbula VG, Preciado ORE, and Moreno MM. 2004. Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-based food. *International Journal of Food Microbiology* 94:211-215.
- Montes GN, Reyes MCA, Montes RN, and Cantú AMA. 2009. Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (*Zea mays* L.) grain used as food and animal feed. *Journal of Food* 7:119-125.
- Moreno LS y González SL. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica* 32:193-205.
- Moreno ME y Gil GM. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. Coordinación de la investigación científica. Programa Universitario de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 42p.
- Moreno ME y Vázquez BM. 2000. Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. *Agrociencia* 34:477-484.
- Moudgil V, Redhu D, Dhanda S, and Singh J. 2013. A review of molecular mechanisms in the development of hepatocellular carcinoma by aflatoxin and hepatitis B and C viruses. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 32:165-175.
- Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, and Tuzun S. 2001. Bacillo-mycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* 90:622-629.
- Nazari ZK, Nakisa A, and Rahbar NF. 2013. The occurrence of aflatoxins in peanuts in supermarkets in Ahvaz, Iran. *Journal of Food Research* 2:94-100.
- Niknejad F, Zaini F, Faramarzi MA, Amini M, Kordbacheh P, Mahmoudi M, and Safara M. 2012. *Candida parapsilosis* as a potent biocontrol agent against growth and aflatoxin production by *Aspergillus* species. *Iranian Journal of Public Health* 41:72-80.
- Nogueira JHC, Gonzalez E, Galletti SR, Facanali R, Marques MOM, and Felicio JD. 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology* 137:55-60.
- Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, productos y servicios. Cereales y sus productos. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. [d o f . g o b . m x / n o t a _ d e t a l l e . p h p ? c o d i g o = 5 1 0 0 3 5 6 & f e c h a = 2 7 / 0 7 / 2 0 0 9](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5100356&fecha=27/07/2009) (consulta, mayo 2012).
- Novas MV and Cabral D. 2002. Association of mycotoxin and sclerotia production with compatibility groups in *Aspergillus flavus*. *Plant Disease* 86:215-219.
- Ochoa MA, Torres CP, Moreno IG, Yépiz GS, Álvarez CR, Marroquín JA, Tequida MM, and Silveira GM. 1989. Incidencia de Aflatoxina B₁ y Zearalenona en trigo y maíz almacenado en el estado de Sonora. *Revista de Ciencias Alimentarias* 1:16-20.
- Ortega PR. 2003. La diversidad del maíz en México. Pp:123-154. In: Esteva G y C Marielle (eds.). *Sin Maiz no hay País*. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas México, D. F.
- Palumbo JD, Baker JL, and Mahoney NE. 2006. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microbial Ecology* 52:45-52.
- Paterson RRM and Lima M. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food?. *Food Research International* 43:1902-1914.
- Paterson RRM and Lima M. 2011. Further mycotoxins effects from climate change. *Food Research International* 44:2555-2566.
- Payne GA and Yu J. 2010. Ecology, development and gene regulation in *Aspergillus flavus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Machida M, Gomi K (eds.). pp. 157-171. Caister Academic Press. Norwich, United Kingdom. 238 p.
- Pérez-Flores GC, Moreno-Martínez E, and Méndez-Albores A. 2011. Effect of microwave heating during alkaline-cooking of aflatoxin contaminated maize. *Journal of Food Science* 76:T48-T52.
- Peterson SW, Horn BW, Ito Y, and Goto T. 2000. Genetic variation and aflatoxin production in *Aspergillus tamarii* and *A. caelatus*. pp. 447-458. In: Samson RA y Pitt JI. (eds.). *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Harwood Academic Publishers, Australia.
- Pitt JI and Hocking AD. 2006. Mycotoxins in Australia: biocontrol of aflatoxin in peanuts. *Mycopathologia* 162:233-243.
- Plasencia J. 2004. Aflatoxins in maize: a Mexican perspective. *Journal of Toxicology* 23:155-177.

- Probst C, Schulthess F, and Cotty PJ. 2010. Impact of *Aspergillus* section Flavi community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). *Journal of Applied Microbiology* 108:600-610.
- Probst C, Callicott KA, and Cotty PJ. 2012. Deadly strains of Kenyan *Aspergillus* are distinct from other aflatoxin producers. *European Journal of Plant Pathology* 132:419-429.
- Ramos A y Hernández E. 1997. Adsorción *in vitro* de aflatoxinas mediante la utilización de compuestos adsorbentes: montmorillonita. *Revista Iberoamericana de Micología* 14:7277.
- Reddy KN, Abbas HK, Zablutowickz RM, Abel CA, and Koger CH. 2007. Mycotoxin occurrence and *Aspergillus flavus* soil propagules in a corn and cotton glyphosate-resistant cropping systems. *Food Additives and Contaminants* 24:1367-1373.
- Reglamento Sanitario de los Alimentos. 2012. Artículo 169, decreto 977/96 del Ministerio de Salud de Chile. www.sernac.cl/sernac2011/descargas/leyes/decreto/ds_977-96_reglamento_alimentos.pdf (consulta, mayo 2012).
- Requena F, Saume E y León A. 2005. Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical* 23:393-410.
- Reyes MCA y Cantú AMA. 2003. H-439: Híbrido de maíz de grano blanco para el trópico y subtrópico de México. *Campo Experimental Río Bravo, INIFAP. Boletín Informativo Volumen 3, Número 7. Río Bravo, México. 2p.*
- Reyes MCA y Cantú AMA. 2004. H-437, Híbrido de maíz para el noreste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:289-290.
- Reyes MCA y Cantú AMA. 2006. Maíz. Pp. 55-74. En: LA Rodríguez del Bosque (ed.). *Campo Experimental Río Bravo: 50 años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas. Historia, Logros y Retos. Libro Técnico no. 1. Campo Experimental Río Bravo, INIFAP- SAGARPA. Río Bravo, México. 325 p.*
- Reyes MCA, Cantú AM, Garza CM, Vázquez CG y Córdova OH. 2009. H-443A, Híbrido de maíz de grano amarillo para el noreste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:331-333.
- Reyes VW, Patricio MS, Isaías EVH, Nathal VMA, De Lucas PE y Rojo F. 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Técnica Pecuaria en México* 47:223-230.
- Reyes-Velázquez WP, Isaías-Espinoza VH, Rojo F, Jiménez-Plascencia C, de Lucas-Palacios E, Hernández-Góborra J, and Ramírez-Álvarez A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 30:182- 185.
- Robledo ML, Marín S y Ramos AJ. 2001. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología* 18:141-144.
- Rocha-Vilela G, de Almeida GS, D'Arce MABR, Moraes MHD, Brito JO, da Silva MFGF, Silva SC, Piedade SMS, Calori-Domingues MA, and da Gloria EM. 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1, 8- cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research* 45:108-111.
- Rodríguez BLA. 1996. Impact of agronomic factor on aflatoxin contamination in preharvest field corn in Northeastern México. *Plant Disease* 80:988-993.
- Rodríguez BLA, Cantú AMA, and Reyes MCA. 2010. Effect of planting date and hybrid selection on *Helicoverpa zea* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) damage on maize ears in Northeastern México. *Southwestern Entomologist* 35:157-164.
- Rodríguez BLA, Reyes MCA, Acosta NS, Girón CJR, Garza CI y Villanueva GR. 1995. Control de aflatoxinas en maíz en Tamaulipas. *Campo Experimental Río Bravo, INIFAP. Folleto Técnico No. 17. Río Bravo, México. 20p.*
- Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N, and Geisen R. 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 135:231- 237.
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2014. Consulta Pública de Solicitudes de OGM. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.senasica.gob.mx (consulta, enero, 2014)

- Sharma M and Márquez C. 2001. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology* 93:109-114.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. Estadísticas de Producción para el Año Agrícola 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.siap.gob.mx/index (consulta, enero, 2014).
- Soini Y, Chia SC, Bennet WP, Groopman JD, Wang JS, and De Benedetti VMG. 1996 An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from México. *Carcinogenesis* 17:1007-1012.
- Stojanovska-Dimzoska B, Hajrulani-Muslin Z, Dimitrieska-Stojkovic E, Uzunov R, and Sekulovski P. 2013. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products determined by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Natural Sciences Matica Srpska Novi Sad* 124:27-35.
- Suárez EFC, Vargas GMJ, López CC, and Moreno J. 2007. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection* 26:26-53.
- Tapia-Salazar M, García-Pérez OD, Nieto-López M, Ricque-Marie D, Villarreal-Cavazos y Cruz-Suárez LE, 2010. Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura. En: Cruz- Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto- López MG, Villarreal-Cavazos D, Gamboa-Delgado J (eds.). *Avances en Nutrición Acuicola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuicola*. Monterrey, México. pp. 514-546.
- Taylor WJ and Draughon FA. 2001. *Nannocystis exedens*: A potential biocompetitive agent against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection* 64: 1030-1034.
- Tejada-Castañeda ZI, Ávila-González E, Casaubón- Huguenin MT, Cervantes-Olivares RA, Vásquez-Peláez C, Hernández-Baumgarten EM, and Moreno-Martínez E. 2008. Biotodetoxificación de aflatoxina-contaminado de alimento de pollo. *Poultry Science* 87:1569-1576.
- Tequida MM, Cortez RM, Rosas BEC, López SS y Corrales MC. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología* 19:84-88.
- Thompson DP. 1992. Inhibition of mycelial growth of mycotoxigenic fungi by phenolic antioxidants. *Mycologia* 84:791-793.
- Torres EE, Acuña AK, Naccha TL, and Castellon SJP. 1995. Quantification of aflatoxins in corn distributed in the city of Monterrey, Mexico. *Food Additives and Contaminants* 12:383-386.
- Torres PI, Guzmán OM, and Ramírez WB. 2001. Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2825- 2829.
- Umamura M, Koike H, Nagano N, Ishii T, Kawano J, Yamane N, Kozono I, Horimoto K, Shin-ya K, Asai K, Yu J, Bennett JW, and Machida M. 2013. MIDDAS-M: motif independent de novo detection of secondary metabolite gene clusters through the integration of genome sequencing and transcriptome data. *PlosONE* 8:e84028.
- Unión Europea EFSA. 2002. Directiva de la Comisión del Parlamento Europeo y del Consejo sobre sustancias indeseables en la alimentación animal no. 2002/32/EC eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:285:0033:0037:ES:PDF (consulta, mayo 2012).
- Wild CP and Gong YY. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31:71-82.
- Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, and Kuca K. 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metabolism Reviews* 41:1-7.
- Yin YN, Yan LY, Jiang JH, and Ma ZH. 2008. Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Zhejiang University Science B* 9:787-792.
- Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, and Bennett JW. 2009. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1253-1262.
- Zhao LH, Guan S, Gao X, Ma QG, Lei YP, Bai XM, and Ji C. 2010. Preparation, purification and characteristics of an aflatoxin degradation enzyme from *Myxococcus fulvus* ANSM068. *Journal of Applied Microbiology* 110:147- 155.

1.3. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear*

Andrés Quezada Salinas, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Guillermo Pérez Valenzuela 127, Colonia Del Carmen, Delegación Coyoacán, México D.F., CP. 04100, México; Carlos De León García De Alba, Ana María Hernández Anguiano, Cristian Nava Díaz, Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. de México, CP. 56230, México.
*Autor de correspondencia: andresqs@colpos.mx

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de inoculación con teliosporas del hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* en semillas de maíz que resulte en un alto y consistente porcentaje de infección de plántulas, e implementarlo en programas de selección de germoplasma resistente a este patógeno. Semillas de maíz susceptible a la enfermedad se inocularon con diferentes métodos que permitieron el contacto entre patógeno y hospedante (teliosporas-semilla). Las semillas inoculadas se sembraron en macetas con suelo estéril en condiciones de 25 °C y fotoperíodo de 12 h luz. A 25 d después de la siembra se cuantificó el número de plántulas infectadas mediante la observación de micelio en el mesocotilo. Se determinó que semillas inoculadas con una suspensión de 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹ y 1% de carboximetilcelulosa de sodio, produjeron 93.3 y 96.6% de infección en plántulas de maíz susceptible del criollo Blanco de Toluca y del híbrido AS- 910, respectivamente. En plántulas infectadas se observó micelio intracelular en el parénquima del mesocotilo sin provocar síntomas visibles, en plantas adultas se presentó la formación de soros en la panoja y mazorca. La identidad del micelio presente en el mesocotilo se confirmó mediante la técnica de PCR usando los iniciadores específicos SR1 y SR2.

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

El carbón de la espiga del maíz (*Zea mays*), por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (sin. *Sphacelotheca reiliana*), se encuentra en varios países de Europa, Norte y Sur de América, China, Australia, Nueva Zelanda, India occidental, Palestina, y otros países. En México, es de mayor importancia en la zona del Bajío donde ocasionó pérdidas de 30% de 1956-1961. Esta enfermedad se encuentra presente en los estados de Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Aguascalientes (Aquino *et al.*, 2011).

La reducción en la producción por *S. reilianum* f. sp. *zeae* se debe principalmente a la infección sistémica y a la producción de soros que reemplazan parcial o totalmente a la mazorca y panoja durante la floración, afectando así la producción de grano. Los soros son estructuras fructíferas que contienen teliosporas, las cuales en el siguiente ciclo de cultivo germinan en el suelo, producen un basidio de cuatro células y cada célula origina una basidiospora haploide (Ingold, 1994). La unión de dos basidiosporas haploides compatibles dan origen al dicarion (hifa parasítica), que penetra la raíz de las plántulas de maíz (Martínez *et al.*, 2000) e invade los tejidos en forma sistémica hasta llegar al meristemo apical (Martínez *et al.*, 1999).

Debido a que la infección ocurre durante la germinación y las primeras etapas de desarrollo de la plántula de maíz, la principal estrategia de control se basa en la aplicación de fungicidas a la semilla para evitar el contacto entre el patógeno y el hospedante durante estas etapas (Stienstra *et al.*, 1985; Martínez y Ledesma, 1990; Wright *et al.*, 2006). Por otra parte, mediante la evaluación de la expresión de la enfermedad se han identificado variedades e híbridos de maíz tolerantes (Stromberg *et al.*, 1984; Aquino *et al.*, 2011). Por lo tanto, la obtención de materiales resistentes es el método más efectivo de control del carbón de la espiga, por ello se requieren técnicas de inoculación efectivas para promover la infección del hospedante por el patógeno. Para lograr la infección de plántulas de maíz, se han usado mezclas de suelo con teliosporas y su deposición junto con semillas (Stromberg *et al.*, 1984; Matyac y Kommedahl, 1985b; Whyte y Gevers, 1988; Pradhanang y Ghimire, 1996), suspensiones de teliosporas aplicadas al momento de la siembra (Baggett y Koepsell, 1983; Martínez y Ledesma, 1990), inoculación hipodérmica de plántulas con basidiosporas (Craig y Frederiksen, 1992), e infiltración de teliosporas a la semilla mediante la generación de vacío (Metha, 1967). Sin embargo, estos

métodos producen porcentajes de infección que varían de 5 a 95.8 %, lo cual limita su utilidad en un programa de selección de resistencia a la enfermedad.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue desarrollar un método de inoculación eficaz y, con el cual se obtenga un alto y consistente porcentaje de infección de plantas, con la finalidad de que pueda implementarse en programas de selección de germoplasma de maíz resistente a la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

La viabilidad del inóculo se verificó previo a los tratamientos de inoculación en semilla. Para ello se preparó una suspensión de 50 000 teliosporas mL^{-1} en agua destilada estéril y se depositó 1 mL por caja Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) preparado con papas (Gilchrist *et al.*, 2005). Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C y a 48, 72 y 96 h después cinco cajas se observaron directamente al microscopio, se contó el número de teliosporas germinadas por campo a una magnificación de 40X. Por cada caja se observaron cuatro campos y el promedio de germinación se registró en porcentaje.

Inoculación de semillas de maíz con teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae*. Semillas de maíz de los cultivares Criollo Blanco de Toluca (CBT) y del híbrido Aspros-910 (AS-910), ambos de endospermo blanco y susceptibles al carbón de la espiga, se desinfectaron con una solución a 1.5 % de NaOCl por 3 min, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril y se secaron a 22 °C sobre

papel absorbente estéril. Luego, las semillas de ambos materiales se inocularon con teliosporas utilizando los siguientes métodos:

1. Carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC; marca libre: Droguería Metropolitana, México, D.F.). Se preparó una suspensión a 1 % de NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En esta suspensión se incorporaron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.
2. Cápsulas. Cápsulas farmacéuticas de gelatina rígida del número 1, se llenaron con 500 mg de teliosporas y se depositaron junto a semillas de maíz al momento de la siembra en macetas. Se colocó una cápsula por semilla.
3. Adyuvante de pesticidas (Agrocer® 010). Se preparó una suspensión a 0.2% (v/v) y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En ésta suspensión se sumergieron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.
4. Dispersante (KEM-KOL^{MR}). Se preparó una suspensión a 0.2 % (v/v) y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En ésta suspensión se sumergieron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.
5. Semilla impregnada con teliosporas. En una bolsa de polietileno de 20 x 14.5 cm, se depositaron 3 g de teliosporas, se agregaron 50 semillas de maíz y se mezclaron por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno.
6. Semillas con daño mecánico e impregnadas con teliosporas. Para ocasionar daños sobre la superficie de la semilla, entre dos papeles lija No. 4 se frota-ron 50 semillas de maíz por 1 min, posteriormente se depositaron en una bolsa de polietileno de 20 x 14.5 cm con 3 g de teliosporas y se mezclaron por 1 min, luego se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno.
7. Esmalte acrílico (Aero Comex^{MR}). En una bolsa de polietileno de 20 x 14.5 cm, se depositaron 3 g de teliosporas, se agregaron 50 semillas de maíz y se agitaron por 1 min. Las semillas se extrajeron y, después de rociarlas con esmalte en aerosol por 1 min, se secaron a 22 °C sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.

8. Testigo. Semilla desinfectada. Las semillas de maíz inoculadas de los tratamientos anteriores se sembraron en macetas con suelo estéril con pH de 8.0, conductividad eléctrica de 5.08 dSm⁻¹, contenido de materia orgánica de 3.23% y textura franco-arenosa (arena 75.6%, limo 14.5% y arcilla 9.9%). Las macetas se colocaron en una cámara bioclimática (Modelo CEL 38-15), distribuidas en un diseño de bloques completos al azar con siete unidades experimentales (repeticiones), a 25 °C con un fotoperíodo de 12 h luz, generado por 16 lámparas de luz blanca fluorescente de 160 watts. Cada unidad constó de una maceta con cinco semillas inoculadas. La variable evaluada fue: número de plántulas infectadas con *S. reilianum* f. sp. *zeae* expresada en porcentaje.

Evaluación de la infección. El porcentaje de plántulas infectadas, registrado en los diferentes tratamientos, se determinó mediante la detección de micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae* 25 d después de la siembra. Para esto se realizaron cortes transversales del mesocotilo con navaja de afeitar en el microscopio estereoscópico. Las secciones se tiñeron con azul de algodón al 0.5 % en lactofenol por 3 min, se colocaron en una solución de safranina al 1 % en etanol 70 % por 1 min, y se lavaron en glicerol al 70 % por 1 min. Las secciones se montaron en glicerol al 70 % y se examinaron en un microscopio compuesto (40X). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y separación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), con el paquete estadístico SAS (1999). Las imágenes de tejido se tomaron con una cámara digital (Moticam 2300).

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

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

El ADN de tejido vegetal se obtuvo del mesocotilo de plántulas 25 d después de su siembra, procedentes tanto de semillas inoculadas con el hongo (1 % de NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1}) como de semillas sin inocular (Testigo). Mientras que el ADN del hongo se obtuvo de cultivos monoesporiales (basidiospora) de 72 h de crecimiento a 25 °C en oscuridad de acuerdo a Xu *et al.* (1999). Para esto, 0.5 mL de suspensión en agua destilada estéril con 50 000 teliosporas mL^{-1} se distribuyeron en PDA y de las colonias aisladas que se desarrollaron se tomaron muestras con un asa estéril para cultivos puros de basidiosporas en PDA.

Las pruebas de PCR incluyeron un testigo positivo (ADN de basidiosporas), un testigo negativo (ADN de tejido vegetal de plantas testigo sin inocular) y muestras de plantas inoculadas (ADN de tejido vegetal de plantas desarrolladas a partir de semillas inoculadas).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μL y por cada reacción se utilizó un tubo para PCR en el cual se adicionaron los siguientes reactivos: 10 μL de buffer de amplificación (GoTaq® Flexi Buffer, Promega), 5 μL de MgCl_2 25 μM , 1 μL de mezcla de nucleótidos a 10 μM de cada uno, 1 μL de cada iniciador a 1 μM , 0.25 μL de la enzima GoTaq® ADN polimerasa (5u/ μL), 4 μL de DNA correspondiente y 27.75 μL de agua libre de nucleasa. Los reactivos se mezclaron con un paso de vórtex y la mezcla se centrifugó por 5 s. Las reacciones PCR se realizaron en un termociclador (TC-300, Techne®) con los siguientes parámetros: 1 ciclo de 4 min a 94 °C, 1 min a 56 °C y 2 min a 72 °C, seguido por 36 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C y 2 min a 72 °C. El programa finalizó con 10 min a 72 °C. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % a 85 V durante 40 min, se tiñeron con bromuro de etidio a 1mg L^{-1} y visualizaron en un fotodocumentador (Gel Doc 2000, BIO-RAD®). La detección de un fragmento de 0.96 kb fue evidencia de la presencia de *S. reilianum* f. sp. *zear* en el tejido vegetal, de acuerdo a Xu *et al.* (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Viabilidad de teliosporas. En medio de cultivo PDA a 25 °C, se registró 19, 29.8 y 35.4 % de germinación de teliosporas después de 48, 72 y 96 h, res-

pectivamente. Las teliosporas formaron un basidio septado con cuatro células (Figura 1), cada una de las cuales originó una basidiospora que desarrolló colonias tipo levadura de color crema.

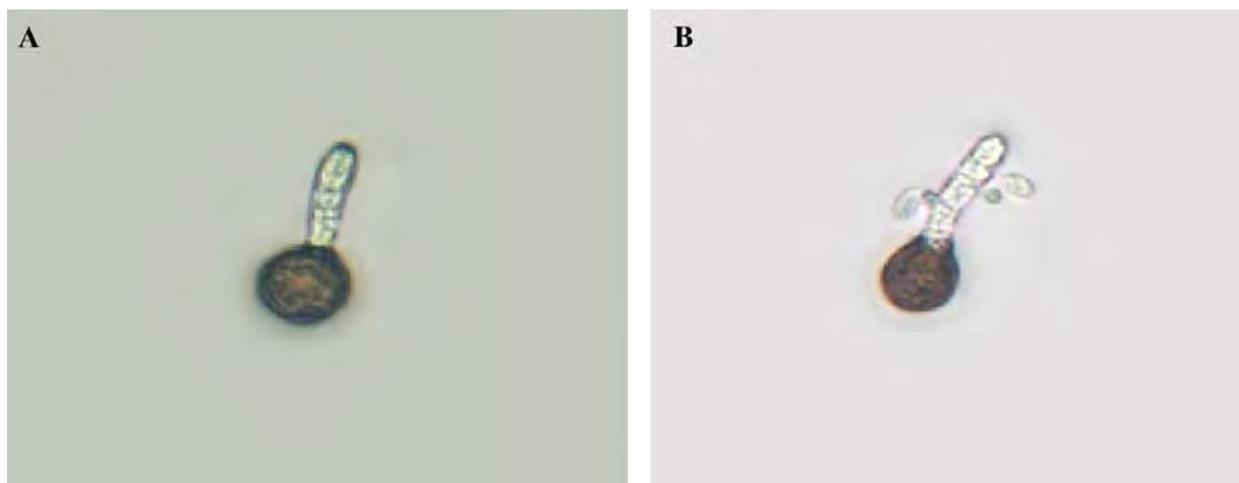


Figura 1. Teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae* en medio de cultivo PDA. A) Germinación de teliospora y desarrollo de basidio. B) Basidio con producción de basidiosporas. Colegio de Postgraduados, 2010.

Los porcentajes de germinación de teliosporas observados en esta investigación después de 48 h de incubación fueron superiores en 7 puntos porcentuales a los reportados por Osorio y Frederiksen (1998), quienes obtuvieron germinaciones máximas de 12% en PDA después de 48 h de incubación en oscuridad a 28 °C. Las diferencias podrían deberse a las condiciones de almacenaje, incubación y medio de crecimiento utilizado. Pai y Pan (1964) observaron que teliosporas de *S. reilianum* almacenadas por 30 d sobre papel húmedo a 30-35 °C germinaron a una tasa de 60-90 % en una solución de sucrosa 1 %; sin embargo, cuando se mantuvieron durante el mismo tiempo en un ambiente frío y seco, la germinación fue de 10 %. En el presente estudio teliosporas conservadas en bolsas de papel a 20±2 °C registraron un porcentaje máximo de germinación de 35.4 %.

Evaluación de los tratamientos de inoculación. En las plantas testigo y en las que resultaron libres de infección, después de cada tratamiento con el hongo, no se registró micelio ni alteraciones morfológicas en las células de los tejidos del mesocotilo (Figura 2A-2C). En contraste, en el mesocotilo de las plántulas

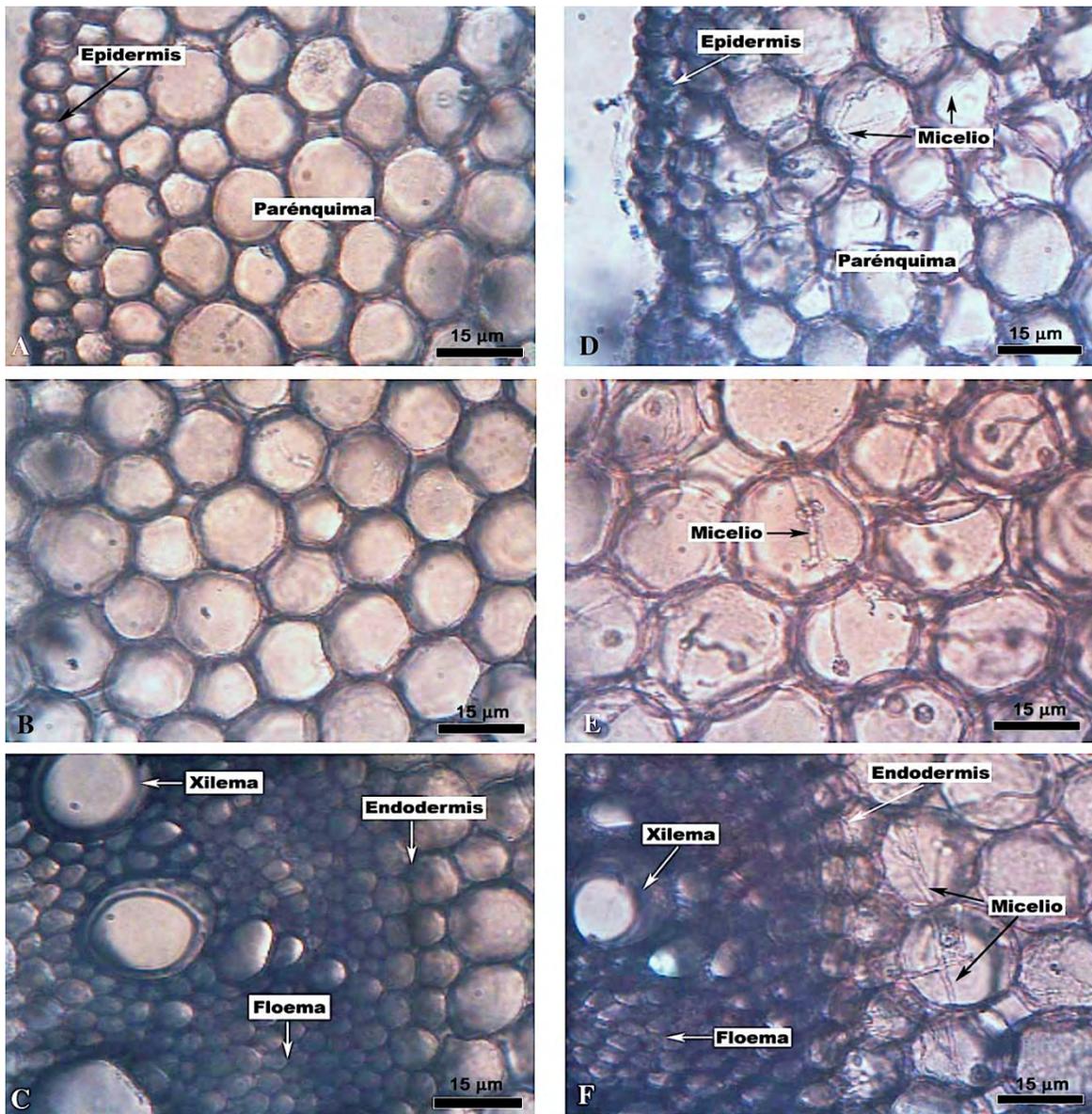


Figura 2. Cortes transversales de tejido del mesocotilo de plántulas de maíz 25 d después de la siembra. A-C) Tejido de plántula no infectada. D-F) Tejido de plántula infectada. A) Células de la epidermis y parénquima. B) Células del parénquima. C) Células de la endodermis y cilindro vascular. D y E) Células del parénquima infectadas con micelio de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. F) Micelio intracelular de *S. reilianum* f. sp. *zeae* infectando a células del parénquima cercanas a la endodermis. Colegio de Postgraduados, 2010.

infectadas, específicamente en el parénquima y la zona cercana a la endodermis, se observó micelio intracelular delgado (0.9-1.3 µm), liso y septado (Figura 2D-2F) correspondiente a *S. reilianum* f. sp. *zeae*, este se desarrolló sin causar alteraciones en las células colonizadas ni síntomas visibles; sin embargo,

no proliferó en el xilema y floema. Lo anterior coincide con lo reportado por Martínez *et al.* (1999), quienes observaron que las células infectadas del meristemo vegetativo tienen una actividad normal, por lo que el hongo actúa como un endófito biotrófico hasta el momento de la esporogénesis, la cual ocurre en el meristemo floral. Por su parte, Matyac (1985) reportó la presencia de micelio de *Sphacelotheca reiliana* en el floema y el xilema de plantas de maíz, esto contrasta con lo observado en este trabajo, ya que no se encontró micelio infectivo en esos tejidos.

En este estudio se observó que el método de tinción diferencial con azul de algodón a 0.5 % en lactofenol y safranina a 1 % en etanol a 70 %, desarrollado durante este trabajo, permite diferenciar los tejidos vegetales de la plántula de maíz y el micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae* resultando en una rápida identificación de plántulas infectadas cuando se realizan cortes transversales del mesocotilo a 25 d después de la siembra de semillas inoculadas, lo cual indica que a este período de tiempo el patógeno ya ha penetrado en el hospedante, esto coincidiendo con lo reportado por Martínez *et al.* (2002), quienes determinaron que a tres semanas después de la inoculación, plántulas cultivadas *in vitro* no presentan *zeae* el cual penetró a través de las células de la epidermis, y en algunos casos las células de la raíz fueron invadidas totalmente por el hongo.

Por otra parte, las plantas infectadas desarrollaron síntomas característicos de la enfermedad (Matyac y Kommedahl, 1985b; Pataky, 1999). A los 45 d después de la emergencia y a partir de la cuarta hoja, se registraron manchas cloróticas (1-2 mm de diámetro), tanto en la lámina foliar como en la nervadura central (Figura 3A). En cortes transversales de estas zonas cloróticas, se observó la presencia de micelio intracelular que fue más abundante en la zona con clorosis (Figura 3B). Observaciones similares fueron realizadas por Foster y Frederiksen (1977) y Martínez *et al.* (2002), quienes registraron el desarrollo de manchas cloróticas en hojas como el síntoma inicial en el desarrollo de la enfermedad en plántulas. En el presente trabajo, tanto las plántulas del cultivar CBT como las del híbrido AS-910 presentaron manchas cloróticas en etapas tempranas y posteriormente desarrollaron soros durante la etapa de floración. Por lo anterior, la aparición de estas pequeñas manchas cloróticas podría usarse como un indicador de la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en maíz. Previamente, Matyac y Kommedahl (1985b) usaron este síntoma como un indicador indirecto de la infección en plantas inoculadas artificialmente y

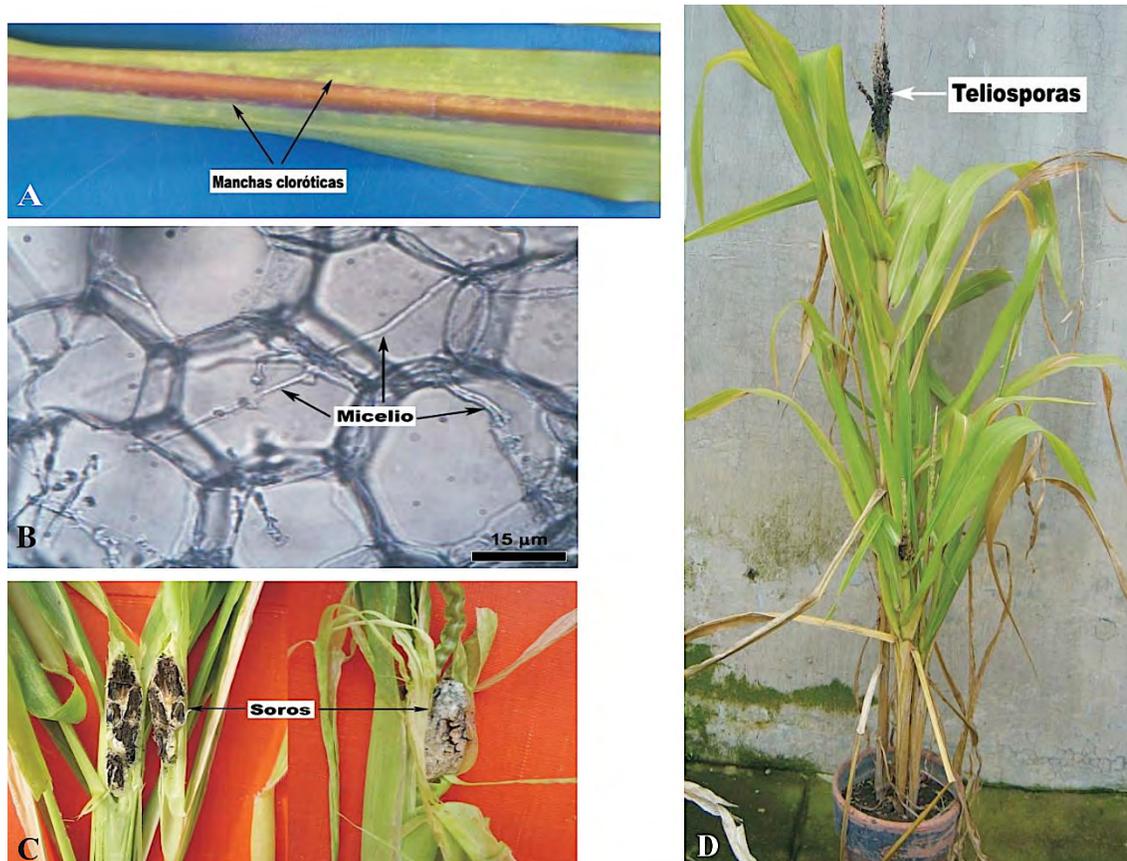


Figura 3. Material vegetal con síntomas y signos del carbón de la espiga del maíz por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. Material colectado de plantas del híbrido AS-910 desarrolladas a partir de semillas inoculadas con una suspensión de 1 % de carboximetilcelulosa de sodio y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} , incubadas en condiciones controladas de 25 °C con 12 h de luz. A) Hoja con manchas cloróticas en nervadura central y lámina foliar 45 d después de la emergencia. B) Tejido con crecimiento de micelio intracelular obtenido de la zona clorótica de la hoja. C) Soros formados en la mazorca, 102 d después de la siembra. D) Planta adulta con teliosporas en la panoja. Colegio de Postgraduados, 2010.

desarrolladas en invernadero. A los 102 d después de la siembra, se encontró formación de soros tanto en la panoja como en la mazorca de las plantas. Las panojas fueron parcialmente invadidas por el carbón, lo que afectó el desarrollo de las espiguillas y con ello la producción de polen (Figura 3D). Asimismo, en la mazorca no se presentó la formación de granos debido a que estos fueron reemplazados por el desarrollo de soros que contenían a las teliosporas (Figura 3C). La formación de teliosporas es el producto derivado de la esporogénesis, la cual inicia al momento de la inducción floral en maíz (Martínez *et al.*, 2002). El reemplazo total o parcial de las estructuras de la panoja y la mazorca por soros, es una de las principales características de la infección y del

desarrollo de la enfermedad por *S. reilianum* en maíz (Pataky, 1999; Matyac y Kommedahl, 1985a).

En esta investigación, además de la evidencia del micelio en el tejido del hospedante y la presencia de soros al final del experimento contó con la confirmación molecular de la identidad del micelio en las plántulas colectadas después de 25 d de siembra. Cuando se utilizó ADN de tejido vegetal de plántulas desarrolladas a partir de semillas inoculadas con *S. reilianum* f. sp. *zcae* se amplificó un segmento de 0.96 kb con los iniciadores SR1 y SR2. Este fragmento también se amplificó a partir de ADN de un cultivo puro del hongo desarrollado en medio de cultivo de PDA. El tamaño de las bandas obtenidas de 0.96 kb coincide con el reportado por Xu *et al.*, (1999) para *S. reilianum* f. sp. *zcae*. En contraste, ninguna banda se registró con las muestras de ADN de tejido vegetal de plántulas desarrolladas a partir de semillas no inoculadas con el hongo (Figura 4).

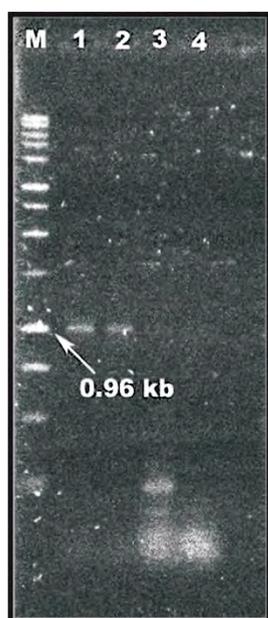


Figura 4. Productos de amplificación mediante PCR empleando el par de iniciadores SR1 y SR2; M. marcador molecular 1 kb; 1. ADN de colonias desarrolladas en medio de cultivo; 2. ADN de tejido vegetal de plántulas de maíz desarrolladas a partir de semillas inoculadas con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zcae*; 3. ADN de tejido vegetal de plántulas de maíz desarrolladas a partir de semillas no inoculadas con el hongo; 4. Agua. Colegio de Postgraduados, 2010.

El ANOVA detectó diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación, evaluados mediante el porcentaje de plántulas infectadas con micelio de *S. reilianum* f. sp. *zcae* a 25 d después de la siembra (Cuadro 1). Tanto el cultivar CBT como el AS-910 presentaron infección cuando las semillas se

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

Tratamiento	Infección de plántulas de maíz (%)	
	Criollo Blanco de Toluca	Híbrido AS-910
1) Carboximetil-celulosa de sodio	93.3 a ^z	96.6 a
2) Cápsulas	6.6 b	20.0 b
3) Adyuvante	0.0 b	6.6 b
4) Dispersante	0.0 b	6.6 b
5) Semilla impregnada	10.0 b	13.3 b
6) Semilla con daño	0.0 b	0.0 b
7) Esmalte	6.6 b	13.3 b
8) Testigo	0.0 b	0.0 b

^zMedias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

inocularon con NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . Este tratamiento registró medias de 93.3 y 96.6 % de infección en CBT y AS-910, respectivamente, superando a los demás. Estos porcentajes de plántulas infectadas fueron superiores a los reportados por Baggett y Koepsell (1983), quienes al inocular semillas de maíz dulce de un cultivar susceptible, con metilcelulosa y teliosporas de *Sphacelotheca reiliana* obtuvieron como máximo 54.5 % de infección en campo. Por otra parte, la inoculación con cápsulas, semilla impregnada y esmalte produjo infección de plántulas en ambos materiales de maíz, pero sin ser significativamente diferentes del testigo.

CONCLUSIONES

La inoculación de semillas de maíz con una suspensión a 1 % de carboximetilcelulosa de sodio y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, induce un 96.6 % de plántulas infectadas.

El método de tinción diferencial con azul de algodón a 0.5 % en lactofenol y safranina a 1 % en etanol a 70 % aplicado en cortes transversales del mesocotilo de plántulas de maíz a 25 d después de la siembra, es efectivo para diferenciar el micelio de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* de los tejidos de la planta.

Agradecimientos

Al proyecto PM 0541 y PM 0542 “Desarrollo de cultivares de maíz (*Zea mays*) para el Altiplano de México con alto rendimiento y resistencia al car-

bón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), financiado por la Dirección General de Sanidad Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 176171 para el primer autor.

LITERATURA CITADA

- Aquino MJG, Sánchez FA, González HA y Sánchez PJR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:39-49.
- Baggett JR and Koepsell PA. 1983. Field inoculation of sweet maize with the head smut pathogen (*Sphacelotheca reiliana*). *Hortscience* 18:67-68.
- Craig J and Frederiksen RA. 1992. Comparison of sorghum seedling reactions to *Sporisorium reilianum* in relation to sorghum head smut resistance classes. *Plant Disease* 76:314-318.
- Foster JH and Frederiksen RA. 1977. Symptoms of head smut in maize seedlings and evaluation of hybrids and inbreds. In: Progress Report, Texas Agricultural Experimental Station. 3423: January, 1-4.
- Gilchrist SL, Fuentes DG, Martínez CC, López ARM, Duveiller E, Singh RP, Henry M y García AI. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT. 8-9 pp.
- Ingold CT. 1994. Products of teliospore germination in *Sporisorium* spp. *Mycological Research* 98:467-473.
- Martinez CA, Roux C, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94:505-514.
- Martinez CA, Jauneau C, Roux C, Savy C and Dargent R. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Protoplasma* 213:83-92.
- Martinez C, Roux C and Dargent R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Phytopathology* 89:247-253.
- Martinez RJL y Ledesma MJ. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en el Valle de Zapopan, Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8:68-70.
- Matyac CA. 1985. Histological development of *Sphacelotheca reiliana* on *Zea mays*. *Phytopathology* 75:924-929.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985a. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on maize. *Phytopathology* 75:577-581.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985b. Occurrence of chlorotic spots on maize seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. *Plant Disease* 69:251-254.
- Metha BK. 1967. Evaluation of physiological specialization in *Sphacelotheca reiliana*. *Phytopathology* 57:925-928.
- Osorio JA and Frederiksen RA. 1998. Development of an infection assay for *Sporisorium reilianum*, the head smut pathogen on sorghum. *Plant Disease* 82:1232-1236.
- Pai CK and Pan SF. 1964. Studies on factors influencing the germination of the chlamydospores of *Sphacelotheca reiliana*. *Acta Phytopathologica Sinica* 7:53-60.
- Pataky JK. 1999. Smuts. In: Compendium of maize diseases (White D.G., ed). 3rd. Edition. APS Press. Saint Paul, Minnesota, USA. 33-35 pp.
- Pradhanang PM and Ghimire SR. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. *Tropical Agriculture* 73:325-328.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC USA. 1028 p.
- Stienstra WC, Kommedahl T, Stromberg EL, Matyac CA, Windels CE and Morgan F. 1985. Suppression of maize head smut with seed and soil treatments. *Plant Disease* 69:301-302.

- Stromberg EL, Stienstra WC, Kommedahl T, Matyac CA and Windels CE. 1984. Smut expression and resistance of maize to *Sphaelotheca reiliana* in Minnesota. *Plant Disease* 68:880-884.
- Whyte IV and Gevers HO. 1988. Diallel analysis of resistance of eight maize inbred lines to *Sphaelotheca reiliana*. *Phytopathology* 78:65-68.
- Wright PJ, Fullerton RA and Koolaard JP. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetmaize (*Zea mays*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34:23-26.
- Xu ML, Melchinger AE and Lübberstedt T. 1999. Species- specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. *Plant Disease* 83:390-395.

1.4. Confirmación de la identidad de *Exserohilum turcicum*, agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa

Rubén Félix-Gastélum*, Glenda Judith Lizárraga-Sánchez, Universidad de Occidente, Unidad Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, Bulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n Los Mochis, Sinaloa, CP. 81223, México; Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza, Karla Yeriana Leyva-Madriral, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-IPN Unidad Sinaloa. Departamento de Biotecnología Agrícola. Bulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. Guasave, Sinaloa, CP. 81101, México; Gabriel Herrera-Rodríguez, Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte. Lázaro Cárdenas, PTE. 315, Colonia Centro, Los Mochis Sinaloa, CP. 81200, México; Silvia Espinoza-Matías, Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Delegación Coyoacán. CDMX, CP. 04510. *Autor para correspondencia: ruben.felix@udo.mx.

Resumen

Las enfermedades de origen fungoso constituyen una limitante en la producción de maíz en Sinaloa, México. En ciclos agrícolas recientes, una enfermedad foliar ha ocurrido en niveles epidémicos en la región costera del Norte de Sinaloa. Los síntomas de la enfermedad se asemejan a los causados por *Exserohilum turcicum* previamente reportados en los valles altos en estados de la Mesa Central de México y otras partes del mundo con clima subtropical o templado. El objetivo de ésta investigación fue confirmar la identidad de *E. turcicum* asociado al tizón foliar del maíz y evaluar la severidad de la enfermedad en 17 híbridos de maíz en lotes comerciales. Variación en color y morfología de los aislados se observó en diferentes medios. El medio extracto de maíz-agar fue el más favorable para el desarrollo micelial de los aislados. En pruebas de patogenicidad, los aislados exhibieron variación en patogenicidad en el híbrido comercial de maíz DK-3000. Los postulados de Koch se cumplieron mediante el re-aislamiento del patógeno de las plantas inoculadas. Aun cuando el teleomorfo (*Setosphaeria turcica*) no se observó, estudios morfométricos y moleculares confirmaron la identidad de *E. turcicum* como agente causal del tizón del maíz. Los híbridos de maíz mostraron una severidad diferencial de

la enfermedad, lo cual estuvo relacionado con periodos prolongados de alta humedad relativa. Estudios futuros deberían enfocarse a la determinación de las *formae specialis* importantes para la implementación de un programa de mejoramiento genético para el control de la enfermedad.

Palabras clave: hongo, patogenicidad, severidad, anamorfo, identificación, morfología.

En ciclos agrícolas recientes, una severa enfermedad foliar atacó a varios híbridos de maíz en niveles epifíticos en las regiones costeras del norte de Sinaloa en los meses entre noviembre y enero, que incluyeron periodos diarios con humedad relativa $\geq 90\%$ por 13-17 h, y una temperatura diaria promedio de entre 18 y 26 °C. Los síntomas de la enfermedad se desarrollaron inicialmente en las hojas inferiores, causando lesiones ovaladas, largas, elípticas, verde grisáceo o marrones de diferentes tamaños. Más tarde, los síntomas alcanzaron a las hojas medias y superiores de las plantas. Si bien todavía están por determinarse las pérdidas de rendimiento, observaciones personales del autor indican que la enfermedad ha destruido hasta 65% del follaje de algunos híbridos comerciales de maíz sembrados en la región costera del norte del estado. Aunque el tizón foliar del maíz causado por *Exserohilum turcicum* (Et) es una de las enfermedades foliares más importantes en el maíz sembrado en México, hoy en día no existe suficiente evidencia científica acerca de la etiología de la enfermedad, aunque los productores de maíz y asesores de campo demuestran interés en determinar su etiología. En consecuencia, el objetivo principal del presente estudio fue confirmar la identidad del agente causal del tizón foliar del maíz a nivel de especie, con base en datos morfométricos y moleculares del anamorfo.

Quince muestras sintomáticas fueron colectadas del mismo número de campos de maíz en los municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa, entre el 16 de diciembre de 2013 y el 15 de enero de 2014. Una muestra de cada campo consistió en cinco hojas sintomáticas recolectadas de las esquinas y el centro de cada campo (n=25). Fragmentos de hojas sintomáticas (5-6 cm de longitud) fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% por 2 min, lavados por 3 min en agua destilada estéril y secados con papel de filtro Whatman Núm. 1. Los fragmentos fueron colocados en una cámara húmeda por 48 h a 25 °C. De los conidios formados en el tejido de las hojas se

obtuvieron cultivos monospóricos a través de su transferencia con una aguja de disección a placas de Petri con papa dextrosa y agar (PDA), bajo un microscopio de disección.

Se evaluó el crecimiento micelial de ocho aislados monoconidiales del hongo en los siguientes medios de cultivo: papa dextrosa agar (PDA), Czapek-Dox Agar (CDA), glucose peptona agar (GPA), agar sintético de Richards (ASR) y extracto de hoja de maíz agar (EHMA) (Dhingra y Sinclair, 1985). Después de ocho días de incubación, bajo un régimen de luz por 14 h y 10 h de oscuridad a 25 °C, el color de la superficie de las colonias del hongo en los diferentes medios de cultivo variaron de oliváceo y verde olivo grisáceo.

Todos los aislados presentaron una pigmentación de color verde oliva claro en el reverso del cultivo en CDA y ASR, aunque no se observó pigmentación en otros medios. La tasa de crecimiento micelial radial de los aislados en EHMA fue de entre 3.7 y 4.9 mm/día y fue significativamente ($P \leq 0.05$) mayor al crecimiento en los otros medios. Hubo una interacción significativa ($P < 0.0001$) entre los medios de cultivo y el crecimiento radial de los aislados, indicando que las tasas de crecimiento de los aislados dependieron del medio. En PDA, los aislados produjeron de 1 a 3 conidios en la punta del conidióforo (Figura 1). Los conidios eran curvos, ahusados y alargados, con un promedio de cinco septas y una longitud de 44 a 110 μm (promedio de 85.3 μm) de 10 a 21 μm de ancho (promedio de 14.8 μm). No se observaron diferencias en la morfología entre aislados de *Et* obtenidos de hojas sintomáticas del maíz, y las características fueron consistentes con reportes previos (Tang *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2017).

Para observar los conidios bajo el microscopio electrónico, se cortaron fragmentos de 3.5 cm² de una colonia de un aislado (*Et3*) en PDA de 8 días de edad y se sumergieron en una solución (FAA: 10% formaldehído, 5% ácido acético, 50% dilución de etanol 96%, y 35% agua). Después de 48 h, las muestras fueron lavadas con agua de la llave por 10 minutos y enseguida fueron deshidratadas incrementando las concentraciones de etanol. Las muestras fueron deshidratadas hasta un punto crítico con CO₂ en una desecadora BAL-TEC CPD030. Las muestras fueron montadas en portaobjetos de aluminio sobre una tira de carbón conductivo y cubiertas con una fina capa de oro en un ionizador Denton Vacuum Desk II (Hofstra Group, Ltd. Co; Boston MA,

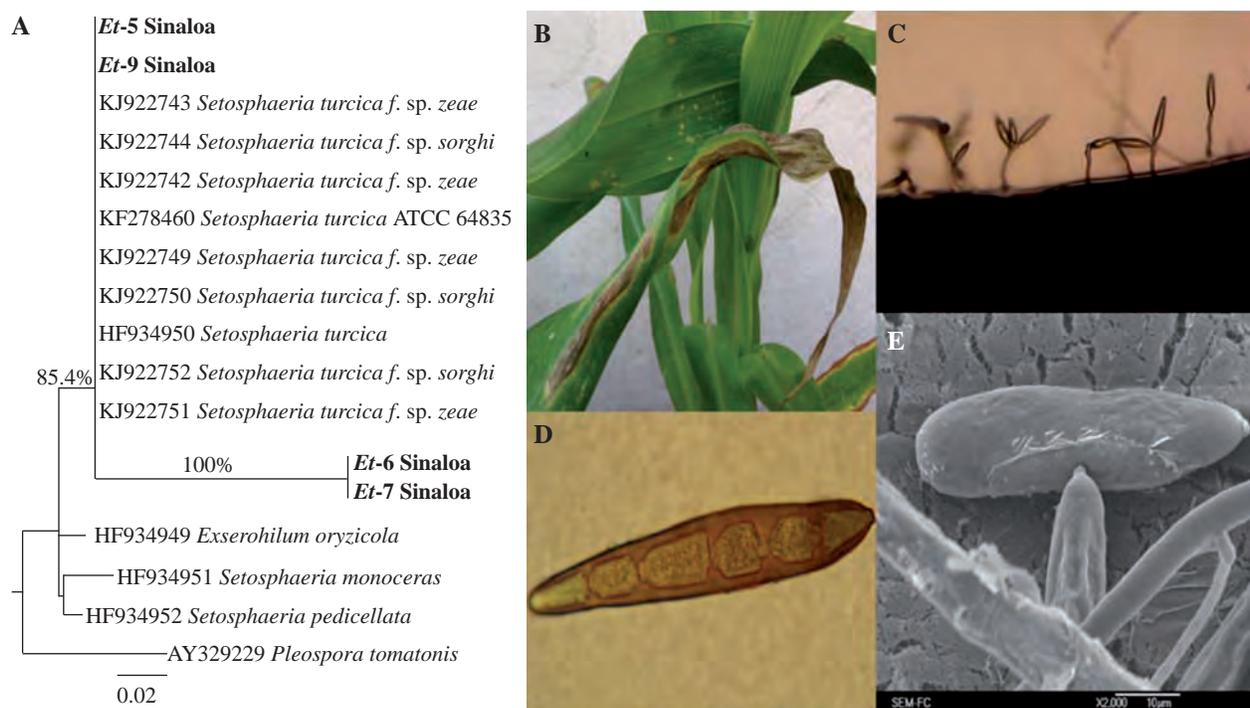


Figura 1. Análisis filogenético de aislados asociados al tizón foliar del maíz de Sinaloa. A) Árbol de verosimilitud (Log likelihood=-1276.64) basado en el traductor interno de espacios (ITS) de cuatro aislados de *Exserohilum* (*Setosphaeria* se refiere al telomorfo de *Exserohilum*). El árbol fue construido con Mega 6.06 (bootstrap = 1000), usando el modelo de sustitución Jukes-Cantor (JC) con sitios invariados (+I). Los aislados caracterizados en este estudio aparecen en negritas. La secuencia correspondiente de *Pleospora tomatonis* fue usada como un grupo externo *Et* = *E. turcicum*. Numero de accesión en la base de datos de las secuencias precede el nombre científico de los organismos. Los valores de bootstrap se muestran como porcentajes. La barra de escala indica el número esperado de sustituciones de aminoácidos. Morfología de *E. turcicum* del maíz (aislado *Et-2*). B) Lesiones de forma elíptica del tizón foliar del maíz en el híbrido DK-300 inoculado artificialmente con *E. turcicum* en invernadero. C) Mono conidióforo recto o curvo con uno a tres conidios. D) Conidio con forma de mazo, con célula basal protuberante en el punto de conexión. E) Micrografía con microscopio electrónico de barrido de un conidio liso con un hilum protuberante en un cultivo de 8 días en PDA.

USA). Finalmente, se tomaron fotografías de conidios bajo un microscopio electrónico JEOL JSM-53110 LV (Bozzola and Russell, 1999). Mediante estos procedimientos, las imágenes revelaron conidios lisos con un hilum prominente (Figure 1).

Para las pruebas de patogenicidad, se cultivaron ocho aislados monocloneales del hongo en PDA a 24 °C en la oscuridad por 9 días. Se agregaron tres mL de agua destilada estéril a los cultivos y el micelio y los conidios fueron desprendidos del medio usando un asa bacteriológica; enseguida se distribuyeron 0.2 mL de las suspensiones conidiales sobre una placa de Petri con PDA de un diámetro de 90 mm e incubadas a la misma temperatura. Las

placas inoculadas fueron selladas con película selladora (Parafilm®) y colocadas invertidas a 24 °C en la oscuridad por 9 días. Los conidios fueron raspados de la superficie del medio usando una espátula esterilizada y la suspensión de conidios fue filtrada a través de dos capas de malla quesera esterilizada para remover el micelio. Se probó la patogenicidad de ocho aislados fúngicos monoconidiales asociados con el tizón foliar del maíz en el híbrido comercial de maíz DK-3000, que presentó una alta incidencia de la enfermedad en el ciclo agrícola previo. Se ajustó cada suspensión de conidios a una concentración de 2×10^4 conidios/mL con agua destilada estéril y fueron asperjadas sobre cuatro plantas de maíz en estado de desarrollo VS5-6. Las plantas control fueron asperjadas con agua destilada estéril. Después de la inoculación, las plantas fueron colocadas en bolsas de plástico negras para asegurar una humedad relativa (HR) del 100% por 48 h e incubadas a una temperatura de entre 12 y 15 °C. Las plantas inoculadas y las testigo se distribuyeron en un arreglo completamente al azar con cuatro repeticiones (4 macetas 25 x 20 cm, cada una con una planta). Después, las plantas se sometieron a una HR de 100% por cinco días consecutivos por 12 h al día. La patogenicidad de los aislados fue determinada 14 días después de la inoculación, considerando el porcentaje de área foliar afectada (AFA). El experimento se realizó dos veces en un invernadero. La temperatura del invernadero fluctuó entre 8 y 26 °C, y 12 y 30 °C en el primer y segundo experimento, respectivamente. Para estandarizar los datos, los porcentajes de AFA fueron transformados usando la función de arcoseno. Los datos transformados fueron analizados usando ANOVA y la separación de medias se realizó mediante el procedimiento de Tukey (Little y Hills, 1973). Para cumplir el postulado de Koch, al concluir los de los periodos experimentales, el hongo fue aislado de las plantas inoculadas y su identidad fue confirmada por medio de la identificación morfológica de veinte conidios por aislado. Los ocho aislados de *Et* probados fueron patogénicos en el híbrido de maíz DK-3000. Se detectó variación en virulencia entre los aislados. Diez días después de la inoculación, las hojas de maíz presentaban lesiones típicas y síntomas de tizón foliar similares a los observados en campo (Figura 1). El AFA en las plantas inoculadas varió entre 9.5 y 54.1% y entre 9.0 y 26.9%, con diferencias significativas ($P=0.05$) entre aislados en el primer y segundo experimento, respectivamente. Las plantas control asperjadas con agua destilada estéril permanecieron asintomáticas a lo largo del estudio.

Para la caracterización molecular, la región ITS rDNA fue amplificada usando los primers universales ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')

e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). La PCR se realizó en un volumen de 25 µL con un template de ADN de 1 ng, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM de cada dNTP, 0.4 µM de cebadores sentido y antisentido y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Brazil, Cat. No. 11615-050). El termociclador se programó para la desnaturalización inicial a 95 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C, anillado a 54 °C, extensión a 72 °C, cada uno por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (1% w/v en 0.5 X TAE) y visualizados por tinción de bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron purificados con el equipo de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Cat. No. 28106) y cuantificados usando un Nanodrop 2000. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones con un secuenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems, USA). Las secuencias fueron editadas en CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) y comparados con las secuencias en el NCBI (Centro Nacional para la Investigación Biotecnológica) usando el software BLAST-N y el algoritmo Megablast. Todas las secuencias fueron depositadas en el GenBank bajo los números de accesión KT253948-KT253952. Para la alineación y el análisis filogenético se usó el MEGA 6.06. Las secuencias fueron alineadas con las secuencias de referencia de especies *Exserohilum/Setosphaeria* (Tang *et al.*, 2015), usando el programa de alineación MUSCLE. Múltiples alineaciones fueron sujetas a un análisis de modelo de sustitución de ADN en MEGA para seleccionar el modelo que mejor se ajustara a los datos. Se creó un árbol filogenético usando el modelo Jukes-Cantor (JC) y el modelo de verosimilitud (ML). La variación de la tasa entre sitios fue modelado por una proporción de sitios invariantes (I). El apoyo de la topología del árbol fue evaluado por 1000 réplicas bootstrap.

Secuencias de *S. turcica* (teleomorfo de *Et*) y de diferentes especies de *Setosphaeria/Exserohilum* (*E. oryzae*, *S. monoceras*, *S. pedicellata*) fueron usadas para llevar a cabo el análisis filogenético. Las secuencias de *S. turcica* incluyeron aislados obtenidos del maíz (HF934950, KF278460; secuencia del cultivo de referencia, ATCC64835), algunos de éstos fueron identificados como *formae specialis zeae* (todos los números KJ Genbank excepto por KJ922752) y de sorgo identificadas como *formae specialis sorghi* (KJ922752) (Tang *et al.*, 2015). El árbol filogenético de verosimilitud generado con las secuencias ITS rDNA demostraron que los aislados de Sinaloa guardan estrecha relación con secuencias de *S. turcica* obtenidas de maíz y sorgo (Tang *et al.*, 2015). Estas secuencias están claramente separadas de otras especies *Exserohilum/Setosphaeria*

(Figura 1). Los aislados *Et-6* y *Et-7* fueron diferentes del resto de las secuencias *Et* incluidas, aunque igualmente agrupadas dentro de *S. turcica*.

Las características de las colonias y la morfometría de los conidios, y la secuenciación de la región ITS rDNA del anomorfo indicaron que *E. turcicum* [(Pass.) (Leonard y Suggs)] (syn. *Helminthosporium turcicum* Pass.) es el agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa, tal como se ha reportado en otras áreas productoras de maíz del mundo (Shi *et al.*, 2017). El análisis llevado a cabo no permite discriminar al nivel del *formae specialis*. Estudios recientes han demostrado la utilidad de la reacción en cadena de polimerasa cebada universalmente (UP-PCR) para caracterizar la diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre los *formae specialis* de *Et* (Tang *et al.*, 2015). En el futuro, este enfoque será útil en el proceso de discriminación de la existencia de *formae specialis* en Sinaloa.

La severidad del tizón foliar de maíz fue evaluado en 115 parcelas comerciales que variaban desde el estado de espigamiento hasta grano masoso en los municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa en la temporada de cultivo 2013-2014. Las parcelas inspeccionadas iban desde las 10 hasta las 50 ha. Cada parcela fue muestreada en las 4 esquinas y en el centro para la severidad de la enfermedad; diez plantas fueron extraídas de cada punto de muestreo y una hoja fue tomada al azar de las plantas, para un total de 150 hojas por cada parcela. El porcentaje promedio de área foliar afectada (AFA) fue determinado usando una escala del 0 al 4, donde 0= ninguna lesión detectable, 1= algunas lesiones en las hojas ($\leq 5\%$), 2= varias lesiones pequeñas y grandes en muchas hojas (5.1-10%), 3= lesiones en muchas hojas (10.1-15%), 4= muchas lesiones grandes (15.1-20%). Diez hojas sintomáticas de cada parcela fueron colocadas en una hielera (8-10 °C) y llevadas al laboratorio para determinar si *E. turcicum* estaba asociada a la enfermedad. La presencia del hongo en tejido sintomático fue confirmada por la observación de conidios bajo el microscopio estereoscópico y compuesto.

La severidad de la enfermedad, reflejada como porcentaje de AFA, varió con los híbridos y las ubicaciones. El híbrido P3254W presentó la severidad más alta, particularmente en los sectores de Despensa-Bolsa de Tosalibampo No. 2, Olas Altas-Bachomobampo, San Isidro-Grullas Derecha, Ahome-Grullas Izquierda y Concheros-9 de Diciembre, con porcentajes de AFA de 17.3, 13.3, 9.0, 7.6 y 3.5%, respectivamente. El mismo híbrido presentó una

severidad reducida de la enfermedad en los sectores Águila Azteca-El Guayabo, El Fuerte, 5 de Mayo-Sufragio, Santa Rosa-Los Tercos con un AFA de 3.2, 0.8, 0.4, 0.0 %, respectivamente. Los híbridos XR56 y Máximo presentaron un AFA de 11.0% en el sector Olas Altas-Bachomobampo, donde el híbrido P3254W presentó la mayor severidad. Los híbridos DK 2030, Sultán, Gorilla, DK.2038, N1R01, P3254W, XR47, Garañón, MN1078, Caribú, DK3000, Máximo, DK 2036, Máximo y DS2301 presentaron un porcentaje promedio de AFA de entre 0.0 y 4.6 %. Los episodios diarios acumulados, en horas, con la humedad relativa (HR) $\geq 90\%$ en el sector Despensa-Bolsa de Tosalibampo No2 del 16 de diciembre de 2013 al 1 de enero de 2014, donde el híbrido P3254W mostró la mayor severidad de tizón foliar, alcanzó las 317 hr mientras que en el sector 5, de Mayo-Sufragio, dichos periodos de fueron de 184 hr y el mismo híbrido presentó un AFA de 0.4%. En general, se observó una reducción gradual de tizón foliar del maíz, independientemente del híbrido a medida que aumentaba la distancia a partir de la costa y la elevación de 4 a 100 km y de 0 a 80 msnm, respectivamente.

CONCLUSIONES

La identidad de *E. turcicum*, consistentemente asociado al tizón foliar del maíz en Sinaloa, fue confirmado mediante medidas morfométricas de los conidios, morfología de las colonias, técnicas moleculares y pruebas de patogenicidad. El presente estudio establece el punto de partida para investigaciones futuras orientadas a la variación patogénica de *Et*, que es fundamental en programas de mejoramiento para obtener híbridos de maíz resistentes para el manejo de la enfermedad.

La alta dependencia del patógeno de la humedad relativa alta fue evidente, ya que la severidad de la enfermedad en el híbrido más susceptible fue conspicuo en sectores con periodos prolongados de humedad relativa $\geq 90\%$, aunque se redujo paralelamente con la reducción de periodos con humedad relativa a dichos niveles.

LITERATURA CITADA

- Bozzola JJ and Russell LD. 1999. Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists. Jones and Bartlett Publishers. London, UK. 670 p.
- Dhingra OD and Sinclair JB. 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. 355p.
- Little TM and Hills FJ. 1973. Agricultural Experimentation and Analysis. John Wiley and Sons, New York, USA. 350p.
- Shi NN, Du YX, Ruann HC, Yang XJ, Dai YL, Gan L, Chen FR and Liu XZ. 2017. First report of northern corn leaf blight caused by *Setosphaeria turcica* on Corn (*Zea mays*) in Fujian Province, China. Plant Disease 101:831. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-0942-PDN>
- Tang L, Gao ZG, Yao Y and Liu X. 2015. Identification and genetic diversity of formae speciales of *Setosphaeria turcica* in China. Plant Disease 99:482-487. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0570-RE>



SEM-FC

X2,000 10µm

1.5. Germinación de esclerocios y formación de ascoporas de *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez

Moreno-Manzano, Celeste E¹, De León-García de Alba, Carlos^{1*}, Nava-Díaz, Cristian¹ y Sánchez-Pale, Ricardo². ¹Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. ²Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México. *Autor de correspondencia: cdeleon@colpos.mx

Resumen

La enfermedad “diente de caballo” del maíz (*Claviceps gigantea*) afecta hasta 90 % del grano. Se estudiaron condiciones para germinación de esclerocios, formación de estructuras sexuales y se describe parte del ciclo del hongo en laboratorio y campo. Se estableció un diseño con sustrato y tiempo de incubación a 4 °C. Se evaluaron porcentaje de esclerocios germinados, tiempo de germinación y formación de cabezuelas estromáticas. En laboratorio, los esclerocios germinaron solamente en carbón residual después de 3 meses a 4 °C y 2 meses a 22-24 °C de incubación resultando en 55 % de germinación. Esclerocios germinados producen en promedio cinco cabezuelas por esclerocio 15 d después de la aparición de los primordios. En campo, los primordios aparecieron cuando los esclerocios se incubaron 3 meses a 4 °C y 64 d a temperatura promedio de 14.07 °C. En campo y laboratorio, la liberación de ascoporas se observó 23 d después de aparecer de los primordios. La aparición de cabezuelas estromáticas, su desarrollo y maduración en el mismo esclerocio no fué sincronizado. Se documentó la liberación de ascoporas largas y delgadas emergiendo de cabezuelas estromáticas. El patógeno se identificó morfológica y molecularmente como *Claviceps gigantea*.

Palabras clave: Diente de caballo en maíz, clavicipitales, identificación-morfológica, biología de patógenos.

El maíz continúa siendo el alimento básico de los mexicanos. Del total de 23.3 Mt que se producen en el país, aproximadamente 20 % de éste se produce en el altiplano, incluyendo los estados de México, Puebla y Michoacán (SAGARPA-SIAP, 2014), localidades en donde se presentan baja temperatu-

ra y alta humedad, condiciones idóneas para que se presente la enfermedad causada por el hongo *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.* (anamorfo *Sphacelia* sp.) conocida por los agricultores como “diente de caballo”, debido a la forma que toman los granos infectados. Recientemente, la enfermedad ha aumentado su incidencia y distribución limitando la calidad del grano producido, afectando hasta 90 % de la cosecha, especialmente en híbridos comerciales. Además del daño al grano, el hongo produce toxinas alucinógenas del grupo del ácido lisérgico.

El primer reporte de la enfermedad diente de caballo en maíz (*Zea mays* L.), causada por *C. gigantea* lo realizaron Fuentes y De la Isla (1961) y Fuentes *et al.* (1964), quienes describieron el agente causal. Esos autores reportaron la enfermedad en los valles altos de Toluca y Amecameca en el estado de México y en la sierra Tarasca de Michoacán (Fuentes *et al.*, 1964); en estos dos estados se produce aproximadamente 17 % del maíz para grano de todo el país (SAGARPA-SIAP, 2014). Los síntomas característicos de la enfermedad se observan al final del ciclo del cultivo, en el ápice de las mazorcas las brácteas se abren y dejan al descubierto estructuras fungosas de color castaño que corresponden a los esclerocios (Figura 1A), que remplazan a los granos (Fuentes y De la Isla, 1961; Osada *et al.*, 1986).

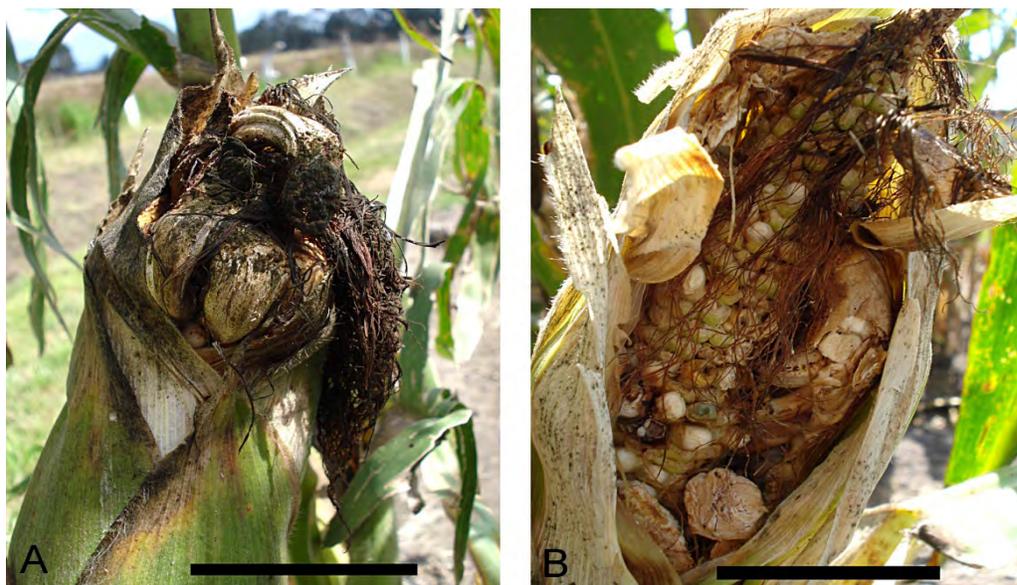


Figura 1. Mazorcas de maíz infectadas con *Claviceps gigantea*, en el municipio de Almoloya de Juárez, México. A) parte apical de la mazorca con esclerocios que emergen rompiendo las brácteas y, B) daño en granos aledaños a los esclerocios.

En el Valle de Toluca, Moreno y Fucikovski (1972) documentaron incidencia de 42.3 a 61.5 % en tres híbridos comerciales de maíz. En cuantificaciones de pérdidas en grano causadas por la enfermedad en las zonas productoras de maíz en Metepec y Calimaya, México, los agricultores Sres. Alfredo Vásquez y Juan Manuel Pereyra, informaron que en sus parcelas, en el ciclo de cultivo de 2012, se registraron pérdidas de grano del 70 y 90 % en siembras con los híbridos comerciales Aspros 910 (Aspros) y Quetzal (De Kalb), respectivamente (Figura 2).



Figura 2. Incidencia de diente de caballo en mazorcas de maíz producidas en lotes de agricultores sembradas con híbridos comerciales susceptibles durante el ciclo de cultivo 2012. Se ha recomendado a los agricultores recoger y quemar las mazorcas afectadas para evitar la diseminación del inóculo en sus terrenos.

Según Fucikovsky y Moreno (1971), ésta enfermedad puede reducir significativamente la producción ya que el hongo reemplaza al grano afectando el aspecto y germinación de los granos cercanos al esclerocio (Figura 1B). Además, la contaminación del grano con esclerocios penaliza el precio del grano durante su comercialización pues contiene alcaloides tóxicos, como otras especies de *Claviceps* (Osada *et al.*, 1986). Poco se sabe del ciclo biológico de *C. gigantea* y de las condiciones ambientales que lo afectan. De la Isla y Fuentes (1963), Fuentes *et al.* (1964), Agurell *et al.* (1963) y Osada (1984) reportaron la germinación de los esclerocios de *C. gigantea* después de haberlos sometido

a desinfección, incubación a altas y bajas temperaturas y períodos de luz-oscuridad simulando condiciones de campo, y utilizando como sustrato arena estéril, húmeda. Sin embargo, aun no se ha documentado el ciclo biológico del patógeno y el tiempo que requiere cada fase de desarrollo, lo que tiene importantes repercusiones en el manejo integrado del patógeno. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) determinar el tiempo de germinación de los esclerocios y la formación de peritecios, ascas y liberación de ascosporas de *C. gigantea* en condiciones de laboratorio y en campo, 2) crecimiento de ascosporas en medio de cultivo y, 3) confirmar la identidad del patógeno mediante morfología y técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de esclerocios

Para inducir la germinación de esclerocios en laboratorio se usaron esclerocios colectados en los municipios de Almoloya de Juárez (19° 33' 01" N - 99° 56' 13" O), Calimaya (19° 10' 25" N - 99° 37' 02" O) y Villa Victoria (19° 26' 00" N - 100° 00' 00" O), en el estado de México, durante noviembre - diciembre del 2012. Los esclerocios colectados se almacenaron a 4 °C durante tres meses. Los esclerocios se clasificaron por tamaño, se lavaron con detergente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) 1.5 % por 2 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se secaron sobre papel absorbente durante 24 h (CMI, 1974).

Germinación de esclerocios en laboratorio

Se desinfectaron botellas de polietileno tereftalato glicol (PET, producido por Amacor Plastic Containers de México, S. A. de C. V) de 500 mL con alcohol etílico 96 %. A éstos frascos se agregaron 20, 35, 40 y 70 g de cada uno de los siguientes sustratos: 1) suelo de Almoloya, Calimaya o Villa Victoria, 2) carbón comercial, 3) carbón residual, 4) avena, y 5) testigo sin sustrato. A todos los frascos se adicionaron 75 ml de agua destilada estéril. En cada frasco se colocaron tres esclerocios. Los frascos se colocaron en un cuarto frío a 4 °C durante 1, 2, 3, 4 y 6 meses. Después, se incubaron a temperatura ambiente (22-24 °C) por 2 meses y todas las variables se monitorearon diariamente.

Las variables evaluadas fueron el tiempo a la emisión de los estípites (germinación), tiempo para desarrollo de los estípites y tiempo para la formación de cabezuelas. La descarga de ascosporas se monitoreó mediante tres métodos: 1. Observación directa cada 2 h utilizando un microscopio estereoscópico (Olympus SL2 ILST), 2. Observación cada 8 h de ascosporas capturadas en un portaobjetos (Corning 75x25 mm) cubiertos de azul de lactofenol colocados en la tapa de frascos PET y, 3. Observación cada 24 h de esporas capturadas en 6 ml de agua destilada estéril contenida en la tapa de una caja Petri (6 cm de diámetro) colocada en el fondo de los frascos PET invertidos fijando los esclerocios en la base usando paraplást.

El diseño experimental fue de un ensayo factorial 5x3 con sustratos y tiempos de incubación a 4 °C como los factores. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. La unidad experimental fue un frasco cilíndrico con el sustrato y tres esclerocios. El experimento completo se repitió dos veces.

Germinación de esclerocios en campo

En junio de 2013, los esclerocios almacenados a 4°C durante tres meses, se colocaron sobre suelo de cultivo del rancho El Rosedal (Km 13.5 carretera Toluca-Atlacomulco, municipio de Atlacomulco, estado de México. (19° 24' 19.28" N y 99° 43' 12.84" O), cuando el cultivo de maíz (Aspros HC8) tenía tres semanas de siembra. Cuatro armazones de 40x40x40 cm con paredes de malla de alambre (1 cm²) se distribuyeron al azar en la parcela. Cada armazón contenía 30 esclerocios (Pedroza-Sandoval, 2010). Las variables en los esclerocios colocados en el campo se monitorearon semanalmente. Una vez germinados, los esclerocios se transfirieron a un frasco de PET de 2 L que contenía 3 cm de suelo en la base del frasco donde las variables se observaron diariamente. Los datos climatológicos se obtuvieron de la estación Arroyo, municipio Almoloya de Juárez, México (19° 24' 34.92" N, 99° 44' 12.12" O) perteneciente a la Red Nacional de Estaciones del INIFAP. Las variables evaluadas diariamente fueron tiempo de emisión de estípites, desarrollo completo de los estípites, formación de cabezuelas y peritecios y descarga de ascosporas con los métodos descritos anteriormente.

Cortes histológicos de cabezuelas estromáticas

Con la finalidad de observar las estructuras sexuales (peritecios, ascas y ascosporas) formadas en las cabezuelas obtenidas se realizaron cortes histo-

lógicos a mano con navaja de afeitar. Los cortes obtenidos se colocaron en un portaobjetos con azul de lactofenol para ser documentados utilizando un fotomicroscopio III Carl Zeiss adaptado con una cámara digital PAXcam3. Adicionalmente, las cabezuelas se fijaron en FAA (formaldehído : ácido acético glacial : alcohol, 1:1:1) por 24 h (Kulkarni, 1963). Las muestras se enjuagaron con agua corriente por 20 min para eliminar el fijador y se deshidrataron en una serie de concentraciones de etanol (10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 %) durante 3 h en cada concentración. Para la deshidratación e inclusión en parafina se siguió el protocolo descrito por López *et al.* (2005). Los cortes de tejido se realizaron con un micrótopo de rotación (American Optical Mod. 820) a 10 µm de grosor. Las secciones fueron fijadas en los portaobjetos, se removió la parafina y se tiñeron con safranina-verde rápido (López *et al.*, 2005). Los cortes se documentaron y midieron usando un microscopio óptico (VELAB modelo: VE-B6) equipado con una cámara digital Moticam 2300 (3.0 M Pixel USB 2.0) y el software de procesamiento de imágenes Motic MC Camara 1.1. Las medidas del largo y ancho de las ascas, ascosporas y peritecios se evaluaron en una muestra de 30 individuos (Pedroza-Sandoval, 2010) y las dimensiones fueron comparadas con las reportadas en la literatura (Fuentes *et al.*, 1964).

Crecimiento en medio de cultivo

Para evaluar el crecimiento *in vitro* del hongo, las cabezuelas estromáticas en plena descarga de ascosporas se lavaron con detergente en polvo, se enjuagaron con agua destilada estéril, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1.5 % por 2 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Las cabezuelas se cortaron con navaja de afeitar esterilizada y las secciones se colocaron en 5 mL de agua destilada estéril. Con el propósito de observar el efecto de tratamiento térmico en la germinación de las ascosporas, una vez verificada su presencia, la muestra se dividió en dos partes iguales utilizando una pipeta Pasteur esterilizada, una parte se sometió a calor (50°C por 3 min), mientras que la otra no tuvo tratamiento térmico. Se tomaron 100 µL de la suspensión de ascosporas de cada tratamiento, y se dispersaron en los siguientes medios de cultivo: 1) papa dextrosa agar (PDA; Bioxon®), 2) agar harina de maíz (AHM; Bioxon®), 3) extracto de malta agar (EMA; Difco®), 4) agar-agar (Difco®), 5) agar-agar con dextrosa (Difco®) y 6) agar (Difco®) con una mezcla de granos de maíz frescos y estigmas. Las cajas se incubaron a 22 °C y se revisaron diariamente para determinar el efecto de los tratamientos en la germinación y el desarrollo

del hongo *in vitro*. El experimento se estableció en condiciones de laboratorio siguiendo un diseño factorial 6x2 (medios de cultivo y tratamiento térmico), con tres repeticiones.

Identificación morfológico-molecular

La extracción del ADN total del hongo se obtuvo de cabezuelas y estípites utilizando el kit de extracción QIAGEN DNeasy Plant Minikit (50) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (Dneasy® Plant Handbook, 2012). Las muestras de ADN secuenciadas fueron KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) y KJ543567 (onesi2). Para verificar la calidad del ADN total, las muestras se colocaron en un gel de agarosa 1 % y se sometieron a electroforesis a 88 volts por 30 min. El ADN total extraído se envió a MacroGen Inc., Korea, para la amplificación de la región del ITS y su secuenciación simultánea utilizando los iniciadores ITS1 (5´TCCGTAGG-TGAACCTGCGG 3´) e ITS 4 (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC 3´) de acuerdo con el protocolo descrito por White *et al.* (1990), Glass y Donaldson (1995) y Pazoutová (2001). Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se depositaron en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) para posteriormente compararlas con las disponibles en el banco de datos, utilizando la herramienta “Nucleotide BLAST”. Para el análisis filogenético, las secuencias obtenidas en este estudio fueron comparadas con las reportadas por Pazoutová para *Claviceps gigantea* y *C. sorghi* utilizando el programa Mega 7 y el procedimiento UPGMA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de esclerocios en laboratorio

La germinación de esclerocios se observó únicamente en el tratamiento que contenía carbón residual, con un periodo de incubación de tres meses a 4 °C y dos meses a 22-24 °C (Figura 3C), por lo que no se realizó análisis estadístico. El 55.5 % de los esclerocios germinaron en este tratamiento. Osada (1984) indica que solamente obtuvo 47 y 48 yemas preformadoras de estípites a partir de esclerocios colocados a 18°C con pretratamiento de 4 °C por 8 y 16 d, respectivamente. En *C. purpurea*, Hadley (1968) reportó una germinación de 50%, limitado principalmente por baja humedad en la tierra durante



Figura 3. *Claviceps gigantea*: A) inicio de la germinación donde se observan primordios de las cabezuelas estromáticas 64 d después del establecimiento en campo, B) estípites y cabezuelas estromáticas, C) esclerocios con estípites completamente desarrollados, D) esclerocios con estípites y cabezuelas delgadas y marchitas después de la liberación de ascosporas (Escala 1 cm).

la germinación del esclerocio. El tratamiento en frío (4°C) durante 3 meses, la humedad del carbón residual y el cambio de temperatura a 22 - 24°C por 2 meses simulan las condiciones naturales del campo donde se encuentran los esclerocios, facilitando su germinación.

En el presente experimento en laboratorio, el único sustrato que facilitó la germinación de esclerocios fue el carbón residual. Según Villamagua *et al.* (2008), en trabajos en invernadero con jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), el carbón vegetal añadido al suelo mostró un incremento en la producción de frutos debido al incremento en la porosidad y la estructura del suelo y en la disponibilidad de N, P, K, Zn, Ca, Mg, Mn y Cu, que pueden actuar como nutrientes en la germinación de las semillas y nutrición de la planta, los que probablemente tuvieron el mismo efecto sobre los esclerocios en el presente estudio.

Germinación de esclerocios en campo

En la muestra colocada en el Rancho El Rosedal para determinar la germinación de esclerocios en campo, se determinó un porcentaje de germinación de 46.6 %. Estos promedios de germinación son bajos, pero coinciden con lo señalado por Pazoutová *et al.* (2011), quienes mencionaron que la germinación para la formación de cabezuelas estromáticas es difícil en la mayoría de las especies de *Claviceps*, ya que requieren diferentes tratamientos para eliminar la dormancia (Kunfer and Seckring, 1977). Entre los tratamientos se observó que las temperaturas bajas tienen efectos importantes en los procesos fisiológicos del esclerocio al aumentar: 1) la absorción del agua proveniente del medio ambiente, 2) aumentar la tasa de respiración y, 3) incrementar el metabolismo de los lípidos almacenados. La presencia de lípidos en el esclerocio sugiere que inmediatamente después, o durante el tratamiento de activación por frío, se activan enzimas que hidrolizan los lípidos posiblemente para su conversión en manitol (Mitchell y Cooke, 1968).

En el campo, la aparición de primordios en los esclerocios se observó después de 3 meses de incubación a 4 °C y 64 d después de que se colocaron en el campo a temperatura promedio de 14° C, humedad relativa de 76 % y una precipitación acumulada de 705 mm durante junio-septiembre, 2013 (Figura 3A). Las estructuras completamente desarrolladas se observaron 23 d después de aparecer los primordios (Figura 3B). Fucikovsky y Moreno (1971) reportaron una temperatura anual en el municipio de Almoloya de Juárez de 13-15 °C y una precipitación anual de 1000 mm cuando observaron el diente de caballo en el estado de México, mientras que en el presente estudio la humedad relativa promedio anual fue 65.26 % y la precipitación acumulada total fue 832.8 mm. Según Cooke y Mitchell (1967), en la naturaleza transcurre aproximadamente una semana desde los inicios de la germinación de los esclerocios de *C. purpurea* a la maduración de los estromas.

En campo, al final de la cosecha del maíz, los esclerocios caen al suelo entre el otoño y el invierno. Desde el otoño hasta primavera, los esclerocios están expuestos a temperaturas bajas y heladas frecuentes por un período de 6 a 9 meses. Al terminar éste período, la temperatura y humedad aumentan y el hospedante se encuentra disponible, sincronizando el ciclo biológico del patógeno y el hospedante para el desarrollo de la enfermedad.

Tiempo de emisión y desarrollo de estípites y formación de cabezuelas

Los primeros indicios de germinación de los esclerocios, tanto en laboratorio como en campo, fue la observación de los primordios de las cabezuelas estromáticas que ocurrió cinco meses después de iniciado el experimento (tres meses a 4 °C y dos a 22-24 °C) (Figura 3A). Los primordios se observaron como protuberancias globosas de color claro emergiendo de los esclerocios. Este tiempo de germinación fue al menos 6 meses más rápido comparado con el reportado por De la Isla y Fuentes (1963) y Fuentes *et al.* (1964), quienes observaron la germinación de esclerocios de *C. gigantea* después de 12 meses con un tratamiento de temperatura alternada (4- 2 °C y de 22-28 °C, por períodos de una a dos semanas por 8 meses) y constante (12 °C por 4 meses en oscuridad).

Cooke y Mitchell (1967), mencionan que en la naturaleza el potencial de inóculo de una población de esclerocios depende del número de cabezuelas que puede producir lo cual se relaciona con el tamaño del esclerocio. En el presente estudio los esclerocios produjeron de tres a nueve cabezuelas, con un promedio de cinco por esclerocio. Las protuberancias se constriñeron en la base para formar el cuerpo del estípite. En la punta del estípite se formaron cabezuelas estromáticas que maduraron después de 15 d en condiciones de laboratorio y 23 d en campo, después de la aparición de los primordios (Figuras 3B y C). Durante el proceso de maduración de la cabezuela estromática ésta mostró un cambio en la coloración de café claro a oscura y la presencia de puntos o papilas que correspondían a los ostiolos de los peritecios inmersos en la cabezuela de la que sobresalen ligeramente. Estas observaciones son similares al proceso de germinación de esclerocios de *C. purpurea*, *C. sorghicola* y *C. africana* descritas por Hadley (1968), Loveless y Peach (1986) y Tsukiboshi *et al.* (2001).

Se observó que los esclerocios no tienen sincronización en su germinación, formación de primordios, estípites ni cabezuelas, lo que sugiere que existe un amplio rango de tiempo en la liberación de ascosporas (Figura 3D).

Producción y descarga de ascosporas

Se logró grabar por primera vez en video (Sony Cyber-shot (modelo DSC-W120) (Figura 4F) la liberación de ascosporas. En microscopio estereoscópico

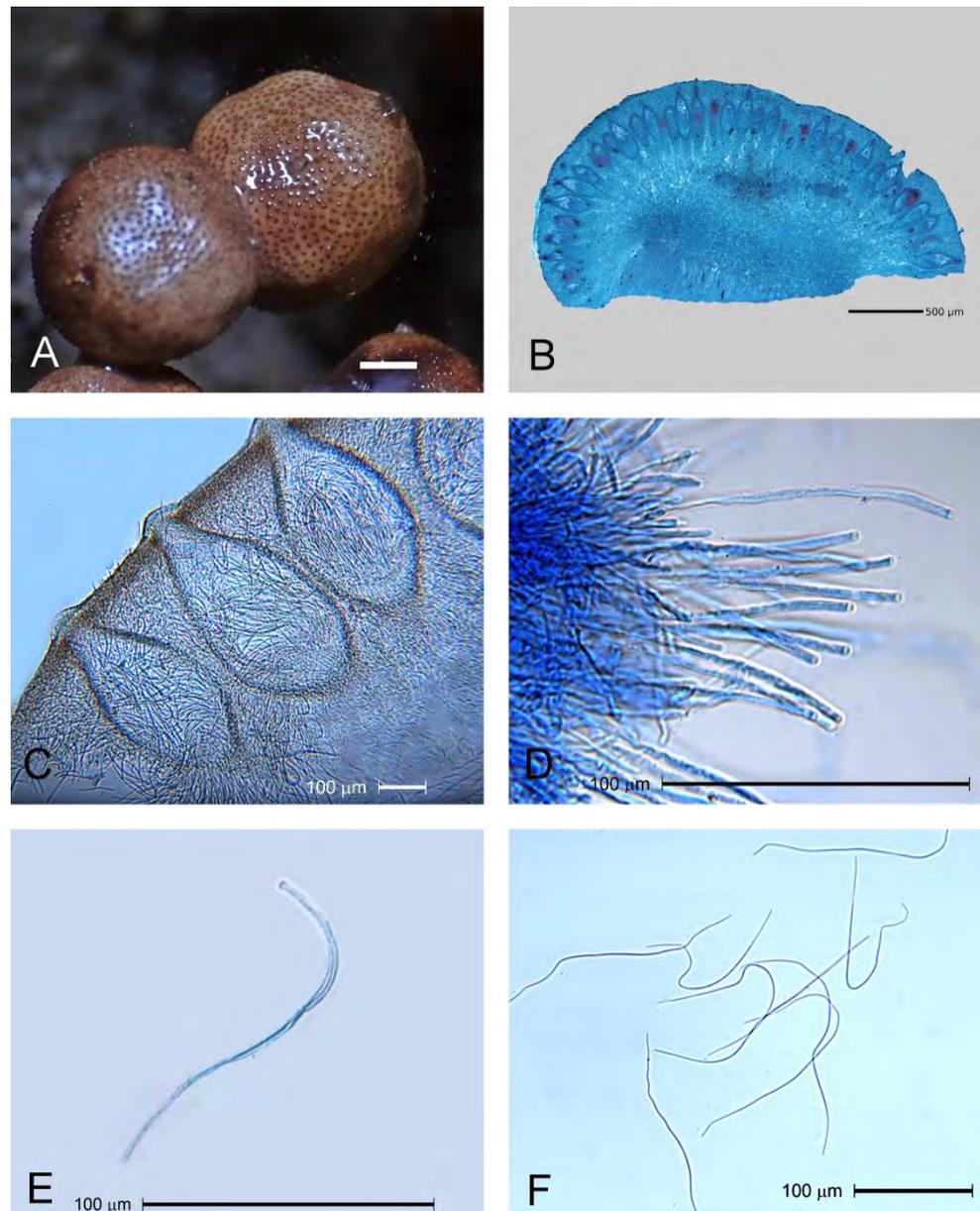


Figura 4. Estructuras sexuales resultado de la germinación de esclerocios en condiciones de laboratorio. Cortes longitudinales de cabezuelas estromáticas muestran: A) Peritecios con diferente grado de desarrollo, B) Peritecios con ascas y ascosporas teñidos con azul de lactofenol, C) Ascas intercaladas con parafisos, D) Ascas con ascosporas y E) Ascosporas expulsadas de los peritecios.

se observó la liberación de ascosporas emergiendo de los ostiolos de peritecios como estructuras muy delgadas y alargadas que flotaban en el espacio, debido a su falta de peso o un posible fenómeno de geotropismo.

Según Loveless y Peach (1986), las ascosporas de *C. purpurea* se observan a simple vista en el aire sobre la cabezuela estromática. Lutrell (1977) y Prakash *et al.* (1983) reportaron la descarga de ascosporas de *C. paspali* y *C. fusiformis* directamente con un microscopio, enfocando en los ostiolos de los peritecios (Figura 4C+), mientras que Pazoutová y Parbery (1999) también observaron las puntas de las ascas emergiendo del ostiolo. Los ascomicetos pueden descargar las ascosporas ya sea expulsándolas al aire a una distancia de varios centímetros o son lentamente exudadas en una masa mucilaginosa acumulada alrededor del ostiolo (Loveless y Peach, 1986).

No se observaron ascosporas de los esclerocios invertidos con agua destilada estéril en la base que se utilizaron para el monitoreo nocturno. Cuando los estromas germinados y diferenciados en estípites y estroma se colocaban invertidos en los frascos, estas estructuras tomaban un color oscuro y una apariencia rugosa sin continuar su desarrollo normal y madurez. Sin embargo, no se logró captura de ascosporas en portaobjetos con azul de lactofenol o agua destilada aun cuando la distancia entre las cabezuelas y los portaobjetos fue de aproximadamente 10 cm.

De acuerdo con los resultados de éste estudio, en *C. gigantea* el proceso de germinación, formación de estípites, cabezuelas estromáticas, peritecios, ascas y hasta la expulsión de las ascosporas se logró en un total de aproximadamente 175 d.

Crecimiento de ascosporas en medio de cultivo

No se observó ningún crecimiento en los 6 medios probados en este estudio (PDA, AHM, EMA, AA, AAD y Agar-Maíz) y el tratamiento térmico a 50 °C. Deacon (2006) mencionó que para la germinación de ascosporas y su crecimiento *in vitro* son necesarios algunos estímulos como, la presencia de carbohidratos y los choques de calor para interrumpir la dormancia de las ascosporas e inducir su germinación, pero en el presente estudio no se logró obtener cultivos puros a partir de ascosporas.

Identificación morfológico - molecular

Las secciones longitudinales de los cortes hechos a mano y los cortes finos de las cabezuelas revelaron numerosos peritecios piriformes embebidos en la región periférica del tejido. En los peritecios se observaron ascas, parafisos y

ascosporas. El ostiolo de los peritecios alcanzaba la superficie de la cabezuela (Figuras 4A, B). Pazoutová y Parbery (1999) mencionaron que el tamaño y forma de los peritecios dependen de su grado de madurez. Los peritecios jóvenes son pequeños, oblongos a ovales, mientras que los maduros generalmente son elipsoides a piriformes, lo que igualmente se muestra en los resultados del presente estudio (Figura 4B).

Los peritecios (Figura 4C) midieron de 404.9-569.3 x 151.3-284.4 μm , con ascas de 187-265.3 μm de largo, que contenían 8 ascosporas de 169.6-263.7 x 1.0-2.1 μm . Las dimensiones de éstas estructuras observadas fueron mayores a las reportadas por Fuentes *et al.* (1964). Según Loveless (1964) y Pazoutová y Parbery (1999), la longitud de las ascosporas filiformes del género *Claviceps* es un carácter taxonómico confiable, condicionado a que las medidas se realicen después de ser expulsadas del asca (Figuras 4E, F). El tamaño de los peritecios también se considera otro criterio taxonómico confiable, ya que es un carácter constante de un estroma maduro (Loveless, 1967).

El análisis de la secuencia de la región parcial del gen 18s, ITS1 completo, 5.8s completo, ITS2 completo y parcial del 28s, mostró que las cuatro secuencias depositadas en NCBI No. KJ543564 (celes1), KJ543565 (celes2), KJ543566 (onesi1) y KJ543567 (onesi2) tienen un porcentaje de identidad de 99 % con AJ133394.2 (*Claviceps gigantea* Pazoutová). Estas cinco muestras se compararon contra *Claviceps sorghi* que perteneció a otro grupo filogenético (Figura 5) (Pazoutová, 2001). Tanto las características morfológicas (Fuentes

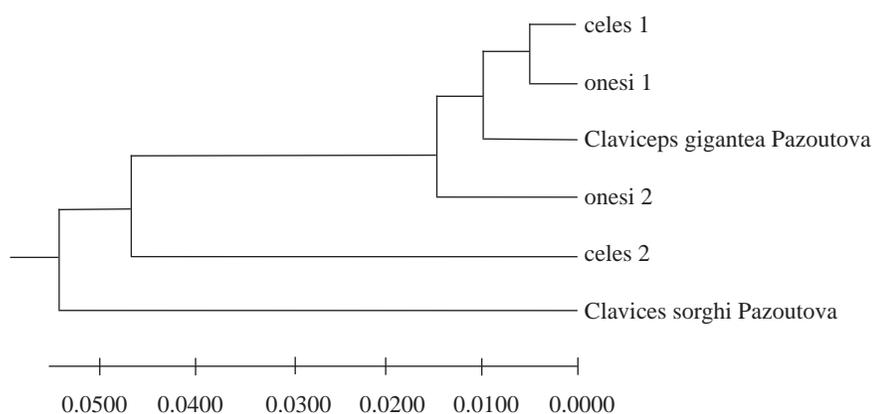


Figura 5. Relación filogenética de secuencias de cuatro muestras de ADN de *C. gigantea* comparadas con las secuencias de *C. gigantea* y *C. sorghi* reportadas previamente por Pazoutová (2001) en el NCBI.

et al., 1964) como moleculares confirmaron la especie como *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez.

CONCLUSIONES

- En laboratorio, se logró la germinación de esclerocios y formación de estípites después de incubación en carbón residual por 90 d a 4 °C y 60 d a 22 °C, formación de cabezuelas en 15-23 d y liberación de ascosporas en 15 d.
- No se encontró sincronización en la germinación de esclerocios, formación de estructuras reproductivas y liberación de ascosporas.
- No hubo efecto del tratamiento con temperaturas ni medios de cultivo en la germinación de las ascosporas.
- Por primera vez, la expulsión de ascosporas en esta especie se documentó electrónicamente (en video).
- Las características morfológicas y moleculares permitieron identificar al hongo como *C. gigantea*.
- De las secuencias de ADN que se obtuvieron a partir de las estructuras sexuales, en los análisis de ADN (AJ133394.2) se confirmó la identidad de *C. gigantea* a nivel molecular; este primer reporte quedó consignado en el Banco de Genes.
- Estos resultados facilitarán el establecimiento de programas de manejo integrado de la enfermedad y el estudio de la biología del patógeno.

LITERATURA CITADA

- Aguell, S. L., Ramstad, E., and Ullstrup, A. J. 1963. The alkaloids of maize ergot. *Planta Medica* 11: 392-398. DOI: 10.1055/s-0028-1100254
- CMI (Commonwealth Mycological Institute). 1974. *Plant Pathologist's Pocketbook*. Kew, Surrey, England. 267 p.
- Cooke, R. C., and Mitchell, D. T. 1967. Germination pattern and capacity for repeated stroma formation in *Claviceps purpurea*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 50:275-283. DOI: 10.1016/S0007-1536(67)80038-X
- Cunfer, B. M., and Seckinger, A. 1977. Survival of *Claviceps purpurea* and *C. paspali* sclerotia. *Mycologia* 69: 1142-1148. DOI: 10.2307/3758937
- Deacon, J. W. 2006. *Fungal Biology*. 4^a ed. Blackwell Publ. England. 384 p.
- De la Isla, Ma. L. y Fuentes F., S. 1963. Germinación de esclerocios de *Sphacelia* sp., causante del "Diente de caballo" en el maíz. *Agric. Téc.* 3:119.
- Dneasy plant handbook Qiagen. 2012. Protocolo del proveedor. p. 22-2 <http://www.qiagen.com/knowledgeandsupport/resourcecenter/resourcedownload.aspx?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=e> (Consulta: enero 2014)

- Fucikovsky, L. y Moreno, M. 1971. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the State of México, México. Plant Dis. Repr. 55:231-233. <http://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=mdp.39015001262727;view=1up;seq=11>
- Fuentes F, S. y De la Isla, Ma. de L. 1961. Una enfermedad desconocida del maíz el “Diente de caballo”. Agric. Téc. 12:11-12.
- Fuentes, S. F., De la Isla, M. de L., Ullstrup, A. J., and Rodríguez, A. E. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of maize in México. Phytopathology 54:379-381.
- Glass, N. L., and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 61:1323-1330. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167388/pdf/611323.pdf>
- Hadley, G. 1968. Development of stromata in *Claviceps purpurea*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 51: 763-769.
- Kulkarni, U. K. 1963. Initiation of the dikaryon in *Claviceps microcephala* (Wallr.) Tul. Mycopathologia et Mycologia Applicata. pp:19-22. <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02053250>
- López, C. M. L., Márquez, J. y Murguía, G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Libro de laboratorio. 2ª ed. Fac. de Ciencias, UNAM. México. 178 p.
- Loveless, A. R. 1964. Use of the honeydew state in the identification of ergot species. Trans. Brit. Mycol. Soc. 47:205-213. DOI: 10.1016/S0007-1536(64)80054-1
- Loveless, A. R. 1967. A new species of *Claviceps* on *Cyperaceae*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 50:19-22. DOI:10.1016/S0007-1536(67)80059-7
- Loveless, A. R., and Peach, J. M. 1986. Evidence from ascospores for host restriction in *Claviceps purpurea*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 86:603-610. DOI:10.1016/S0007-1536(86)80063-8
- Lutrell, E. S. 1977. The disease cycle and fungus-host relationships in dallisgrass ergot. Phytopathology 67:1461-1468. DOI: 10.1094/Phyto-67-1461.
- Mitchell, D. T. and Cooke, R. C.. 1968. Water uptake, respiration pattern and lipid utilization in sclerotia of *Claviceps purpurea* during germination. Trans. Brit. Mycol. Soc. 51:731-736. DOI:10.1016/S0007-1536(68)80093-2
- Moreno M. y Fucikovsky, L. 1972. Efecto de la posición y el número de esclerocios de *Claviceps gigantea* sobre la germinación de granos de maíz. Fitopatología 5:7-9.
- Osada-K., S. 1984. Estudio sobre la germinación del cornezuelo del maíz e interacción-hospedante parásito (*Zea mays* L.-*Claviceps gigantea* Fuentes et al.). Tesis doctoral. Fitosanidad- Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx. 86p.
- Osada, S. K., Fucikovsky, Z. L., Ortega D., M. L. y Engleman, E. M. 1986. Estudio sobre la germinación del diente de caballo del maíz e interacción hospedante - parásito (*Zea mays* L. *Claviceps gigantea* Fuentes et al.). Agrociencia 66:57-69.
- Pazoutová, S. 2001. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. Mycol. Res. 105:275-283. DOI:10.1017/S0953756201003562
- Pazoutová, S., and Parbery, D. P. 1999. Ergot: the genus *Claviceps*: The taxonomy and phylogeny of *Claviceps*. Hardwood Acad. Publ., London. 499 p.
- Pazoutová, S., Odvody, G. N., Frederickson, D. E., Chudicková, M., Olsovska, J., and Kolarik, M. 2011. New *Claviceps* species from warm-season grasses. Fungal Diversity 49:145-165. DOI:10.1007/s13225-011-0102-4
- Pedroza-Sandoval, A. 2010. Epidemiología fitosanitaria. Univ. Autónoma Chapingo. pp. 1-28.
- Prakash, H. S., Shetty, H. S., and Safeulla. K. M. 1983. Germination and nuclear behavior of sexual and asexual propagules of *Claviceps fusiformis*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 81:65-69. <http://eurekamag.com/research/005/522/005522683.php>
- SAGARPA-SIAP (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Producción Nacional de Maíz en Grano. Consultado en: www.siap.gob.mx.
- Tsukiboshi, T., Shimanuki, T., and Koga, H. 2001. *Claviceps sorghicola* and *C. africana*, the ergot pathogens of sorghum, and their cultural control in Japan. Japan Agric. Res. Quart. 35:221-226. <https://www.jircas.affrc.go.jp/english/publication/jarq/35-4/35-04-02.pdf>

- Villamagua M, A., Loaiza, C., E. R. y Naula, A., P. E. 2008. Efecto del carbón vegetal en las propiedades físicas-químicas del suelo en cultivo de tomate de mesa *Solanum lycopersicum* L. bajo invernadero. Estudios Universitarios. Rev. Cient. (Ecuador) 8:85-100. <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/362>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p:315-322. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (Eds). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego. DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

1.6. Bacterias antagonistas contra *Fusarium* spp. aisladas de esclerocios de *Claviceps gigantea* en maíz (*Zea mays*)

Ana María Ayala-Torres, Sergio Aranda-Ocampo*, Carlos De León-García de Alba, Cristian Nava-Díaz, Postgrado en Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; Jesús Ricardo Sánchez-Pale, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo carretera Toluca-Ixtlahuaca km. 15.5, Piedras Blancas 50200, Toluca de Lerdo, México.

*Autor de correspondencia: arandasergio63@gmail.com

Resumen

Los esclerocios de algunos hongos albergan bacterias nativas para el control biológico de hongos fitopatógenos. Los objetivos de esta investigación fueron: i) explorar poblaciones bacterianas asociadas a esclerocios de *Claviceps gigantea* en maíces de seis localidades del Estado de México, ii) evaluar el antagonismo *in vitro* de estas poblaciones bacterianas contra tres especies de *Fusarium* fitopatógenos de maíz, iii) identificar molecularmente los antagonistas más eficientes y caracterizar la producción de metabolitos *in vitro*. Poblaciones bacterianas en los esclerocios se calcularon por conteo directo en placa; el antagonismo *in vitro* contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* se evaluó por confrontación en medio Waksman agar. Las bacterias antagonistas se identificaron por secuenciación parcial del gen 16S rRNA y se evaluaron *in vitro* para la producción de ácido indol-3-acético, sideróforos, actividad lipolítica, proteolítica y solubilización de fosfato mineral. La densidad bacteriana estuvo entre 2.023 a 2.397 Log₁₀ UFC g⁻¹ de esclerocio. Veintidos cepas mostraron antagonismo *in vitro* contra al menos una especie de *Fusarium*. Se identificaron como miembros de los géneros *Bacillus*, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*. Los 22 antagonistas mostraron *in vitro* actividad lipolítica, proteolítica, produjeron sideróforos y solubilizaron fosfato; únicamente 12 (55%) produjeron ácido indol-3-acético. Las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* y produjeron todos los metabolitos evaluados.

Palabras clave: Pudrición de mazorca, *Bacillus*, *Pseudomonas*, inhibición, metabolitos.

El maíz (*Zea mays*) es el cereal más producido en el mundo, seguido de trigo y arroz (CIMMYT, 2019). México es el centro de origen del maíz (Matsuoka *et al.*, 2002), además de ser el cultivo con la mayor superficie anual sembrada y consumo per cápita (García-López y Giraldo, 2021; Padrón *et al.*, 2013). En México se estima que la producción y calidad de grano de este cultivo es afectado por diversas enfermedades fúngicas, destacando las enfermedades de pudrición de la mazorca (Moreno-Limón *et al.*, 2011).

El hongo *Fusarium* causa pudriciones de mazorca que representa una limitante en la producción e inocuidad del maíz a nivel mundial. Se consigna que la mayoría de los híbridos de maíz cultivados en el mundo son susceptibles a más de 10 especies de *Fusarium* que causan pudrición de la mazorca (Mesterhazy *et al.*, 2012). La mayoría de estas especies de *Fusarium* producen micotoxinas que afectan la salud no solo de animales sino también de los seres humanos (Holf, 2020; Mielniczuk y Skwaryło-Bednarz, 2020). En México, se reporta a *F. verticillioides* como la especie de mayor distribución y más importante por causar pudriciones en mazorca en los estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Puebla y Nuevo León. También se han reportado a *F. graminearum* y *F. subglutinans* causando pudriciones en mazorca en los estados de México, Michoacán y Yucatán (Zenteno-Zevada, 1963).

El biocontrol de enfermedades en plantas con microorganismos antagonistas es una estrategia útil para aminorar el uso de plaguicidas en la agricultura y disminuir costos de producción e impacto ambiental (Dimkić *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán y Santoyo 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022). Investigaciones previas han demostrado que los exudados en los esclerocios de hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* estimulan el crecimiento de poblaciones bacterianas específicas en el mismo agroecosistema con mayor actividad antifúngica hacia estos mismos hongos, que cepas bacterianas aisladas de otros nichos ecológicos (Abdullah *et al.*, 2008; Coley-Smith y Dickenson, 1971; Gilbert y Linderman, 1971; Hou *et al.*, 2006). Las poblaciones bacterianas que coexisten en hábitats específicos con escasos nutrientes, como es el caso de los esclerocios, promueven la producción de metabolitos que incrementan su capacidad de competencia contra otros microorganismos; por lo tanto, se considera que los esclerocios de hongos son potenciales reservorios naturales de antagonistas eficientes para el control biológico de fitopatógenos (Hou *et al.*, 2006; Zachow *et al.*, 2011).

El ascomiceto *Claviceps gigantea* causa la enfermedad “diente de caballo” así llamada por la forma de los esclerocios. Este hongo produce alcaloides principalmente ergolina, festuclavina, dihydroelymoclavina, chanoclavina y elimoclavina (Agurell *et al.*, 1963; Solano-Báez *et al.*, 2018) que también son tóxicos para animales y seres humanos (Mielniczuk y Skwaryło-Bednarz, 2020; Bragg *et al.*, 2017; Hof, 2020). *C. gigantea* es un hongo endémico, geográficamente limitado a localidades en México con altitudes mayores a los 1800 msnm y humedad relativa $\geq 60\%$ (Fucikovsky y Moreno, 1976; Fuentes *et al.*, 1964; Ullstrup, 1973). En los valles altos de México ($>2\ 000$ msnm), el maíz se cultiva en ambientes con climas templados en donde las pudriciones de mazorca causadas por *Fusarium* spp. son comunes en infecciones simultáneas con *C. gigantea* causando pérdidas de hasta el 100% (CIMMYT, 2004). En el presente estudio, se infiere que los esclerocios de *C. gigantea* albergan poblaciones bacterianas con antagonismo eficiente contra especies de *Fusarium* que causan la pudrición de mazorca de maíz en México. Los objetivos de esta investigación fueron: i) explorar las poblaciones bacterianas asociadas a esclerocios de *C. gigantea* en el Estado de México, ii) evaluar el antagonismo *in vitro* de estas poblaciones bacterianas contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, iii) identificar molecularmente los antagonistas más eficientes y caracterizar la producción *in vitro* de metabolitos de los antagonistas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de esclerocios de *Claviceps gigantea*

Los esclerocios de *C. gigantea* se colectaron en seis localidades del Estado de México con historial severo en condiciones naturales de las enfermedades diente de caballo y pudriciones de mazorca causados por *Fusarium* spp. (Cuadro 1; Figura 1). Los esclerocios de cada localidad se colectaron de mazorcas infectadas con *C. gigantea* sin síntomas de pudrición por *Fusarium* spp.

Aislamiento de bacterias de esclerocios de *Claviceps gigantea*

Se colectaron 10 esclerocios de *C. gigantea* en cada localidad. El tamaño de muestra del número de esclerocios se calculó con el modelo descrito por Cochran (1982). Los esclerocios (n=10) de cada localidad se molieron por separado en un mortero estéril; de aquí, se utilizó 1 g de esclerocios molidos diluido en 100 mL de agua destilada estéril para realizar diluciones seriadas

Cuadro 1. Colecta de esclerocios de *C. gigantea* en localidades del Estado de México.

Localidad	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (msnm)
Almoloya de Juárez	19° 14' 10"	90° 42' 07"	2600
Atlacomulco	19° 43' 37"	99° 42' 12"	2700
Calimaya	19° 10' 25"	99° 32' 12"	2680
Mina México	19° 40' 35"	99° 40' 10"	2580
Toluca	18° 59' 00"	99° 40' 58"	2600
Villa Victoria	19° 26' 00"	100° 00' 00"	2570

¹Tamaño de muestra de 10 esclerocios por localidad estimado con el modelo de Cochran (1982).



Figura 1. A) Mazorcas de maíz con infección simultánea de *Claviceps gigantea* y *Fusarium* spp. B) Esclerocios de *C. gigantea* en mazorcas de maíz.

hasta 10^4 ; de cada dilución se sembraron 100 μ L en placas Petri con medio de cultivo R2A (Difco) con tres repeticiones y se incubaron a 28 °C por 24 h. Del crecimiento bacteriano se cuantificó el número de colonias por el método de conteo directo en placa. La densidad microbiana se expresó en Log_{10} UFC g^{-1} de esclerocio (Peng *et al.*, 2009). Entre las seis localidades muestreadas, se seleccionaron 129 aislados bacterianos asociados a los esclerocios con diferente morfología de la colonia observada en un microscopio estereoscópico (American Optical AO) para el estudio posterior de antagonismo *in vitro*.

Antagonismo *in vitro* contra *Fusarium* spp.

Se evaluó el antagonismo *in vitro* de 129 cepas bacterianas contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* que causan pudrición de mazorca

en las localidades muestreadas; la patogenicidad de estas cepas se evidenció experimentalmente en plántulas de tres poblaciones nativas de maíz en el Estado de México por inoculación del hongo en sustrato y se identificaron molecularmente por amplificación de las regiones internas ITS de los genes rRNA 18S-5.8S y 5.8S-28S las cuales fueron donadas por la Dra. Dolores Briones Reyes del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, del Colegio de Postgraduados. El antagonismo *in vitro* se evaluó por confrontación dual en placas Petri cuadradas (120 x 120 mm) con medio de cultivo Waksman agar seleccionado entre los medios B de King, R2A, agar nutritivo y papa-dextrosa agar por ser el que permitió el óptimo crecimiento tanto de *Fusarium* spp. como de los aislados bacterianos. Inicialmente, las cepas de *Fusarium* spp. se inocularon por extensión con un asa L-digralsky sobre la superficie del medio de cultivo con 300 µL de una suspensión acuosa con 1.8×10^4 conidios mL⁻¹ cuantificados en una Cámara Neubauer de cada especie con cinco días a 28 °C en medio Waksman agar (1 L) (agar 20 g, glucosa 10 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, peptona 5.0 g, pH 6.8). Las placas de Petri inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente por 60 min; en seguida, las bacterias (n=129) se inocularon con un inoculador multipunto (Boekel®, microplate replicator 96 puntos) y se incubaron a 28 °C por 7 días; de aquí, se seleccionaron las cepas bacterianas que evidenciaron antagonismo (halo de inhibición del crecimiento fúngico) contra una o más especies de *Fusarium*. Posteriormente, en otro ensayo las cepas bacterianas antagonistas se sembraron individualmente por punción de masa bacteriana con un palillo estéril bajo las mismas condiciones experimentales del ensayo anterior. Se realizaron observaciones diarias y se seleccionaron únicamente las cepas bacterianas que mostraron antagonismo evidenciado por la formación de un halo de inhibición ≥ 5 mm del crecimiento del micelio contra una, dos o las tres especies de *Fusarium* evaluadas. El ensayo se repitió tres veces. Los testigos consistieron en placas de Petri con crecimiento de las especies de *Fusarium* en ausencia de las bacterias antagonistas.

Detección cualitativa de la producción de metabolitos

Las bacterias antagonistas se caracterizaron cualitativamente en cuanto a su capacidad para producir metabolitos *in vitro* como el ácido indol-3-acético en el medio de cultivo caldo soja triptona (TSB); se consideraron positivas las cepas bacterianas que produjeron una coloración rojiza en el medio (Frey-Klett *et al.*, 2005) y sideróforos en el medio universal cromo azurol S (CAS)

considerando positivas las cepas bacterianas que evidenciaron un halo amarillo alrededor de la colonia (Schwyn y Neilands, 1987); actividad lipolítica en el medio agar nutritivo suplementado con Tween 80 y proteolítica en el medio TSB suplementado con leche descremada, considerando positivas las cepas bacterianas que evidenciaron un halo opaco y claro alrededor de la colonia respectivamente (Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007), y solubilización de fosfato mineral en el medio TCP, considerando positivas las cepas bacterianas que evidenciaron un halo opaco alrededor de la colonia (El-Yazeid *et al.*, 2007). Todas las evaluaciones se hicieron por triplicado.

Identificación molecular de las bacterias antagonistas

El ADN de los antagonistas potenciales se obtuvo de colonias individuales con 72 h de crecimiento a 28 °C en medio Waksman agar con el kit Pure-Link Genomic DNA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) siguiendo el protocolo del fabricante. La amplificación parcial del gen 16S rRNA se realizó con los iniciadores 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (3' GGTTACCTTGTTACGACTT 5') y las condiciones de PCR descritas por Baker *et al.* (2003). Los productos amplificados se secuenciaron (secuenciación Sanger) en MacroGen Inc. (Seul, Korea) (<https://www.macrogen.com>); las secuencias se compararon en el banco de genes (GenBank) del Centro Internacional para la Información en Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) empleando el algoritmo Blast_n (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.29+ (Altschul *et al.*, 1990).

RESULTADOS

Densidad de poblaciones bacterianas en esclerocios de *Claviceps gigantea*

Se observó crecimiento bacteriano en medio de cultivo R2A de los esclerocios provenientes de todas las localidades muestreadas. Del crecimiento bacteriano se cuantificó el número de colonias por el método de conteo directo en placa y la densidad bacteriana en esclerocios de *C. gigantea* fue diferente entre las seis localidades muestreadas en rangos desde 2.023 hasta 2.397 Log₁₀ UFC g⁻¹ de esclerocio (Cuadro 2). La mayor densidad bacteriana se registró en los lotes de Atlacomulco (2.397) y la menor en Villa Victoria (2.023) Log₁₀ UFC g⁻¹ de esclerocio respectivamente. Lo anterior sugiere que existen poblacio-

Cuadro 2. Densidad bacteriana ($\text{Log}_{10}\text{UFC g}^{-1}$) en esclerocios de *C. gigantea* por localidad de muestreo.

Localidad	Número de colonias	$\text{Log}_{10}\text{UFC g}^{-1}$ de esclerocio
Almoloya de Juárez	^z 204.1	2.309
Atacomulco	249.9	2.397
Calimaya	188.8	2.276
Mina México	200.4	2.301
Toluca	133.6	2.125
Villa Victoria	105.6	2.023

^z Promedio del número de colonias aisladas de 10 esclerocios de *C. gigantea* por localidad muestreada mediante conteo directo en placa en medio R2A con tres repeticiones.

nes bacterianas asociadas a los exudados de los esclerocios de *C. gigantea*; sin embargo, es necesario profundizar más en investigaciones que evidencien los factores que influyen la densidad y estructura bacteriana en este nicho ecológico.

Antagonismo *in vitro* contra *Fusarium* spp.

De 129 cepas bacterianas morfológicamente diferentes aisladas de esclerocios, 22 (17%) se identificaron por su antagonismo *in vitro* (halo de inhibición del crecimiento fúngico ≥ 5 mm) contra una o más especies de *Fusarium* (Cuadro 3). Entre estas, 13 cepas bacterianas (59%) fueron aisladas de la localidad de Atacomulco, y tres cepas (13%) en cada una de las localidades Calimaya, Mina y Toluca. Entre los antagonistas ($n=22$), 10 (45%) cepas fueron antagonistas a *F. verticillioides*, 14 (63%) a *F. subglutinans* y 17 (81%) a *F. graminearum*. Entre las bacterias antagonistas destacaron las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) las cuales fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* evaluados. Estas tres cepas tuvieron origen en la Localidad de Atacomulco (Cuadro 3).

Identificación molecular de antagonistas

La amplificación parcial del gen 16S rRNA permitió la identificación de las 22 cepas antagonistas entre 99.02 y 99.49% de similitud de acuerdo al alineamiento en el banco de genes del NCBI (Cuadro 3). Las cepas antagonistas pertenecieron a los géneros *Pseudomonas* (36.3%), *Bacillus* (31.8%), *Delftia*

Cuadro 3. Identificación molecular, origen, antagonismo contra *Fusarium* spp. y producción de metabolitos de 22 cepas antagonistas aisladas de esclerocios de *Claviceps gigantea*.

ID cepa	Localidad	Identificación por secuenciación parcial del gen 16S rRNA	No. acceso de secuencias tipo de la especie (NCBI)	% de identidad	Antagonismo <i>in vitro</i>			Producción de metabolitos <i>in vitro</i>				
					¹ Fg	Fs	Fv	AIA	LIP	PRO	SID	SFM
BA1	Atlacomulco	<i>Bacillus subtilis</i>	KF021537.1	99.39	+	+	+	+	+	+	+	+
BA2	Atlacomulco	<i>Pseudomonas syringae</i>	NR_043716.1	99.28	+	+	+	+	+	+	+	+
BA3	Atlacomulco	<i>Delftia lacustris</i>	KF054933.1	99.46	+	-	+	-	+	+	+	+
BA4	Mina	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913974.1	99.40	+	-	+	-	+	+	+	+
BA5	Calimaya	<i>Delftia acidovorans</i>	EF564190.1	99.38	+	-	+	-	+	+	+	+
BA6	Calimaya	<i>Sphingobacterium</i> sp.	KF777439.1	99.41	+	-	-	-	+	+	+	+
BA7	Atlacomulco	<i>Pseudomonas geniculata</i>	JX042457.1	99.44	+	-	-	-	+	+	+	+
BA8	Mina	<i>Micromonospora</i> sp.	KY015111.1	99.44	-	+	-	-	+	+	+	+
BA9	Mina	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FJ859699.1	99.37	-	+	-	-	+	+	+	+
BA10	Calimaya	<i>Staphylococcus aureus</i>	LN929738.1	99.49	+	+	-	-	+	+	+	+
BA11	Atlacomulco	<i>Pseudomonas putida</i>	KC582298.1	99.05	+	+	-	+	+	+	+	+
BA12	Toluca	<i>Bacillus</i> sp.	HM032893.1	99.48	+	+	-	+	+	+	+	+
BA13	Atlacomulco	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GU198115.1	99.47	+	+	-	+	+	+	+	+
BA14	Atlacomulco	<i>Bacillus subtilis</i>	KF527828.1	99.35	+	+	-	-	+	+	+	+
BA15	Atlacomulco	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KC494392.1	99.02	+	+	-	+	+	+	+	+
BA16	Atlacomulco	<i>Pseudomonas putida</i>	KC582298.1	99.16	+	+	-	+	+	+	+	+
BA17	Atlacomulco	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GU198113.1	99.40	-	+	-	+	+	+	+	+
BA18	Atlacomulco	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MH781489.1	99.02	+	+	+	+	+	+	+	+
BA19	Atlacomulco	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ991143.2	99.05	-	+	+	-	+	+	+	+
BA20	Toluca	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MF765339.1	99.48	+	-	+	+	+	+	+	+
BA21	Atlacomulco	<i>Pseudomonas putida</i>	JX120503.1	99.15	+	-	+	+	+	+	+	+
BA22	Toluca	<i>Bacillus</i> sp.	MF510169.1	99.48	-	-	+	+	+	+	+	+

¹Fg= *Fusarium graminearum*; Fs=*Fusarium subglutinans*; Fv=*Fusarium verticillioides*; AIA = producción de ácido indol-3-acético; LIP= actividad lipolítica; PRO= actividad proteolítica; SID= producción de sideróforos; SFM= solubilización de fosfato mineral.

+ = antagonismo *in vitro* (halo de inhibición ≥ 5 mm).

(9.09%), *Stenotrophomonas* (9.09%), *Micromonospora* (4.5%), *Sphingobacterium* (4.5%) y *Staphylococcus* (4.5%). Entre las especies de *Pseudomonas*, se identificaron a *P. putida* (37.5%), *P. fluorescens* (25%), *P. geniculata* y *P. syringae* (12.5%); entre las especies de *Bacillus* a *B. amyloliquefaciens* (57.1%) y *B. subtilis* (28.5%). El mayor número de antagonistas (n=13) se aisló de la localidad de Atlacomulco (59%) y el resto en igual proporción (n= 3) (14.3%) de las localidades de Calimaya, Mina y Toluca respectivamente (Cuadro 2). Las 22 cepas antagonistas se distribuyeron taxonómicamente en cuatro Phyla y seis órdenes. Se registró mayor abundancia de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* en los Phyla Firmicutes (Gram positivas) y Proteobacteria (Gram negativas) y en los órdenes Bacillales y Pseudomonadales respectivamente. La menor abundancia en los géneros *Micromonospora*, *Sphingobacterium* y *Staphylococcus*, en los Phyla Firmicutes (Gram positivas) Bacteroidetes (Gram negativas), en los órdenes Actinomycetales, Sphingobacteriales y Bacillales respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución taxonómica de 22 cepas bacterianas antagonistas *in vitro* contra *Fusarium* spp. aisladas de esclerocios de *C. gigantea*.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Frecuencia %
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	36.3
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	31.8
Proteobacteria	Beta Proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Delftia</i>	9.1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	9.1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	4.5
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	4.5
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	4.5

Producción cualitativa *in vitro* de metabolitos

Los 22 antagonistas mostraron *in vitro* actividad lipolítica, proteolítica, produjeron sideróforos y solubilizaron fosfato mineral; sin embargo, solamente 12 (55%) produjeron ácido indol-3-acético. Únicamente las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* y produjeron todos los metabolitos evaluados (Figura 2, Cuadro 3).

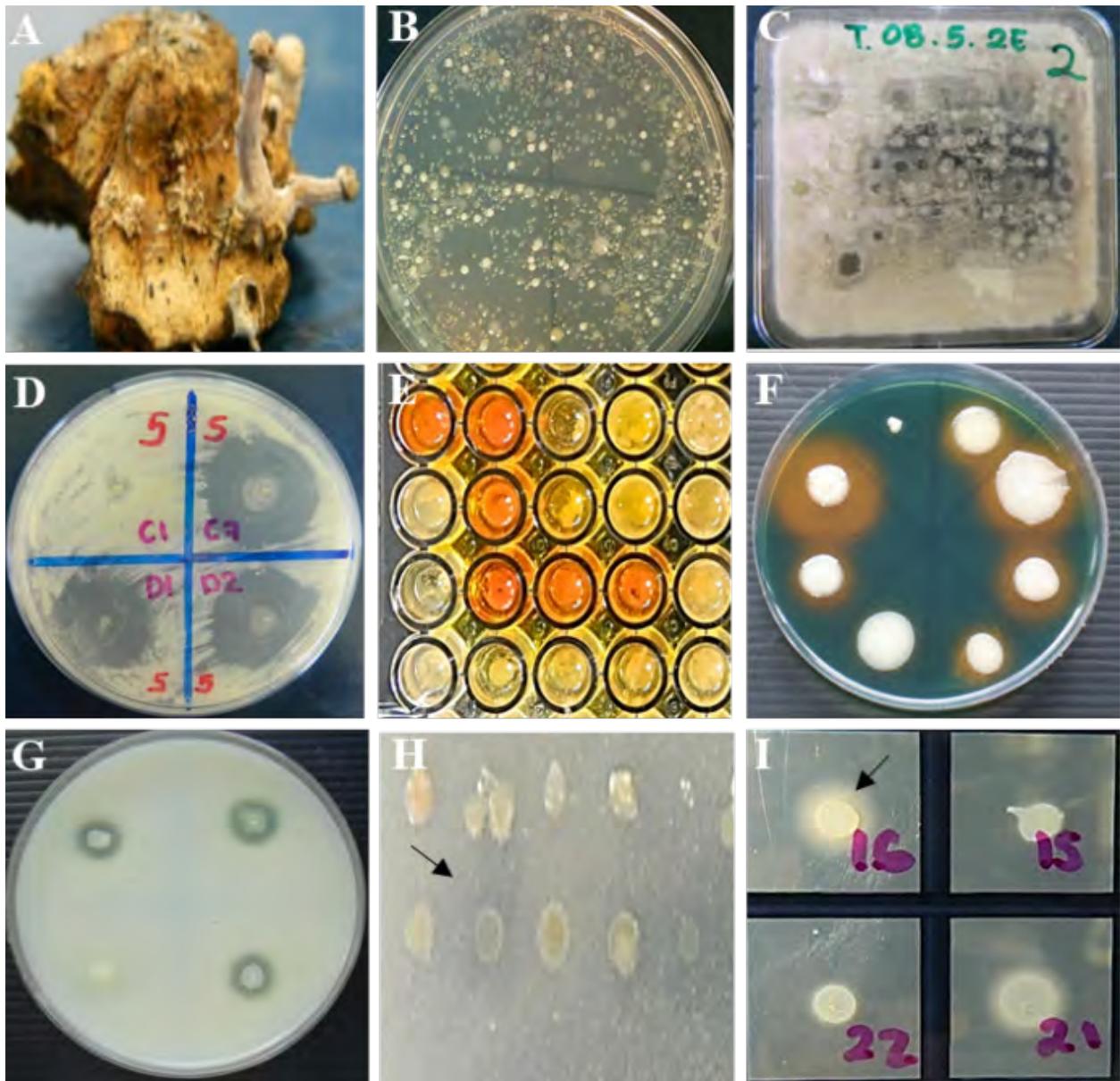


Figura 2. Antagonismo *in vitro*. A) esclerocio de *C. gigantea*, B) crecimiento bacteriano a partir de 1 g de esclerocio en medio R2A, C) antagonismo *in vitro* de bacterias en medio de cultivo Waksman agar inoculadas con un inoculador multipunto (Boeckel®, microplate replicator 96 puntos) contra *Fusarium* spp. D) selección de cepas bacterianas antagonistas evidenciando halos de inhibición ≥ 5 mm del crecimiento fúngico de *Fusarium* spp. Producción *in vitro* de metabolitos por antagonistas. E) producción de ácido indol-3-acético, F) producción de sideróforos, G) actividad proteolítica, H) solubilización de fósforo mineral, I) actividad lipolítica. Se consideraron positivas las cepas que evidenciaron coloración rojiza del medio, halo amarillo, claro y opaco alrededor de la colonia respectivamente.

DISCUSIÓN

En esta investigación se estimó la densidad bacteriana en esclerocios de *C. gigantea* y se evaluó su antagonismo *in vitro* contra tres especies de *Fusarium* causantes de pudrición de mazorca en maíz. Los resultados mostraron diferente densidad bacteriana asociada a esclerocios de *C. gigantea* en las diferentes localidades muestreadas; la mayor densidad bacteriana se registró en los lotes de Atlacomulco (2.397) y la menor en Villa Victoria (2.023) $\text{Log}_{10} \text{UFC g}^{-1}$ de esclerocio respectivamente. Lo anterior puede deberse a la utilización de productos y/o residuos agroquímicos utilizados como parte del manejo agronómico del cultivo que pudieron afectar la diversidad y densidad de microorganismos asociados al cultivo del maíz (FAO, 2010), lo cual sugiere la necesidad de conducir estudios sobre los residuos de agroquímicos utilizados en los sitios muestreados y su efecto en la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas en los esclerocios. Así mismo, se ha demostrado que la densidad bacteriana está estrechamente relacionada con las fuentes de carbono contenidas en los exudados de esclerocios (Coley-Smith y Dickenson, 1971) por lo que investigaciones futuras deberán enfocarse en determinar las fuentes de carbono presentes en los exudados de los esclerocios de *C. gigantea* y en qué cantidad se encuentran. La presencia de bacterias asociadas a esclerocios se ha evidenciado en otras investigaciones. Coley-Smith y Dickenson (1971) evidenciaron que los esclerocios del hongo *Sclerotium cepivorum*, favorecen el crecimiento de bacterias específicas debido a los exudados que contienen fuentes de carbono como etanol, trealosa, glucosa y manitol y que este microambiente constituye un nicho ecológico específico. Gilbert y Linderman (1971) reportaron cambios cualitativos e incremento de la actividad microbiana en el suelo cercano a los esclerocios de *Sclerotium rolfii* atribuido a los exudados en los esclerocios de este patógeno. Estos autores denominaron “micosfera” a la porción de suelo influenciado por los esclerocios y demostraron que albergan poblaciones bacterianas con mayor representatividad de especies antagonistas contra *S. rolfii* que las obtenidas de otros nichos ecológicos.

En esta investigación, de 129 cepas bacterianas aisladas de esclerocios de las diferentes localidades muestreadas, 22 (17%) de ellas se identificaron por su antagonismo *in vitro* (halo de inhibición del crecimiento fúngico ≥ 5 mm) contra una o más especies de *Fusarium* que causan pudrición de mazorca de maíz. Mediante la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, fue posible identificar a las 22 cepas bacterianas antagonistas pertenecientes a los géneros

Bacillus, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*

Los antagonistas más abundantes en esclerocios de *C. gigantea* pertenecieron a los géneros *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) (36.3%) y *Bacillus* (Bacillaceae) (31.8%). En ambos géneros se han dilucidado sus mecanismos para el biocontrol de fitopatógenos mediado por antibiosis, competencia por nutrientes y espacios, promoción del crecimiento e inducción de resistencia en plantas (Cui *et al.*, 2019; Dimkill *et al.*, 2022; Fira *et al.*, 2018; Guzmán-Guzmán y Santoyo, 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022).

Los resultados de esta investigación coinciden con los obtenidos en otras investigaciones en donde destacan la mayor abundancia de ambos géneros colonizando esclerocios de *Rhizoctonia solani* (Zachow *et al.*, 2011) y *Sclerotium cepivorum* (Backhouse y Stewart, 1989; Utkhede y Rahe, 1980) evidenciando fuerte antagonismo contra estos patógenos, además del género *Stenotrophomonas* el cual también se identificó en esta investigación. Wong y Hughes (1986) demostraron que el 80% de los antagonistas aislados de muestras de suelo y esclerocios de *S. cepivorum* fueron especies del género *Bacillus*. Este género incluye un grupo de bacterias Gram positivas con alta heterogeneidad fenotípica y genética considerados entre los colonizadores más comunes en diversos nichos ecológicos (Abriouel *et al.*, 2011). En este estudio, la mayoría de las cepas identificadas fueron antagonistas *in vitro* contra una o dos especies de *Fusarium*; sin embargo, las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18), *B. subtilis* (BA1) y *Pseudomonas syringae* (BA2) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* evaluados (*F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*) causantes de pudrición de mazorca de maíz.

En otras investigaciones, *B. amyloliquefaciens* se ha reportado como antagonista con alto potencial para el biocontrol de otras especies de *Fusarium* en espinaca (*Spinacia oleracea*) (Zhao *et al.*, 2014), banano (*Musa* sp.) (Tian *et al.*, 2021), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Elanchezhiyan *et al.*, 2018; Proca *et al.*, 2020) y trigo (*Triticum* sp.) (Ursan *et al.*, 2019). Algunas cepas de *B. amyloliquefaciens* se han reportado como antagonistas y eficientes agentes de biocontrol de *F. graminearum* (de Ángel *et al.*, 2021; Gu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019) y *F. verticillioides* (Xu *et al.*, 2021).

La prevalencia y antagonismo de *B. subtilis* aislado de esclerocios de *C. gigantea*, coincide con otros estudios. Utkhede y Rahe (1980) demostraron que existe mayor prevalencia de *B. subtilis* en esclerocios de *S. cepivorum* colectados de varias partes del mundo y que la mayoría de estas cepas protegieron significativamente a la cebolla (*Allium cepa*) de la pudrición blanca causado por este patógeno cuando se inocularon en semilla al momento de la siembra. Estos autores atribuyeron la prevalencia de *B. subtilis* a los carbohidratos específicos contenidos en los exudados de los esclerocios de *S. cepivorum*. También, cepas de *B. subtilis* han mostrado antagonismo y eficiente biocontrol contra *F. graminearum* y *F. verticillioides* en trigo y maíz respectivamente (Cavaglieri *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021).

El género *Pseudomonas* incluye especies Gram negativas las cuales han sido ampliamente estudiadas como una opción en el control biológico de fitopatógenos y promoción del crecimiento de plantas (Dimkill *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán y Santoyo 2022; Singh *et al.*, 2022). *Pseudomonas syringae* identificada en este estudio como antagonista contra las tres especies de *Fusarium* pertenece al complejo de especies de *P. fluorescens* y se ha descrito como una especie importante como agente de biocontrol junto con *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* y *P. putida* y (Panpatte *et al.*, 2016). *Pseudomonas syringae* es un complejo de especies que incluye cepas fitopatógenas en un amplio rango de plantas hospedantes (Baltrus *et al.*, 2017); sin embargo, se han identificado cepas de *P. syringae* no fitopatógenas cuyo genoma alberga un extenso grupo de genes relacionados con el biocontrol de fitopatógenos, promoción de crecimiento e inducción de resistencia en plantas (Passera *et al.*, 2019). Yu *et al.* (2017), demostraron que la cepa *Pseudomonas syringae* BAF.1 inhibió completamente la germinación de conidios y afectó la estructura del micelio de *Fusarium oxysporum* proponiéndolo como un promisorio agente de biocontrol contra este patógeno.

En esta investigación, las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* y produjeron *in vitro* todos los metabolitos evaluados (producción de ácido indol-3-acético; enzimas lipolíticas y proteolíticas, sideróforos y solubilización de fosfato mineral) (Cuadro 3). Se ha evidenciado que la producción de estos metabolitos juega un papel importante en el biocontrol de hongos fitopatógenos y promoción del crecimiento de plantas (Sagar *et al.*, 2022). Las enzimas proteolíticas y lipolíticas producidas por especies

de *Bacillus* y *Pseudomonas* causan lisis celular de hongos; los sideróforos son compuestos antimicrobianos que facilitan la movilización de hierro y solubilización de nutrientes no disponibles por las plantas (Admassie *et al.*, 2022). La producción de reguladores del crecimiento vegetal como el ácido indol-3-acético estimula el desarrollo del sistema radical de las plantas e inducen resistencia a patógenos; en tanto que la solubilización de minerales como el fósforo promueve el desarrollo de las plantas, inducen resistencia a patógenos y mejoran la absorción de agua y otros nutrientes (Mahapatra *et al.*, 2022; Sagar *et al.*, 2022).

Se ha sugerido que en especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*, la supresión de enfermedades, promoción de crecimiento e inducción de resistencia en plantas son resultado de su capacidad para producir una amplia gama de metabolitos secundarios codificados por diversos grupos de genes (Andrić *et al.*, 2020; Dimkić *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2022); sin embargo, se consigna que la proporción de estos genes en el genoma involucrada en la síntesis de compuestos antimicrobianos y otros metabolitos secundarios bioactivos dependen de la especie y la cepa (Devi *et al.*, 2019), por lo que se sugiere profundizar en el conocimiento sobre las características del genoma de estas tres cepas antagonistas identificadas en esta investigación, previo al registro de las secuencias 16S rRNA en el GenBank del NCBI. Se ha demostrado que la inoculación de cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. promueven el crecimiento e inducen la resistencia en plantas de maíz (Egamberdiyeva *et al.*, 2007).

Especies del género *Bacillus* son promisorios agentes de control biológico debido a sus características genéticas, alta resistencia al calor y desecación por la formación de endosporas (Luo *et al.*, 2022); se consideran cepas que no representan un riesgo a la salud humana por lo cual no hay restricciones para su uso como agentes de biocontrol de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de EUA (Dimkić *et al.*, 2022; Hou *et al.*, 2006). Así mismo, formulaciones comerciales de *P. syringae* están aprobadas para el manejo de *Fusarium* spp. en postcosecha en EUA y Canadá (Al-Mughrabi *et al.*, 2013). Por lo anterior, las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *B. amyloliquefaciens* (BA18) identificadas en esta investigación, aisladas de esclerocios de *C. gigantea* antagonistas *in vitro* contra tres especies de *Fusarium* causantes de pudrición en mazorca de maíz, multifuncionales en la producción de metabolitos secundarios, son un recurso biotecnológico importante para futuras investigaciones como agentes de biocontrol contra este patógeno en el cultivo de maíz en México.

CONCLUSIONES

Los esclerocios de *C. gigantea* albergan diferente densidad de poblaciones bacterianas. En los esclerocios con origen en la localidad de Atlacomulco Estado de México hay mayor densidad bacteriana que en el resto de las localidades. Entre las poblaciones bacterianas que colonizan los esclerocios existen cepas antagonistas contra al menos una especie de *Fusarium* que causan pudrición de mazorca en maíz y producen diversos metabolitos posiblemente implicados con el antagonismo y promoción del crecimiento de plantas. De 22 cepas bacterianas antagonistas, la secuenciación parcial del gen 16S rRNA identificó a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* como las bacterias antagonistas más abundantes en esclerocios de *C. gigantea*. *Fusarium verticillioides* es menos sensible que *F. subglutinans* y *F. graminearum* al antagonismo *in vitro* de las cepas bacterianas aisladas de esclerocios de *C. gigantea*; *Fusarium graminearum* es la más sensible entre las tres especies de *Fusarium* evaluadas. Las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) son antagonistas *in vitro* eficientes contra las tres especies de *Fusarium* y una potencial alternativa para el biocontrol de estos patógenos en el cultivo de maíz en México.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). A la Dra. Dolores Briones Reyes del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados campus Montecillo por la donación de las cepas de *Fusarium* spp. utilizadas en esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Abdullah MT, Ali NY and Suleman P. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 27: 1354-1359. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.05.007>
- Admassie M, Woldehawariat Y and Alemu T. 2022. In vitro evaluation of extracellular enzyme activity and its biocontrol efficacy of bacterial isolates from pepper plants for the management of *Phytophthora capsici*. *BioMed Research International* 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6778352>
- Agurell SL, Ramstad E and Ullstrup AJ. 1963. The alkaloids of maize ergot. Part V of biogenetic studies in ergot; Part IV: *Svensk Farmaceutisk Tidskrift* 66(741). *Planta Medica* 11:392-398. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1100254>
- Al-Mughrabi KI, Vikram A, Peters RD, Howard RJ, Grant L, Barasubiye T and Jayasuriya KE. 2013. Efficacy of *Pseudomonas syringae* in the management of potato tuber diseases in storage. *Biological Control* 64:315-322. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.011>

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Andriil S, Meyer T and Ongena M. 2020. *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. *Frontiers in Microbiology* 11:1350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350>
- Backhouse D and Stewart A. 1989. Interactions between *Bacillus* species and sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Soil Biology and Biochemistry* 21:173-176. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90029-1)
- Baker GC, Smith JJ and Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55:541-555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Baltrus DA, McCann HC and Guttman DS. 2017. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 18:152-168. <https://doi.org/10.1111/mpp.12506>
- Bragg PE, Maust MD and Panaccione DG. 2017. Ergot alkaloid biosynthesis in the maize (*Zea mays*) ergot fungus *Claviceps gigantea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(49): 10703–10710. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04272>
- Cavaglieri L, Orlando JR, Rodriguez MI, Chulze S and Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156:748-754. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.001>
- CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: Una Guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F. CIMMYT. 112 p.
- CIMMYT. 2019. Maíz para México. Plan Estratégico 2030. <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/20219>
- Cochran WG. 1982. Técnicas de muestreo. Compañía Editorial Continental. México. 513 p.
- Coley-Smith JR and Dickinson DJ. 1971. Effects of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. on soil bacteria. The nature of substances exuded by sclerotia. *Soil Biology and Biochemistry* 3(1):27-32. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(71\)90028-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(71)90028-9)
- Cui W, He P, Munir S, He P, Li X, Li Y, Wu J, Yang L, He P and He Y. 2019. Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. *Biological Control* 139:104080. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104080>
- de Ángel EC, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, and Ochoa-Fuentes YM. 2021. Actividad antifúngica de bacterias endófitas para el control de *Fusarium verticillioides* en maíz. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 8(2): e2790. <https://doi.org/10.19136/era.a8n2.2790>
- Devi S, Kiesewalter HT, Kovács R, Frisvad JC, Weber T, Larsen TO, Kovács AT and Ding L. 2019. Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001. *Synthetic and Systems Biotechnology* 4(3):142-149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.08.002>
- Dimkiil I, Janakiev T, Petrovil M, Degrassi G and Fira D. 2022. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 117:101754. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>
- Egamberdiyeva D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36:184–189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.02.005>
- Elanchezhyan K, Keerthana U, Nagendran K, Prabhukarthikeyan SR, Prabakar K, Raguchander T and Karthikeyan G. 2018. Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 103:92-101. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.008>
- El-Yazeid AA, Abou-Aly HA, Mady MA and Moussa SAM. 2007 Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using phosphate dissolving microorganisms (bio phosphor) combined with boron foliar spray. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3:274-286.
- Fira D, Dimkiil I, Beril T, Lozo J and Stankovil S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology* 285:44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

- Fucikovsky L and Moreno M. 1976. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the state of México, México. *Plant Disease Reporter* 55:231-233.
- Fuentes SF, De la Isa ML, Ullstrup AJ and Rodríguez AE. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of Maize in Mexico. *Phytopathology* 54(4):379-381.
- García-López V and Giraldo OF. 2021. Redes y estrategias para la defensa del maíz en México. *Revista Mexicana de Sociología* 83(2):297-329.
- Guzmán-Guzmán P and Santoyo G. 2022. Action mechanisms, biodiversity, and omics approaches in biocontrol and plant growth-promoting *Pseudomonas*: an updated review. *Biocontrol Science and Technology* 32(5):527–550. <https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2066630>
- Gilbert RG and Linderman RG. 1971. Increased activity of soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. *Canadian Journal of Microbiology* 17(4):557-562. <https://doi.org/10.1139/m71-091>
- Gu Q, Yang Y, Yuan Q, Shi G, Wu L, Lou Z, Huo R, Wu H, Borriss R and Gao X. 2017. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plantpathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied Environmental Microbiology* 83:e01075-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01075-17>
- Guimarães RA, Zanotto E, Perrony PEP, Zanotto LAS, da Silva LJ, Machado JDC and de Medeiros FHV. 2021. Integrating a chemical fungicide and *Bacillus subtilis* B10UFLA2 ensures leaf protection and reduces ear rot (*Fusarium verticillioides*) and fumonisin content in maize. *Journal of Phytopathology* 169(3):139-148. <https://doi.org/10.1111/jph.12968>
- Hantsis-Zacharov E and Halpern M. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73(22):7162-7168. <https://doi.org/10.1128/aem.00866-07>
- Hof H. 2020. The medical relevance of *Fusarium* spp. *Journal of Fungi* 6(3): 117. <https://doi.org/10.3390/jof6030117>
- Hou X, Boyetchko SM, Brkic M, Olson D, Ross A and Hegedus D. 2006. Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(4):644-653. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0315-8>
- Liu Y, Lu J, Sun J, Lu F, Bie X and Lu Z. 2019. Membrane disruption and DNA binding of *Fusarium graminearum* cell induced by C16-Fengycin A produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Food Control* 102:206-213. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.031>
- Luo L, Zhao C, Wang E, Raza A and Yin C. 2022. *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research* 259:127016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>
- Mahapatra S, Yadav R and Ramakrishna W. 2022. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Journal of Applied Microbiology* 132(5): 3543-3562. <https://doi.org/10.1111/jam.15480>
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez J, Buckler E and Doebley J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(9):6080-6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Mesterhazy A, Lemmens M and Reid LM. 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize—a review. *Plant Breeding* 131(1):1-19. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01936.x>
- Mielniczuk E and Skwaryło-Bednarsz B. 2020. *Fusarium* head blight, mycotoxins and strategies for their reduction. *Agronomy* 10(4):509. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040509>
- Moreno-Limón S, González-Solís LN, Salcedo-Martínez SM, Cárdenas-Ávila ML and Perales-Ramírez A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica* 32:193-205. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.12>
- Padrón HYM, Delgado SH, Méndez CAR and Carrillo GV. 2013. El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2): 126-146.
- Panpatte DG, Jhala YK, Shelat HN and Vyas RV. 2016. *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. In: Singh, D., Singh, H., Prabha, R. (eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (pp. 257-270). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_15

- Passera A, Compant S, Casati P, Maturo MG, Battelli G, Quaglino F, Antonielli L, Salerno D, Brasca M, Toffolatti SL, Mantegazza F, Delledonne M and Mitter B. 2019. Not Just a Pathogen? Description of a Plant-Beneficial *Pseudomonas syringae* Strain. *Frontiers in Microbiology* 10:1409. doi: 10.3389/fmicb.2019.01409
- Peng S, Zhou Q, Cai Z and Zhang Z. 2009. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials* 168(2-3):1490-1496. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.036>
- Proca IG, Diguñ CF, Cornea CP, Jurcoane S and Matei F. 2020. Halotolerant *Bacillus amyloliquefaciens* 24.5. *Rom Biotechnology Letters* 25(4):1744-1753.
- Sagar A, Yadav SS, Sayyed RZ, Sharma S and Ramteke PW. 2022. *Bacillus subtilis*: a multifarious plant growth promoter, biocontrol agent, and bioalleviator of abiotic stress. In *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting* (pp. 561-580). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2_24
- Schwyn B, and Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160(1):47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Singh P, Singh RK, Zhoua Y, Wanga J, Jiangb Y, Shena N, Wanga Y, Yangb L and Mingguo J. 2022. Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review. *Journal of Plant Interactions* 17(1):220–238. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>
- Solano-Báez AR, Cuca-García JM, Delgado-Alvarado A, Panaccione D, De León-García de Alba C, Leyva-Mir SG, Sánchez-Pale JR and Hernández-Morales J. 2018. Biological activity of *Claviceps gigantea* in juvenile New Zealand rabbits. *Mycotoxin Research* 34:297-305. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0324-3>
- Tian D, Song X, Li C, Zhou W, Qin L, Wei L, Di W, Huang S, Li B, Huang Q, Long S, Hew Z and Wei S. 2021. Antifungal mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GKT04 against *Fusarium* wilt revealed using genomic and transcriptomic analyses. *Microbiology Open* 10(3):e1192. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1192>
- Ullstrup AJ. 1973. Maize ergot: a disease with a restricted ecological niche. *PANS Pest Articles & News Summaries* 19(3):389-391. <https://doi.org/10.1080/09670877309412786>
- Ursan MD, Boiu-Siciua OA and Cornea CP. 2019. *Bacillus amyloliquefaciens* strains with biocontrol potential against *Fusarium* spp. wheat pathogens. *Scientific Papers. Series A. Agronomy*: 486-491. <https://doi.org/10.2478/alife-2018-0093>
- Utkhede RS and Rahe JE. 1980. Biological control of onion white rot. *Soil Biology and Biochemistry* 12(2):101-104. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(80\)90043-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(80)90043-7)
- Wang S, Sun L, Zhang W, Chi F, Hao X, Bian J and Li Y. 2020. *Bacillus velezensis* BM21, a potential and efficient biocontrol agent in control of corn stalk rot caused by *Fusarium graminearum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30(1):1-10. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0209-6>
- Wong WC and Hughes IK. 1986. *Sclerotium cepivorum* Berk. in onion (*Allium cepa* L.) crops: isolation and characterization of bacteria antagonistic to the fungus in Queensland. *Journal of Applied Bacteriology* 60(1):57-60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01065.x>
- Xu S, Wang Y, Hu J, Chen X, Qiu Y., Shi J, Wang G and Xu J. 2021. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01, a bifunctional biocontrol bacterium with antagonistic activity against *Fusarium graminearum* and biodegradation capacity of zearalenone. *Food Control* 130:108259. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108259>
- Yu C, Liu X, Zhang X, Zhang M, Gu Y, Ali Q, Mohamed MSR, Xu J, Shi J, Gao X, Wu H and Gu Q. 2021. Mycosubtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 inhibits growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. *Toxins* 13(11):791. <https://doi.org/10.3390/toxins13110791>
- Yu S, Teng C, Liang J, Song T, Dong L, Bai, X Jin Y and Qu J. 2017. Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. *Journal Microbiology* 55:877–884. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7191-z>
- Zachow C, Grosch R and Berg G. 2011. Impact of biotic and a-biotic parameters on structure and function of microbial communities living on sclerotia of the soil-borne pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Applied Soil Ecology* 48(2):193-200. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.03.006>

- Zenteno-Zevada M, 1963. Estudios sobre hongos parásitos de gramíneas de la República Mexicana. III. Pruebas de inoculación en plántulas de maíz con *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. In Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México 34: 69-83. <https://doi.org/10.21829/ib.289.2000.82>
- Zhao P, Quan C, Wang Y, Wang J and Fan S. 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. Journal of Basic Microbiology 54(5):448-456. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200414>



1.7. Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía

Alma Sánchez-Bautista, Carlos De León-García de Alba, Sergio Aranda-Ocampo*, Emma Zavaleta-Mejía, Cristian Nava-Díaz, Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, CP. 56230, Texcoco, Estado de México; Paul H. Goodwin, Department of Plant Pathology, School of Environmental Sciences, University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada; Santos G. Leyva-Mir, Laboratorio de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, CP. 56230, Texcoco, Estado de México. *Autor para correspondencia: saranda@colpos.mx.

Resumen

El maíz (*Zea mays*) ocupa el segundo lugar como alimento en el mundo y la sequía limita su productividad. Las plantas albergan bacterias endófitas que influyen en la sanidad y tolerancia a la sequía. El objetivo de esta investigación fue estimar la densidad y diversidad de las bacterias endófitas cultivables de la raíz en siete líneas homocigóticas de maíces tolerantes y siete susceptibles a sequía en tres localidades de México durante tres ciclos del cultivo. La densidad y diversidad de las poblaciones bacterianas se evaluó mediante conteo directo en placas y se identificaron por PCR. Los resultados identificaron tres grupos de bacterias endófitas: 1) altamente frecuentes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas geniculata*), 2) frecuentes (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* y *Sinorhizobium meliloti*) y 3) baja frecuencia (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia gladioli*). El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la densidad ($_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ de raíz) de población por localidad, ciclo de cultivo, días después de siembra y líneas de maíz. La densidad de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas hibiscola* en la localidad de El Batán y *Bacillus megaterium*, *Sinorhizobium meliloti* en Tlaltzapán, fueron significativamente mayores en las líneas de maíz tolerantes que en las susceptibles a sequía.

Palabras clave: *Zea mays*; bacterias endofíticas; diversidad bacteriana; 16S rADN.

El maíz (*Zea mays*) es actualmente el segundo cultivo alimenticio más importante en términos de fuentes de energía y un contenido de proteína de aproximadamente 9.2% en la nutrición humana (FAO, 2016). México ocupa el séptimo lugar en producción del cereal con aproximadamente 25 millones de toneladas al año (FIRA, 2016). La productividad de esta gramínea se limita por factores bióticos por varias plagas y enfermedades y abióticos como sequía, deficiencia de nutrientes, salinidad y altas temperaturas (Grover *et al.*, 2007). La sequía es el término meteorológico para la escasez de agua y es uno de los factores ambientales de estrés más importantes que afectan la germinación, vigor de la planta y productividad de los cultivos agrícolas (Kamara *et al.*, 2003; Wilkinson y Davies, 2010) y una posible alternativa para hacer frente a este problema es la generación de conocimiento sobre los microorganismos de las plantas que desempeñan una función importante en la expresión de resistencia al estrés por factores abióticos (Gond *et al.*, 2015).

Los microorganismos endófitos son bacterias, hongos o virus que habitan, parte o todo su ciclo de vida, en el tejido interno de las plantas sin causar daño a su hospedante y que establecen una interacción simbiótica que modulan la sanidad de la planta y su habilidad para adaptarse a diferentes factores de estrés del ambiente (Hardoim *et al.*, 2015). Las bacterias endófitas representan un subgrupo dentro de la comunidad de bacterias de la rizosfera y rizoplano que colonizan el tejido interno de las raíces de la planta hospedante y que le confiere ventajas ecológicas sobre otras poblaciones que colonizan en forma epífita. Diversas especies de bacterias endófitas Gram positivas y Gram negativas se han aislado de diferentes tipos de tejido en numerosas especies de plantas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).

Existen evidencias del efecto positivo que inducen los microorganismos endófitos mediado por la expresión de mecanismos como el antagonismo, resistencia sistémica inducida (RSI) y adquirida (RSA), promotores del crecimiento de la planta, y la inducción de una respuesta de adaptación al estrés ambiental (Liu *et al.*, 2013). La relación entre la planta hospedante y la comunidad bacteriana endofítica refleja la coevolución en el proceso de colonización influenciado por el genotipo, etapa de crecimiento, estado fisiológico y tejido de la planta, así como por las características del suelo, prácticas agronómicas y condiciones ambientales como la temperatura, agua y el suministro de nutrientes (Higgins *et al.*, 2007).

En Maíz, la inoculación de estos microorganismos se relaciona con un incremento en la germinación, altura de la planta, biomasa radical y aérea que mejora el rendimiento (Morales *et al.*, 2011). Así mismo, se ha demostrado la eficiencia con la inoculación de estas bacterias en maíz promoviendo tolerancia al stress por sequía (Fan *et al.*, 2015), mediado por el incremento de la longitud y biomasa de la raíz mejorando la absorción de agua y nutrientes (Naseem y Bano, 2014; Yasmin *et al.*, 2013). Las bacterias endófitas pueden inducir tolerancia contra enfermedades abióticas como salinidad y sequía, mientras que algunas poblaciones confieren tolerancia a factores de estrés específico y son responsables de la supervivencia de las plantas bajo esas condiciones particulares del ambiente (Gond *et al.*, 2015; Montañez *et al.*, 2011). Así, los microorganismos que establecen una interacción positiva con las raíces de las plantas desempeñan un papel clave en sistemas agrícolas con un promisorio potencial biotecnológico para su uso en una agricultura sostenible.

En México no existen investigaciones sobre las comunidades bacterianas endófitas en raíces de líneas de maíz tolerantes y susceptibles a sequía. Tales bacterias endófitas, potencialmente podrían utilizarse para el desarrollo de futuras estrategias biotecnológicas como inductores de tolerancia a sequía y a otros factores bióticos y abióticos limitantes en la productividad del cultivo. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar la densidad y diversidad de las poblaciones bacterianas cultivables endófitas en la raíz en líneas de maíz homocigóticas (S6) tolerantes y susceptibles a sequía previamente identificadas con este carácter en condiciones de campo y cultivadas en tres localidades de México durante tres ciclos del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo. Se sembraron siete líneas homocigóticas de maíz tolerantes (CLQRQ108, CML384, CML445, CML544, DTMA90, DTMA224, DTMA256) y siete susceptibles a sequía (CML181, DTMA34, DTMA41, DTMA43, DTMA109, DTMA144, DTMA182), las cuales se seleccionaron por ser líneas endocriadas debido a su uniformidad en la respuesta a sequía. Cada línea se sembró con tres repeticiones en el Campo Experimental del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMyT) en las localidades de Tlaltizapán, Morelos (18.68 N; 99.11 O), El Batán, Texcoco, México (19.53 N; 98.85 O), y Agua Fria, Puebla (20.5 N; 97.6 O) durante los

ciclos de cultivo verano 2012 (V-2012), invierno 2012 (I-2012) y verano 2013 (V-2013). Se realizaron muestreos del tejido interno formado en la zona apical de la raíz en tres plantas de cada línea por localidad y ciclo de siembra a los 25, 52 y 75 días después de la siembra (dds) para su análisis en el Laboratorio de Patología de Maíz del CIMMyT, El Batán, Edo. México. El tamaño de muestra se determinó por el método propuesto por Cochran (1982).

Aislamiento de bacterias endófitas de raíces. Se definieron como cepas endófitas aquellos aislamientos bacterianos obtenidos del tejido interno de las raíces del maíz superficialmente esterilizadas. Las raíces de maíz sin síntomas se lavaron con agua destilada estéril y se cortaron en trozos de 2 cm. Se esterilizaron superficialmente 10 g de raíces en frascos de vidrio estériles con lavados en serie con etanol 70% durante 5 min; hipoclorito de sodio 0.53% durante 10 min y tres lavados con agua destilada estéril. Del último lavado con agua destilada estéril, se sembraron 100 μ L de cada frasco en placas Petri con medio de cultivo NB (1L): Agar Bacteriológico 15 g (BIOXON® México), Peptona 5 g (BD DIFCO™ EE. UU), Extracto de levadura 3 g (DIBICO® México), NaCl JT BAKER® México) y se incubaron a 28 ± 1 °C durante 2-5 días. La ausencia de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo confirmó la eficiente esterilización superficial de las raíces. Estas raíces se molieron en morteros fríos con 20 mL de una solución amortiguadora (50 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.6) estéril. Las suspensiones obtenidas se diluyeron en serie (1:9) desde 10^0 hasta 10^3 y se sembraron 100 μ L de cada dilución con tres repeticiones en medio NB incubados a 28 °C durante 24 h con luz continua. Se cuantificaron y clasificaron los diferentes morfotipos bacterianos con base al color, forma, textura y tipo de crecimiento. El crecimiento bacteriano se consideró representativo de bacterias cultivables endófitas en la raíz de maíz. Las cepas bacterianas se preservaron por congelación en medio NB y glicerol 20% para estudios posteriores.

Densidad poblacional de bacterias endófitas. La densidad poblacional de bacterias por tejido de raíz se estimó por conteo directo de colonias en placa. El número de colonias bacterianas aisladas de las 14 líneas de maíz se cuantificó con un contador de colonias (Quebec®, Darkfield Colony Counter). La población bacteriana de las muestras de tejido de raíz se expresó como unidades formadoras de colonias (UFC g^{-1} de raíz). Los datos obtenidos se transformaron a $_{\text{Log}10}$ UFC g^{-1} de raíz y se realizó un análisis de varianza (ANOVA)

siguiendo un diseño de análisis factorial de donde se obtuvo la separación de medias por DMS ($\alpha=0,05$) con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1.3 SAS Institute, Cary, NC, EE.UU) en función del ciclo de cultivo, localidad, días después de la siembra (dds) y líneas de maíz tolerantes/susceptibles a sequía estudiadas.

Amplificación del gen 16S rADN e identificación de bacterias endófitas.

La extracción de ADN de las bacterias se realizó por el protocolo descrito por Mahuku (2004), con las siguientes modificaciones: las células bacterianas se obtuvieron a partir del crecimiento en medio NB a 28 °C durante 48 h. Después de suspender el precipitado en 100 μ L de 1X TE, se agregaron 2 μ L de RNAsa (1 mg mL⁻¹), y se incubó en baño María a 37 °C durante 1 h. La calidad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa. Las bacterias se identificaron mediante la amplificación parcial del gen 16S rADN con los iniciadores universales 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5' TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3') con las condiciones de PCR descritas por Galkiewicz y Kellogg (2008). La amplificación y secuenciación se hizo en MacroGen (DNA Sequency Service. Korean Biotechnology Company); las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI) utilizando el programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación taxonómica de bacterias endófitas. La secuenciación parcial del gen 16S rADN permitió identificar 22 especies de bacterias endófitas en la raíz en ambos grupos de líneas de maíz. La mayor abundancia de bacterias se asoció a los phyla *Proteobacteria*, seguido de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Dentro de *Firmicutes*, el 100% de las cepas se identificaron como *Bacillus sp.* y dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, 33% como *Pseudomonas sp.*

La diversidad y riqueza de bacterias naturalmente asociadas a las raíces de maíz es amplia y la estimación de esta depende del método de análisis. En este estudio se utilizó un enfoque de cultivo dependiente y los resultados coinciden con investigaciones previas que reportaron el phylum *Proteobacteria* como el más dominante entre las poblaciones bacterianas endófitas aisladas en raíces, tallos y hojas de maíz (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Así

mismo, otros estudios sobre la diversidad de las comunidades endófitas de la raíz en maíz utilizando métodos de cultivo dependiente e independiente también coinciden en que las bacterias más frecuentemente asociadas a este cultivo son *Firmicutes* (*Bacillus*), *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*) (Pereira *et al.*, 2011) y *Burkholderia* spp. (Ikeda *et al.*, 2013). El análisis de estas poblaciones por cromatografía de gases y perfiles de ácidos grasos identificaron a *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* como las especies relativamente más predominantes en el tallo de maíz (Rai *et al.*, 2007), mientras que mediante pyrosecuenciación se identificó como los más abundantes en la rizosfera de maíz a los phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* (Li *et al.*, 2014).

Experimentaciones en maíz han mostrado el potencial uso de estas poblaciones como inoculantes bacterianos para el control de estrés por sequía, sugiriendo que la inducción de tolerancia a sequía se debe a la producción de fitohormonas como el ácido abscísico, giberélico, indol-3-acético, citocininas, enzimas como la ACC deaminasa, producción de exopolisacáridos bacterianos y la inducción de tolerancia sistémica (Dimkpa *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Timmusk *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2009). En otros cultivos se han señalado como inductores de tolerancia en trigo (*Triticum sativum*) y leguminosas (*Vigna radiata*) al ser inoculados en semilla y promoviendo el incremento en los niveles de regulación de genes relacionados con la tolerancia a sequía y la actividad de diversas enzimas (Kasim *et al.*, 2013; Saravanakumar *et al.*, 2011).

Por la frecuencia de los aislamientos, en el presente estudio se destacan tres grupos de bacterias endófitas en la raíz de maíces tolerantes y susceptibles a sequía: 1) altamente frecuentes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas geniculata*), aislados durante los tres ciclos de cultivo en las tres localidades, 2) frecuentes (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* y *Sinorhizobium meliloti*), aislados durante los tres ciclos de cultivo en dos localidades y 3) baja frecuencia (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia gladioli*), aisladas solo en dos localidades y no en todos los ciclos del cultivo (Cuadro 1).

La estructura taxonómica y funcional de las comunidades bacterianas en el suelo está influenciada por factores bióticos y abióticos como las características físicoquímicas del suelo, condiciones climáticas, genotipo de la planta y la interacción con otros procariontes y eucariontes en el suelo, lo cual indica que son interacciones complejas. En este estudio, la estructura y abundancia

Cuadro 1. Especies de bacterias endófitas identificadas en la raíz de 14 líneas de maíz en tres localidades y durante tres ciclos del cultivo.

ID	Endófito	Línea T/S	Identidad de Nucleótidos	Clase	Localidad/ciclo de cultivo		
					TL	AF	EB
AF101	<i>Acinetobacter soli</i> ^Z	T, S	96% (KU551890)	γ Proteobacteria		1	1
AF105	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	T, S	97% (KX518841)	α Proteobacteria		1	
TL007	<i>Bacillus asahii</i>	T, S	95% (KU551893)	Firmicutes	1, 2, 3		1
TL008	<i>Bacillus firmus</i> ^Y	T, S	98% (KU551896)	Firmicutes	1, 2, 3		1, 2, 3
AF103	<i>Bacillus megaterium</i> ^X	T, S	96% (KC414697)	Firmicutes	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
AF102	<i>Bacillus subtilis</i> ^X	T, S	97% (KU551891)	Firmicutes	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
AF111	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	T, S	96% (GU433447)	β Proteobacteria		1, 2, 3	
AF129	<i>Burkholderia gladioli</i> ^Z	S	97% (EU1611873)	β Proteobacteria	1, 2	2	
AF109	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	T, S	98% (KU551895)	Flavobacteria		1, 2, 3	2
TL032	<i>Enterobacter aerogenes</i>	T, S	97% (AM184247)	γ Proteobacteria	1	1, 2, 3	
BT011	<i>Enterobacter</i> spp.	T, S	97% (KX518848)	γ Proteobacteria			1
TL012	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	T, S	96% (KU551897)	Flavobacteria	1		
AF116	<i>Klebsiella oxytoca</i>	T, S	97% (KU551901)	γ Proteobacteria		2	
AF128	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	T, S	96% (KX518847)	γ Proteobacteria		1	
TL015	<i>Pseudomonas hibiscola</i> ^Y	T, S	97% (KX518846)	γ Proteobacteria	1, 2, 3		1, 2, 3
AF112	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	T, S	96% (KX518844)	γ Proteobacteria		1, 2, 3	
AF115	<i>Pseudomonas geniculata</i> ^X	T, S	96% (KU551900)	γ Proteobacteria	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
TL011	<i>Pseudomonas lini</i>	T, S	99% (KX518842)	γ Proteobacteria	1		
AF107	<i>Salmonella bongori</i>	T, S	96% (KU551899)	γ Proteobacteria	1		
AF106	<i>Serratia marcescens</i>	T, S	96% (KX518843)	γ Proteobacteria	1, 2, 3	1	
TL010	<i>Sinorhizobium meliloti</i> ^Y	T, S	98% (KU551892)	α Proteobacteria	1, 2, 3		1, 2, 3
TL009	<i>Stenotrophomas maltophilia</i> ^Z	T, S	98% (KU551894)	γ Proteobacteria		1, 2, 3	1

TL= Tlaltizapán, Mor., AF= Agua Fria, Pue., EB= El Batán, Méx. / TL= Tlaltizapán, Mor., AF= Agua Fria, Pue., EB= El Batán, Mex. 1=Verano 2012; 2=Invierno 2012; 3=Verano 2013.

^X Endófitos altamente frecuentes.

^Y Endófitos frecuentes.

^Z Endófitos de baja frecuencia.

de las bacterias aisladas puede asociarse con la interacción de varios factores, incluyendo el genotipo de la planta, las características genéticas de la bacteria, el suelo, la temperatura, ciclo de cultivo y fenología de la planta de maíz (Li *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2009) que influyen en la colonización y dinámica de las comunidades bacterianas endófitas (Bodenhausen *et al.*, 2013). Se ha mostrado la relación específica entre planta-endófito mediante una quimiotaxia bacteriana hacia exudados de la planta hospedante como fuentes de carbono que actúan como moléculas de señalización (Albareda *et al.*, 2006) y que las diferencias en la composición y patrones de exudación son dependientes del cultivar, etapa de desarrollo, exposición a estrés de la planta y tipo de suelo, los cuales influyen la colonización por comunidades bacterianas (Haichar *et al.*, 2008). Estudios en maíz indicaron que los exudados de la raíz están compuestos de 65% de azúcares, 33% de ácidos orgánicos y 2% de aminoácidos y

que los cambios en cantidad y calidad en estos patrones de exudación en las diferentes etapas del crecimiento y fisiología de la raíz, influyó en la biomasa y estructura de las comunidades bacterianas incrementando la actividad y deposición de nutrientes por estas comunidades microbianas beneficiando el crecimiento de la planta (Baudoin *et al.*, 2003). Algunas investigaciones en maíz mediante un enfoque de cultivo dependiente han demostrado cambios dinámicos en la comunidad bacteriana de la rizosfera en diferentes etapas de crecimiento del cultivo (Cavaglieri *et al.*, 2009; Nacamulli *et al.*, 1997).

En este estudio se identificaron bacterias específicas como *Burkholderia gladioli*, la cual se aisló con baja frecuencia únicamente en las líneas susceptibles en dos localidades y ciclos de cultivo (Cuadro 1).

B. gladioli se ha identificado previamente en raíces del ancestro silvestre (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) y en genotipos modernos de maíz como un endófito con propiedades antifúngicas (Shehata *et al.*, 2016); así mismo, la inoculación de *Burkholderia* sp. en maíz mostró efectos positivos en la tolerancia a sequía (Fan *et al.*, 2015; Naveed *et al.*, 2014).

Densidad de poblaciones endófitas en líneas de maíz. La densidad de bacterias endófitas en las 14 líneas de maíz tuvo rangos entre 1, 6_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz. El ANOVA mostró diferencias altamente significativas (**= p<0,01) en la densidad de población endófitas de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscola* y *S. meliloti* en función de la localidad, ciclo de cultivo, días después del trasplante (dds) y grupo (tolerancia/susceptibilidad a sequía) de línea de maíz (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza y comparación de medias de la densidad de población (Log₁₀ UFC g⁻¹ de raíz) en las raíces de 14 líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía.

	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>P. hibiscola</i>	<i>S. meliloti</i>
Localidad	**	**	**	**
Ciclo	NS	**	**	NS
Días	NS	**	NS	**
Tolerancia	**	**	**	**
Tolerante	2.2684 a	3.7374 a	2.9388 a	4.8880 a
Susceptible	1.7410 b	3.3976 b	2.4501 b	4.6389 b

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05) .

NS= No existen diferencias significativas.

**= Diferencias altamente significativas.

Por localidad, en El Batán, las mayores densidades de poblaciones se registraron con *B. subtilis* y *P. hibiscola*, mientras que en Tlaltizapán fueron con *B. megaterium* y *S. meliloti*. Por ciclo de cultivo y fecha de muestreo, *B. megaterium* y *P. hibiscola* fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) durante el ciclo V-2012 a los 52 dds. En el presente estudio se identificaron un total de 22 bacterias endófitas en raíces de líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. Sin embargo, la densidad de población de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscola* y *S. meliloti* fueron significativamente mayores en las líneas de maíz tolerantes que en las susceptibles a sequía (Cuadro 2).

La densidad de poblaciones en bacterias es un elemento clave y se considera como el mayor mecanismo de regulación del metabolismo en la interacción con el medioambiente biótico y abiótico, a través del cual coordina la expresión de genes especializados dependiente de una densidad celular. Este comportamiento conocido como Quorum sensing (QS), en bacterias asociadas a plantas se ha demostrado que regula la expresión de genes en la rizosfera para la síntesis de metabolitos secundarios, compuestos antifúngicos, antibióticos y enzimas extracelulares que están involucrados en el biocontrol. (Somers *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2001).

En este estudio, la densidad total de población de *B. subtilis* en las líneas de maíz en la localidad de El Batán fue de $3, 4_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} de raíz, no hubo diferencia significativa por ciclo y días después de la siembra, pero fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 1).

Como endófito, *B. subtilis* es un microorganismo de gran interés en aplicaciones biotecnológicas como agente de biocontrol de enfermedades bióticas y abióticas, mediada por la eficiente colonización de las raíces de las plantas que desencadenan diferentes mecanismos de biocontrol y adaptación a diferentes ambientes (Marulanda *et al.*, 2006); además, demostrando su alta capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que actúan como moléculas de señalización para disparar una respuesta de defensa mediante la resistencia sistémica inducida (ISR) específica (Farag *et al.*, 2013). Estos VOCs activan las vías de producción de hormonas incluyendo auxinas, giberelinas, citocininas y ácido salicílico, que promueven el desarrollo de la planta hospedante en condiciones de estrés, principalmente por el incremento de biomasa radicular resultando en una mejor absorción de agua (Zhang *et al.*, 2007). Otro estudio demostró que la inoculación en semilla de maíz con cepas

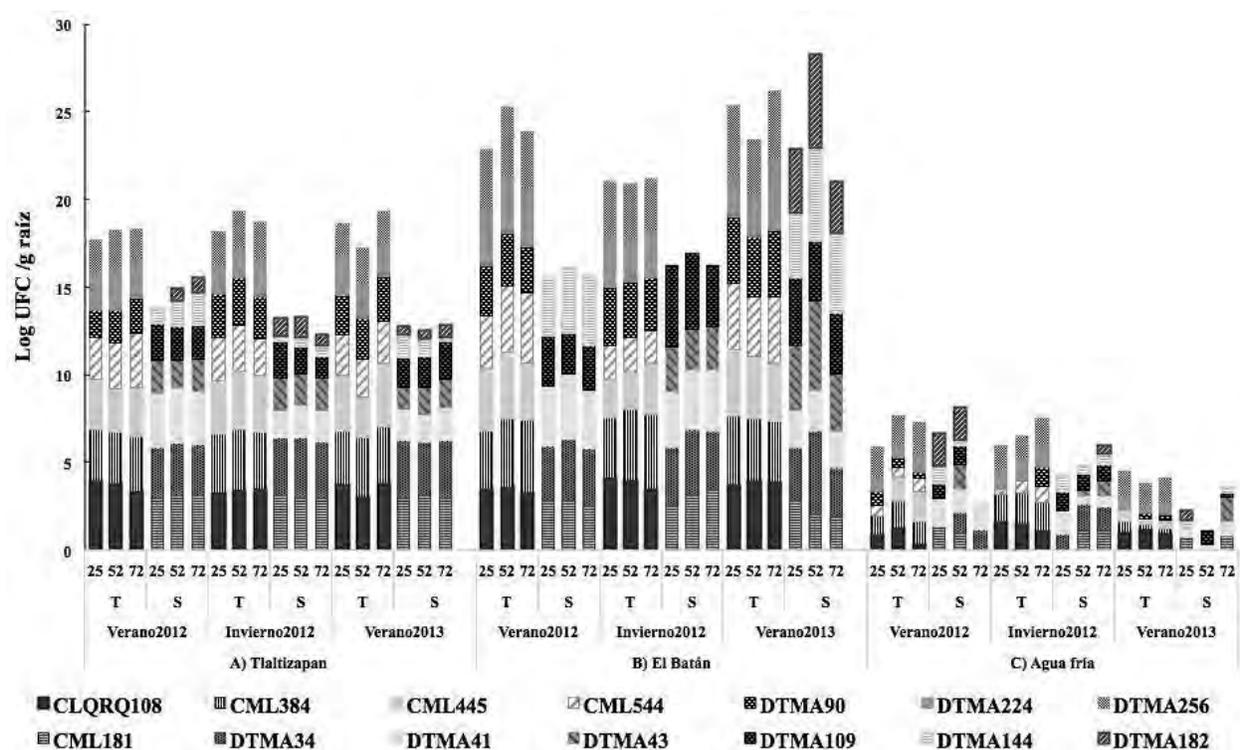


Figura 1. Población de *B. subtilis* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

seleccionadas de *B. subtilis* aportó importantes beneficios como promotor de crecimiento y mayor capacidad de absorción de nutrientes (Canbolat *et al.*, 2006).

En Tlaltizapán, la densidad de población de *B. megaterium* en las líneas de maíz estuvo entre 3, $5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} de raíz en los tres ciclos y fue significativamente mayor ($5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} de raíz) en el ciclo V-2012 a los 52 dds, fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 2).

Investigaciones recientes demostraron que *B. megaterium* modifica la respuesta de la planta del maíz ante varios estreses abióticos, incluyendo la importancia de la densidad poblacional de algunas especies de *Bacillus* en la respuesta de tolerancia a sequía y transporte de agua en *Retama sphaerocarpa*, al estimular el crecimiento de la raíz y la capacidad de absorción de agua y los niveles de prolina y ácido indol acético (Marulanda *et al.*, 2006). Particular-

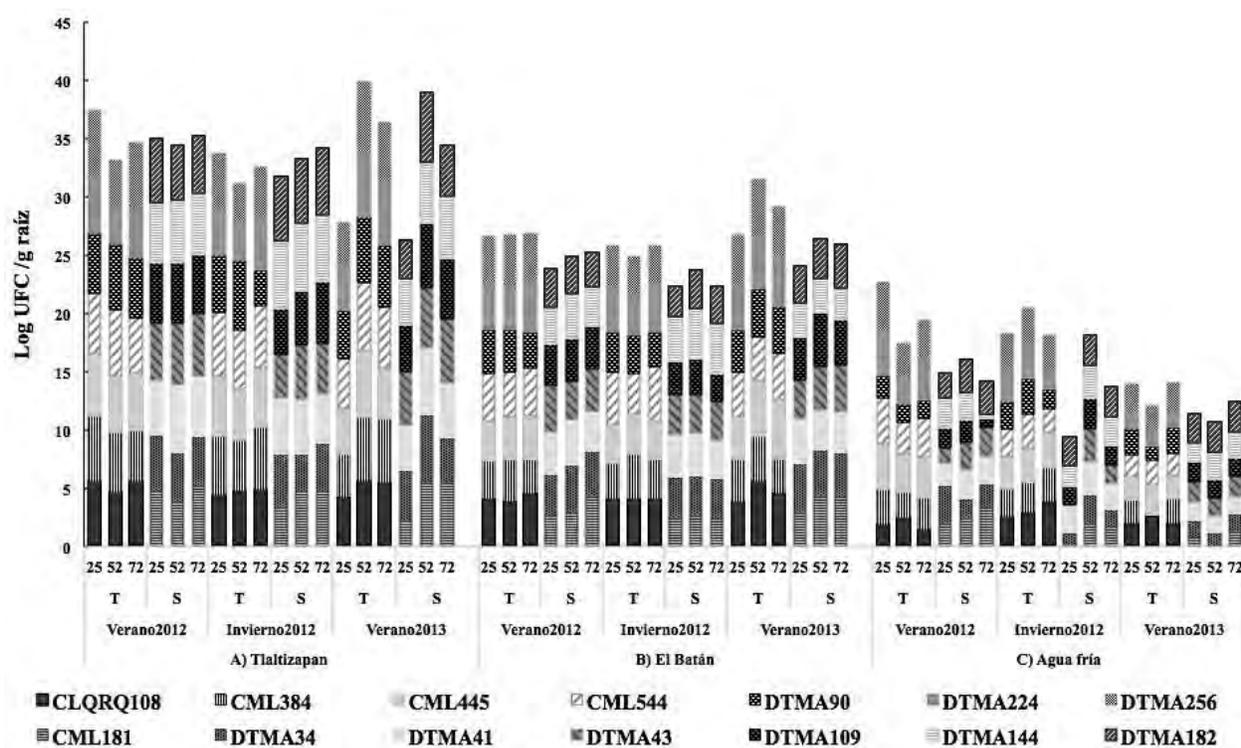


Figura 2. Población de *B. megaterium* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

mente, destacan que la presencia de *B. megaterium* en su planta hospedante aumenta la biomasa y contenido de agua de la raíz (Marulanda *et al.*, 2009), que sugiere un uso potencial de estas poblaciones endófitas en plantas de maíz cultivadas en zonas áridas y semiáridas. La función biológica de otras especies de *Bacillus* endofíticos en maíz se relaciona con una eficiente respuesta de defensa de la planta contra patógenos relacionada con la producción de lipopéptidos antifúngicos que induce la expresión de genes de defensa (Gond *et al.*, 2015).

En El Batán, la densidad de población de *P. hibiscola* en líneas de maíz estuvo entre 3, 5_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz en los tres ciclos y fue significativamente mayor (5_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz) en el ciclo V-2012. No se aisló en la localidad de Agua Fria. No hubo diferencias significativas entre los días después de la siembra (dds), fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 3).

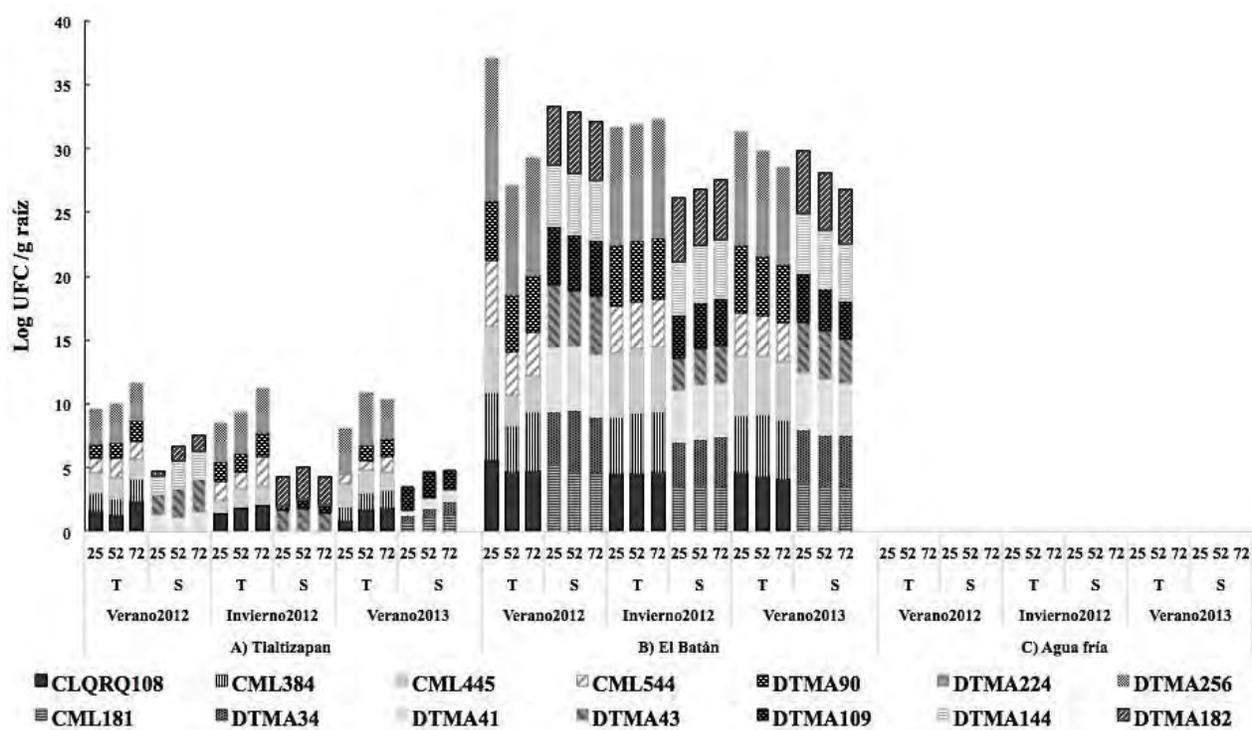


Figura 3. Población de *P. hibiscola* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

P. hibiscola no se ha citado como endófito en maíz; sin embargo, la afiliación filogenética de la cepa tipo ATCC 19867 de *P. hibiscola*, basados en el análisis comparativo de secuencias del gen 16S rADN y perfiles quimio-taxonómicos, lo reclasifican como *Stenotrophomonas* sp. (Anzai *et al.*, 2000). *S. maltophilia* se ha citado como endófito en maíz (McInroy y Kloepper, 1995) y se reporta su función como agente de control biológico contra patógenos con origen en el suelo como *Pythium* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* además de la capacidad para producir ácido indol acético que en plantas regula el desarrollo de brotes y raíces laterales (Mehnaz *et al.*, 2010).

La densidad de población de *S. meliloti* en líneas tolerantes a sequía en Tlaltizapán estuvo entre $4,6_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} de raíz en los tres ciclos y fue significativamente mayor ($6_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} de raíz) a los 52 dds. No se aisló en la localidad de Agua Fría. No hubo diferencias significativas por ciclo de cultivo, pero fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 4).

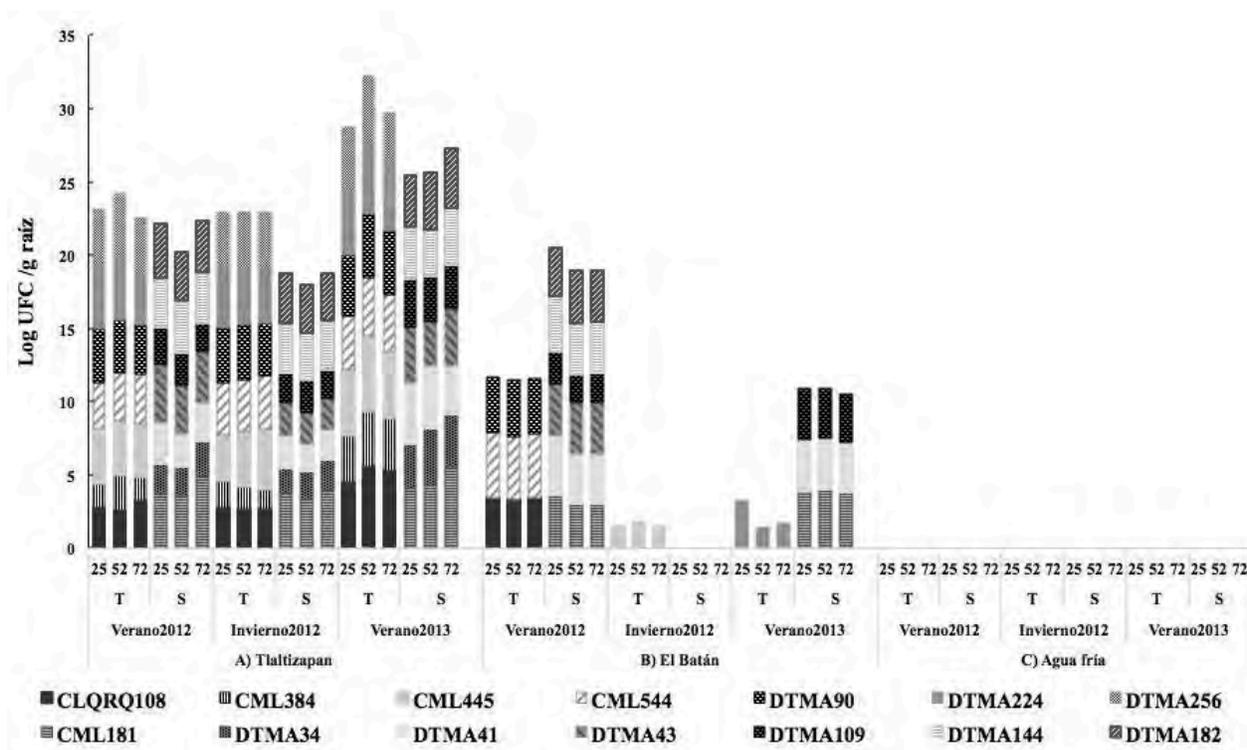


Figura 4. Población de *S. meliloti* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

S. meliloti se conoce como una bacteria noduladora fijadora de nitrógeno en plantas del género *Medicago*, con implicaciones en la respuesta de tolerancia a sequía y salinidad (Roumiansteva y Muntyan, 2015). En México se determinó la existencia de una gran diversidad genética de poblaciones nativas de *S. meliloti* en alfalfa (*Medicago* spp.) y actualmente se han identificado nuevas especies en leguminosas leñosas en el género *Leucaena* (Wang *et al.*, 2002) y *Acacia* (Toledo *et al.*, 2003). El género *Sinorhizobium* se encontró en la rizosfera de maíz (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006) y a *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* como endófito en raíces de maíz en México (Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero, 2001); sin embargo, no existe información sobre *S. meliloti* como endófito en la raíz de maíz, por lo que el presente estudio aporta información de referencia de la colonización natural endófito de *S. meliloti* en esta gramínea en México. En las localidades estudiadas es común el cultivo intercalado de alfalfa con maíz, que podría explicar la colonización endófito de raíces de maíz por *S. meliloti*. Estudios en arroz (*Oryza sativa*) sugieren que *S. meliloti*

podría producir la molécula señal lumicromo en la rizosfera de estas plantas promoviendo el crecimiento por inducción de una mejor respiración de las raíces, conductancia estomática, transpiración de la hoja y eficiencia fotosintética (Chi *et al.*, 2010). Su aplicación en concentraciones nanomoleculares promovió el crecimiento en leguminosas y gramíneas e incrementó la biomasa de las raíces de la leguminosa *Lotus japonicus* y jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Gouws *et al.*, 2012).

La frecuencia de ciertos géneros de bacterias aisladas de la raíz en este estudio podría tener relación con la filogenia de estas líneas de maíz. Por ejemplo, entre las bacterias con mayor frecuencia y densidad en líneas tolerantes de maíz destacan dos especies de *Bacillus*; *Bacillus* se considera una bacteria endófito importante que se ha aislado tanto de Teozintle (ancestro del maíz) como de genotipos de maíces modernos y se demostró que la composición de la comunidad bacteriana endófito en semilla de maíz, es variable y conservada a través de la evolución, etnografía y ecología de la planta de maíz como hospedante (Johnston-Monje y Raizada, 2011).

En esta investigación se determinó que algunos de los factores: tolerancia/susceptibilidad a sequía de las líneas de maíz estudiadas, localidad, ciclo de cultivo, tiempo (días después del trasplante) afectaron significativamente la densidad de bacterias cultivables endófitas en la raíz de estos materiales genéticos de maíz. Las rizobacterias como promotores del crecimiento (PGPR), nutrición y manejo de enfermedades en plantas ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, su función en el manejo de enfermedades abióticas como el estrés a sequía es de gran interés en los últimos años (Dimpka *et al.*, 2009; Grover *et al.*, 2010; Kavamura *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2009). El uso de microorganismos endófitos puede ser una alternativa viable contra estreses bióticos y abióticos; las cepas aisladas en este estudio constituyen un recurso microbiano que está íntimamente asociados al maíz con potencial de uso biotecnológico en la agricultura que merecen ser evaluados en el futuro como inoculantes microbianos e inductores de tolerancia al estrés hídrico y otros factores bióticos y abióticos en regiones con condiciones limitantes para la producción de este cultivo en México.

CONCLUSIONES

Las bacterias cultivables endófitas de la raíz que tuvieron mayor presencia en las 14 líneas de maíz probadas pertenecen a los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes*. La mayor densidad de población de bacterias endófitas se estimó en líneas de maíz tolerantes a sequía. Las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Sinorhizobium* fueron las que presentaron mayor frecuencia y densidad de población en las líneas de maíz tolerantes a sequía en las tres localidades y ciclos de cultivo estudiados. *Sinorhizobium meliloti* es capaz de colonizar endófiticamente la raíz de maíz.

Agradecimientos

Al Colegio de Postgraduados y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por los recursos económicos y beca otorgados. Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por la semilla proporcionada para el desarrollo de esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M, Temprano F and Rodríguez D. 2006 Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiology Letters* 259:67-73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00244.x>
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H and Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1563-1589. DOI: 10.1099/00207713-50-4-1563
- Baudoin E, Benizri E and Guckert A., 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1183-1192. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00179-2)
- Bodenhausen N, Horton MW and Bergelson J. 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* 8:e56329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329>
- Canbolat M, Bilen S, Çakmakçi R, Sahin F and Aydi A. 2006. Effect of plant growth promoting bacteria and soil compaction on barley seeding growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils* 42:350-357. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-005-0034-9>
- Cavaglieri L, Orlando J and Etcheverry M. 2009. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiological Research* 164:391-399. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.03.006>
- Chi F, Yang P, Han F, Jing Y and Shen S. 2010. Proteomic analysis of rice seedlings infected by *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Proteomics* 10:1861-1874. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200900694/full>
- Cochran, W. G. Técnicas de muestreo. México: Compañía Editorial Continental, 1982. 513 p.
- Dimpka C. Weinand T and Asch F. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell and Environment* 32:1682-1694. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x

- Fan X, Hu H, Huang G, Huang F, Li Y and Palta J. 2015. Soil inoculation with *Burkholderia* sp. LD-11 has positive effect on water-use efficiency in inbred lines of maize. *Plant Soil* 390:337-349. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2410-z>
- Farag MA, Zhang H and Ryu CM. 2013. Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 39:1007-1018. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-013-0317-9>
- FAO. 2016. Disponible en línea: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s10.html> (Consulta, marzo 2016)
- FIRA, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. 2016. Disponible en línea: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2015.pdf (Consulta, febrero 2016)
- Galkiewicz JP and Kellogg CA. 2008. Cross-Kingdom amplification using *Bacteria*-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied Environmental Microbiology* 74:7828-7831. Disponible en línea: <http://aem.asm.org/content/74/24/7828.short>
- Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White JF and Kharwar RF. 2015. Effect of bacterial endophyte on expression of defense in Indian popcorn against *Fusarium moniliforme*. *Symbiosis* 66:133-140. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0348-9>
- Gouws LM, Botes E and Wiese AJ, Trenkamp S, Torres-Jerez I, Tang J, Hills NP, Usadel B, Lloyd RJ, Fernie RA, Kossmann J and van der Merwe M. 2012. The plant growth promoting substance, lumichrome, mimics starch, and ethylene-associated symbiotic responses in lotus and tomato roots. *Front Plant Science* 120:1-20. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2012.00120>
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A and Venkateswarlu B. 2010. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:1231-1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
- Gutiérrez-Zamora ML and Martínez-Romero E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology* 91:117-126. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00332-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00332-7)
- Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T and Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* 2:1221-1230. Disponible en línea: http://www.abdn.ac.uk/staffpages/uploads/mbi010/ISME%20Journal%202012,%201221-1230_1.pdf
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M and Sessitsch A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79:293-320. Disponible en línea: <http://mmb.asm.org/content/79/3/293.short>
- Higgins KL, Arnold AE, Miadlikowska J, Sarvate SD and Lutzoni F. 2007. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42:543-555. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.07.012>
- Ikeda CA, Bassani LL, Adamoski D, Stringari D, Cordeiro VK, Glienke C, Steffens MBR, Hungria M and Galli-Terasawa LV. 2013. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microbial Ecology* 65:154-160. DOI: 10.1007/s00248-012-0104-0
- Johnston-Monje D and Raizada MN. 2011. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE* 6: e20396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>
- Kasim WA, Osman ME, Omar MN, Abd El-Daim IA, Bejai S and Meijer J. 2013. Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* 32:122-130. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-012-9283-7>
- Kamara YA, Menkir A, Badu-Apraku B and Ibikunle O. 2003. The influence of drought stress on growth, yield and yield components of selected maize genotypes. *Journal of Agricultural Science* 141:43-50. <https://doi.org/10.1017/S0021859603003423>
- Kavamura VN, Santos SN, Silva JL, Parma MM, Avila LA, Visconti A, Zucchi TD, Taketani RG, Andreote FD and Melo IS. 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research* 168:183-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>

- Kim YC, Glick BR., Bashan Y and Ryu CM. 2012. Enhancement of plant drought tolerance by microbes. In: Aroca R. (eds) Plant responses to drought stress. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_15
- Li X, Rui J, Mao Y, Yannarell A and Mackie R. 2014. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biology and Biochemistry* 68: 392-401. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.017>
- Liu Y, Zuo S, Zou YY, Wang JH and Song W. 2013. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Annals of Microbiology* 63:71-79. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-012-0446-3>
- Mahuku GS. 2004. A simple extraction method suitable for PCR based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:71-81. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02773351?LI=true>
- Marulanda A, Barea JM and Azcón R. 2006. An indigenous drought-tolerant strain of *Glomus intraradices* associated with a native bacterium improves water transport and root development in *Retama sphaerocarpa*. *Microbial Ecology* 52:670-678. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-006-9078-0>
- Marulanda A, Barea JM and Azcón R. 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation* 28:115-124. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-009-9079-6>
- McInroy JA and Klopper JW. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173:337-342. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00011472?LI=true>
- Mehnaz S, Kowalik T, Reynolds B and Lazarovits G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1848-1856. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.07.003>
- Montañez A, Blanco RA, Barlocco C, Beracochea M and Sicardi M. 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. *Applied Soil Ecology* 58:21-28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.009>
- Morales Y, Juárez D, Aragón C, Mascarua M, Bustillos M, Fuentes L, Martínez R and Muñoz J. 2011. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Revista Argentina de Microbiología* 43:287-293. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v43n4/v43n4a09.pdf>
- Nacamulli C, Bevivino A, Dalmastric C, Tabacchioni S and Chiarini L. 1997. Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiology Ecology*. 23:183-193. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00401.x>
- Naseem H and Bano A. 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance in maize. *Journal of Plant Interactions*. 9:689-701. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.902125>
- Naveed M, Mitter B, Reichenauer TG, Wiczorek K and Sessitsch A. 2014. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD 17. *Environmental and Experimental Botany* 97:30-39. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.014>
- Oliveira ALM, Stoels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI and Hartmann A. 2009. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology* 45:106-113. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.09.004>
- Pereira P, Ibáñez F, Rosenblueth M, Etcheverry M and Martínez-Romero E. 2011. Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. *International Scholarly Research Network* 2011:1-10. DOI:10.5402/2011/938546
- Rai R, Prasanta K, Dash BM, Prasanna AS. 2007. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 23:853-858. DOI:10.1007/s11274-006-9309-z
- Rosenblueth M and Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interaction with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:827-837. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI-19-0827>

- Roumiansteva ML and Muntyan VS. 2015. Root nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*: Tolerance to salinity and bacterial genetic determinants. *Microbiology* 84:303-318. DOI: 10.1134/S0026261715030170
- Saravanakumar D, Kavino M, Raguchander T, Subbian P and Samiyappan R. 2011. Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiology Plant* 33:203-209. Disponible en línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11738-010-0539-1.pdf>
- Shehata HR, Lyons EM, Jordan KS and Raizada MN. 2016. Bacterial endophytes from wild and ancient maize are able to suppress the fungal pathogen *Sclerotinia homoeocarpa*. *Journal of Applied Microbiology* 120:756-769. Disponible en línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13050/epdf>
- Somers E, Vanderleyden J and Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*: 30:205-240. DOI: 10.1080/10408410490468786
- Timmusk S, Islam A, Abd El D, Lucian C, Tanilas T and Kannaste A, Behers L, Nevo E, Seisenbaeva G, Stenströ E and Niinemets Ü. 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS One* 9:1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096086>
- Toledo I, Lloret L and Martínez-Romero E. 2003. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* 26:54-64. Disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004701599>
- Wang E, Tan ZY, Willems A, Fernández-López M, Reinhold-Hurek B and Martínez-Romero E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1687-1693. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-5-1687>
- Wilkinson S and Davies WJ. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment* 33:510-525. Disponible en línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x/full>
- Whitehead AN, Barnard LMA, Slater H, Natalie JL, Simpson G and Salmond PC .2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25:365-404. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x>
- Yang J, Kloepper JW and Ryu C. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
- Yasmin H, Bano A and Samiullah A. 2013. Screening of PGPR isolates from semi-arid region and their implication to alleviate drought stress. *Pakistan Journal Botany* 45: 51-58. Disponible en línea: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84873424619&origin=inward&txGid=f67ad4b109d3d368731a8b22a1f14cfa>
- Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Farag MA, Ryu CM, Allen R, Melo IS and Pare PW. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226:839-851. Disponible línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00425-007-0530-2.pdf>

Capítulo 2

Epidemiología de las enfermedades

2.1. Escala Diagramática de Severidad para el Complejo Mancha de Asfalto de Maíz

Lervin Hernández Ramos, Instituto de Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230, México. José Sergio Sandoval Islas, Instituto de Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230, México. Correspondencia: (lervin.hernandez@colpos.mx).

Resumen

El complejo mancha de asfalto del maíz, inducido por los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, es una enfermedad de importancia económica en México, debido a que provoca severas pérdidas en rendimiento. Dada su importancia se requieren métodos estandarizados de cuantificación de los daños ocasionados por la enfermedad, que permitan realizar estudios epidemiológicos reproducibles; con este propósito fue elaborada una escala logarítmica de severidad con los intervalos y punto medio de cada clase de 0(0-0), 3(1-6), 12(7-22), 38(23-55), 72(56-84), 91(85-95) y 98(96-100) % de área foliar afectada, analizándose su exactitud, precisión y reproducibilidad. La evaluación consideró a diez evaluadores y 50 plantas con distintos niveles de severidad, determinadas con el Software ImageTool 3.0. La precisión y exactitud se calculó mediante un análisis de regresión lineal, entre la severidad real y estimada. Todos los evaluadores mostraron una tendencia a sobreestimar la enfermedad; y registraron valores del coeficiente b_1 estadísticamente igual a 1 ($P < 0.01$), por lo que la evaluación del CMA con la escala propuesta arroja resultados cercanos a los valores reales. Se observaron buenos niveles de precisión, la r^2 estuvo comprendida entre el rango 0.71 a 0.91; indicando que la escala puede ser implementada exitosamente en la evaluación de los daños de la enfermedad.

Palabras clave: *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis*, *Zea mays*.

El Complejo Mancha de Asfalto (CMA), asociado a los hongos *Phyllachora maydis* Maubl. y *Monographella maydis* Müller & Samuels, es una enfermedad que se ha convertido en el principal factor limitante en la producción de maíz (*Zea mays* L.) en diversas zonas del trópico húmedo, subhúmedo y zonas

de transición (Hock *et al.*, 1989), en distintas regiones de México y Centroamérica. La incidencia del CMA provoca pérdidas severas en rendimiento y deteriora la calidad del forraje, además, tiene el potencial para destruir las parcelas en su totalidad (Pereyda *et al.*, 2009). En México, la enfermedad se considera potencialmente importante en unas 800 mil hectáreas distribuidas en los Estados de Michoacán, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Gómez *et al.*, 2013).

A nivel de campo, se ha observado que siempre el maíz es primeramente infectado por *P. maydis*, produciendo pequeñas manchas negras en forma de costras carbonosas sobresalientes, que por su aspecto se les denomina manchas de asfalto (Hock *et al.*, 1989). Posteriormente se forma un halo necrótico alrededor de cada una de las lesiones de *P. maydis* debidas a la infección secundaria de *M. maydis*, dando origen al denominado síntoma ojo de pescado (Hock *et al.*, 1992). De todos los organismos asociados *M. maydis*, el causante de la necrosis foliar, tienen el efecto más devastador; bajo condiciones favorables el follaje de la planta puede secarse completamente en menos de ocho días debido a la fusión de las lesiones de los dos organismos patógenos y a la posible producción de una toxina (Hock *et al.* 1995).

Dada la creciente importancia del CMA, se requieren de métodos estandarizados de cuantificación de la enfermedad que permitan realizar estudios epidemiológicos reproducibles, exactos y precisos; entendiendo como exactitud a la proximidad que tiene un valor estimado con el valor real, precisión como la variación o repetitividad asociadas con una estimación; y reproducibilidad a la ausencia de variación en las estimaciones cuando diversos evaluadores cuantifican la misma característica (Nascimento *et al.*, 2005).

Dentro de los métodos para medir la intensidad de una enfermedad el uso de escalas logarítmicas diagramáticas es el más ampliamente utilizado. Estas escalas consisten en la representación ilustrada de una serie de plantas o partes de plantas mostrando los síntomas de una enfermedad en diferentes grados de severidad (Nascimento *et al.*, 2005) y están basadas en el principio de Weber-Fechner que establece que la agudeza visual del daño es proporcional al logaritmo del estímulo hasta en un 50% de severidad y a partir de este valor, la relación es inversamente proporcional al logaritmo del estímulo ocasionado por la cantidad de tejido sano restante (Mora *et al.*, 2000).

A pesar de la creciente importancia del complejo mancha de asfalto del maíz y la consecuente necesidad de llevar a cabo estudios epidemiológicos o de control, no se tiene la existencia de un método estandarizado de cuantificación de la enfermedad que provea de resultados fácilmente reproducibles entre investigadores o instituciones, por lo que el objetivo de esta investigación fue diseñar y validar una escala logarítmica diagramática de severidad para el patosistema maíz - *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* que permita la evaluación de los daños de la enfermedad en campo, analizando los valores de exactitud, precisión y reproducibilidad generados con su utilización.

Diseño de la escala logarítmica diagramática. Se empleó la metodología propuesta por Mora *et al.* (2000), incluyendo 50 hojas con un amplio rango de severidad, provenientes de diferentes híbridos con una base genética distinta, lo que permitió que quedaran representados los distintos niveles de severidad. La documentación fotográfica fue obtenida en las parcelas de la estación experimental Agua Fría CIMMYT, Puebla y en comunidades de Chilpancingo en Guerrero, durante 2013. Mediante el software Image Tool 3.0 se determinó el área total foliar y el área total enferma de cada imagen digitalizada; la proporción de tejido sano y enfermo permitió calcular el porcentaje de severidad de la enfermedad. La escala logarítmica se generó mediante el programa 2-Log V1.0 propuesto por Mora *et al.* (2000).

Validación de la escala diagramática. Se utilizó una secuencia de 50 fotografías de hojas y plantas de maíz con diversos niveles de severidad del CMA, determinándose previamente el área afectada de cada una de ellas. La severidad de cada imagen fue evaluada con ayuda de la escala por diez evaluadores, cinco de ellos con experiencia en la cuantificación de la severidad de enfermedades y cinco sin experiencia directa en el ámbito fitopatológico. La exactitud y precisión de cada evaluador fue determinada por medio de un análisis de regresión lineal simple tal como lo describen Nutter *et al.* (1991).

La exactitud de cada evaluador fue determinada mediante la prueba T aplicada al intercepto de la regresión lineal (b_0), para verificar la hipótesis $H_0: b_0=0$; y con el coeficiente de la pendiente de la recta (b_1) para estimar si fue diferente de 1 ($H_0: b_1=1$), con $P \leq 0.01$. La precisión de los ensayos fue estimada con el coeficiente de determinación (r^2) de la misma regresión lineal y por la varianza absoluta del error. El análisis de regresión lineal simple fue realizado mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.0.

A nivel de campo el valor máximo de severidad del CMA observado fue de 100%, causando senescencia y muerte prematura de toda la planta; en contraste, el límite inferior resultó con 0 % de severidad. Considerando ambos límites, la escala logarítmica diagramática de severidad estuvo constituida por siete clases, representadas por los intervalos de 0(0-0), 3(1-6), 12(7-22), 38(23-55), 72(56-84), 91(85-95) y 98(96-100) % de área foliar necrosada (Figura 1).

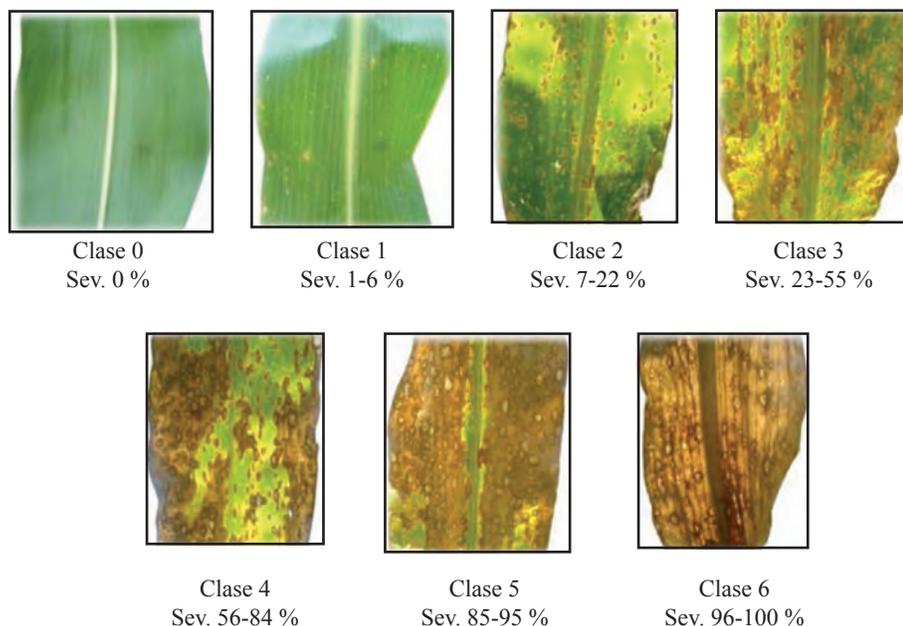


Figura 1. Escala diagramática de severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del Maíz.

La exactitud, representada por el grado de proximidad de los valores estimados a los valores reales (Nutter *et al.* 1991), medida por el intercepto b_0 y el coeficiente b_1 del modelo lineal, fue mayor para los evaluadores con experiencia en la cuantificación de enfermedades (Cuadro 1). Los valores del intercepto b_0 fueron más cercanos a cero para el primer grupo. El valor del intercepto b_0 fue positivo en casi todos los casos, lo que indica que hay una tendencia hacia sobreestimar la severidad de la enfermedad; esta tendencia fue mayor en los evaluadores sin experiencia. En base a la hipótesis de nulidad ($a=0$ o $b=1$), el coeficiente b_1 fue estadísticamente igual a 1 ($P<0.01$) para la mayoría de los evaluadores, indicando que la evaluación del CMA arroja resultados cercanos a los valores reales, aún cuando existe la tendencia hacia sobreestimar

Cuadro 1. Estimación de los parámetros de intercepción (b_0), pendiente (b_1) y coeficiente de determinación (r^2) del análisis de regresión lineal simple calculado entre la severidad real y estimada del CMA, realizada por 10 evaluadores con y sin experiencia en la cuantificación de enfermedades.

Evaluador	Con Experiencia			Evaluador	Sin Experiencia		
	b_0	b_1	r^2		b_0	b_1	r^2
1	2.52	1.01	0.91	6	12.53**	1.01	0.70
2	2.63	0.96	0.81	7	12.14**	0.97	0.80
3	0.09	0.99	0.83	8	5.10*	0.93	0.72
4	3.79	1.04	0.92	9	-5.73*	0.94	0.72
5	2.25	0.95	0.85	10	20.91**	0.89*	0.65
Media	2.26	0.99	0.87	Media	8.99	0.95	0.72

*, ** Situación donde el valor del intercepto de la recta (b_0) o el coeficiente de la pendiente (b_1) fueron estadísticamente diferentes de 0 y 1 respectivamente; basado en la prueba de T con $\alpha=0.05$ y 0.01 , respectivamente.

los mismos; Nascimento *et al.* (2005) señalan que una sobreestimación en la mayoría de los evaluadores indica la presencia de desvíos positivos constantes para todos los niveles de severidad de la enfermedad.

De acuerdo a Sherwood *et al.*, (1983) las hojas con severidades similares pero con un número diferente de lesiones generan una tendencia a sobreestimar la enfermedad, principalmente cuando el número de lesiones es muy alto y su tamaño pequeño, tal es el caso de CMA, donde el típico síntoma denominado “ojo de pescado” se presenta en un gran número de lesiones. La sobreestimación de los niveles de severidad utilizando escalas logarítmicas ha sido común en varios patosistemas, así lo han reportado entre otros, Barbosa *et al.*, (2006) para *Puccinia horiana*; y Aquino *et al.*, (2008) para *Ramularia gossypii*.

La precisión (repetitividad o variación asociada con una estimación), estimada por el coeficiente de determinación (r^2) y por la varianza de los errores absolutos (Nutter *et al.*, 1991) fue mucho mayor en aquellos evaluadores con experiencia, fluctuando en el rango de 0.81 a 0.92 (Figura 2). Los niveles de precisión observada indican que el primer contacto con la escala es adecuado para ser implementada exitosamente en la evaluación del CMA. Al respecto, Michereff *et al.*, (2006) determinaron valores de precisión adecuados en una primera evaluación con el uso de escalas; en contraparte, Tovar *et al.*, (2002) tuvieron que familiarizar a los evaluadores para incrementar los valores de precisión y exactitud.

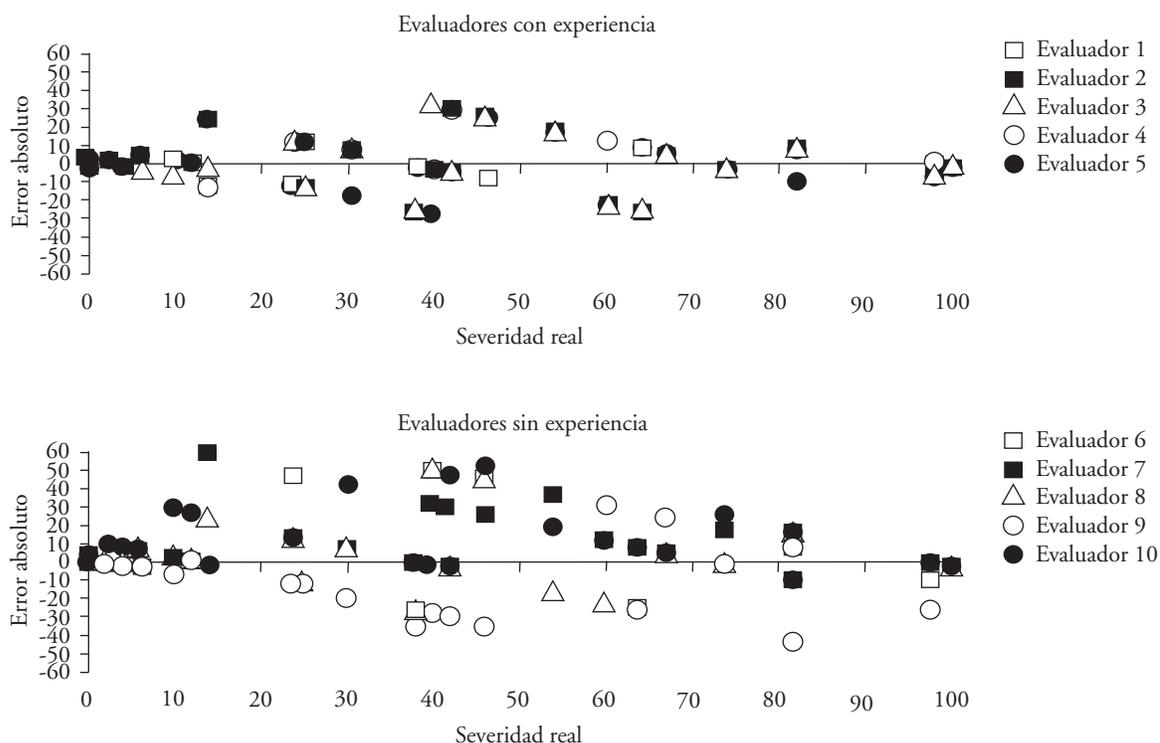


Figura 2. Errores absolutos (severidad real - severidad estimada) de las evaluaciones del CMA con el uso de la escala logarítmica; en la parte superior los evaluadores con experiencia en la cuantificación de enfermedades, en la parte inferior los evaluadores sin experiencia.

Los valores de precisión observados en los evaluadores sin experiencia son aceptables; un entrenamiento previo podría tener una influencia positiva en la calidad de las evaluaciones. Esto ha sido demostrado para otros patosistemas: Barbosa *et al.* (2006) y Aquino *et al.*, (2008) elevaron considerablemente la exactitud y precisión de las estimaciones de evaluadores sin experiencia luego de entrenamientos previos; los mismos autores señalan que no hubo una mejora significativa para aquellos evaluadores experimentados.

La reproducibilidad de la escala fue alta, dado que diferentes evaluadores, utilizando una misma escala en la evaluación del material, estimaron porcentajes similares de severidad. La regresión lineal de las severidades estimadas por los evaluadores produjo coeficientes de determinación que variaron en el rango de 65 a 91 (Cuadro 1). Por lo tanto, el uso de la escala diagramática para la evaluación del CMA produce una alta concordancia con los valores reales de severidad, reflejado en una alta precisión entre los evaluadores.

Hock *et al.*, (1992) desarrollaron una escala basada también en el principio logarítmico para la evaluación en campo de la severidad del CMA, sin embargo, los valores de precisión obtenidos no resultaron adecuados, esto debido al complicado sistema de cuantificación y al número elevado de clases con el cual fue desarrollada; además consideraba de manera separada los síntomas producidos por ambos agentes infecciosos. En este estudio se consideraron conjuntamente los síntomas de *P. maydis* y *M. maydis* dando como consecuencia que el evaluador se fije de manera conjunta en los síntomas de la enfermedad.

Finalmente, el uso de sistemas estandarizados para la cuantificación de enfermedades en maíz, y en cualquier otro cultivo, resulta ser una poderosa herramienta dado que permite la perfecta comparación de experimentos llevados a cabo por diferentes instituciones e investigadores. La escala logarítmica diagramática para el CMA propuesta en este estudio representa un método estandarizado de cuantificación de la enfermedad que ayudará a obtener resultados fácilmente reproducibles, ya que provee de altos niveles de exactitud y precisión entre diversos evaluadores, por lo que puede ser utilizada como material de apoyo para estudios de diversa índole relacionados con la cuantificación de la severidad del CMA.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a todos los evaluadores del Colegio de Postgraduados que participaron en las etapas de validación de la escala logarítmica.

LITERATURA CITADA

- Aquino LA, Berger PG, Rodríguez FA, Zambolim L, Hernández FR, Miranda LM. 2008. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da mancha de ramularia do algodoeiro. *Summa Phytopathologica* 34(4):361-363.
- Barbosa MA, Michereff SJ, Mora AG, 2006. Elaboration and validation of diagrammatic key to evaluate white rust severity in *Chrysanthemum*. *Summa Phytopathologica* 32:57-62.
- Gómez MN, González CM, Cantú AM, Sierra MM, Coutiño EB, Manjarrez SM. 2013. "H-563", Híbrido de maíz tropical tolerante a la enfermedad "Mancha de asfalto". *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(1):81-83.
- Hock J, Kranz J, Renfro BL. 1989. El "complejo mancha de asfalto" del maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7(2):129-135.
- Hock J, Kranz J, Renfro BL. 1992. Tests of standard diagrams for field use in assessing the tarspot disease complex of maize (*Zea mays*). *Tropical Pest Management* 38:314-318.

- Michereff SJ, Noronha MA, Andrade DEG, Oliveira EP, Xavier FMS, Moreira PAA. 2006. Development and validation of diagrammatic key for *Cercospora* leaf spot of sweet pepper. *Summa Phytopathologica* 32(3):260-266.
- Mora AG, Rivas VP, Góngora CC, Tovar SA, Cristóbal AJ, Loeza KE, Michereff JS, Marinelli A, Osada VK. 2000. Sistemas computarizados en la epidemiología: 2-Log ver. 1.0 y su aplicación en el diseño de escalas diagramáticas logarítmicas. XXIX Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Puerto Vallarta, México.
- Nascimento RPA, Michereff JS, De la Rosa LR, Gómez MAA. 2005. Elaboração e validação de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. *Summa Phytopathologica* 31: 59-64.
- Nutter FW, Teng PS, Shokes FM. 1991. Disease assessment terms and concepts. *Plant Disease* 75: 1187-1188.
- Pereyda HJ, Hernández MJ, Sandoval IJS, Aranda OS, De León GC, Gómez MN. 2009. Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia* 43(5):511-519.
- Sherwood RT, Berg CC, Hoover MR, Zeiders KE. 1983. Illusions in visual assessment of *Stagonospora* leaf spot of orchard-grass. *Phytopathology* 73(2): 173-177.
- Tovar SA, Hernández MM, Cristóbal AJ, Romero HR, Mora AG. 2002. Escala logarítmica diagramática de severidad de la mancha negra (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Chirimoyo (*Annona cherimola* M.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:103-109.

2.2. Incidencia y efecto de la enfermedad “mano de chango” en la producción de 29 genotipos de maíz

José Jesús Márquez-Diego, Estudiante de doctorado, Carlos De León-García de Alba*, Reyna Isabel Rojas-Martínez, Programa de Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; José Ricardo Sánchez-Pale, Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, C.P. 50295. *Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx

Resumen

Recientemente, se ha observado un incremento en la presencia de una posible nueva enfermedad en plantas de maíz que genera prolificidad de mazorcas que los agricultores denominan “mano de chango”. Estos síntomas se han observado en áreas tropicales, subtropicales y del altiplano de México. Observaciones iniciales, en los años 1960s, indicaron, sin pruebas, que esta enfermedad era causada por hongos, insectos, o deficiencias nutricionales con incidencia de hasta 100% y pérdidas en producción de grano. Este es el primer trabajo en que se evalúa la incidencia de la enfermedad en 21 híbridos comerciales en el Valle de Toluca, México, un híbrido comercial y una variedad nativa de polinización libre en el Valle del Mezquital, Hidalgo, y seis variedades mejoradas de polinización libre en Montecillo, Texcoco, México. La mayor incidencia y pérdidas en rendimiento de grano por la enfermedad se observó en los genotipos Aspros HC8 y la variedad nativa “Hidalgo”, en el Valle del Mezquital, Hidalgo, en donde la presencia de síntomas de la enfermedad mostró una considerable reducción en rendimiento. Es necesario continuar estudios para investigar su etiología y generar información para selección de resistencia genética a esta posible nueva enfermedad.

Palabras clave: Mano de chango, fitoplasmas, enfermedades de maíz.

El maíz es uno de los tres principales cereales cultivados, debido a sus cualidades alimenticias para humanos, animales y uso industrial. En México, tiene

alta importancia económica, social y cultural (SAGARPA, 2017). Sin embargo, este cultivo es afectado por diversos problemas fitosanitarios que disminuyen considerablemente su producción, entre los que destacan especialmente las enfermedades de origen fungoso (CIMMYT, 2005). En los últimos años, un grupo de fitopatógenos de la clase Mollicutes, entre los que se incluyen los espiroplasmas y fitoplasmas, originalmente considerados como un grupo secundario, han cobrado importancia en diversos cultivos, incluyendo el maíz (Galvão *et al.*, 2020).

El término de achaparramiento (corn stunt) lo utilizó por primera vez Kunkel (Kunkel, 1946) quien atribuyó la sintomatología a un virus como agente causal. Doi *et al.* (1967) describió a este grupo como microorganismos parecidos a micoplasmas animales, con sensibilidad a tetraciclina, a los cuales se les llamó inicialmente organismos parecidos a micoplasmas (MLO) (CIPF, 2016). Davis (1973), en observaciones en microscopio de contraste de fases, observó y reportó filamentos helicoidales que asoció como agente causal de la enfermedad del achaparramiento y denominó “corn stunt spiroplasma”. Además, como resultado de observaciones realizadas en México en maíz con síntomas de achaparramiento, Davis (1974) publicó la posibilidad de que las chicharritas fueran vectoras del agente causal del achaparramiento, así como de otro organismo no móvil que causaba otra enfermedad en maíz. La presencia de un organismo adicional al espiroplasma en los vectores, fue confirmado por Bascopé (1977) y más tarde por Nault (1980), al observar estructuras tipo micoplasmas en células del floema de plantas infectadas asociadas al achaparramiento del maíz en el insecto *Dalbulus* (Moya y Nault, 1998). La nueva enfermedad reportada por estos autores se denominó enanismo arbustivo del maíz o “Maize Bushy Stunt Disease” (MBSD). Estas investigaciones demostraron que el “Corn Stunt Disease” (CSS) y el MBSD eran enfermedades diferentes transmitidas por insectos del género *Dalbulus*. Fue hasta la última década de siglo XX que, mediante pruebas moleculares basadas en el análisis del ARN ribosomal 16S, se estableció la filogenética de los fitoplasmas como miembros de la clase Mollicutes (Lee *et al.*, 1998).

Entre las enfermedades del maíz causadas por Mollicutes, Costa *et al.* (2019) mencionan al achaparramiento del maíz causado por *Spiroplasma kunkelii* y al enanismo arbustivo del maíz, esta última, según Pérez-López *et al.* (2018), detectada, sin base, por primera vez en México en 1955. Ambas enfermedades son transmitidas por varias especies de homópteros, siendo la principal la chi-

charrita del maíz (*Dalbulus maidis*), un insecto presente en localidades del sur de México, considerado el centro de origen del género *Dalbulus* (Nault, 1980; Tsai y Miller, 1995; Casuso, 2017). Fue en 1994 que el Comité de Taxonomía de los Mollicutes, de la Organización Internacional de la Micoplasmología (IOM por sus siglas en inglés), estableció el nombre actual de fitoplasmas (Kirkpatrick, 1994).

Los síntomas del MBSD en maíz incluyen la formación de largas ramas laterales, disminución en el desarrollo de mazorca y proliferación de mazorcas en el mismo raquis con aparición de brácteas a menudo torcidas con bordes rasgados mostrando clorosis y enrojecimiento (Pecher *et al.*, 2013) (Figura 1), llegando a producir la mazorca sin matar a la planta. Alcántara-Mendoza *et al.* (2010) señalan que la enfermedad “mano de chango” del maíz no es un



Figura 1. Síntomas de la enfermedad mano de chango asociados a fitoplasmas en mazorcas de maíz.

síntoma asociado al MBSD quienes describe que esta enfermedad sí causa la muerte a la planta. La descripción de síntomas indica una confusión y desconocimiento en la separación del achaparramiento, del MBSD y de la mano de chango. Esta última enfermedad fue inicialmente reportada inicialmente como “Manita” por Cruz (1991) y posteriormente por Aguilar y Molina (1996).

La enfermedad de “mano de chango” se ha vuelto destructiva, causando pérdidas variables en la producción, reportándose, en la zona del Mezquital, Hidalgo, México, con pérdidas de 35% (Ortega, 2021. Comunicación personal) hasta pérdidas de 35 al 93% dependiendo de la población de insectos vectores (González *et al.*, 2018).

Para su manejo, se han estudiado diversas estrategias culturales, incluyendo las fechas de siembra, eliminación de restos de cultivo, tratamientos a semilla y control del vector, las cuales han mostrado baja eficiencia para controlar la enfermedad del enanismo arbustivo, por lo que actualmente se reconoce que el uso de germoplasma resistente es la principal alternativa para reducir los daños y la incidencia causada por el fitoplasma, aunque hay pocos estudios relacionados con la identificación de fuentes de resistencia y de control genético (Costa *et al.*, 2019), uno de los objetivos del presente estudio.

Localidades de evaluación. La incidencia y efecto de la “mano de chango” se evaluó en híbridos comerciales y variedades de polinización libre de maíz en tres localidades. En el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) en Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Edo. de México (19° 27' 56" N, 99° 39' 20" O, 2667 msnm) se evaluaron 21 híbridos comerciales en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. Cada parcela se constituyó de dos surcos de 3 m de largo, 80 cm entre surcos y 22 cm entre plantas, para un total de 28 plantas por parcela. En el Centro de Innovación Tecnológica Cinta Larga, en Mixquiahuala, Hidalgo (20° 13' 52" N, 99° 12' 47" O, 2100 msnm) se establecieron un híbrido comercial (Aspros HC8) y la variedad nativa de polinización libre “Hidalgo”, que se sembraron en 20 surcos de 50 m de largo, a 80 cm entre surcos y 25 cm entre plantas, para una densidad de 85 000 plantas ha⁻¹. En el Campo Experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo (19° 28' 26" N y 98° 53' 18" O, 2250 msnm) en Texcoco, Edo. de México, se valoró la incidencia de la enfermedad en seis variedades mejoradas de polinización libre, sembradas cada una en 12 surcos de 100 m de largo, 80 cm entre surcos y 22 cm entre plantas. En el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México, la incidencia se evaluó en la cosecha. En las tres localidades, los cultivos se llevaron siguiendo un esquema convencional de producción agrícola y no se realizó control de insectos ni de malezas.

Evaluación de incidencia y daño. Para la variable incidencia en el germoplasma en la localidad de la UAEM, aproximadamente un mes antes de cosecha, se colectaron las mazorcas con síntomas de la enfermedad. En el lote experimental localizado en Mixquiahuala, Hidalgo, se contabilizaron 600 plantas en quince surcos del híbrido comercial Aspros HC8 y de la misma manera con la variedad nativa de polinización libre “Hidalgo”, en los que se contabilizaron 600 plantas incluyendo aquellas con presencia de síntomas de la enfermedad. En el Campus Montecillo, del Colegio de Postgraduados, en las cinco variedades mejoradas de polinización libre sembradas, se contabilizaron 400 plantas por variedad en estado cercano a madurez, revisándolas individualmente buscando síntomas característicos de proliferación de mazorcas para determinar la incidencia de la enfermedad. Entre estas plantas, las que presentaban síntomas de la enfermedad se aparearon con plantas sin síntomas inmediatamente anexas para posteriormente determinar el efecto en rendimiento de grano. Las plantas así apareadas se colectaron en pares para pesarlas, desgranarlas y registrar el porcentaje de humedad en grano fresco con un medidor de humedad Dicky John miniGAC plus® y ajustando su humedad a 14%. El peso del grano de mazorcas producidas por las plantas con síntomas de la enfermedad y el de las plantas vecinas sanas fueron analizados usando un diseño de parcelas apareadas, comparando estadísticamente las medias de incidencia de la enfermedad y el de grano en pares de mazorcas transformadas realizando la prueba de normalidad Shapiro-Wilk de los datos con $\alpha=0.05$ para la transformación arco seno de la incidencia (0.077) por lo que los residuos tienen una distribución normal con lo que se justifica su análisis. Las medias obtenidas se separaron mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia con el paquete de análisis SAS versión 9.0.

Los 21 híbridos evaluados en la UAEM mostraron muy baja incidencia de la enfermedad con mal desarrollo de las mazorcas y grano, por lo que se eliminó el ensayo de esta localidad.

En la localidad de Mixquiahuala, el híbrido comercial y la variedad nativa “Hidalgo”, así como, las seis variedades de polinización libre evaluadas en Montecillo, Texcoco (Cuadro 1) analizadas en conjunto, mostraron que el germoplasma evaluado en Montecillo mostró menores incidencias que en los materiales evaluados en Mixquiahuala. Las diferencias en incidencia entre materiales sembrados en Mixquiahuala y Montecillo fueron significativas, especialmente entre las variedades de origen MO19 (Montecillo 2019) con 5.5,

Cuadro 1. Incidencia de la enfermedad “mano de chango” y su efecto en el rendimiento de grano de híbridos y variedades de maíz evaluados en Mixquiahuala, Hidalgo y Montecillo, México, 2020.

Germoplasma evaluado	Media Incidencia (%)	Incidencia (Arco seno)	Grano de mazorcas sanas (g)	Grano de mazorcas enfermas (g)	Disminución rendimiento de grano (%)
Aspros HCS (Hidalgo)	17.5	0.427 a ²	128.24	62.75 **	44.65 a ²
Criollo Hidalgo	13.5	0.375 ab	169.61	73.25 **	42.13 a
MO19: CP Elvia 3 TSR# Bco (Colpos)	5.5	0.225 bc	148.33	76.80 **	46.86 a
MO19: CP-Vero1 Bco (Colpos)	5.2	0.217 bc	156.45	111.04 *	73.34 a
MO19: 15# Bco (Colpos)	3.5	0.185 c	133.84	114.88 NS	86.76 a
MO19: CP Hilda 2 Amar. (Colpos)	1.0	0.068 c	111.00	12.25 **	20.77 a
MO19: 11# Amar. (Colpos)	0.7	0.065 c	110.66	99.00 NS	69.75 a
MO19:19+2# Bco (Colpos)	0.7	0.065 c	104.00	51.00 **	48.25 a
		DMS: 0.176 CV (%): 73.5			DMS: 77.45 CV(%): 60.4

²Medias con la misma letra dentro de cada columna son iguales estadísticamente (Tukey, P≤0.05).

*: Significativo P=0.05. **: Altamente significativo P=0.01. NS: no significativo.

5.2, 3.5, 1.0, 0.75 y 0.75% contra el híbrido Aspros HC8 y el criollo “Hidalgo”, con 17 y 13%, respectivamente. En el ensayo establecido y evaluado en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, el análisis de rendimiento de grano aplicando el análisis de parcelas apareadas, mostró una pérdida significativa en producción de grano por mazorca en todas las variedades, las cuales disminuyeron su rendimiento desde el 86% en MO19:15# Bco (Colpos) hasta el 20% en MO19: CP Hilda 2 Amar (Colpos).

Se presenta información preliminar de la presencia y efecto en rendimiento de plantas con síntomas de la enfermedad mano de chango en condiciones subtropicales (Mezquital, Hidalgo), y del Altiplano de México (Montecillos, Estado de México), pero debe determinarse su efecto en el rendimiento de grano en un mayor número de localidades, incluyendo condiciones de trópico húmedo, en donde, productores de maíz indican que han observado síntomas parecidos a los descritos. Esta información, la confirman los reportes de Alcántara-Mendoza *et al.* (2010) y Costa *et al.* (2019) en investigaciones realizadas en regiones tropicales de México y Brasil, respectivamente.

Se encontraron síntomas de “mano de chango” y pérdida de rendimiento de grano en el germoplasma de maíz evaluado, con mayor incidencia y pérdida de grano en el híbrido Aspros HC8 y el criollo “Hidalgo” en la localidad de Mixquiahuala, Hidalgo. Las plantas afectadas por la enfermedad disminuyen su producción de grano en forma significativa. Se deben continuar trabajos de investigación para determinar la etiología de la enfermedad y evaluar mayor cantidad de variantes en germoplasma de maíz, para identificar y seleccionar posibles fuentes de resistencia a la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- Aguilar RVH and Molina GJD. 1996. Factors influencing the presence of ear prolificacy (“Manita”) in maize. *Agrociencia* 30: 569-572.
- Alcántara-Mendoza S, Téliz-Ortiz D, De León C, Cárdenas-Soriano A, Hernández-Anguiano A, Mejía-Sánchez D y De la Torre-Almaraz R. 2010. Detección y evaluación del fitoplasma maize bushy stunt en el estado de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 34-43. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a4.pdf>
- Bascope JB. 1977. Agente causal de la llamada Mesa Central del achaparramiento del maíz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados; Chapingo, Méx. 55 p.
- Casuso M. 2017. *Dalbulus maidis* (De Long & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae): una plaga que va cobrando importancia en los maíces del sudoeste chaqueño. Ministerio de Agroindustria 12. Retrieved from https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-dalbulus_maidis.pdf
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 2005. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en campo. Disponible en: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/715/25905.pdf>
- Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF). 2016. NIMF 27 Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas. Disponible en: https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/02/DP_12_2016_Es_2017-01-11.pdf
- Costa da RV, Silva da DD, Cota LV, Campos LJM, Almeida de REM and Bernardes FP. 2019. Incidence of corn stunt disease in off-season corn hybrids in different sowing seasons. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 54. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.PAB2019.V54.00872>
- Cruz SPEV. 1991. La proliferación de jilotes en la mazorca (manita) y el rendimiento de maíz (*Zea mays* L.). Tesis licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 61 p.
- Davis RE. 1973. Occurrence of a spiroplasma in corn stunt-infected plants in Mexico. *Plant Disease Reporter* 57(4): 333-337.
- Davis RE. 1974. Spiroplasma in corn stunt-infected individuals of the vector leafhopper *Dalbulus maidis*. *Plant Disease Reporter* 58(12): 1109-1112.
- Davis RE, Worley JF, Whitcomb RF, Ishijima T and Steere RL. 1972. Helical Filaments Produced by a Mycoplasma-Like. *Science* 176: 521-523. <https://doi.org/10.1126/science.176.4034.521>
- Doi Y, Teranaka M, Yora K and Asuyama H. 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants Infected with mulberry dwarf, potato witches´ broom, aster yellows, or paulownia witches´ broom. *Annals Phytopathology Society Japan* 33: 259-266. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.33.259>
- Galvão SR, Sabato EO and Bedendo IP. 2020. Occurrence and distribution of single or mixed infection of phytoplasma and spiroplasma causing corn stunting in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00381-6>.

- Kirkpatrick BC, Smart C, Blonquist C, Guerra L, Harrison N, Ahrens U, Lorenz KH, Schneider B and Seemüller E. 1994. Identification of MLO-specific PCR primers obtained from 16s/23s rRNA spacer sequences. *Proceedings 10th International Congress of the Internacional Organization for Mycoplasmaology (IOM)*: 261–262.
- Kunkel LO. 1946. Leafhopper transmission of corn stunt. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America*. PNAS 32(9): 246-247. <https://doi.org/10.1073/pnas.32.9.246>
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE and Bertaccini A. 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88(12): 1359–1366. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1359>
- Moya RG and Nault LR. 1998. Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 91(5): 668–676. <https://doi.org/10.1093/aesa/91.5.668>
- Nault RL. 1980. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology* 70 (7): 659 - 662. <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-659>
- Ortega BJ. 2021. Director del Centro de Desarrollo Agrícola Cinta Larga, Estado de Hidalgo, México. Comunicación personal.
- Pecher P, Moro G and Canale MC. 2013. Phytoplasma SAP11 effector destabilization of TCP transcription factors differentially impact development and defence of Arabidopsis versus maize. *PLoSPathog* 1: 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008035>
- Pérez-López E, Wist T, Rodríguez Y, Luna-Rodríguez M and Olivier CY. 2018. Maize bushy stunt in native corn: implications for Mexican “subsistence farmers.” *Environment, Development and Sustainability* 20(4): 1797–1805. <https://doi.org/10.1007/s10668-017-9966-0>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2017. *Agrícola Nacional. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*. <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/planeacion-agricola-nacional-2017-2030?state=published>
- Tsai JH and Miller JW. 1995. Corn Stunt Spiroplasma. *Plant Pathology Circular No. 373*. <https://www.fdaacs.gov/content/download/11380/file/pp373.pdf>

2.3. Incidencia de la mano de chango en germoplasma de maíz (*Zea mays*) en diferentes localidades de México

José Jesús Márquez-Diego, Carlos De León-García de Alba^{*}, Reyna Isabel Rojas-Martínez, ¹Programa de posgrado en Fitosanidad-Fitopatología; J. Concepción Rodríguez-Maciél, Programa de Posgrado de Fitosanidad-Entomología; ¹Cristián Nava-Díaz. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Edo. de México, CP 56230. ^{*}Autor de correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Resumen

El objetivo de esta investigación, fue determinar la incidencia y distribución de la enfermedad mano de chango en maíz en nueve estados de la República Mexicana (Tlaxcala, Puebla, Edo. de México, Hidalgo, Veracruz, Morelos, Oaxaca, Chiapas y Jalisco). Los sitios de evaluación se georreferenciaron, se estimó la incidencia y se realizó una encuesta con los productores para determinar la identidad del germoplasma utilizado. La mano de chango se encontró afectando plantas de maíz en localidades de los estados de Puebla con incidencia de 24%, Hidalgo (17.05%), Morelos (11.7%), Chiapas (7.28%), Tlaxcala (7.0%), Oaxaca (6.5%), Veracruz (6.3%), Edo. de México (6.2%), y Jalisco (3.0%). Los datos mostraron una correlación baja, pero positiva ($r=0.30$) entre la altitud y la incidencia. Observaciones indicaron que el germoplasma nativo es más susceptible a la enfermedad que el mejorado.

Palabras clave: Proliferación de mazorcas, enfermedades de maíz, “bouquet ears”.

Desde 1997, el cultivo de maíz ocupa el primer lugar en la superficie y producción a nivel mundial (CIMMYT, 2019). En 2021, en México se sembraron 8.5 M ha y su consumo *per cápita* fue de 297 kg. Pese a la importancia nacional, se tiene una media de producción nacional de 3.47 t ha⁻¹, inferior al promedio mundial de 5.38 t ha⁻¹ y muy abajo del de Estados Unidos de Norteamérica con una media de 10.96 t ha⁻¹ (CIMMYT, 2019). México es uno de los grandes importadores del cereal, puesto que en los 80s se importaban

3 Mt de maíz, ésta cantidad se incrementó a 5 Mt en el 2000 (Reyes-Santiago *et al.*, 2022). Fue en 2018 cuando se registraron compras históricas mayores a 17 M t (CEDRSSA, 2019) que se ha mantenido en más de 16 M t en 2020 (SIAVI, 2021), representando en 2021 más de \$5000 M USD involucrados en compras maíz blanco y amarillo (GCMA, 2022).

Dentro del complejo de enfermedades del maíz, existe un síntoma de producción múltiple de jilotes (Bonnet, 1966), denominada como MESS (“Multiple Ears on Same Shank”) (Nielsen, 1999), o “Bouquet ears” (Nielsen, 2014), de la que existen pocos reportes debido a los bajos niveles de incidencia e importancia que se presentaron en los últimos años (Ortez *et al.*, 2022) y cuya etiología no ha sido determinada (Elmore y Abendroth, 2006; Ciampitti, 2014; Thomison y Geyer, 2015; Moghadam *et al.*, 2022).

En México, en 1991, se documentó un síntoma en plantas de maíz que desarrollaban mazorcas múltiples a partir de la principal, a la que Cruz (1991) llamó “manita del maíz”, y Hernández (1993) descartó como enfermedad importante. Aguilar y Molina (1996), determinaron una correlación entre el uso de semillas procedentes de plantas sintomáticas con la incidencia de este problema y descartaron que la aplicación de fungicidas redujera los síntomas. En 2010, en un estudio realizado en Veracruz, México, se reportó el síntoma de producción múltiple de jilotes asociado al fitoplasma “maize bushy stunt” (Alcántara-Mendoza *et al.*, 2010). Márquez-Diego *et al.* (2021) indicaron que los productores conocen a este problema como “mano de chango” (Figura 1) y determinaron que plantas con éste síntoma tienen una disminución de rendimiento de grano entre 20 y 86%, dependiendo del material genético utilizado. Singh y Pooja (2008) también sostienen que la incidencia es dependiente del material genético. Ortez *et al.* (2022) encontraron que plantas con síntomas presentan pérdidas de grano que varían de 30 a 90%. El objetivo del presente trabajo fue determinar la incidencia y distribución de plantas de maíz con síntoma de mano de chango en diferentes altitudes y germoplasma sembrado por los agricultores.

El estudio se realizó en nueve estados de la República Mexicana, incluyendo Tlaxcala, Puebla, Edo. de México, Hidalgo, Veracruz, Morelos, Oaxaca, Chiapas y Jalisco, durante la época otoño - invierno 2021. Se seleccionaron parcelas comerciales de maíz en etapa R1 (Ritchie *et al.*, 1986) o posterior. Se hicieron entrevistas a los productores para conocer el germoplasma que



Figura 1. Síntoma asociado a 'mano de chango' en jilote de maíz.

habían utilizado. En cada localidad se determinaron las coordenadas geográficas, metros sobre el nivel del mar (msnm), material genético e incidencia del síntoma mano de chango en 100 plantas en cada uno de cuatro surcos en la parte central de la parcela. Para estimar la incidencia por parcela se utilizaron las cuatro repeticiones de 100 plantas en cada una de las parcelas usando la fórmula:

$$I (\%)= n/N *100$$

Donde: I=incidencia, n= cantidad de plantas con síntomas, N= total de plantas evaluadas.

La incidencia de la enfermedad se asoció con la altitud (msnm) mediante la prueba de covarianza y correlación. La incidencia en las variedades nativas se comparó con las variedades mejoradas. Las diferencias entre las entidades federativas muestreadas se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis debido a la anormalidad de los datos.

Singh y Pooja (2010), en estudios realizados en India, indican que la enfermedad “bouquet ears” ha incrementado tanto en distribución como en incidencia. Esta información coincide con reportes de agricultores sobre una importante disminución de rendimiento asociado a la enfermedad. En México, reportes iniciales la colocaban como un síntoma de poca importancia económica (Cruz, 1991; Hernández, 1993; Aguilar y Molina, 1996). Sin embargo, Márquez *et al.* (2021) documentaron pérdidas en la región del Mezquital, en Hidalgo, de hasta 86% en plantas con síntomas que variaban de acuerdo al material genético. Datos colectados en el presente estudio muestran un comportamiento similar (Cuadro 1). Se observó que, en 72 de las 74 localidades muestreadas del país, la incidencia de síntomas indicó que la mano de chango se encuentra distribuida en todos los estados muestreados. Solamente el híbrido Aspros Gladiador y la variedad nativa en Tlaxcala y Ciudad Mendoza, Veracruz, respectivamente, no mostraron síntomas de la deformación.

Elmore y Abendroth (2006), Alcántara-Mendoza *et al.* (2010) Thomison (2015), Sravani *et al.* (2021), Márquez-Diego *et al.* (2021), Moghadam *et al.* (2022) reportaron que la incidencia es dependiente del germoplasma utilizado. En la presente investigación, las variedades nativas presentaron mayor incidencia del síntoma de mano de chango con una media de 12.06a, que las variedades mejoradas con 7.53b ($\chi^2 = 0.0367$) (Cuadro 2). Se observaron variaciones en incidencia en los diferentes estados muestreados. Los estados más afectados fueron: Puebla, con un porcentaje mayor a 24a, Hidalgo (17ab) y Morelos (11.7ab), y los de menor incidencia en Chiapas (7.2b), Tlaxcala (7.0b), Oaxaca (6.5b), Veracruz (6.3b), Estado de México (6.2b) y Jalisco con 3.0b% (DMS 5%: 4.537).

La covarianza tiene un valor positivo (Cuadro 2) y la correlación un porcentaje de 30.38, indicando una correlación directa ya que al aumentar la altitud de la localidad existe una tendencia de incremento en la incidencia (Figura 2).

Los resultados obtenidos mostraron que la mano de chango se encontró en todos los estados evaluados, siendo Puebla el que presentó mayor incidencia (24%) y que las variedades nativas fueron más susceptibles que las mejoradas. Las diferentes altitudes de las localidades no influenciaron la incidencia de la mano de chango.

Cuadro 1. Incidencia con síntomas de ‘mano de chango’ en plantas de maíz en diferentes localidades muestreadas en México.

Estado	Localidad	Coordenadas	Msnm	Germoplasma ^a	Incidencia ^b
Tlaxcala	La Venta	19°33'28.2"N 98°42'16.4"W	2785	Nativo morado	12.5
	La Venta	19°33'56.5"N 98°41'04.2"W	2780	Nativo	13.0
	Calpulalpan	19°35'05.7"N 98°37'44.9"W	2618	Trébol amarillo	0.25
	San Felipe Sultepec	19°35'19.8"N 98°37'02.2"W	2600	Nativo	11.25
	Calpulalpan	19°35'35.7"N 98°35'26.2"W	2620	Nativo	4.0
	Calpulalpan	19°36'30.9"N 98°33'37.8"W	2600	Nativo morado	16.5
	Tlaxco	19°37'11.3"N 98°07'44.8"W	2550	Local	0.5
	Tlaxco	19°36'16.7"N 98°09'10.0"W	2500	Aspros Gladiador	0
	Tetlán de Solidaridad	19°28'35.4"N 98°02'55.5"W	2400	Asgrow H48	5.75
Hidalgo	Emiliano Zapata	19°40'05.8"N 98°33'01.3"W	2500	Nativo	9.5
	Tlanalapa	19°49'40.3"N 98°35'26.2"W	2450	Cacahuacintle amarillo	21.75
	Singuilucan	19°56'06.0"N 98°33'34.5"W	2580	Nativo	23.5
	Cinta larga	20°11'20.7"N 99°13'25.9"W	2005	Nativo	14.0
	Cinta larga	20°11'20.7"N 99°13'25.9"W	2005	Aspros Hc8	16.5
Puebla	Chignahuapan	19°49'20.9"N 98°01'32.9"W	2670	Nativo	22.0
	Chignahuapan	19°47'06.4"N 98°02'20.7"W	2670	Nativo	12.75
	Camino Chignahuapan-Tlaxco	19°44'54.8"N 98°03'26.0"W	2300	Asgrow Rinoceronte	6.00
	San José Chiapa	19°14'11.3"N 97°44'52.4"W	2380	Asgrow H48	39.75
	Sierra de Soltepec	19°06'00.9"N 97°40'03.5"W	2355	Nativo	36.25
Morelos	Cerca de Nicolás Bravo	18°40'05.9"N 97°22'15.1"W	2620	Híbrido	3.75
	Cañada de Morelos	18°44'46.1"N 97°24'59.3"W	2323	Nativo	42.25
	Palmar de Bravo	18°50'19.0"N 97°31'15.8"W	2199	Nativo	30.0
	Ayala	18°46'23.6"N 98°53'48.7"W	1147	Antilope	2.0
	Tlayecac	18°45'24.1"N 98°52'16.7"W	1360	Nativo	7.75
	Jantetelco	18°44'33.3"N 98°50'10.4"W	1436	Asgrow Berrendo	24.25
	Jantetelco	18°43'17.1"N 98°50'58.4"W	1430	Unisem Ares	0.75
	Yecapixtla	18°53'26.0"N 98°52'51.3"W	1500	Dekalb 2037	27.5
	Atlahuacán	18°57'47.2"N 98°52'22.2"W	1610	Brevant B3916	8.0
Oaxaca	Tuxtepec	18°08'29.8"N 96°10'59.9"W	20	Nativo	11.5
	Tuxtepec	18°08'06.9"N 96°10'59.9"W	35	Nativo	3.5
	San Juan Bautista	18°08'04.3"N 96°10'57.5"W	20	Papaloapan	4.5
Jalisco	Autlán de Navarro	19°45'16.6"N 104°21'43.1"W	900	Asgrow 7573	2.0
	Autlán de Navarro	19°45'16.6"N 104°21'43.1"W	900	Asgrow 7573	3.0
	Unión de Tula	19°58'45.7"N 104°15'40.4"W	1349	Asgrow 7573	4.25
Veracruz	Rancho viejo	18°47'02.2"N 97°12'22.0"W	1260	Nativo	20.75
	Nueva Rosita	18°47'47.7"N 97°11'35.6"W	1320	Xalapeño	0.5
	Cd. Mendoza	18°48'53.9"N 97°10'51.2"W	1280	Nativo	0
	Emiliano Zapata	18°43'56.2"N 97°16'31.4"W	1630	Poncho	12.5
	Cosamaloapan de Carpio	18°09'01.5"N 96°10'29.5"W	10	Nativo	9.25
	Cosamaloapan de Carpio	18°08'45.3"N 96°10'31.0"W	15	Nativo	11.5
	Cosamaloapan de Carpio	18°08'44.7"N 96°10'27.8"W	10	Nativo	2.25
	Cosamaloapan de Carpio	18°08'43.6"N 96°10'29.2"W	10	Nativo	0.25
	Cosamaloapan de Carpio	18°08'33.8"N 96°10'30.6"W	10	Papaloapan	6.25
	Cosamaloapan de Carpio	18°08'44.1"N 96°09'42.6"W	20	Papaloapan	10.75
	Cosamaloapan de Carpio	18°08'45.0"N 96°09'44.9"W	20	H-520	3.5
	Cosamaloapan de Carpio	18°09'00.0"N 96°09'45.0"W	10	Nativo	3.75

Cuadro 1. Continuación.

Estado	Localidad	Coordenadas	Msnm	Germoplasma ^a	Incidencia ^b	
Chiapas	Cosamaloapan de Carpio	18°08'43.4"N 96°10'33.3"W	10	Nativo	5.5	
	Cosamaloapan de Carpio	18°08'43.4"N 96°10'33.3"W	10	Nativo	5.5	
	Cosamaloapan de Carpio	18°08'43.4"N 96°10'33.3"W	10	Nativo	5.5	
	Cosamaloapan de Carpio	18°08'43.4"N 96°10'33.3"W	10	Nativo	5.5	
	Siltepec	15°27'42.0"N 92°23'29.5"W	790	Christian	10.25	
	Motozintla	15°25'22.8"N 92°21'22.9"W	830	Dekalb 7500	15.0	
	Motozintla	15°25'33.0"N 92°21'50.9"W	866	Pioneer	15.75	
	Motozintla	15°26'06.6"N 92°21'48.8"W	879	Nativo	2.25	
	Siltepec	15°27'26.3"N 92°22'58.5"W	986	Híbrido amarillo	0.5	
	Siltepec	15°27'26.3"N 92°22'58.5"W	986	Pioneer	1.75	
	Siltepec	15°27'26.3"N 92°22'58.5"W	987	Christian	5.0	
	Siltepec	15°26'40.5"N 92°22'30.5"W	1056	Pioneer	5.0	
	Montecristo de Guerrero	15°39'00.0"N 92°43'12.0"W	1215	Nativo	5.5	
	El Nominado	15°36'00.0"N 92°43'12.0"W	1215	Pioneer	0.75	
	El Nominado	15°36'00.0"N 92°43'12.0"W	1223	Pioneer	16.75	
	El Nominado	15°36'00.0"N 92°43'12.0"W	1223	Jarocho	9.75	
	Edo. de México	Motozintla	15°23'34.5"N 92°25'50.6"W	1226	Nativo	12.75
		Motozintla	15°23'29.6"N 92°24'18.1"W	1250	Nativo	3.5
Motozintla		15°25'11.1"N 92°23'01.9"W	1343	Pioneer	4.75	
Colpos		19°28'06.6"N 98°54'03.5"W	2250	MO19:15# Bco (Colpos)	3.5	
Colpos		19°28'06.6"N 98°54'03.5"W	2250	MO19:19+2# Bco (Colpos)	0.75	
Colpos		19°28'06.6"N 98°54'03.5"W	2250	MO19:Elvia 3 TSR# Bco (Colpos)	5.25	
Colpos		19°28'06.6"N 98°54'03.5"W	2250	MO19:11# Amar. (Colpos)	0.5	
Colpos		19°28'06.6"N 98°54'03.5"W	2250	MO19:CPVero1 Bco (Colpos)	5.0	
Colpos		19°28'06.6"N 98°54'03.5"W	2250	MO19:CP Hilda 2 Amar. (Colpos)	1.0	
Chapingo		19°29'30.5"N 98°52'30.7"W	2250	Mejorado	7.0	
Chapingo	19°29'30.5"N 98°52'30.7"W	2250	Mejorado	16.0		
Tepetlixpa	19°00'57.9"N 98°49'49.8"W	2330	Nativo	17.0		

^a De acuerdo con la entrevista con el dueño de la parcela. ^b Promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 2. Covarianza de las variables de altitud (msnm) e incidencia de la enfermedad mano de chango en maíz.

Variabes	R	p-value	Significancia
Correlación Msnm - incidencia (Spearman) = 0.3038984	27.03%	0.01984	*
Covarianza: 2716.052			

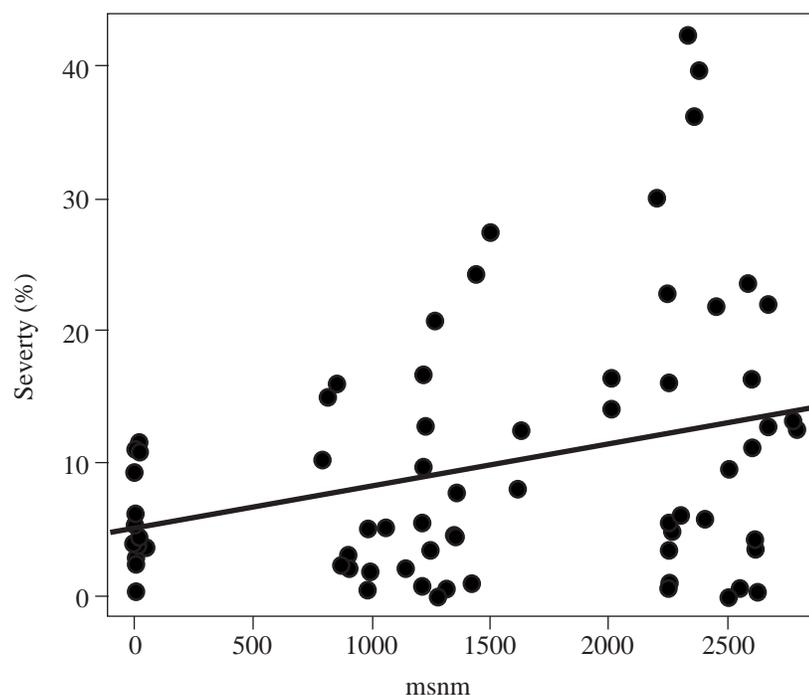


Figura 2. Correlación entre las variables de altitud (msnm) y la incidencia de la enfermedad mano de chango del maíz.

LITERATURA CITADA

- Alcántara-Mendoza S, Téliz-Ortiz D, De León C, Cárdenas-Soriano A y Hernández-Anguiano A. 2010. Detección y evaluación del fitoplasma maize bushy stunt en el estado de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 97: 34-43. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a4.pdf>
- Aguilar RVH and Molina GJD. 1996. Factors influencing the presence of ear prolificacy (“Manita”) in maize. *Agrociencia* 30: 569-572.
- Bonnet OT. 1966. *Inflorescences of Maize, Wheat, Rye, Barley and Oats: Their Initiation and Development*. Univ. of Illinois, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station. Bulletin 721. <http://hdl.handle.net/2142/27945>
- CEDRSSA, Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. 2019. *Producción de granos básicos y suficiencia alimentaria 2019-2024*. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/39ProduccionGranosBasicos.pdf>
- Ciampitti I. 2014. Abnormal Corn Ears. *Infection* 2373: 2373. <https://bookstore.ksre.ksu.edu/pubs/EP169.pdf>
- CIMMYT. 2019. *Maíz Para México. Plan Estratégico 2030*. <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/20219/60937.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cruz SPEV. 1991. *La proliferación de jilotes en la mazorca (manita) y el rendimiento de maíz (Zea mays L.)*. Tesis profesional de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 61 p.
- Elmore RW and Abendroth LJ. 2006. Multiple ears per node. Iowa State University Agronomy Extension Corn Production. <https://crops.extension.iastate.edu/corn/production/management/mid/multiple.html>
- GCMA, Grupo Consultor de Mercados Agrícolas. 2022. *Comportamiento de comercio exterior de granos y oleaginosas*. <https://gcm.com.mx/reportes/comercio-exterior/granos-y-oleaginosas/>

- Hernández AM. 1993. Evaluación de algunos componentes del rendimiento en cuatro variedades de maíz (*Zea mays* L.) con proliferación en el nudo de la mazorca (manita) en Chapingo México. Tesis profesional de Licenciatura Universidad Autónoma Chapingo. 59 p
- Márquez-Diego JJ, De León-García de Alba C, Rojas-Martínez RI and Sánchez-Pale JR. 2021. Incidence and Effect on Grain Yield of the “ Monkey’s Hand ” Disease in 29 Maize Genotypes. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(3): 1-9. doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-2.
- Moghadam HH, Najafinezhad H and Shirkhani A. 2022. Bouquet ears in maize inbred lines as affected by agronomic factors. *Crop Improvement* 1-17. <https://doi.org/10.1080/15427528.2022.2063776%0ABouquet>
- Nielsen RLB. 1999. What a MESS! Corny news network. Purdue University. <https://www.agry.purdue.edu/ext/corn/news/articles.99/990823b.html>
- Nielsen RLB. 2014. Multiple Ears of Corn on the Same Shank. <http://www.kingcorn.org/news/timeless/MessyEars.html%0AMultiple>.
- Ortez OA, McMechan AJ, Hoegemeyer T, Rees J, Jackson ZT and Elmore RW. 2022. Abnormal ear development in corn: A field survey. *Agrosystems, Geosciences & Environment* 5(1): 1-12. <https://doi.org/10.1002/agg2.20242>
- Reyes-Santiago E, Bautista-Mayorga F and García-Salazar JA. 2022. Análisis del Mercado de maíz en México desde una perspectiva de precios. *Acta Universitaria*, 32, 1-16. <https://doi.org/10.15174/au.2022.3265>
- Ritchie SW, Hanway JJ and Benson GO. 1986. How a Corn Plant Develops. Iowa State University of Science and Technology. Cooperative Extension Service, Ames, Iowa. 21p.
- Singh NK and Pooja D. 2008. Studies on multiple ears trait expression in maize (*Zea mays* L.). Pp: 130-135. In Pervez H, Zaidi MA and Pixley K (eds). *Maize Tehnology Transfer to Poor: Lessons Learned from Community Based Approaches of Technology t the Hill and Mountain Farmers of Nepal*. Makassar, Indonesia. 668 p. <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/811>
- SIAVI, Sistema de Información Arancelaria Vía Internet. 2021. Cereales-Maíz. Gobierno de México. <http://www.economia-snci.gob.mx/>
- Sravani D, Guddeti M, and Rajanikanth E. 2021. “Boquet Ears in Maize.” *Biotica Research Today* 3(1): 70-71. https://www.researchgate.net/publication/350688092_Boquet_Ears_in_Maize
- Thomison PL and Geyer A. 2015. “Abnormal Corn Ears.” Troubleshooting abnormal corn ears. Ohio State University extension. https://cpb-us-w2.wpmucdn.com/u.osu.edu/dist/d/4866/files/2014/08/Abnormal_ear_poster_2015_April28-16810pl.jpg.

Capítulo 3

Retos del fitomejoramiento para la sanidad del maíz

3.1. Enfermedades de maíz en el Noreste

César Augusto Reyes-Méndez*, Rosendo Hernández-Martínez*.

*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Río Bravo. Km 61 Carretera Matamoros-Reynosa. Río Bravo, Tamaulipas. Tel.: (55) 3871 8700, Ext. 411. *Autor de correspondencia: reyes.cesar@inifap.gob.mx

Resumen

En el norte del estado de Tamaulipas, en el noreste de México, se localizan los Distritos de Riego No. 25 Bajo Río Bravo y No. 26 Bajo Río San Juan, ubicado en el segundo de ellos, el INIFAP-Campo Experimental Río Bravo (CERIB) en los paralelos LN 25°96' 46" y LO 98° 01' 49". Las casi 300 mil hectáreas de riego en los dos distritos representan la mayor superficie compacta con irrigación en el país (Salinas *et al.*, 2006); siendo el maíz el segundo cultivo de mayor importancia. En el ciclo otoño-invierno 1993-1994 se sembraron con este cereal 236 mil ha con una producción de poco más de 1 millón de toneladas, cifras históricas en cuanto a superficie y producción (Reyes y Cantú, 2006). La intensa sequía que inició en 1994 contribuyó directamente a la baja captación de las presas y por consiguiente a la disminución de la superficie dedicada a este cultivo, por lo que en el ciclo otoño-invierno 2021-2022 se sembraron 46,431 ha con una producción de 279,898 t de grano blanco y amarillo y un rendimiento medio de 6.02 t ha⁻¹ (SIAP, 20023). Durante ese ciclo las siembras de temporal son mínimas. En el norte del estado de Coahuila y norte de Nuevo León la siembran con este cultivo fue de 2,023 y 954 ha, con un rendimiento medio de 4.43 y 3.48 t ha⁻¹, respectivamente. Por las bajas y erráticas precipitaciones de los últimos años, y la falta de disponibilidad de agua en las presas del noreste de México, el maíz en el ciclo primavera-verano se siembra en pequeñas superficies.

Antecedentes

Los distritos No. 25 y No. 26, creados en la década de los 40 's se iniciaron con un patrón de cultivos de algodón y maíz, dominando ampliamente en poco tiempo el primero de ellos. La persistencia de la siembra del algodón

provocó la incidencia de plagas y enfermedades fungosas, especialmente la pudrición texana causada por el hongo, *Phymatotrichopsis omnivorum*, así como las plagas adquirieron resistencia a los insecticidas, ocasionando grandes pérdidas de rendimiento y la incosteabilidad del cultivo (Adkinson, 1971, citado por Rodríguez y Loera, 2006; Montes y Díaz, 2006). Debido a estos problemas, al inicio de la década de los 60's el algodón fue desplazado por el sorgo y el maíz, cultivos que no son susceptibles a esta enfermedad.

El CERIB inició actividades a partir de agosto de 1956 en diversos cultivos, principalmente dirigidas a la obtención de tecnología de producción. Los primeros estudios sobre las enfermedades del maíz se realizaron en la década de los 60's (Medina, 1968, citado por Montes y Díaz, 2006). No fue sino hasta 1974, cuando se iniciaron los estudios que involucraban formalmente a la fitopatología trabajando en estrecha coordinación con el Programa de Mejoramiento Genético de Maíz, siendo el Biólogo y fitopatólogo Rodolfo Girón Calderón (1974-1999), el único investigador que, hasta el momento, ha trabajado en esta disciplina (Reyes y Cantú, 2006). A través de la historia del CERIB, se han realizado estudios básicos (etiología y epidemiología) y aplicados tendientes a resolver los problemas relacionados con las enfermedades mediante diferentes métodos de control, principalmente genético, y cultural (Montes y Díaz, 2006).

Descripción

Climática. En la planicie costera de las tierras bajas del noreste de México que incluye las regiones inferiores a 700 msnm del norte de los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, se presenta un clima subtropical con veranos calientes e inviernos húmedos y templados, en donde las estaciones de primavera y otoño no están bien definidas. En la región se pueden distinguir tres áreas con clima diferente, según el sistema de clasificación climática de Köppen modificado por García (2004): El clima seco, seco extremo y semicálido-semihúmedo con una temperatura de media regional de 23.5 °C y una precipitación media anual de 575 mm.

Enfermedades. Las condiciones climáticas extremas que se presentan en el noreste de México, el monocultivo de maíz que se practica desde hace poco más de 60 años en el norte de Tamaulipas y la libre introducción de germoplasma de diferentes regiones del país y el extranjero, han propiciado que se

presenten diversas enfermedades que atacan el tallo, follaje y mazorca de la planta (INIA,1976). A continuación, se describen las actividades de investigación sobre enfermedades que se han desarrollado en el CERB.

El mildiú vellosa (*Peronosclerospora sorghi*, *Sclerophthora macrospora*) alcanzó proporciones epifíticas en 1967, convirtiéndose una enfermedad endémica en las décadas de los 70's y 80's y su ataque ocasionó hasta un 30 % de infestación con pérdidas de 1.08 ton ha⁻¹. A corto plazo, la medida que se tomó para disminuir la incidencia fue ajustar la fecha de siembra y recomendar las variedades menos susceptibles (INIA, 1976; Reyes *et al.*, 1992).

Al inicio de los años 60's, la época óptima para sembrar maíz comprendía del 1 de febrero al 15 de marzo, observando que en las fechas de siembra retrasadas se tenía mayor presencia de plantas enfermas, y no solo de esta enfermedad, también había mayor incidencia de carbón común (*Ustilago maydis*) y tizón del norte (*Exserohilum tursicum*). Los estudios de fechas de siembra mostraron que, sembrando en el mes de febrero, se reducía drásticamente su incidencia (Medina 1968, citado por Montes y Díaz, 2006).

Por lo ineficaz y antieconómico del combate químico del mildiú vellosa, la investigación se enfocó en la evaluación, selección y obtención de germoplasma altamente tolerantes a la enfermedad a través de genotipos nacionales e introducidos, principalmente de Asia, material sobresaliente se muestra en el Cuadro 2 (Girón 1975; Mejía 1975; INIA 1976).

Posteriormente, se desarrolló una técnica de inoculación en campo usando conidios de *Peronosclerospora sorghi* mediante el uso de franjas de sorgo forrajero susceptible como dispersor conidial, la que resultó ser eficiente para la

Cuadro 2. Reacción de mildiú vellosa y días a floración de poblaciones de maíz provenientes de ASÍA EN Río Bravo, Tamaulipas. 1976.

Genealogía	Días a floración	% Mildiú vellosa
Ph. 9 DMR	62	1.2
Ph. DMR 2	62	4.0
Ph. DMR 1	58	4.6
Ph. DMR 3	61	9.4
Hawaiian Super Sweet (T)	60	21.6
H-412	60	26.3

selección de materiales tolerantes (Girón, 1978). Los primeros genotipos obtenidos de estos trabajos de investigación son los híbridos H-421 y H-422, liberados por el Ing. Hugo Mejía Andrade en 1982, el segundo de ellos presentó un 0.2 % de incidencia de *Peronosclerospora sorghi* y su antecesor el H-417 mostró una vulnerabilidad del 12 %. Otro resultado de estos trabajos fue el control químico, mediante la aplicación del fungicida sistémico Aprón 35 SD, el cual en dosis de 2.5 a 3 gramos por kg de semilla reduce la incidencia de mildiú en 16 % (Reyes *et al.*, 1992). La presencia del mildiú veloso se redujo significativamente en la región, como resultado del uso de una nueva generación de híbridos de INIFAP y casas comerciales de maíz resistentes a esta enfermedad.

Con el objeto de conocer los factores limitantes en la producción de maíz en el área de riego del norte de Tamaulipas, durante los años de 1979 y 1980, el Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del CERIB realizó un estudio en los dos distritos de riego del norte de Tamaulipas, que consistió en recopilar información en muestreos directos en campo y entrevistas con los agricultores de los 200 predios incluidos en el estudio. En el apartado de fitopatología, se encontró que las principales enfermedades fueron: carbón común o huitlacoche, pudrición negra o carbonosa del tallo, mildiú veloso y pudrición de mazorca y tallo causadas por *Fusarium moniliforme* (Garza, 1984, Reyes *et al.*, 1992).

La cercanía del CERIB con la frontera de Estados Unidos de América facilita la introducción de material genético de aquel país. Hess y Menéndez (1985) reportan que en la década de los 70's se sembraban híbridos importados con esterilidad citoplasmática, los que mostraron susceptibilidad al tizón foliar (*Exserohilum tursicum*), ocasionando pérdidas importantes en la región, por lo que tuvieron que dejar de sembrarse.

En algunos años sigue presentándose en algunos años el tizón foliar del norte y ha ocasionado pérdidas económicas importantes para algunos productores, debido a que se siembran comercialmente híbridos traídos de otras regiones sin haber realizado previamente evaluaciones experimentales. En el año 2007 se perdieron 600 ha en el Distrito de Riego No. 25 Bajo Río Bravo por esta enfermedad.

En el Distrito de Riego No. 26 Bajo Río San Juan, en el área de Cd. Díaz Ordaz, Tamaulipas, única región del país donde se siembra maíz palomero

(*Zea mays everta*) en forma comercial, en el período 2010-2016, en promedio, se establecieron 500 ha anuales con un híbrido de importación ya que en la actualidad no hay cultivares comerciales de este tipo para esta región. En el año 2015 la totalidad del cultivo se vio afectado por *Exserohilum tursicum*, ocasionando pérdidas económicas a los productores que variaron del 30 al 70 %, orillándolos prácticamente de dejar de sembrarlo. Este cultivo no se sembró en 2020 y 2021, en el año 2022 solo se sembraron 64 ha (SIAP, 2023).

Desde que inició la siembra de maíz de manera importante en la región, el carbón común o huitlacoche (*Ustilago maydis*) se identificó como una de las principales enfermedades del maíz (Medina *et al.*, 1969). Girón (1992a) realizó un muestreo regional a inicio de la década de los 80's y reporta una incidencia de 7.5 % de esta enfermedad y en muestreo posterior, en 1990, la estimó en 18 % (Girón, 1992b). Posteriormente, el mismo investigador condujo estudios de campo para evaluar la reacción de materiales experimentales y comerciales de maíz a esta enfermedad, para asegurar la infección, hacía cuatro inoculaciones con suspensión de esporas en plantas de maíz en etapas vegetativas de V4, V8, V12 y cuando los estigmas tenían 2-3 cm de longitud. Con este método se lograron identificar materiales que presentaban daños del 2.3% (tolerantes) hasta el 22 % (Susceptibles) (Girón, 1992b), Las densidades altas de siembra y la sobre-fertilización con nitrógeno, favorecen la presencia de este hongo (Reyes *et al.*, 1992).

Otra enfermedad importante que se presenta variando en intensidad de un año a otro por condiciones climáticas, es la pudrición de mazorca causada por *Fusarium moniliforme*. En un estudio conducido por Girón en 1990 (1992b) en los dos distritos de riego, encontró que este hongo era el segundo patógeno de mayor presencia con 7 %, después de *Ustilago maydis*.

En los 80's, la pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), sobresalió como otra enfermedad importante en la región. Se realizaron estudios para evaluar la reacción de materiales experimentales y comerciales de maíz a esta enfermedad. Para la selección del germoplasma del programa de mejoramiento genético, Girón (1988) evaluó un grupo de 284 líneas experimentales de maíz en un terreno de 3,200 m², al cual se le estuvo incorporando durante 10 años entrenudos de maíz contaminados con el hongo *Peronosclerospora sorghi* y sembrando frijol pinto americano (*Phaseolus vulgaris*) susceptible a dicho hongo y comparó el grado de daño observado en plantas inoculadas vs plantas

no inoculadas. Las inoculaciones se hicieron 10 días después de la floración masculina en 5 plantas en el segundo entrenudo por arriba del nivel del suelo. La evaluación se hizo al momento de la cosecha, cortando los tallos longitudinalmente para contar los entrenudos dañados de las plantas inoculadas y de 5 plantas no inoculadas. No se encontraron diferencias estadísticas entre los dos tratamientos, con inóculo el 63 % resultó con daño y el inoculado presentó el 60 %, por lo que se decidió seguir seleccionando material tolerante sin inocular en el terreno infestado ya que resulta más práctico y económico. Desafortunadamente todos los trabajos de inoculación se suspendieron en 1999 con la jubilación del Biólogo Girón.

En los años de 1979 y 1980 se reportó la presencia del hongo *Aspergillus flavus* en los campos del norte de Tamaulipas en forma esporádica y con mínima incidencia (Garza, 1984). Fue en los años de 1989 y 1990 cuando se observó un incremento considerable del hongo, lo que provocó que más del 90 % de la cosecha de las 926,908 toneladas de grano producidas en ambos daños, resultaran contaminadas con aflatoxinas en niveles no permisibles para consumo humano (> 20ppb), ocasionando pérdidas económicas por 280 millones de pesos por año (Reyes 1989, Rodríguez *et al.* 1995). Por otro lado, la presencia de insectos dañando la mazorca y el mal manejo del cultivo, han sido señalados como factores que favorecen la presencia de aflatoxinas (Rodríguez *et al.* 1995).

Ante la gravedad de la situación y con la amenaza de la SSA de prohibir la siembra comercial de maíz en el norte de Tamaulipas si en el siguiente año volvía a resultar la cosecha contaminada, los Programas de Mejoramiento Genético de Maíz y de Fitopatología del CERIB, se avocaron a dar solución en el corto plazo, atendiendo el problema desde el punto de vista de prácticas culturales. Los resultados indican que las fechas de siembra después del 15 de febrero, los insectos del elote y la no aplicación oportuna de los riegos de auxilio son factores consistentes que favorecen la presencia de aflatoxinas.

Relevancia de cada una de las enfermedades que se han atendido

A través de los años, las actividades del CERIB han permitido desarrollar una serie de medidas para prevenir y disminuir significativamente el ataque de microorganismos al cultivo de maíz, mediante diferentes métodos como son el desarrollo de materiales genéticos tolerantes, el uso de productos quím-

micos o bien prácticas agronómicas, lo que ha contribuido de manera importante a que continué sembrándose este cereal en la región y a incrementar el rendimiento unitario.

Todas las actividades enfocadas a la obtención de tecnología para el control de enfermedades han sido relevantes como lo fue la introducción del extranjero de material genético resistente al mildiú veloso en la década de los 70's, pero sin duda alguna, una de las investigaciones de mayor relevancia, en la que participaron investigadores del Programa de Mejoramiento del Maíz del CERIB, son los trabajos iniciados en 1990, orientados a estudiar el impacto del clima y las prácticas culturales sobre las aflatoxinas. La mejor estrategia para minimizar los riesgos de contaminación es usar el paquete tecnológico desarrollado por el INIFAP, el cual lo implantó la SARH (SADER) en Tamaulipas a partir de 1991, adaptándose su aplicación a otras regiones agroecológicas similares del país. El paquete consiste en la selección y preparación oportuna del terreno, sembrar del 20 de enero al 15 de febrero, controlar los insectos de la mazorca y la maleza, aplicar un riego de presembrado y tres de auxilio, uso de variedades adaptadas con buena cobertura de mazorca, una densidad de 70 mil plantas ha⁻¹ a cosecha, fertilización balanceada, iniciar la cosecha con 22% de humedad en el grano y ajustar las trilladoras para evitar quebrar los granos y eliminar al máximo las impurezas. El uso de este paquete permitió que la SSA autorizara continuar sembrando maíz, el cultivo más rentable bajo riego en la región. Las temperaturas altas y la sequía favorecen la contaminación, especialmente en las etapas de floración y llenado de grano. Los factores agronómicos más asociados a la presencia de aflatoxinas son la fecha de siembra, el control de insectos y la irrigación. También se desarrolló un modelo de predicción el cual ha demostrado su eficiencia. En el período de 1991 a 2019 la superficie total de siembra de maíz en el norte de Tamaulipas bajo riego fue de 2.2 millones de hectáreas y se cosecharon 11.5 millones de toneladas de grano de maíz apto para consumo humano y animal. El beneficio económico de la tecnología en dicho periodo se estima en 40 353 millones de pesos (Rodríguez *et al.*, 1995; Reyes y Rodríguez, 2020).

Reseña del trabajo de fitomejoramiento relacionado a la sanidad de maíz

El Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del CERIB desde su inicio al presente, ha generado 14 materiales de maíz, de estos, 11 son híbridos convencionales, un híbrido varietal y dos variedades de polinización libre

(Cuadro 1). Durante la selección y formación de los progenitores e híbridos liberados, además de rendimiento de grano, precocidad y tolerancia al acame, han sido sometidos a condiciones favorables para el desarrollo de las principales enfermedades de la región, por lo que todos los genotipos presentan buen rendimiento de grano y tolerancia al ataque de los principales patógenos del noreste de México.

Cuadro 1. Híbridos y variedades de maíz liberados por el Campo Experimental Río Bravo.

Híbrido	Características	Año de Liberación
H-417	Híbrido de cruza doble para riego	1976
H-418	Híbrido de cruza doble para riego	1976
H-421	Híbrido de cruza simple para riego	1982
H-422	Híbrido de cruza simple para riego	1982
VS-409	Variedad precoz para temporal	1984
H-433	Cruza de tres líneas para riegos restringidos	1987
HV-1	Híbrido intervarietal de ciclo precoz para temporal	1992
VS-440	Variedad de ciclo intermedio para condiciones de temporal	1992
H-435	Híbrido de cruza simple para riego	1992
H-436	Híbrido de cruza simple para riego	1992
H-437	Híbrido de tres líneas para riego restringido	2003
H-439	Híbrido de tres líneas con buena adaptación en todo Tamaulipas	2003
H-440	Híbrido precoz para temporal y riegos restringidos	2006
H-443A	Híbrido de tres líneas para riego y buen temporal	2008

Perspectivas y retos

Otras enfermedades que se han observado esporádicamente en el noreste de México desde hace varias décadas sin que hasta el momento causen daños importantes son, roya común (*Puccinia sorghi*), tizón foliar del sur (*Heminthosporium maydis*) y pudriciones de mazorca causadas por *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. y *Diplodia zeae* (Garza, 1984). Recientemente se ha visto la mancha café (*Physoderma maydis*). Es prioritario estar atentos a la evolución de estas enfermedades o alguna otra emergente y tan pronto crezca su incidencia, iniciar trabajos de mejoramiento genético orientados a seleccionar germoplasma tolerante. También es deseable exponer los híbridos de compañías privadas que se comercializan, a las enfermedades más importantes de la región para identificar los que mejor se adapten a las condiciones agroclimáticas de la región.

Hay que poner énfasis en las enfermedades que ponen en riesgo la salud humana y animal como son las causadas por *Aspergillus* spp., y *Fusarium* spp las cuales producen micotoxinas. No obstante, los esfuerzos realizados en la búsqueda de genotipos de maíz con tolerancia o resistencia a estos patógenos, aún falta más información en esa línea de investigación, así como de otras opciones para su control.

La biotecnología es de gran valor ya que reduce en tiempo y costos la identificación de agentes causantes de enfermedades, por lo que, en un futuro cercano, es deseable incluir esta herramienta en el Programa de Mejoramiento Genético en un futuro cercano. Para la prevención y control de enfermedades, se deberá enfatizar en un control integral en donde se incluya la tolerancia o resistencia genética, el control químico y las prácticas culturales.

LITERATURA CITADA

- Garza GL. 1984. El marco de referencia como una herramienta para la detección de problemas en el cultivo de maíz. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Marín, N. L. México. 189 p.
- García E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Serie libros Núm. 6. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultado el 4 de noviembre. en <http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/view/83/82/251-1>.
- Girón CR. 1975. Incidencia de downy mildew en variedades comerciales y experimentales de sorgo, en diferentes fechas de siembra. Resultados 74-75. CIAT, SAG. Río Bravo, Tamaulipas. México. pp. 9-10.
- Girón-Calderón R. 1988. Comparación de plantas de maíz inoculadas con palillo y sin inocular. Primera Reunión Científica, Forestal y Agropecuaria de Tamaulipas. CIRNE, INIFAP, SARH. Cd. Victoria, Tamaulipas. México. p. 102.
- Girón CR. 1992a. Diagnóstico fitosanitario de maíz en híbridos comerciales en la región norte de Tamaulipas. Segunda Reunión Científica, Forestal y Agropecuaria de Tamaulipas. CIRNE, INIFAP, SARH. Cd. Victoria, Tamaulipas. México. pp. 64-66.
- Girón CR. 1992b. Evaluación del carbón común o huitlacoche en materiales de maíz y experimentales. Segunda Reunión Científica, Forestal y Agropecuaria de Tamaulipas. CIRNE, INIFAP, SARH. Cd. Victoria, Tamaulipas. México. p. 72.
- Hess ML y Menéndez MA. 1985. Manual Sanitario Regional. Patronato para la Investigación y Fomento de Sanidad Vegetal (PIFSV). Delegación Estatal Norte Tamaulipas. SARH. 132 p.
- INIA. 1976. INIA XV Años de Investigación Agrícola. Secretaría de Agricultura y Ganadería. SAG 1961- INIA 1976. México, D.F. pp. 225-247.
- Medina AJ, Maciel RC y Rosas JG. 1969. Aumente sus rendimientos de maíz. SAG. INIA. Centro de Investigaciones Agrícolas de Tamaulipas. Hoja Informativa No. 2. Río Bravo, Tamaulipas.
- Mejía-Andrade H. 1975. Observación de resistencia a downy mildew y características agronómicas de colecciones nacionales y extranjeras. Resultados 74-75. CIAT, SAG. Río Bravo, Tamaulipas. México. pp. 22-23.
- Montes GN y Díaz AF. 2006. Fitopatología, pp. 192-213. En: L. A. Rodríguez del Bosque (ed.), Campo Experimental Río Bravo: 50 Años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos. Libro Técnico No. 1. INIFAP, Campo Experimental Río Bravo. Río Bravo, Tam., México. 325 p.

- Reyes MCA. 1989. Diagnóstico de los problemas que afectaron la producción y calidad de maíz en la zona norte de Tamaulipas en 1989. SARH, INIFAP, Campo Experimental Río Bravo. Publicación Especial. 6 p.
- Reyes MCA, Rosales ER y Girón RC. 1992. La producción de maíz de riego en el ciclo otoño-invierno en el norte de Tamaulipas. *En: Manual de Cultivos del Norte de Tamaulipas*. SARH. INIFAP. Patronato para la Investigación y Fomento de Sanidad Vegetal (PIFSV). Cd. Victoria, Tamaulipas. pp. 28-43.
- Reyes MCA y Cantú MAA. 2006. Maíz, pp. 55-74. *En: L. A. Rodríguez del Bosque (ed.), Campo Experimental Río Bravo: 50 Años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos. Libro Técnico No. 1.* INIFAP, Campo Experimental Río Bravo. Río Bravo, Tam., México. 325 p.
- Reyes M y Rodríguez LA del B. 2020. Control y prevención de aflatoxinas en Tamaulipas. P. 70. *En: E. Cruz C., y L. Reyes M. (Comp.) Aportaciones del INIFAP al Campo Mexicano en 35 años.* Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Oficinas Centrales. Ciudad de México. México. Libro técnico No. 1. 244 p.
- Rodríguez del BLA, Reyes CAM, Acosta SN, Girón RC, Garza IC y García RV. 1995. Control de aflatoxinas en maíz en Tamaulipas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Agrícola Experimental Río Bravo. Río Bravo, Tamaulipas, México. Folleto Técnico N° 17. 18p.
- Rodríguez del BLA y Loera-Gallardo J. 2006. Entomología, pp. 163-191. *En: L. A. Rodríguez del Bosque (ed.), Campo Experimental Río Bravo: 50 Años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos. Libro Técnico No. 1.* INIFAP, Campo Experimental Río Bravo. Río Bravo, Tam., México. 325 p.
- Salinas GJR, Alvarado MC y Sánchez R de la C. 2006. Suelo y Agua, pp. 147-162. *En: L. A. Rodríguez del Bosque (ed.), Campo Experimental Río Bravo: 50 Años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos. Libro Técnico No. 1.* INIFAP, Campo Experimental Río Bravo. Río Bravo, Tam., México. 325 p.
- Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP). 2023. Cierre de la producción agrícola (1980-2022). México. SIAP. <https://nube.siap.gob.mx>

ANEXO

Algunas enfermedades prevalentes en el noreste de México



Aspergillus flavus



Diplodia Zeae



Siembra comercial de maíz afectada por *Macrophomina phaseolina*



Exserohilum tursicum



Ustilago maydis



H-443A (tolerante)



Garst 8285 (susceptible)

Fusarium moniliforme



Physoderma maydis



Peronosclerospora sorghi

3.2. Enfermedades del maíz en la Región Pacífico Centro

Vidal Martínez Víctor Antonio^{1*}, Ramírez Díaz José Luis², Ledesma Miramontes Alejandro², Alemán de la Torre Ivone², Salinas Moreno Yolanda². ¹INIFAP. Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Carretera Internacional México - Nogales Kilómetro 6, Centro, 63300 Santiago Ixcuintla, Nay. ²INIFAP-Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco. Av. Biodiversidad 2470. 47600 Tepatitlán, Jal.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de maíz en la región Pacífico Centro se cultiva bajo condiciones de temporal en una superficie de 918,069 ha, destacando Jalisco y Michoacán con mayor superficie sembrada (543,360 y 342,854 ha, respectivamente). En Nayarit, se siembran 22,491 ha y en Colima solamente 9,362 ha (SIAP, 2022). Su producción anual promedio de grano en temporal durante el ciclo agrícola de Primavera-Verano, es de 3.2, 3.8, 4.0 y 6.7 t ha⁻¹ en Michoacán, Colima, Nayarit y Jalisco, respectivamente. Bajo condiciones de riego en Otoño-Invierno, se siembra en esta región Pacífico Centro, una superficie total de 174,532 ha (124,600 en Michoacán, 43,980 en Jalisco, 3,090 en Nayarit y 2862 ha en Colima, cuyos rendimientos de grano promedio son de 6.6, 8.0, 7.9 y 5.6 t ha⁻¹ (SIAP, 2022).

Antecedentes

En específico, la presencia de enfermedades en el maíz, hace 15 años no era un problema fuerte en la región Pacífico Centro de México; inclusive las recomendaciones del INIFAP señalaban en sus Guías Técnicas que estas no eran de importancia económica, por dos razones fundamentales: su incidencia era muy baja y porque el INIFAP al desarrollar sus actividades de mejoramiento hacia rendimiento de grano principalmente, en complemento realiza su mejoramiento *in situ* incluyendo selección de materiales tolerantes a enfermedades foliares y de tallo (Ramírez *et al.*, 2010). Este proceso genotécnico siempre ha sido complementado y certificado por la adaptación y adaptabilidad de sus genotipos mejorados; los cuales no son liberados, sino hasta que cumplen con

esta prueba de estabilidad genotipo x ambiente (Vidal *et al.*, 2006). Actualmente, por el cambio climático y la alta presencia de germoplasma exótico, ha ocasionado una mayor incidencia de organismos dañinos como son las enfermedades, lo que ha obligado a reforzar los trabajos de mejoramiento genético hacia la obtención de tolerancia a estas enfermedades. La presencia actual de especies fitopatógenas que antes no se presentaban en las entidades, es también atribuible a la introducción por diferentes agencias productoras de semilla, de germoplasma no adaptado ni mejorado en la entidad; que por ser originado en otros países, han propiciado el ingreso y presencia del inóculo de enfermedades exógenas como la mancha foliar por *Phaeosphaeria maydis*, que si bien ya se había reportado en México, en Nayarit, por ejemplo, su presencia es relativamente reciente en condiciones temporales, durante el ciclo agrícola de Primavera-Verano; al igual que el tizón foliar por *Helminthosporium turcicum*, prevaleciente durante el ciclo agrícola de Otoño-Invierno. En el caso de Michoacán, la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis*), es también de introducción reciente.

Descripción

Región agroclimática. La región Pacífico Centro, en general se considera dentro de un clima de trópico seco, aunque en particular los climas que predominan en las diferentes zonas agroecológicas de la región van desde el subtropical árido semicálido, en el noreste del estado de Jalisco, hasta el Trópico subhúmedo muy cálido, en la región costera de los cuatro estados de la Región. De esta manera, las áreas de adaptación de los maíces formados y liberados por el INIFAP-CIRPAC, recaen en los ambientes tropicales (0 a 900 msnm). Subtropicales (900-1200) y de transición (> a 1400 msnm), los cuales se localizan en los cuatro estados que conforman su área de influencia: Jalisco, Michoacán, Nayarit y Colima.

Enfermedades que se han atendido. El maíz como cualquier otro cultivo agrícola, está expuesto a la presencia de organismos dañinos como lo son las enfermedades, plagas y maleza. Eso a consecuencia de condiciones agroclimáticas favorables para el establecimiento de dichos agentes dañinos. En lo que respecta a las enfermedades que inciden en el maíz, es importante identificarlas a través de su nombre común, sus agentes causantes y sobre todo su sintomatología. Las enfermedades que se han identificado que se presentan y afectan al maíz en la región Pacífico Centro se detallan en el Cuadro 1. Allí

Cuadro 1. Enfermedades del maíz y su prevalencia en orden de importancia por estado en la Región Pacífico Centro.

Nombre común	Nombre técnico	Orden de prevalencia por estado ^z							
		Nayarit		Jalisco		Michoacán		Colima	
		PV	OI	PV	OI	PV	OI	PV	OI
Mildiu Velloso	<i>Sclerophthora macrospora</i>		2		2		1		2
Tizón Foliar	<i>Helminthosporium maydis</i>	9		5					
Tizón Foliar	<i>H. turcicum</i>		1	2	1	2		2	1
Tizón Foliar	<i>H. carbonum</i>								
Roya	<i>Puccinia sorghi</i>	2	3	3	3	3	4	3	3
Mancha Foliar	<i>Phaeosphaeria maydis</i>	6							
Mancha Foliar	<i>Curvularia lunata</i>								
Mancha Foliar	<i>Cercospora zea-maydis</i>	1		1					
Mancha Foliar	<i>Kabatiella zea</i>	4							
Mancha Café	<i>Physoderma maydis</i>	5							
Mancha de Asfalto	<i>Phylachora maydis</i>					4			
Fusarium	<i>Fusarium moniliforme</i>	3	4	4	4	1	3	1	4
Falso carbón de la Espiga	<i>Ustilaginoidea virens</i>	8							
Carbón de la Espiga	<i>Sphacelotea reiliana</i>								
Carbón común	<i>Ustilago maydis</i>	7	5				2		
Complejo de Virosis	Varios		6		4				

^z**Comentario:** Si bien todas las enfermedades aquí descritas llegan a presentarse, el orden es de 1 mayor a menor incidencia.

se observa su prevalencia a través de los ciclos agrícolas Primavera – Verano (PV) donde predominan las siembras de temporal y de Otoño-Invierno (OI), primordialmente bajo condiciones de riego. En esta región al menos se presentan o se han identificado 16 diferentes tipos de enfermedades foliares y de tallo durante el desarrollo del cultivo del maíz en estas zonas productoras de los cuatro estados que conforman dicha región Pacífico Centro. El orden de prevalencia de mayor a menor incidencia (1> a 9<) se detallan también en el Cuadro 1; donde se aprecia una mayor presencia de enfermedades foliar como tizones y manchas foliares. Predomina también la presencia de pudrición de raíz, tallo y mazorca por presencia de *Fusarium moniliforme* y *F. graminearum*. Como es de todos conocido la presencia del patógeno va a estar en función de las condiciones climáticas favorables para su establecimiento, el cual es más rápido y notorio cuando se presenta como hospederos aquellos maíces con susceptibilidad a dichos patógenos. Por lo anterior, el programa de Mejoramiento Genético de Maíz del CIRPAC, ha prestado especial atención a seleccionar a la par del rendimiento de grano, dentro de su germoplasma base o parental y avanzado, aquellos genotipos que muestren tolerancia a los patógenos prevaletentes en las zonas maiceras de la región (Ramírez *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2019a; Ramírez *et al.*, 2010b).

Síntesis de la relevancia de cada una de las enfermedades que se han atendido

En este apartado se destacan las enfermedades identificadas como prevalentes en la Región Pacífico Centro, por ciclo agrícola y en cuales de ellas se les ha incorporado tolerancia genética al patógeno allí descrito. Dicha característica de tolerancia ha sido incorporada a través del proceso de mejoramiento genético convencional durante sus diversas etapas genotécnicas, donde se fueron seleccionando tanto para rendimiento de grano y tolerancia a enfermedades a través de sus líneas endogámicas y cruza simple progenitoras y al híbrido *per se* formado (Cuadro 2).

Cuadro 2. Enfermedades identificadas en la Región Pacífico Centro con y sin incorporación de tolerancia genética.

Enfermedades principales	Nombre técnico	Ciclo agrícola		Incorporación de tolerancia genética mediante el mejoramiento genético
		PV	OI	
Mildiu Velloso	<i>Sclerophthora macrospora</i>	X	X	SI
Tizón Foliar	<i>Helminthosporium maydis</i>	X		
Tizón Foliar	<i>Helminthosporium turcicum</i>		X	SI
Tizón Foliar	<i>Helminthosporium carbonum</i>	X		
Roya	<i>Puccinia sorghi</i>	X	X	SI
Mancha Foliar	<i>Phaeosphaeria maydis</i>	X		
Mancha Foliar	<i>Curvularia lunata</i>	X		
Mancha Foliar	<i>Cercospora zae-maydis</i>	X		
Mancha Foliar	<i>Kabatiella zae</i>	X		
Fusarium	<i>Fusarium moniliforme</i>	X	X	SI
Falso carbón de la Espiga	<i>Ustilagoidea virens</i>	X	X	
Carbón de la Espiga	<i>Sphaceloteca reiliana</i>		x	SI

Reseña del trabajo de fitomejoramiento relacionado a la sanidad de maíz

La capacidad de tolerancia conferida tanto a los híbridos como a sus progenitores ha sido adquirida mediante los procesos genotécnicos de formación y selección en condiciones primordiales de infestaciones naturales del agente etiológico presente en los viveros de mejoramiento. El proceso de selección ha estado encaminado hacia la obtención de dicha tolerancia hacia enfermedades que requieren o han requerido atención prioritaria en su momento, por

su mayor presencia y niveles de infestación, tal como se aprecia en el Cuadro 3. Cual fuese el caso del tipo de híbrido de maíz generado, es importante destacar que es notorio en todos estos maíces liberados, la presencia de una buena y consistente calidad de planta, mazorca y grano que llegan a reflejar la Fitosanidad que les confiere la tolerancia adquirida mediante el proceso de su formación y selección. De esta manera, el INIFAP en la Región Pacífico Centro ha formado y liberado 12 híbridos de maíz, 5 de endospermo blanco y 7 de endospermo amarillo en los últimos 25 años, mediante técnicas de mejoramiento genético convencional. Así, de acuerdo con su origen genético, se han generado, cinco cruza trilineales, cinco cruza simples, una cruza doble modificada y una cruza simple modificada (Ramírez *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2019a y Ramírez *et al.*, 2010b). A continuación, se describe para cada uno de ellos la tolerancia incorporada a los patógenos Mildiú veloso, tizón foliar por *Turcicum*, *Fusarium* y roya común (Cuadro 3).

Cuadro 3. Relación de Híbridos de Maíz de diverso origen genético y su tolerancia a enfermedades, liberados por el INIFAP en la Región Pacífico Centro de México.

Híbrido	Tipo de cruza	Descripción de su tolerancia
H-318	Trilineal	Tolerante a pudrición de raíz y tallo (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>Sclerophthora macrospora</i>) y tizón foliar (<i>Helminthosporium turcicum</i>)
H-375	Simple	Tolerante a pudriciones de raíz (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>Sclerophthora macrospora</i>), tizón foliar (<i>Helminthosporium turcicum</i>) y resistente a roya común (<i>Puccinia sorghi</i>)
H-377	Trilineal	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>Sclerophthora macrospora</i>) y tolerancia media a tizón foliar (<i>Helminthosporium turcicum</i>)
H-378 ^a	Simple	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo, (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>S. macrospora</i>), tizón foliar (<i>H. turcicum</i>) y medianamente tolerante a carbón de la espiga (<i>S. reiliana</i>)
H-380 ^a	Simple	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo, (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>S. macrospora</i>), tizón foliar (<i>H. turcicum</i>)
H-381A	Simple	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo, (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>S. macrospora</i>) y tizón foliar (<i>H. turcicum</i>)
H-382A	Simple	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo, (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>S. macrospora</i>) y tizón foliar (<i>H. turcicum</i>)
H-384A	Simple Modificada	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo, (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>S. macrospora</i>) y tizón foliar (<i>H. turcicum</i>)
H-385A	Doble Modificada	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo, (<i>Fusarium</i> spp.), tizón foliar (<i>H. turcicum</i>) y carbón de la espiga (<i>S. reiliana</i>)
H-386A	Trilineal	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo, (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>S. macrospora</i>) y tizón foliar (<i>H. turcicum</i>)
H-391	Trilineal	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo, (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>S. macrospora</i>), tizón foliar (<i>H. turcicum</i>)
H-392	Trilineal	Tolerante a pudriciones de raíz y tallo, (<i>Fusarium</i> spp.), mildiú veloso (<i>S. macrospora</i>) y tizón foliar (<i>H. turcicum</i>)

Perspectivas y retos

Las fuentes de tolerancia a las enfermedades detalladas en los apartados anteriores han sido en su mayoría incorporadas a los nuevos maíces a través del proceso genotécnico utilizado, bajo presión de selección de incidencia natural, no inoculada. La tolerancia inducida por el grupo de trabajo es un proceso continuo tanto en el material experimental como en el próximo a liberarse y el ya liberado. De esta manera, se están cubriendo las perspectivas de fitosanidad a mediano y largo plazo. La presencia de la tolerancia adquirida es manifiesta en los maíces del CIRPAC-INIFAP, una vez que dichos genotipos presentan mayor calidad de planta, mazorca y grano en comparación con maíces comerciales de otros orígenes. Además, el reto de su consistencia a través del tiempo es sostenida al menos en 10 años de uso continuo, sin que el efecto de la interacción genotipo x ambiente llegue a deteriorar en demasía sus características de tolerancia y calidad (Vidal *et al.*, 2006). De igual manera, el hecho de que en algunas enfermedades no se han desarrollado trabajos genotécnicos hacia la obtención de tolerancia; es debida a su baja prevalencia actual o bajo impacto económico. En el momento que alguna enfermedad (presente, nueva o introducida) se convierta endémica va a obligar a redoblar los esfuerzos de selección hacia la tolerancia por parte del Grupo de Trabajo de Maíz de la Región Pacífico Centro del INIFAP.

Grupo de trabajo

El grupo de trabajo que ha colaborado en la generación de estos híbridos ha estado conformado en estos últimos 25 años, por Investigadores en mejoramiento genético principalmente, producción y tecnología de semillas y otras disciplinas afines al cultivo de maíz. Si bien la mayoría de ellos han trabajado y trabajan actualmente en la región Pacífico Centro; también han colaborado investigadores del INIFAP de otros Centros Regionales del INIFAP como el CIRPAS, CIRNOC; CIRNE y CIANO; y de otras instituciones como el CIMMYT. Los 26 Investigadores que han conformado a través del tiempo y conforman actualmente el presente Grupo de Trabajo, son los siguientes: José Luis Ramírez Díaz, Margarito Chuela Bonaparte, Víctor Antonio Vidal Martínez, Humberto Leonel Vallejo Delgado, Rosalío Ramírez Zamora, Alfonso Peña Ramos, Alejandro Ortega Corona, Hugo Córdova Orellana, Aarón Morfín Valencia, Noel Orlando Gómez Montiel, Filiberto Caballero Hernández, Moisés Ramírez Márquez, Ma. Gricelda Vázquez Carrillo, José Ariel Ruiz Co-

rral, José Ron Parra, José de Jesús Sánchez González, Roberto Valdivia Bernal, Leonardo Soltero Díaz, Alejandro Ledesma Miramontes, Ivone Alemán de la Torre, Yolanda Salinas, Moreno, María Dolores Briones Reyes, César Augusto Reyes Méndez, Santiago Ruíz Ramírez, Luis Eduardo Arias Chávez y Edgardo Bautista Ramírez (Ramírez *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2019a; Ramírez *et al.*, 2010b; Vidal *et al.*, 2006).

LITERATURA CITADA

- Ramírez DJL, Alemán I de la T, Ledesma AM, Vidal VAM, Gómez NOM, Salinas YM, Peña AR, Briones DR, Ruiz SR, Arias LEC y Bautista ER. 2019a. H-391. Híbrido trilineal de grano blanco para la zona centro occidente de México. Folleto Técnico Núm. 3. Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jal. 29 p.
- Ramírez DJL, Peña AR, Alemán I de la T, Vidal VAM, Ledesma AM, Briones DR, Salinas YM, Gómez NOM, Reyes CAM, Ruiz SR, Arias LEC y Bautista ER. 2019b. H-392. Híbrido de maíz de grano blanco para regiones agrícolas del subtropical y transición de México. Folleto Técnico Núm. 4. Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jal. 31 p.
- Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP). 2022. Avances de Siembras y Cosechas de maíz grano. Resumen por estado. México. SIAP. Consultado el 22 de junio de 2022, en http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- Vidal MVA, Ramírez JLD, Peña AR, Chuela MB, Caballero FH y Morfín AV. 2006. Rendimiento de grano y estabilidad de maíces blancos comerciales y experimentales en el centro occidente de México. In. Memoria de Resúmenes. XXI Congreso Nacional y Primero Internacional de Fitogenética. Santacruz VA, Córdova LT y Molina JCM. (comps.). Sociedad Mexicana de Fitogenética. Tuxtla Gutiérrez, Chis. 34 p.
- Ramírez DJL, Alemán I de la T, Chuela MB, Vidal VAM, Ledesma AM, Vallejo HLD, Ramírez RZ, Gómez NOM, Ruiz SR, Peña AR, Reyes CAM, Salinas YM, Vázquez MGC, Ruiz JAC, Trujillo AC y Preciado REO. 2017. H-386A. Híbrido trilineal de maíz de grano amarillo para la zona subtropical de México. Folleto Técnico Núm. 5. Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jal. 36 p.
- Ramírez DJL, Chuela MB, Vidal VAM, Vallejo DHL, Ramírez ZR, Peña RA, Ortega CA, Córdova OH, Morfín VA, Gómez MNO, Caballero HF, Ramírez MM, Vázquez CMG, Ruíz CJA, Ron PJ, Sánchez GJJ, Soltero DL. 2010. H-377. Híbrido de maíz de grano blanco para riego y buen temporal para la zona Centro Occidente de México. Folleto Técnico Núm. 3. Campo Experimental Centro-Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jal. 32 p.

ANEXO

Material fotográfico de algunas enfermedades prevalentes
en la Región Pacifico Centro



Cercospora zeae maydis



Phaeosphaeria maydis



Ustilago maydis



Kabatiella zeae



Phyllachora maydis



Puccinia sorghi



3.3. Enfermedades del maíz en el área tropical del Sureste

Mauro Sierra Macías¹, Enrique Noe Becerra León¹, Noel Orlando Gómez Montiel², Sabel Barrón Freyre³, Alejandro Espinosa Calderón⁴. ¹Programa de maíz Campo experimental Cotaxtla, INIFAP, Km 34 Carr. Veracruz-Córdoba, La Esmeralda, Medellín de Bravo, Ver., CP 94270; ²Campo Experimental Iguala, INIFAP; ³Campo Experimental Huimanguillo, INIFAP; ⁴Campo Experimental Valle de México, INIFAP. *Autor para correspondencia: sierra.mauro@inifap.gob.mx; mauro_s55@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de maíz es el más importante por ser el alimento principal de la población, por su superficie sembrada y generar el 36% del valor de la producción agrícola. El uso principal es el consumo directo en sus diferentes formas en la alimentación humana. Durante 2022, fueron sembradas en México, 7.474 millones de hectáreas con maíz, de las cuales 6.904 millones fueron para grano, con un rendimiento medio de 3.90 t ha⁻¹ y una producción de 26.553 millones de toneladas, un consumo *per cápita* aparente de 338.10 kg y un consumo directo de 148 kg.; De la producción total, se utilizan para el consumo directo 19.35 millones de toneladas; de estas, el 33% es a través de la industria harinera y 67% a través de la industria de la masa y la tortilla en el proceso de nixtamalización; 570 mil hectáreas fueron sembradas para la producción de forraje con rendimiento medio de 30.31 t ha⁻¹ de forraje verde. Así también, durante 2022 se importaron 17.40 millones de toneladas de grano amarillo generalmente para la industria y en la alimentación de aves y cerdos (SIAP,2022).

En la región tropical del país se siembran 2.8 millones de hectáreas con maíz, de las cuales, un millón están comprendidas en provincias agronómicas de buena y muy buena productividad y 91 mil hectáreas son sembradas bajo condiciones de riego (Espinosa *et al.*, 2019); En esta superficie, es factible el uso de semilla mejorada de híbridos y variedades sintéticas con buen potencial de rendimiento bajo condiciones favorables de clima suelo y manejo por parte de los agricultores (Sierra *et al.*, 2019).

Las enfermedades más importantes en el cultivo del maíz para el área tropical en sureste de México son el “Achaparramiento” causada por un *Micoplasma* y un *Spiroplasma* cuyo vector es la chicharrita *Daldulus maydis*. El complejo “Mancha de Asfalto” asociado a los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, el Tizón foliar causado por hongo *Helminthosporium turcicum* y las pudriciones de mazorca causadas por *Diplodia maydis* y *Fusarium moniliforme*. La enfermedad del “Achaparramiento” es causada por un *Micoplasma* y un *Spiroplasma*, cuyo vector es la chicharrita *Daldulus maydis*; Esta enfermedad, es frecuente en siembras tardías y donde se siembran en fechas escalonadas maíz para la producción de elote: La enfermedad del “Achaparramiento” es una de las más importantes que ha causado pérdidas en varios países de América entre ellos: Estados Unidos, México, Centroamérica y el Caribe, Perú y Argentina (Nault 1980, Bradfute *et al.*, 1981, Henríquez y Jeffers, 1997; Gordon *et al.*, 1997; Urbina, 1997; Giménez *et al.*, 2002) y ha sido un factor limitante en zonas tropicales y subtropicales.

El complejo de la “Mancha de Asfalto” (CMA), asociado a los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, es una enfermedad que desde principios de la década de los 90's se ha convertido en el principal factor limitante en la producción de maíz en algunas zonas del trópico húmedo, subhúmedo y zonas de transición en diversas regiones de México y Centroamérica (Hock *et al.*, 1989). La incidencia del CMA provoca severas pérdidas en rendimiento, deteriora la calidad del forraje y tiene el potencial de destruir algunas parcelas en su totalidad (Pereyda *et al.*, 2009). En México la enfermedad se considera potencialmente importante en unas 800 mil hectáreas distribuidas en los Estados de Jalisco, Nayarit, Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero (Gómez *et al.*, 2013).

Tizón foliar causado por el hongo *Helminthosporium turcicum*, es presente en condiciones tropicales y subtropicales y requiere de bajas temperaturas y alta humedad relativa, similar a los requerimientos en el complejo mancha de Asfalto, estas condiciones son particularmente frecuentes en el sureste de México en siembras tempranas en el ciclo otoño invierno bajo condiciones de tonalmil, la cual se logra con la humedad residual del temporal y las lluvias ocasionales provocadas por los vientos “nortes”,

La pudrición de mazorca es la enfermedad más común en todo el mundo en climas cálidos húmedos y secos (De León 1984). Las enfermedades que ata-

can el grano y la mazorca pueden reducir considerablemente el rendimiento, la calidad, y el valor alimenticio (Jugenheimer, 1981). En México se reporta en los principales estados productores de este cereal (Cepeda y Orozco, 1989). En el trópico húmedo de México, este problema es frecuente en áreas que presentan mayor humedad relativa y nubosidad (Betanzos, 2001). Las condiciones que favorecen la infección de hongos patógenos en la mazorca son un ambiente seco al inicio de la estación, seguido de humedad antes y después de la salida de los estigmas (Ireta, 1988). Los agentes causales que atacan mayormente al grano y la mazorca pertenecen a los géneros: *Giberella* en climas templados, *Fusarium* en templado, subtropical, y tierras altas del tropical; *Diplodia* en las subtropicales y *Botrydiploia* durante el verano en clima tropical. Malaguti (2000), por su parte mencionan que las pudriciones ocurren cuando hay períodos muy húmedos durante la formación de los granos y sugiere que los hongos más frecuentes son: *Fusarium moniliforme*, *Diplodia maydis*, *Nigrospora orizae*, *Cladosporium herbarum* y varias especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Rhizopus*.

En el mejoramiento genético de maíz para el trópico, se ha identificado germoplasma derivado de la raza Tuxpeño, con tolerancia a las principales enfermedades; Así, en el norte del estado de Veracruz durante el ciclo otoño invierno, bajo presión natural de “Mancha de asfalto” causada por el hongo *Phyllachora maydis* y del tizón foliar causado por el hongo *Helminthosporium turcicum* fue identificado el híbrido H-513, cuya genealogía corresponde a la cruza simple LT154xLT155, definida como tolerante a la mancha de Asfalto y Tizón foliar; Particularmente, esta cruza simple, es el progenitor hembra de los híbridos H-520, H-518 liberados en Cotaxtla, Ver y H-562 liberado en Iguala Guerrero para la región Costera del Pacífico; Así también, H-565, H-563, tolerante a mancha de asfalto y cuya genealogía es (CML-311-5-1-3-1 x CML-269-1-2-1-3-1)xLT154 (Gómez *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2013). Por lo que se refiere a la tolerancia al “Achaparramiento”, los híbridos H-513, H-520, H-518, (CML264xCML150)CML491, H-564C presentaron menor incidencia y menor severidad de daño por “Achaparramiento” en planta y en mazorca (Sierra *et al.*, 2010; Sierra *et al.*, 2007); Finalmente, los híbridos H-513, H-520, H-518, H-371C, CML146xCML142, CML176xCML144, CL-Q6203xCML150, CLQ6601xCML172, presentaron buena cobertura de la mazorca, buen aspecto y sanidad de planta y de mazorca y con menor daño de pudrición de mazorca (Sierra *et al.*, 2004). Los objetivos del presente trabajo fueron: a) Realizar un diagnóstico sobre las enfermedades del cultivo de maíz

más importantes en el área tropical y subtropical en el sureste de México, b) Compendiar trabajos sobre tolerancia a las principales enfermedades de maíz y c) Identificar germoplasma con tolerancia a las principales enfermedades del maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y área de influencia. Los trabajos de investigación para tolerancia al achaparramiento y tolerancia a la pudrición de mazorca se realizaron en el Campo Experimental Cotaxtla, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y las localidades Tlalixcoyan, Ignacio de la Llave, San Andrés Tuxtla, Papantla, Isla en Veracruz y Huimanguillo, Tabasco comprendidas dentro del área de influencia en el Trópico Húmedo de México, que engloba al grupo climático A (Aw, Am y Af), según García (2004). El campo se ubica a los 18° 50' latitud norte y 96° 10' longitud oeste, a 15 msnm, con temperatura media anual de 25 °C y precipitación anual de 1400 mm distribuidos de junio a octubre. Su suelo es de origen aluvial, profundo, con textura media en todo el perfil, buen drenaje, pH ligeramente ácido (6.6) y pendiente menor de 1 %.

Germoplasma. El germoplasma utilizado en la investigación pertenece a la raza tuxpeño, integrado con variedades y sintéticos de polinización libre, híbridos y líneas progenitoras de híbridos, tanto liberados como en fase experimental, para el Trópico Húmedo de México.

Variables y registro de datos. Durante el desarrollo del cultivo se registraron las variables agronómicas: Rendimiento de grano y características agronómicas, de manera adicional para la identificación de germoplasma tolerante se registraron las variables: porcentaje de plantas con daño de achaparramiento, severidad del daño por achaparramiento con escala de 1 a 9 donde, 1 es el menor daño y 9 representa el daño mayor, tomando en cuenta coloración amarillo-rojizo de las hojas en los tercios de la planta, reducción de la altura y proliferación de mazorcas, porcentaje de mazorcas con daño de achaparramiento (mazorcas pequeñas, chupadas y sin grano), altura de planta y de mazorca, días a floración masculina y femenina, aspecto y sanidad de planta y de mazorca con escala de 1 a 5 donde, 1 es lo mejor y 5 es lo peor; En la identificación de genotipos para tolerancia a la pudrición de mazorca se registraron

además las variables aspecto y sanidad de planta y de mazorca, % de plantas acamadas, % de mazorcas con mala cobertura, % de mazorcas podridas y rendimiento de grano.

Procedimiento. Para la identificación de germoplasma con tolerancia a las principales enfermedades de maíz para el trópico, se consideró el ambiente natural con la presencia del Agente causal; Así, para el Achaparramiento la evaluación fue en las localidades de Tlalixcoyan e Ignacio de la Llave, en la región central de Veracruz, región elotera, donde comercialmente existen fechas de siembra escalonadas y donde la incidencia del “Achaparramiento” y del vector en forma natural estuvieron presentes; Para pudriciones de mazorca causadas por *Diplodia maydis* y *Fusarium moniliforme*, fue la localidad de San Andrés Tuxtla el sitio principal de evaluación, donde es frecuente e importante los daños de pudriciones durante el ciclo primavera verano y bajo condiciones de temporal; En lo que se refiere al complejo de la mancha de asfalto, esta se realizó durante el ciclo otoño invierno en los estados de Veracruz y Guerrero, donde en forma natural esta enfermedad estuvo presente. Esta información fue documentada en su momento y en esta ocasión se compendia en esta contribución: Además, de manera continua, en cada ciclo de siembra en experimentos de líneas, de cruces o variedades de polinización libre se registran las variables de aspecto y sanidad de planta y de mazorca, que hace referencia a la expresión total y a la sanidad en planta y mazorca con una escala de calificación de 1 a 5, donde 1 corresponde a la mejor expresión fenotípica y 5 para lo peor.

Métodos estadísticos. Se hicieron análisis de varianza individuales para las variables en estudio y análisis combinado para rendimiento, porcentaje de plantas y severidad por achaparramiento en planta y porcentaje de daño por achaparramiento en mazorca (Reyes, 1990). Los datos registrados en porcentaje fueron transformados a grados angulares (bliss), para proceder al análisis de varianza. Se hicieron correlaciones fenotípicas entre las variables: rendimiento con porcentaje de daño por achaparramiento en planta y mazorca, severidad, porcentaje de daño en planta con porcentaje de daño en mazorca, y esta última con aspecto y sanidad de mazorca. Para conocer el comportamiento de los genotipos a través de los tres ambientes de evaluación, para la variable rendimiento de grano se aplicó el modelo de parámetros de estabilidad propuestos por Eberhart y Russell (1966).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Achaparramiento”

En México se han reportado daños en la península de Yucatán y en la región costera del Golfo se han registrado daños mayores al 25 % en siembras comerciales en Veracruz (Sierra *et al.*, 2004). Esta enfermedad es provocada al interactuar sobre la planta tres patógenos: el Virus del rayado fino del maíz MRFV el espiroplasma del maíz CSS *Spiroplasma kunkelii* y el *Phytoplasma* del Enanismo arbustivo del maíz MBSM. (Bradfute *et al.*, 1981). En México MBSM es más prevalente que el CSS en altas elevaciones de 2000 metros, mientras que en medias o bajas elevaciones menores de 2000 metros es lo contrario. Ambos patógenos son transmitidos por chicharritas de los géneros *Dalbulus* y *Baldulus*, *D. maidis* (Madden y Nault, 1983).

Al evaluarse 10 híbridos con y sin infestación de *D. maidis* en Cotaxtla, Veracruz, se determinó que el híbrido H-371C rindió 4.66 ton ha⁻¹, y el híbrido H-513 registró un rendimiento de 2.27 t ha⁻¹, la tolerancia se debió principalmente a que los genotipos registraron menor porcentaje de plantas y mazorcas con sintomatología del complejo del achaparramiento (Sierra *et al.*, 2004). El INIFAP ha generado los híbridos H-518 y H-520 los cuales son híbridos trilineales que usan como progenitor hembra el híbrido H-513 y particularmente, el H-520 ha registrado tolerancia a la enfermedad del achaparramiento. (Sierra *et al.*, 2004)

Rendimiento de grano

Con relación al rendimiento de grano de híbridos y variedades de maíz (Cuadro 1), se encontró que el híbrido trilineal H-520 registró el rendimiento medio por localidad y a través de localidades más alto (6.98 t ha⁻¹) a través de las tres localidades. Cotaxtla registró el rendimiento medio más alto (7.46 t ha⁻¹), mientras que Tlalixcoyan e Ignacio de la Llave tuvieron los rendimientos más bajos (3.81 y 3.32 t ha⁻¹), lo cual significa una pérdida de 51 y 44 %, para cada localidad respectivamente, debido a la presencia de la enfermedad del “achaparramiento”. Lo anterior sugiere la importancia de obtener genotipos con alto potencial de rendimiento y tolerantes a esta enfermedad (Cano *et al.* 2000; Sierra *et al.* 2004; Henriquez y Jeffers, 1997; De León, 1984 y Gordon *et al.* 1997).

Cuadro 1. Rendimiento de grano en híbridos y variedades de maíz. Veracruz 2005B.

Genealogía	Cotaxtla	Tlalixcoyan	Ignacio de la Llave	Promedio	Bi	S ² di	T C	Descripción
H-520	9.81*	5.81*	5.26*	6.98**	1.10	-0.35	37.38*	BAC
H-513	7.54	5.48*	5.04*	6.02	0.59	-0.34	-12.17	E
H-518	8.79*	4.38**	3.92*	5.70	1.19	-0.34	7.00	E
C-343	9.36*	4.49**	2.41	5.42	1.55	0.54	1.87	E
H-519C	7.98**	2.43	3.51**	4.64	1.24	1.09	0.65	BAI
SINT 3	6.48	3.73	3.39**	4.53	0.75	-0.35	-43.45	DAC
VS-536	6.21	3.32	3.27	4.27	0.74	-0.30	-3.74	E
A-7573	7.95**	3.25	1.26	4.15	1.49	0.45	1.76	E
V-537C	5.87	2.80	2.98	3.88	0.75	-0.20	-2.04	E
V-556AC	4.62	2.40	2.16	3.06	0.60	-0.35	-34.06	DAC
Promedio	7.46	3.81	3.32	4.86	---	---	---	---
CV (%)	8.26	12.86	19.52	12.67	---	---	---	---
CME	0.38	0.24	0.42	0.35	---	---	---	---

* Significancia de los tratamientos al 0.05 de probabilidad; CV = % Coeficiente de variación

** Significancia de los tratamientos al 0.01 de probabilidad; CME = Cuadrado medio del error, Sig. F = Significancia de F; BAC = Respuesta mejor en buenos ambientes y consistente; E= Estable; BAI = Buena respuesta en buenos ambientes, pero inconsistente; DAC = Respuesta mejor en ambientes desfavorables y consistente.

Daño por “achaparramiento”

Los síntomas principales observados fueron la coloración rojiza y la proliferación de jilotes que corresponden al patógeno *Phytoplasma* del enanismo arbustivo del maíz (MBSM); en menor proporción se presentaron síntomas de bandas blancas y amarillas que corresponde a la presencia del patógeno *Spiroplasma* del maíz (CSS); De León, 1984; Bradfute *et al.* 1981; Giménez *et al.* 2002 y Henríquez y Jeffers, 1997 (Figura 1).

Sierra *et al.* (2010), reportan información sobre el daño de achaparramiento tanto en planta como en mazorca. El porcentaje de daño por achaparramiento en plantas de maíz en las localidades de La Torrecilla, Municipio de Tlalixcoyan, Ignacio de la Llave y Cotaxtla, Ver., registró un porcentaje de daño promedio de 21.44, 47.45 y 6.57 % en cada localidad respectivamente. Los genotipos que registraron el menor daño por esta enfermedad al nivel de significancia del 0.01 de probabilidad fueron: los híbridos H-520, H-513, H-518 y C-343 con 14.57, 16.91, 17.74 y 21.97 % para cada genotipo respectivamente (Cuadro 2).



Figura 1. Sintomatología de la enfermedad del Achaparramiento en maíz

Cuadro 2. Porcentaje de daño y severidad por achaparramiento en planta y mazorca de maíz en tres ambientes del estado de Veracruz 2005B.

Genotipo	Torrecilla			Ignacio de la Llave			Cotaxtla			Promedio		
	PPA	S	PDM	PPA	S	PDM	PPA	S	PDM	PPA	S	PDM
H-520	7.86*	3.5*	22.17*	32.49*	2.5*	24.99*	3.35*	1.5*	1.35	14.57*	2.5*	16.18*
H-513	11.77*	4*	36.94*	34.69*	3*	10.94*	4.28*	1.5*	6.10	16.91*	2.83*	17.99*
H-518	15.22*	5	40.36*	34.19*	3.5	25.62*	3.82*	3.5	8.72	17.74*	4	24.90**
C-343	15.46*	3*	64.27	47.27*	6.5	44.47	3.19*	2*	6.27	21.97**	3.8**	38.34
SINT 3	18.75**	5	52.38	46.78*	5*	24.96*	6.18*	3**	9.50	23.90	4.33	28.95
VS536	24.26	7	59.66	45.96*	5*	25.73*	6.37*	4	5.60	25.53	5.33	30.33
H519C	28.15	7	65.26	58.33	6**	38.30	4.69*	2.5*	12.96	30.39	5.17	38.83
A-7573	25.57	4*	99.10	58.04	6.5	92.80	15.07	4	11.57	32.89	4.83	67.83
V537C	35.88	7	64.43	57.06	7.5	24.80*	6.14*	4	5.28	33.03	6.17	31.50
V556AC	31.53	6.5	45.88**	59.75	8.5	34.32	12.61	3.5	5.15	34.63	6.17	28.45
Prom	21.44	5.20	55.05	47.45	5.4	34.69	6.57	2.95	7.25	25.16	4.52	32.33
CV (%)	8.57	15.7	8.35	8.28	21.2	19.13	18.25	17.61	16.83	10.19	19.15	15.59

* Significancia de los tratamientos al 0.05 de probabilidad; ** Significancia de los tratamientos al 0.01 de probabilidad; PPA = Porcentaje de plantas con achaparramiento; S = Severidad; PDM = Porcentaje de daño en mazorca; CV = % Coeficiente de variación; Prom. = Promedio.

Con relación a la severidad de daño por “achaparramiento” en planta, se encontró que Tlalixcoyan e Ignacio de la Llave presentaron la mayor severidad de daño promedio con valores de 5.2 y 5.4 mientras que la localidad de Cotaxtla presentó la menor severidad (2.95). Los genotipos en los que el daño fue menos severo fueron: H-520, H-513 y C-343 con valores promedio fueron 2.5, 2.83 y 3.83. El daño por “achaparramiento” en mazorca, registraron promedios de 55.05 % en Tlalixcoyan, 34.69 % en Ignacio de la Llave y 7.25 % en Cotaxtla, con un promedio general de 32.38 %. Los genotipos con mayor tolerancia al “achaparramiento”, fueron H-520, H-513, H-518 y C343, De estos genotipos, H-520 y H-518 usan como progenitor hembra al híbrido de cruce simple H-513 tolerante a la enfermedad (Jeffers *et al.*, 2004; Sierra *et al.*, 2004).

Por lo que se refiere a localidades Cotaxtla registró un rendimiento de grano promedio de 7.46 t ha⁻¹; en la variable porcentaje de daño en planta por achaparramiento, en Ignacio de la Llave se registró el valor promedio más alto 47.45 %, seguido de La Torrecilla, Municipio de Tlalixcoyan con 21.44 % y el valor más bajo fue para Cotaxtla 6.57 %; Así también, en la variable severidad fueron las localidades de Ignacio de la Llave y La Torrecilla, Ver., los que tuvieron los valores más altos de 5.4 y 5.2 para cada localidad respectivamente. Tlalixcoyan e Ignacio de la Llave son áreas donde la siembra de maíz para la producción de elote es importante y la siembra en fechas escalonadas no permite romper con el ciclo del vector, la chicharrita *D. maydis*.

Correlaciones fenotípicas

De los trabajos reportados por Sierra *et al.*, 2010, se encontró correlación negativa y altamente significativa entre rendimiento de grano con porcentaje de achaparramiento en planta (-0.78**), severidad del daño en planta (-0.81**) y con porcentaje de achaparramiento en mazorca (-0.71**), lo que nos indica que entre mayor es el daño por achaparramiento en planta y mazorca y severidad, el rendimiento de grano es menor. La variable porcentaje de achaparramiento en planta registró correlación positiva y altamente significativa con severidad del daño (0.77**), con el porcentaje de mazorcas con achaparramiento (0.44*) y con sanidad de planta (0.81**). Finalmente, se encontró correlación positiva y altamente significativa entre porcentaje de mazorcas con achaparramiento y las variables aspecto de mazorca (0.84**) y sanidad de mazorca (0.81**), estos valores sugieren que la enfermedad del achaparramiento afecta el rendimiento de grano y la calidad de mazorca y de grano (Gordon, *et al.* 1997).

Pudrición de mazorca

La pudrición de mazorca es la enfermedad más común en todo el mundo en climas cálidos húmedos y secos, (De León 1984). Las enfermedades que atacan el grano y la mazorca pueden reducir considerablemente el rendimiento, la calidad, y el valor alimenticio, (Jugenheimer, 1981). En México se reporta en los principales estados productores de este cereal (Cepeda y Orozco, 1989). En el trópico húmedo de México, este problema es frecuente en áreas que presentan mayor humedad relativa y nubosidad (Betanzos, 2001). Las condiciones que favorecen la infección de hongos patógenos en la mazorca son un ambiente seco al inicio de la estación, seguido de humedad antes y después de la salida de los estigmas (Ireta, 1988). Los agentes causales que atacan mayormente al grano y la mazorca pertenecen a los géneros: *Giberella* en climas templados, *Fusarium* en templado, subtropical, y tierras altas del tropical; *Diplodia* en las subtropicales y *Botrydiploia* durante el verano en clima tropical. Malaguti, (2000), por su parte mencionan que las pudriciones ocurren cuando hay períodos muy húmedos durante la formación de los granos y sugiere que los hongos más frecuentes son: *Fusarium moniliforme*, *Diplodia maydis*, *Nigrospora orizae*, *Cladosporium herbarum* y varias especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Rhizopus*. *Diplodia maydis* es muy importante en la mayoría de las áreas donde el maíz se cultiva extensivamente. El hongo es la causa de una considerable cantidad de manchas de las hojas, rompimientos del tallo, mazorcas caídas, calidad pobre del grano y bajos rendimientos (Jugenheimer, 1981). Estos patógenos se encuentran generalmente en lugares templados y cálidos con abundante humedad (Jugenheimer, 1981). La pudrición se inicia en la base de la mazorca y se extiende a todos los granos conforme avanza hacia la punta (Figura 2). Los síntomas iniciales en la mazorca comprenden una tonalidad verde grisáceo de las espigas, las que se marchitan y secan; la infección temprana ocasiona la pudrición completa de la mazorca, se arruga y presenta un color pardo grisáceo o amarillento, con un desarrollo algodonoso entre los granos (Jugenheimer, 1981).

La pudrición de la mazorca es más común en épocas con periodos de polinización secos, seguidos por tiempo húmedo y las mazorcas son más susceptibles a la infección, dos a tres semanas después de la floración femenina (Jugenheimer, 1981). Sierra *et al.* (2004), de una evaluación de híbridos de maíz por su tolerancia a la pudrición de mazorca se encontró un grupo de 11 sobresalientes para rendimiento de grano (Cuadro 3) y 9 sobresalientes



Figura 2. Pudrición de mazorca causada por los hongos en maíz *Diplodia maydis*, *Fusarium moniliforme* y en menor proporción *Nigrospora orizae*

Cuadro 3. Rendimiento de grano t ha⁻¹ y parámetros de estabilidad de híbridos de maíz con alta calidad de proteína a través de ambientes CIRGOC 2001B y 2002B.

Trat	Genealogía	PROM	% Relativo	Bi	S ² Di	Tcalc	Descripción
60	REMACO38	7.12*	112	1.34	-0.31	1.96	E
33	CLQ6203XCML150	7.10*	112	1.30	-0.27	1.60	E
36	CML146XCML142	7.08*	111	1.51	0.45	1.50	E
59	REMACO37	6.93*	109	1.16	-0.25	0.81	E
58	H-520	6.87*	108	1.66	-0.13	2.93*	BAC
39	CML176XCML142	6.87*	108	1.25	-0.04	1.02	E
53	H-553 C	6.79*	107	1.15	-0.44	1.16	E
43	H-363 C	6.75*	106	1.12	0.38	0.36	E
1	(CML141XCML144)XCML142	6.73*	106	1.14	0.66	0.36	E
40	CML176XCML144	6.67*	105	0.97	0.47	-0.08	E
55	H-559 C	6.64*	104	0.92	-0.22	-0.40	E
10	(CML144XCML159)XCML186	6.54**	103	1.30	0.10	1.09	E
62	PANTERA	6.53**	103	1.15	0.43	0.43	E
12	(CML149XCML186)XCML142	6.53**	103	1.15	-0.38	1.00	E
34	CLQ6601XCML172	6.51**	102	1.28	-0.39	1.85	E
15	(CML149XCML186)XCML176	6.49**	102	0.78	-0.32	-1.26	E
30	(CML186XCML142)XCML176	6.44**	101	0.80	-0.08	-0.83	E
26	(CML177XCML186)XCML142	6.41**	101	0.63	-0.30	-2.05	E
17	(CML158XCML144)XCML176	6.40**	101	0.75	-0.33	-1.51	E
31	(CML186XCML146)XCML142	6.36	100	1.10	0.45	0.29	E
63	H-513	6.36	100	1.05	-0.50	0.53	E
19	(CML173XCML142)XCML186	6.33	100	1.52	-0.00	2.03	BAI
11	(CML146XCML142)XCML159	6.25	98	0.89	0.09	-0.38	E
50	H-519 C	6.06	95	0.95	-0.37	-0.34	E
56	H-516	5.80	91	0.90	-0.50	-1.07	E
	PROMEDIO	6.15					
	CV	12.38					
	FSIG	1					
	DMS0.05	0.56					
	DMS0.01	0.74					

E= Estable; BAC= Responde mejor en buenos ambientes. Consistente; BAI= Buena respuesta en todos los ambientes, pero Inconsistente.

para porcentaje de mazorcas podridas al 0.05 de probabilidad (Reyes, 1990) (Cuadro 4), de los cuales H-520 y H-518 son híbridos trilineales normales y 7 son híbridos con alta calidad proteínica, tales son: CLQ6203 x CML150, CLQ6601 x CML172, H-371C, CML176 x CML144, H-554C, CML146 x CML142, y H-551C. (Vasal 1994; Larkins *et al.*, 1994).

En relación con el porcentaje de mazorcas podridas, San Andrés Tuxtla, registró el mayor porcentaje de daño promedio (29.88%). Lo anterior debido

Cuadro 4. Porcentaje de mazorcas podridas en híbridos de maíz con alta calidad de proteína. CIRGOC 2001B y 2002B^{1/}

Trat	Genealogía	Cot 01	Papan 01	Huim 01	Huim 02	Cot 02	Sat 02	Prom
33	CLQ6203XCML150	3.4	1.19	0	0	0	12.16	2.79*
34	CLQ6601XCML172	0.3	1.13	0	0	0	16.24	2.95*
57	H-518	4.3	2.5	1.32	0	0.13	14.68	3.82*
47	H-371 C	3.2	2.7	0	0.98	1.33	19.23	4.57*
58	H-520	3	5	0	0	1.23	19.22	4.74*
40	CML176XCML144	1.4	1.09	0	0	1.89	26.19	5.10*
54	H-554 C	1.6	5.74	1.35	0	1.04	21.42	5.19*
36	CML146XCML142	3.9	8.29	0	0	1.53	17.77	5.25*
51	H-551 C	1.7	3.31	0	0	4.08	22.43	5.25*
60	REMACO38	1.3	4.85	0	0	0	25.92	5.35**
63	H-513	1.3	5.13	3.77	0	0.14	22.81	5.53**
59	REMACO37	2.9	7.63	0	0	0.46	24.63	5.94**
1	(CML141XCML144)XCML142	6.2	0	0	0	0.13	29.38	5.95**
39	CML176XCML142	4.7	5.99	0	0	1.26	24.42	6.06**
52	H-552 C	0.8	7.14	0	0	0.72	29.77	6.41**
31	(CML186XCML146)XCML142	5.9	5.53	0	0	1.86	26.08	6.56**
4	(CML142XCML149)XCML176	8.4	2.13	0	0.89	1.91	26.69	6.67**
43	H-363 C	2.5	11.01	0	0	2.86	25.59	6.99**
48	H-441 C	5.4	2.28	1.85	0	4.25	30.17	7.33**
11	(CML146XCML142)XCML159	7.6	7.32	1.19	0	4	24.54	7.44**
50	H-519 C	3.1	2.09	2.28	0	2.28	35.21	7.49**
26	(CML177XCML186)XCML142	5.6	2.22	1.16	0	1.78	34.35	7.52**
8	(CML142XCML186)XCML144	3.3	11.25	2.33	1	1.37	26.36	7.60**
55	H-559 C	3.3	5.77	1.04	1.75	1.95	32.71	7.75
64	H-558C	7.8	18.75	1.28	0	3.28	15.89	7.83
53	H-553 C	3.9	11.74	0	3.69	4.59	24.51	8.07
41	CML176XCML159	5.6	4.84	0	0	0.15	38.82	8.24
56	H-516	8.7	9.52	4.89	0	0.94	28.8	8.81
19	(CML173XCML142)XCML186	14.1	25.38	1.09	0.94	6.16	34.47	13.69
25	(CML177XCML149)XCML186	14.4	13.41	3.41	2.12	0.92	50.28	14.09
	PROMEDIO	7.65	8.57	2.08	0.57	2.31	29.88	8.51
	LSD	8.8	0	0	0	0	15.57	1.46
	CV (%)	57.3	32.08	46.17	32.94	42.22	25.94	27.97
	FSIG	1	0	0	0	0	5	1

1/ = Ciclo primavera - verano; * = Significancia de los tratamientos al 0.05 de probabilidad; ** = Significancia de los tratamientos al 0.01 de probabilidad; COT= Cotaxtla, PAPAN= Papantla, HUIM = Huimanguillo, SAT= San Andrés Tuxtla, Veracruz

a que dicha localidad presenta condiciones climáticas que favorecen la presencia de los hongos *Fusarium moniliforme* y *Diplodia maydis*, agentes causales de la pudrición de mazorca, como son: alta humedad relativa y alta nubosidad durante la floración y el periodo de llenado de grano (Betanzos, 2001; Jugenheimer, 1981) (Cuadro 4). Los agentes causales de la pudrición de mazorca en la localidad de San Andrés Tuxtla, Ver. fueron *Fusarium moniliforme*, *Diplodia maydis* y en menor proporción *Nigrospora orizae*.

Complejo “Mancha de Asfalto”

El denominado complejo de la mancha de asfalto (CMA), asociado a los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, es una enfermedad que desde principios de la década de los 90's se ha convertido en el principal factor limitante en la producción de maíz (*Zea mays*) en algunas zonas del trópico húmedo, subhúmedo y zonas de transición (Hock *et al.*, 1989) en diversas regiones de México y Centroamérica (Figura 3). La incidencia del CMA provoca severas pérdidas en rendimiento, deteriora la calidad del forraje (Pereyda *et al.*, 2009) y tiene el potencial de destruir algunas parcelas en su totalidad. En México la enfermedad se considera potencialmente importante en unas 800 mil hectáreas distribuidas en los Estados de Jalisco, Nayarit, Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero (Gómez *et al.*, 2013).

En el trópico y subtrópico de México se siembran un poco más de 4.0 millones de hectáreas de maíz (Gómez *et al.*, 2013). En estas áreas, la enfermedad foliar “Mancha de asfalto” afecta más de 500 mil hectáreas en los Estados



Figura 3. Síntomas de “Mancha de Asfalto” en planta de maíz causada por *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*.

de Nayarit, Jalisco, Guerrero, Chiapas y Veracruz. El complejo mancha de asfalto (CMA) del maíz (*Zea mays*), inducido por los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, es una enfermedad de importancia económica. El mejoramiento genético de la resistencia del hospedante a través de la generación de genotipos resistentes representa la medida de control más eficiente para la enfermedad (Hernandez *et al.*, 2015; Hock *et al.*, 1989). La Mancha de asfalto *Phyllachora maydis* y *Helminthosporium turcicum* prosperan preferentemente bajo condiciones alta humedad relativa y bajas temperaturas, condición que en el sureste de México es frecuente en las siembras del ciclo otoño invierno bajo condiciones de tonalmil, siembras que se logran con la humedad residual del temporal y las lluvias ocasionales provocadas por los vientos “nortes” (Figura 4)



Figura 4. Síntomas del tizón foliar causado por *Helminthosporium turcicum*

En el norte del estado de Veracruz durante el ciclo otoño invierno, bajo presión natural de “Mancha de asfalto” causada por el hongo *Phyllachora maydis* y del tizón foliar causado por el hongo *Helminthosporium turcicum* fue identificado el híbrido H-513, cuya genealogía corresponde a la cruce simple LT154xLT155, definida como tolerante a la mancha de Asfalto y Tizón foliar; Particularmente, esta cruce simple, es el progenitor hembra de los híbridos H-520, H-518 liberados en Cotaxtla, Ver y H-562 liberado en Iguala Guerrero para la región Costera del Pacífico; Así también, H-563, tolerante a mancha de asfalto y cuya genealogía es 4 (CML-311-5-1-3-1 x CML-269-1-2-1-3-1)xLT154

El mejoramiento genético de la resistencia del hospedante a través de la generación de genotipos resistentes representa la medida de control más efi-

ciente para la enfermedad. La selección recurrente podría ser el método de mejoramiento más útil para acumular e incrementar los niveles de resistencia a la enfermedad en poblaciones sintéticas o compuestas (Hernández *et al.*, 2015).

Retos en el mejoramiento genético

Identificación de fuentes de resistencia a través de la evaluación de germoplasma por su tolerancia a las enfermedades Achaparramiento, Complejo Mancha de Asfalto y pudriciones de mazorca y aprovechamiento del germoplasma mejorado y nativo de la raza Tuxpeño y otras razas para la obtención de híbridos y variedades de maíz con buen rendimiento y características agronómicas favorables y con tolerancia a factores adversos bióticos y abióticos, adaptados a la región tropical en el sureste de México.

CONCLUSIONES

Los genotipos que registraron el mayor rendimiento y menor porcentaje de daño y severidad por “Achaparramiento”, en planta y mazorca fueron: H-520, H-513, H-518 y C-343.

Las localidades que registraron mayor porcentaje de daño y severidad por “achaparramiento” en planta y mazorca fueron: Ignacio de la Llave, y La Torrecilla, Municipio de Tlalixcoyan, Ver., considerándose ambientes aptos para seleccionar genotipos tolerantes a esta enfermedad. Se ha identificado germoplasma de maíz con buen rendimiento y características agronómicas y con tolerancia al complejo “Mancha de asfalto”

Los híbridos con alta calidad de proteína CLQ6203 x CML150, CML146 x CML142, CML176 x CML142, H-553C, H-363, (CML141 x CML144) x CML142, CML176 x CML144, registraron alto rendimiento de grano y los más bajos porcentajes de pudrición de mazorca. En la localidad de San Andrés Tuxtla se tuvo el porcentaje de pudrición de mazorca promedio más alto (29.88 %), y se considera un ambiente que por sus condiciones climáticas permite seleccionar genotipos tolerantes a pudriciones de mazorca.

LITERATURA CITADA

- Betanzos ME. 2001. Variedades de maíz resistentes, una opción para reducir la pudrición de mazorca en Chiapas México. *Agric. Tec. Méx.* 27 (1): 57-67
- Bradfute OE, Tsai JH and Gordon DT. 1981. Corn stunt spiroplasma and viruses associated with a maize disease epidemic in southern Florida. *Plant Disease* 65: 837-841.
- Cepeda M y Orozco G. 1989. Enfermedades del maíz en Michoacán. Memoria del XVI Congreso Nacional de Fitopatología, Montecillos, Edo, de México.
- De León C. 1984. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Tercera Ed., El Batán, Texcoco, Edo. de México. 114 p.
- Eberhart SA and Russell WA. 1966. Stability parameters for comparing varieties. *Crop sci.* (6):36-40.
- Espinosa CA, Tadeo RM, Turrent FA, Zamudio GB, Valdivia BR, Sierra MM, *et al.* 2019. Producción de maíz y soberanía alimentaria en el contexto del deterioro ambiental de México. En: Economía política de la devastación ambiental y conflictos socioambientales en México. Coord. Barreda M., A., Enriquez V., L. y Espinoza H., R. p. 323-380.
- García ME. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 5ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Geografía. México DF México 246p.
- Giménez PM, De Oliveira E, Resende RO, Laguna IG, Conci LR, Avila A, Herrera P, Caldeano E, Virla E and Nome CF. 2002. Occurrence of corn stunt maize viruses in the provinces of Tucumán and Córdoba in Argentina. *Fitopatol. Bras.* (27): 403-407
- Gómez MN; González CM, Cantú AMA, Sierra MM, Coutiño EB y Manjarrez SM. 2013. H-563, Híbrido de maíz tropical tolerante a la enfermedad "Mancha de Asfalto". *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 (1): 81-83
- Gómez MN, Sierra MM, González CM, Cantú AMA, Ramírez FA, Wong PJJ, Manjarrez SM, Ramírez DJL, y Espinosa CA. 2008. H-562, híbrido de maíz de alto rendimiento para el trópico húmedo y seco de México. *Agricultura Técnica en México* 34 (1): 101-105
- Gordon R, de Gracia N, Franco J y González A. 1997. Evaluación de distintas épocas de siembra y la incidencia del achaparramiento en maíz, Azuero, Panamá, 1993-94. *In: Síntesis de resultados experimentales del PRM 1993-1995. CIMMYT-PRM Guatemala.* 5: 268-273.
- Henríquez P y Jeffers D 1997. El achaparramiento del maíz: patógenos, síntomas y diagnóstico. *In: Síntesis de resultados experimentales del PRM 1993-1995. CIMMYT-PRM Guatemala.* Vol 5: 283-290.
- Hernández R., L.; Sandoval I., J.S.; Mahuku., G.; Benítez R., I.; y Cruz I., S. 2015. *Revista Fitotecnia Mexicana* Vol. 38 (1): 39 - 47
- Hock J, Kranz J y Renfro BL. 1989. El "Complejo mancha de asfalto" de maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7:129-135
- Ireta MJ. 1988. Pudriciones de la mazorca. *In: Enfermedades del maíz, frijol, trigo y papa.* Ed.. Téliz, O.D. Centro de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Pp.12-15.
- Jeffers D, Martínez-Hernández L, Bergvinson D; Córdova H y Beck D. 2004. Avances en el desarrollo de germoplasma resistente al complejo del achaparramiento del maíz en el CIMMYT. *Memorias del XXXI Congreso Nacional de Fitopatología.* Resumen C-62.
- Jugenheimer RW. 1981. Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa. México, D.F., México. p. 357-442.
- Larkins, B.A., J.M., Danneffer, D.F. Bostwick EO, Moro GA y López MA. 1994. Opaque 2 modifiers what they are and how they work. *In: Quality protein maize 1964-1994. Proc. Of the international symposium on quality protein maize.* EMBRAPA/CNPMS. Sete Lagoas MG Brasil p 133-148.
- Madden LV and Nault LR. 1983. Differential pathogenicity of corn stunting Mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Baldulus* species. *Phytopathology* 73: 1608-1614.

- Nault LR. 1980. Maize bushy stunt and corn stunt: A comparison of disease symptoms, pathogens host ranges and vectors. *Phytopathology* 70: 659-662.
- Pereyda HJJ, Hernández MJS, Sandoval IS, Aranda OC, De León C y Gómez MN. 2009. Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia* 43:511-519.
- Reyes CP. 1990. Diseño de experimentos aplicados. Ed. Trillas 3ª Ed. 348p.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SADER). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2022. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Acciones y programas Producción agrícola. Disponible en: [http://www.gob.mx/siap/acciones y programas de producción agrícola](http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas-de-produccion-agricola). (Cons. 31 de julio del 2023). s/p.
- Sierra MM, Rodríguez MFA, Gómez MN, Espinosa CA, Ugalde AFJ y Andrés MP. 2019. Mejoramiento genético de maíz para el trópico húmedo de México. En: *Avances en Investigación agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquera, Desarrollo Rural, Transferencia de Tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos Naturales y Cambio Climático*. INIFAP, CP, UACH, INAPESCA, UV, TECNM, Medellín, Ver. p. 482-499.
- Sierra MM, Becerra LEN, Palafox CA, Rodríguez MFA, Espinosa CA and Valdivia BR. 2010. Tropical corn (*Zea mays* L.) genotypes with high yield and tolerance to corn stunt disease in the Gulf of Mexico Region. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12 (3): 485-493
- Sierra MM, Palafox CA, Becerra LEN Córdoba OH, Espinosa CA y Rodríguez MFA. 2007. Comportamiento de híbridos de maíz con alta calidad de proteína, por su buen rendimiento y tolerancia al "Achaparramiento". *Agronomía Mesoamericana* 18 (1): 27-35
- Sierra MM, Becerra LEN, Palafox CA, Barrón FS, Cano RO, Zambada MA, Sandoval RA y Romero MJ. 2004. Caracterización de híbridos de maíz con alta calidad de proteína por su rendimiento y tolerancia a pudrición de mazorca. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(2): 268-276
- Sierra MM, Rodríguez MFA, Castillo GR, Ortiz CJ, Barrón FS, Tosquy VOH, Romero MJ, Tinoco ACA y Sandoval RA. 1994. H-513 híbrido de maíz de cruce simple para el trópico mexicano. *Folleto Técnico* Núm. 9. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro de Investigación Regional Golfo Centro (CIRGOC). Campo Experimental Cotaxtla. Veracruz, Veracruz. México, 18 p.
- Urbina AR. 1997. Desarrollo de dos poblaciones tropicales de maíz con resistencia al complejo del achaparramiento. In: *Síntesis de resultados experimentales del PRM 1993-1995 CIMMYT-PRM Guatemala*. Vol 5 (1): 15-20.
- Vasal SK. 1994. High quality protein corn. In: *Specialty corn*. A.R. Hallauer Ed. CRC press. Boca Ratón Fl. p 75.



3.4. Mancha de asfalto, opciones para su atención derivadas de mejoramiento genético en maíz en Guerrero

Noel Orlando Gómez Montiel¹, César del Ángel Hernández Galeno^{1*}, Alejandro Espinosa Calderón², Jesús Martínez Sánchez³, Mauro Sierra Macías⁴, Bulmaro Coutiño Estrada³. ¹INIFAP Campo Experimental Iguala. Km 2.5 carretera Iguala-Tuxpan, Colonia Centro, C. P. 40,000. Iguala de la Independencia, Guerrero. ²INIFAP Campo Experimental Valle de México ³INIFAP Campo Experimental Centro de Chiapas ⁴INIFAP Campo Experimental Cotaxtla.*Autor de correspondencia: hernandez.cesar@inifap.gob.mx

Resumen

En el trópico y subtrópico de México se siembran un poco más de 4.0 millones de hectáreas de maíz (*Zea mays*) (Gómez *et al.*, 2001). En estas regiones se presentan condiciones climáticas que favorecen la presencia de enfermedades foliares y destaca por su severidad la mancha de asfalto, que está constituida por los hongos *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Coniothyrium phyllachorae*. Esta enfermedad se ha reportado en los estados de Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Hock *et al.*, 1989). Adicionalmente, se ha reportado en los estados de Guerrero (Gonzalez *et al.*, 2008), Nayarit (Gonzales, 2013) y Estado de México (Ríos-Herrera *et al.*, 2016). La mancha de asfalto provoca severas pérdidas en maíz, ocasionando disminución del rendimiento hasta del 40 %; sin embargo, en algunos casos las pérdidas han sido totales. Para disminuir estos efectos negativos en la producción del maíz, se recomienda realizar control químico o genético, principalmente. El objetivo de este documento es presentar información de las acciones que se realizan en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campo Experimental Iguala, para la generación de maíces mejorados con resistencia a la enfermedad mancha de asfalto como parte del control genético de la enfermedad.

Antecedentes

Esta enfermedad fue identificada en los 80's, creció y se extendió en casi todas las áreas cálidas y semicálidas húmedas y subhúmedas de México; fue muy severa en los 90's en el estado de Guerrero, donde inicialmente se detectó en el Valle del Ocotito, región conformada por las poblaciones de Mohoneras, Buena Vista de la Salud, Cajelitos y Rincón de la Vía, ubicadas en el municipio de Chilpancingo, posteriormente, se diseminó a comunidades vecinas, las costas y algunas áreas de la región Norte. A finales de los 90's, en el INIFAP Campo Experimental Iguala, se inició el proceso de mejoramiento genético al explorar la variabilidad genética del maíz tanto de material tropical como subtropical y se identificó al híbrido H-563 como el de mayor resistencia, de este híbrido trilineal se tamizaron sus progenitores y la línea LT154 fue la de mayor resistencia; por otro lado, el CIMMYT identificó la línea CML576 como su principal fuente de resistencia. Se tiene conocimiento de maíces de empresas trasnacionales que también tienen resistencia a la enfermedad mancha de asfalto; sin embargo, cuando la infestación ha sido muy severa se han tenido daños en todos los genotipos en los cuales se ha detectado tolerancia.

Descripción

La mancha de asfalto es una enfermedad ocasionada por un complejo de hongos que incluye *Phyllachora maydis*; *Monographella maydis* y *Coniothyrium phyllachorae*. *P. maydis* es del orden Phyllachorales en la familia Phyllachoraceae (EPPO, 2023), es un parasito obligado, sus esporas se propagan por el viento y bajo condiciones ambientales favorables, varias de estas especies actúan en sinergia (Rodríguez, 2018). *M. maydis* es del orden Xylariales y familia Microdochiaceae (EPPO, 2023) y es un parasito facultativo. *C. phyllachorae* es del orden Pleosporales y familia Coniothyriaceae (EPPO, 2023), en la enfermedad mancha de asfalto es un hiperparásito de los peritecios de *P. maydis*.

Uno de los principales efectos de esta enfermedad es la disminución del rendimiento de grano debido a la limitación del área fotosintética total en las hojas (Johnson *et al.*, 2023). Otro tipo de mermas pueden incluir reducciones en la calidad del grano o la calidad de hojas utilizadas para envolver alimentos

(Bajet *et al.*, 1994). La enfermedad mancha de asfalto también es conocida como mancha negra, pudrición acuosa del tallo, complejo mancha de asfalto, chamusco, quemazón, entre otros.

Región agroclimática

La mancha de asfalto se desarrolla en ambientes medianamente fríos, pero con altos niveles de humedad relativa en las regiones tropicales y subtropicales. Los lugares que presentan ambientes favorables para el desarrollo de la mancha de asfalto tienen condiciones climáticas que consideran temperatura promedio mensual de 16 a 22 °C, precipitación mensual promedio de 150 mm o su equivalente a más de 75 % de humedad relativa y no menos de 60%; la presencia de 10 a 20 días nublados también favorece el desarrollo de la enfermedad.

En México y otras regiones tropicales de América la mancha de asfalto fue reportada desde hace más de 30 años (Hock *et al.*, 1989). Los estados de la República Mexicana en los cuales se ha registrado la presencia de la enfermedad son: Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero. En estos estados se han reportado pérdidas de rendimiento promedio del 40 %, pero se han tenido reportes de pérdidas de más del 80 % en los estados de Oaxaca y Guerrero (Gonzalez *et al.*, 2008; Mahuku *et al.*, 2013)

Ciclo de la enfermedad mancha de asfalto

La enfermedad puede mantenerse de un ciclo a otro en residuos de cultivo sobre el campo, esto ocasiona una fuente permanente de inóculo. Sin embargo, la incidencia y severidad de la enfermedad varía según las condiciones del clima en el temporal (Martínez y Espinoza, 2014). Adicionalmente, la enfermedad puede presentarse si se tiene alta humedad en el ambiente (10 a 20 días nublados en el mes), niveles altos de fertilización nitrogenada, dos ciclos de maíz al año, genotipos susceptibles, baja luminosidad, edad de alta vulnerabilidad del hospedante y nivel de virulencia de los patógenos involucrados (Hock *et al.*, 1989). El tiempo requerido por *P. maydis* para completar su ciclo de vida está influenciado por las condiciones estacionales. En muchos casos, el ciclo completo de *P. maydis* tardó más de 7.5 días en completarse. Asimismo, la presencia de daño en la hoja con aspecto de manchas de asfalto (peritecios en el mesófilo de las hojas afectadas) se presentan solo cuando las plantas de maíz

se acercan a la madurez (Liu, 1973). Bajo condiciones ambientales favorables, el complejo de patógenos que provocan la mancha de asfalto provocan que el follaje se atizone en menos de ocho días, debido a coalescencia de lesiones inducidas por los distintos hongos y atribuido a la producción de una toxina (Pereyda-Hernández *et al.*, 2009).

Síntomas

La sintomatología de la presencia de la enfermedad mancha de asfalto inicia con la aparición del hongo *P. maydis* que genera la presencia de lesiones elevadas oscuras, estromáticas de aspecto liso y brillante, de forma oval a circular, con 0.5 a 2.0 mm de diámetro y forma estrías hasta de 10 mm de longitud (Parbery, 1967; Hamlin, 1999), posteriormente, se expresa *M. maydis* que genera lesiones alrededor de las producidas por *P. maydis*. Al principio se observa un halo de forma elíptica, color verde claro de 14 mm, posteriormente, es necrótico y provoca el síntoma conocido como ojo de pescado. En lesiones jóvenes, es común encontrar a *Microdochium* sp, anamorfo de *M. maydis*. El tercer hongo presente en esta enfermedad es *Coniothyrium phyllachorae* Maubl., que confiere una textura ligeramente áspera al tejido necrótico de la planta (Pereyda *et al.* 2009).

Variedades de maíz y su tolerancia a mancha de asfalto

Se ha explorado y expuesto a la mancha de asfalto gran diversidad genética, tanto de variedades e híbridos de maíz, como de líneas elite y experimentales: de manera que se han identificado materiales con diferente grado de tolerancia. Los materiales terminados con mayor resistencia son H-563 y H-377, con adaptación a áreas tropicales y subtropicales, respectivamente; también debido a la exposición continua a partir de los años 90's, en el Valle del Ocotito, se ha detectado que los maíces nativos regionales ya presentan mayor tolerancia a la enfermedad, estos maíces provienen de introgresiones entre las razas Olotillo y Tuxpeño. En el caso de líneas mejoradas las de mayor tolerancia son, LT154 del INIFAP y CML576 (T10) del CIMMYT, que adicionalmente tiene muy buena aptitud combinatoria general; por lo tanto, el Programa de Maíz del INIFAP, en el estado de Guerrero, está explorando combinaciones que incluyan estos progenitores y otros más como B49 que es progenitor del H-377. Con estas líneas y otras con tolerancia a la mancha de asfalto como son T48,

CML311, CML549, entre otras, se han formado dos sintéticos para conjuntar la resistencia en ellas, estos son, una población tropical y otra subtropical que serán fuente de resistencia horizontal y donadores de resistencia en la generación de nuevas líneas. En el proceso de mejoramiento genético se han generado variedades de grano blanco y amarillo, obtenidas al tamizar cerca de mil líneas S1 contra la mancha de asfalto en el Valle del Ocotito. Actualmente, se cuenta con los híbridos H-562, H-565 y la variedad V-569 A, como materiales tolerantes a esta enfermedad, así como, otros híbridos identificados por el CIMMYT con características similares. A continuación, se realiza una breve descripción de los maíces mejorados generados en el INIFAP Campo Experimental Iguala que tienen al menos una línea con tolerancia a la mancha de asfalto.

H-562. Fue inscrito en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales del Servicio de Inspección y Certificación de Semillas con el número MAZ-692-291105 y título de obtentor 332. El H-562 es un híbrido trilineal, cuya hembra es la cruce simple LT-154 x LT-155, estas líneas provienen de las poblaciones Tuxpeño Crema y La Posta, respectivamente; el macho es la línea endogámica subtropical B₄₁ obtenida a partir de un sintético tardío formado con líneas de híbridos comerciales del subtrópico. Este híbrido tiene adaptación amplia y ha sobresalido en evaluaciones en las regiones cálidas y semicálidas de los estados de Tamaulipas, Yucatán, Chiapas, Guerrero, Nayarit y Sinaloa. El H-562, produce mazorca grande de grano blanco semidentado y presenta resistencia a tizones, royas y mancha de asfalto (Gómez *et al.*, 2008).

H-563. Es un híbrido trilineal de maíz que tiene como hembra a la cruce simple CML-311 x CML-269 y como macho a la línea endogámica LT-154. Se registró en el CNVV del SNICS con el número MAZ-795-150806 y título de obtentor 333. El híbrido H-563 tiene grano blanco con textura semicristalina, sus plantas tienen altura promedio de 257 cm y se adapta a climas tropicales y del subtrópico bajo, se puede sembrar en regiones cálidas y semicálidas desde Sinaloa hasta Chiapas por la costa del Pacífico y desde Tamaulipas hasta Yucatán por la vertiente del Golfo de México, así como, en los estados de Morelos y Estado de México. En las evaluaciones previas a su liberación comercial en localidades con presencia de la mancha de asfalto el H-563 presentó daños de mazorca derivados de la misma en porcentajes de 2.7 a 3.6, en las mismas evaluaciones los híbridos comerciales incluidos como testigos presentaron daños del orden de 26.3 hasta 60.9 % (Gómez *et al.* 2013).

H-565. Es un híbrido trilineal de maíz registrado en el CNVV del SNICS con el número MAZ-987-210509 y título de obtentor 719. Este híbrido está constituido por la cruce simple de T48 x T47 que funge como hembra y la línea LT154 como macho. El híbrido comercial tiene como principales características, porte alto de planta (265 a 290 cm), ciclo biológico de 130 días y presenta tolerancia a la mancha de asfalto (Gómez-Montiel *et al.*, 2013).

V-569 A. Esta es una variedad mejorada de maíz de polinización libre y de grano amarillo seleccionada en el Valle del Ocotito, municipio de Chilpancingo, Guerrero, a partir de 288 líneas S¹ derivadas de híbridos comerciales y experimentales de grano amarillo adaptados al trópico y sub trópico de México; estas líneas fueron expuestas a la mancha de asfalto en la localidad del Ocotito, municipio de Chilpancingo; se realizó la selección de las más sobresalientes aplicando una presión de selección del 10 %, de manera que se quedaron 30 tratamientos, en los cuales se separaron dos mazorcas, decidiendo al final por solo un grupo de 50 mazorcas, con las que se hizo un compuesto de 1.0 Kg en promedio, el cual fue el punto de partida para obtener la V-569 A. esta variedad fue registrada en el CNVV del SNICS con el número MAZ-2479-130423 y título de obtentor 3155. Esta variedad tiene buena adaptación al trópico y montaña baja con altitudes menores a 1,500 m, precipitación anual de 800 mm o más y temperatura media anual de 23 a 26°C (Gómez-Montiel *et al.* 2023).

Perspectivas y retos

El mejoramiento genético que se ha realizado considera principalmente la identificación de ambientes en los cuales la enfermedad de la mancha de asfalto es endémica, posteriormente, la variabilidad genética disponible se evalúa en estos ambientes para tamizar e identificar fuentes de resistencia que se incluyen en procesos formales de mejoramiento que consideran principalmente la hibridación. en el mediano plazo se tiene considerado establecer alianzas con fitopatólogos para que identifiquen y aislen las principales cepas de los hongos que provocan la mancha de asfalto, y que, con ellos se realice la inoculación de los posibles genotipos con resistencia a la enfermedad, con esto, se espera tener mayor efectividad en la resistencia de los genotipos mejorados de maíz que se generen. También, se está incursionando en la generación de líneas con posible resistencia a la enfermedad, a partir de poblaciones candidatas que han sido sometidas al proceso de dobles haploides, esto con la finalidad

de obtener de manera más rápida líneas e híbridos de maíz con resistencia a la mancha de asfalto. Finalmente, se considera relevante estudiar métodos alternativos al mejoramiento genético para la resistencia a la mancha de asfalto, en este caso, es primordial la evaluación de agentes para el biocontrol de la enfermedad, para lo cual, se realizarán las alianzas que correspondan.

LITERATURA CITADA

- Bajet NB, Renfro BL, Valdez CJM. 1994. Control of tar spot of maize and its effect on yield. *International Journal of Pest Management* 40(2):121-125.
- EPPO Global Database. 2023. Taxonomy information by *P. maydis*, *M. maydis* and *C. phyllachorae*. Consulta en línea <https://gd.eppo.int/>
- Gómez-Montiel NO, Hernández-Galeno CA, Anzures-Olvera F, Toledo-Aguilar R, Ramírez-Díaz JL, Espinosa-Calderón A, Tadeo-Robledo M, Santos-Echeverría R y Antúnez-Ocampo OM. 2023. Variedad mejorada de maíz de grano amarillo para ganaderos en pequeña escala del trópico seco. *Agro-divulgación* 3(3): 45-47. <https://doi.org/10.54767/ad.v3i3.186>
- Gómez MNO, Ramírez JLD y Turrent AF. 2001. H-516, maíz de alto rendimiento para regiones cálidas y semicálidas de México. CEIGUA-CIRPAS-INIFAP. Folleto técnico Núm. 6. 20 p.
- Gómez MNO, González MC, Cantú MAA, Sierra MM, Coutiño BE, Manjarrez MS. 2013. ‘H-563’, híbrido de maíz tropical tolerante a la enfermedad “mancha de asfalto”. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(1): 81-83. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v36n1/v36n1a9.pdf>
- Gómez MNO, Sierra MM, Gonzalez MC, Cantú MAA, Ramírez AF, Wong JJP, Manjarrez MS, Ramírez JLD. 2008. H-562, híbrido de maíz de alto rendimiento para el trópico húmedo y seco de México. *Agricultura Técnica en México* 34(1): 101-105.
- González CM, Gómez MN, Pereyda HJ y Muñoz EJ. 2008. Obtención de híbridos de maíz elotero tolerantes al complejo mancha de asfalto en el estado de Guerrero. INIFAP. Folleto técnico 17. Iguala, Guerrero, México. 27 p.
- González CM. 2013. Nuevos métodos de control de la mancha de asfalto del maíz. Fichas Tecnológicas Sistema Producto (Nueva Tecnología). Instituto Nacional de Investigaciones, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). CIRPAS, CE Iguala, Iguala, Gro. 2 p
- Hamlin RT. 1999. Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes. Vol. I y II. APS Press. St. Paul. Minnesota. pp: 63-64.
- Hock J, Kranz J y Renfro BL. 1989. El “complejo mancha de asfalto” de maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7: 129-135.
- Johnson ET, Dowd PF, Ramírez JL and Behle RW. 2023. Potential biocontrol agents of corn tar Spot disease isolated from overwintered *Phyllachora maydis* stromata. *Microorganisms* 11(6): 1-10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061550>
- Liu LJ. 1973. Incidence of tar spot of corn in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 57:211-216.
- Mahuku G, San Vicente F y Sherestha R. 2013. Complejo de la mancha de asfalto del maíz: hechos y acciones. Folleto Técnico. CIMMYT-MasAgro. México. 6 p.
- Martínez SJ y Espinosa PN. 2014. Sugerencias para el control del “Complejo Mancha de Asfalto” del maíz en La Frailesca, Chiapas. Folleto para productores No. 13. INIFAP. CIRPAS. Campo Experimental Centro de Chiapas. México. 15p
- Parbery DG. 1971. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Nke. In: Fckl. VI. Additions and corrections to part V. *Australian Journal of Botany*, 19(2):207-235.

- Pereyda-Hernández J, Hernández-Morales J, Sandoval-Islas JS, Aranda-Ocampo S, de León C y Gómez-Montiel N. 2009. Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis*) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia* 43: 511-519
- Ríos-Herrera EN, Partida-Martínez LP, Ochoa-Fuentes YM, Cerna-Chávez E, Hernández-Castillo FD, Flores-Olivas A, Olalde-Portugal V and Rodríguez-Guerra R. 2016. First Report on the Presence of *Phyllachora* sp. in Corn Crops at Toluca, Estado de Mexico. *American Journal of Plant Sciences*. 7:733-739. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2016.75067>.
- Rodríguez AV. 2018. Comportamiento de híbridos de maíz ante una cepa de *Aspergillus flavus* en la provincia de Córdoba. Diss. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.

3.5. Carbón de la espiga en el Bajío y zona de transición y tizón foliar en Valles Altos

Alejandro Espinosa Calderón¹, Margarita Tadeo Robledo², Consuelo López López², Turrent Fernández, A¹, Noel O. Gómez Montiel³, César del Ángel Hernández Galeno³, Mauro Sierra Macías⁴. ¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Campo Experimental Valle de México, ²Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias -Campo Experimental Iguala. ⁴Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias -Campo Experimental Cotaxtla.

INTRODUCCIÓN

En México, la enfermedad denominada carbón de la espiga, propiciada por el hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zetae*, incidió de forma importante en la región del Bajío en la década de 1950, afectando a variedades de maíces nativos, así como a los híbridos H 353, H 309 que se habían desarrollado para condiciones con altitudes de 1200 a 1800 msnm, los cuales se retiraron del mercado para limitar la diseminación del patógeno (Palacios-Rangel y Ocampo-Ledesma, 2018). A partir del híbrido H 353, se derivaron líneas seleccionadas por su tolerancia a carbón de la espiga. Una cruce simple integrada por dos de esas líneas, fue progenitora del híbrido doble de maíz H 311, liberado comercialmente en 1983, por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), antecesor INIFAP; se recomendó para siembras bajo riego en el Bajío, en alturas de 1200 a 1800 msnm, así como en altitudes superiores en los estados de Zacatecas, Durango, Aguascalientes e Hidalgo. El orden de cruce bajo el cual se inscribió en el Registro Nacional de Variedades de Plantas (RNVP) y produjo semilla inicialmente fue: B16xB17 x B32xB33; sin embargo, posteriormente se cambió al orden inverso, es decir, B32xB33 x B16xB17; esto porque la cruce simple (B32xB33) es altamente productiva (Ramírez *et al.* 1988), y produce la semilla de muy buena calidad física (Espinosa y Carballo 1987; Espinosa *et al.*, 2001).

El carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), ha tenido mayor importancia en la zona del Bajío, donde ha ocasionado pérdidas de hasta el 30% de la producción. A partir de ahí, se ha diseminado por varias regiones del país en localidades de Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Aguascalientes, pero se estima que su distribución puede ser aún más extensa (Aquino-Martínez *et al.*, 2011). También se ha reportado en los valles del Mezquital y de Toluca en donde se siembran semillas de maíces híbridos comerciales que han mostrado susceptibilidad a la enfermedad (Pérez *et al.*, 2006; Martínez y Ledesma, 1990), así también, afectando a gran cantidad de maíces criollos.

En el caso del estado de Hidalgo, en 1988 se reportaron pérdidas de hasta el 50 % de la superficie sembrada con híbridos susceptibles, mientras que en 1998 se registraron 16.6 ha⁻¹ con carbón de la espiga del maíz, y en 2003 ya existían 1275 ha⁻¹ con este problema; situación similar ocurrió con el número de híbridos afectados con carbón, ya que en el mismo período el número aumentó de 3 a 27 híbridos susceptibles a la enfermedad (Pérez *et al.*, 2006). En el tema del tizón foliar, a partir de 1992, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (FESC-UNAM), en colaboración con el Campo Experimental Valle de México, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), se han realizado trabajos de mejoramiento genético para incorporar la esterilidad masculina a las líneas hembras de los híbridos comerciales y experimentales desarrollados por la UNAM y el INIFAP, con énfasis en la fuente C, de interacción hereditaria de citoplasma y nuclear (Espinosa *et al.*, 2009; Tadeo *et al.*, 2010). Posteriormente (1995-1997) se identificaron líneas con capacidad restauradora de la fertilidad. La estabilidad de la fuente de androesterilidad y la capacidad restauradora de las líneas desarrolladas, permitieron el uso potencial del esquema de androesterilidad, con lo cual se podrían limitar, en cierta medida, algunos problemas relacionados con el desespigue, así como reducir los costos que implica esta actividad (Tadeo *et al.*, 2010; Tadeo *et al.*, 2014).

Antecedentes

Se ha antepuesto el argumento de que la superación de los rendimientos por unidad de superficie lograda mediante la introducción de materiales exóticos podría ser suficiente justificación para llevar materiales genéticos a nuevas

regiones; sin embargo, conviene tener cuidado, lo que se consideró por el Ing. José Rodríguez Vallejo, en el pasado, al pedir que se valoraran las variedades de maíz antes de ser llevadas a nuevas regiones. Se debe considerar con sumo cuidado pues además de introducir germoplasma con mayor capacidad de rendimiento, también se introduce la susceptibilidad a plagas y enfermedades; el caso típico es el híbrido H-353, cuya cruza simple macho está formada por dos líneas tropicales; que fueron utilizadas en ese híbrido comercial en El Bajío, este híbrido se mostró sumamente susceptible al carbón de la espiga, causado por el hongo *Sphacelotheca reiliana* (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) (Espinosa y Carballo, 1987).

En México, el carbón de la espiga tiene mayor importancia en la zona de El Bajío, donde ha ocasionado pérdidas de hasta el 30 %. Sin embargo, esta problemática se ha extendido a los estados del altiplano del país (Hidalgo y México) afectando a gran cantidad de maíces criollos e híbridos comerciales (DGSV-CNRF, 2020). En 1971, se liberó el maíz híbrido H 133, específico para la Zona de Transición El Bajío Valles Altos de México, el cual involucró material genético de Valles Altos, Bajío y Tópico, y tuvo buen comportamiento en esa zona durante 10 años. Desde 1982 al 1985, el híbrido de cruza doble H 133, mostró susceptibilidad al carbón de la espiga, incrementándose considerablemente la presencia de la enfermedad, reduciendo la producción y limitando el uso del híbrido. En 1980 se formaron híbridos de tres líneas mediante combinaciones de cruza simples de El Bajío, tolerantes al carbón de la espiga, con líneas de Valles Altos, con la finalidad de ofrecer híbridos con buena combinación de germoplasma y mayor coincidencia en la floración de sus progenitores. Entre los híbridos, tanto a nivel experimental, como semicomercial y validaciones comerciales, el híbrido trilineal H 135, superó al H 133, en rendimiento en 33 localidades del país, en 11.3 a 19.1 %; aunado a ello, también confirmo su tolerancia al carbón de la espiga (Espinosa y Carballo, 1987). El híbrido trilineal H 135, es un maíz de ciclo tardío, producto de una cruza simple obtenida en El Bajío, que fue empleada por la Productora Nacional de Semillas (PRONASE), como progenitora masculina del híbrido de cruza doble H 311. Esta cruza simple tiene la genealogía (H 353-245 -6-10 x H-535-363-7-2) y nomenclatura comercial (B32 x B33). Las líneas de esta cruza simple pertenecen a la raza Celaya y su composición incluye germoplasma de la raza tropical Tuxpeño; esta cruza simple se utiliza en el H 135 como progenitor femenino; el progenitor masculino, es una línea autofecundada de primera generación (S1) con genealogía Hgo. 10-3 obtenida en Progreso, Hidalgo a partir de una colecta local de la raza Chalqueño (Espinosa y Carballo, 1987).

El híbrido de maíz H 135, fue inscrito en 1986, en el Comité Calificador de Variedades de Plantas (CCVP), hoy Catalogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV), con el número de registro MAZ-180886-113, el híbrido fue evaluado de 1981 a 1985, sus progenitores de 1985 a 1986, se verificó su tolerancia a carbón de la espiga, en Zapopan, Jalisco, bajo condiciones de exceso de esporas del hongo. A partir de la petición de los productores del Valle del Mezquital, su siembra se extendió, cubriendo las áreas donde prosperaba el híbrido H 133. Su uso se extendió por varios años, en más de 30,000 hectáreas en el Valle del Mezquital, de Hidalgo, además del 85 % de otras regiones en estados de Michoacán, México, Puebla, etc. Siendo uno de los híbridos importantes para la PRONASE. El híbrido de maíz H 135, se reportó como tolerante al achaparramiento y rayado fino, pero susceptible a roya (*Puccinia* sp.), en altitudes superiores a 2100 msnm.

En tanto se extendía el uso del híbrido H 135, en 1988, en el estado de Hidalgo se reportaron pérdidas de hasta el 50 % de la superficie sembrada con híbridos susceptibles. En el Valle del Mezquital, Hgo., en el año de 1998 se registraron 16.6 ha⁻¹ con carbón de la espiga del maíz y en 2003 ya existían 1275 ha⁻¹ con este problema; situación similar ocurrió con el número de híbridos afectados con carbón, ya que en el mismo periodo el número aumentó de tres a 27 híbridos susceptibles a la enfermedad (Pérez *et al.*, 2006; DGSV-CNRE, 2020).

El híbrido doble de maíz H-311 fue desarrollado en el Campo Experimental Bajío, del INIA, liberándose en 1983; está integrado por la combinación de dos progenitores del AN-360, a su vez progenitor del híbrido de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro llamado Pancho Villa, cuya genealogía es SSE-3XSSE-5 y nomenclatura B16XB17; esta cruce simple posee la característica peculiar de planta baja, es decir enana o braquítica, con una altura aproximada de un metro. La otra cruce simple del H-311, está conformada con líneas que se derivaron de germoplasma de la raza Celaya, con influencia de material Tropical de la raza Tuxpeño, la genealogía es: H-353-245-6-10 x H-353 -363-7-2 y nomenclatura B32xB33; está a diferencia de la otra cruce simple, es de porte normal, con altura de 270 cm, aproximadamente. Como característica sobresaliente del híbrido H-311, destaca que es tolerante al carbón de la espiga (*Sphacelotheca reiliana*) y posee buen potencial de rendimiento, pues alcanza hasta 14 t ha⁻¹, se adapta en diversas regiones ubicadas entre 1200

a 2200 msnm (Jalisco, Michoacán, Querétaro, Guanajuato, Oaxaca, Puebla, Zacatecas, Durango, Aguascalientes, Hidalgo) (Espinosa *et al.*, 2001).

Con respecto al tizón foliar o también llamado tizón norteño, desde 1970, se ha documentó que en EE. UU se dejó de usar la esterilidad citoplasmática denominada cms-T, por las empresas productoras de semillas, debido a los problemas con susceptibilidad al tizón, conocido como *Exserohilum turcicum*, (teleomorfo *Setosphaeria turcica*). Esta enfermedad ocasionó una epifitía que afectó el 90% de las siembras en la faja maicera de ese país (Grogan *et al.*, 1971; Airy *et al.*, 1978; Tadeo *et al.*, 1997).

En 1980 se retomó la investigación con esterilidad masculina, con el desarrollo de nuevas fuentes de esterilidad masculina, lo que permitió combinar la forma génico-citoplásmica, principalmente para los tipos C y S. En los años 2000, se hacía uso de esta tecnología en aproximadamente el 25% de la superficie dedicada a la producción de semilla en EUA (Liu *et al.*, 2002; Beck y Torres, 2005).

En 1992, la FESC-UNAM en colaboración con el CEVAMEX-INIFAP, han realizado trabajos de mejoramiento genético para incorporar la esterilidad masculina a las líneas hembras de los híbridos comerciales y experimentales desarrollados, con énfasis en la fuente C. En el periodo comprendido entre 1995-1997, se estableció la estabilidad de la fuente de androesterilidad y la capacidad restauradora de las líneas desarrolladas, lo que permitió el uso potencial del esquema de androesterilidad, impactando en los costos de producción de semilla (Tadeo *et al.*, 2010; Tadeo *et al.*, 2014).

Descripción

Región agroclimática

La Zona de Transición El Bajío Valles Altos, se ubica en altitudes sobre el nivel del mar, que van de 1800 a 2200 m, en las cuales se recomendaban variedades de Valles Altos (1200 a 2600 msnm) o bien variedades de El Bajío (1200 a 1800 msnm). Para la región Norte Centro de México, ubicada en la Zona de Transición, se liberó en el año 2000, con el número de registro 1265-MAZ-526-240100/C, el híbrido de cruza simple H 361, el cual se generó por el cruzamiento de la línea B32, de El Bajío, resistente al carbón de la

espiga (*Sphacelotheca reiliana*), cuya genealogía es H 353-245-6-10, por la línea B42, de Pabellón, tolerante a altas densidades de población, de origen tropical y cuya genealogía es CN-7.4-3.

El híbrido H 361, tiene buen porte de planta y excelente sanidad de mazorca, no presenta acame, de tallo y acame de raíz de 5 %. No ha presentado síntomas de carbón de la espiga, ni de *Ustilago maydis*, y sólo ocasionalmente se han identificado plantas con *Fusarium moniliforme* (Peña-Ramos y Gaytan-Bautista, 2001).

En la Zona de Transición El Bajío – Valles Altos del Centro de México, ubicada entre los 1800 y 2200 msnm, en los estados de Hidalgo, Puebla, Querétaro, México, Michoacán y Oaxaca, se siembran anualmente 315 mil hectáreas de maíz bajo condiciones de riego, buen temporal y humedad residual; de esta superficie se estima que más de 100 mil hectáreas se podrían sembrar con híbridos de alto potencial de rendimiento de grano (Espinosa, 1985). En Hidalgo destaca el Valle del Mezquital, donde se siembran de riego, con uso de aguas residuales, 34 mil hectáreas de maíz, con un rendimiento medio de 7.3 t ha⁻¹, lo que muestra el alto potencial productivo de los híbridos bajo esas condiciones. Las siembras de maíz en estas áreas, son tempranas, en marzo y abril, se usan híbridos de ciclo muy largo de 170 a 180 días a la madurez fisiológica (Espinosa y Carballo, 1987; Espinosa, 1989), sin embargo, otra época de siembra corresponde a fechas retrasadas, debido a que en los últimos años se ha incrementado la siembra de trigo (*Triticum aestivum* L.) en el ciclo otoño-invierno, cuya cosecha es en el mes de mayo; a fines de este mes y junio se hacen siembras tardías, que requieren híbridos y variedades de maíz de ciclo corto, que completen su ciclo biológico en 135 a 140 días, sin reducir su capacidad productiva (Espinosa, 2002).

En 1999 el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, liberó e inscribió el híbrido de maíz H 153, en el Catálogo de Variedades Factibles de Certificación (CVC), con el número de registro 1255-MAZ-522-091199/C, el cual tiene ciclo vegetativo de intermedio a corto y es adecuado para siembras tardías de riego. El H 153 es tolerante al carbón de la espiga y a la roya (*Puccinia sorghi*), enfermedades que han aumentado su incidencia en los últimos años, cuyos daños son importantes en la Zona de Transición.

Aquino-Martínez *et al.* (2011), indican que, en Metepec, México, durante 2006 se comparó la respuesta al carbón de la espiga *Sporisorium reilianum*, de 35 variedades e híbridos comerciales de maíz. Semilla de 36 genotipos, sin inocular o inoculada con *S. reilianum*, se sembró en un diseño de bloques al azar con tres repeticiones (parcela útil de 2 16 m), con el fin de identificar genotipos resistentes al patógeno. A los 245 días después de la siembra (dds), se obtuvieron los siguientes resultados: el 94.4 % de los genotipos fueron altamente resistentes (AR) y 5.6 % moderadamente resistentes (MR) a carbón de la espiga; y en otro experimento el 8.3 % de los genotipos fueron inmunes (I), 77.8 % altamente resistentes y 13.9% moderadamente resistentes. Se encontraron variedades e híbridos comerciales con resistencia (≤ 3 % de incidencia) a *Sporisorium reilianum* y buen rendimiento de grano (>8 t ha⁻¹), como Niebla, H-52, Almoloya de Juárez, Z-60, HID-17, Cóndor, H40, H-33, AS-722, AS-721, H-50, HS-2 y Promesa. Estos podrían recomendarse para la siembra comercial, iniciar un programa de mejoramiento genético o generar tecnología en el área de estudio.

En los últimos años, en Cuba en las áreas sembradas con maíz, de diferentes provincias del país se detectaron plantas con la inflorescencia masculina deformada, con presencia de soros de carbón y/o filodia en la espiga y mazorcas. Las plantas con estos síntomas se presentaron con una baja frecuencia y se encontraron de manera esporádica en los campos, el agente causal de esta sintomatología, en las plantas que presentaron filodia, se realizaron decoloraciones del tejido foliar para descartar la presencia en las mismas de *Sclerophthora macrospora*. Las características morfológicas del carbón detectado en las muestras corresponden con las descritas para *Sphacelotheca reiliana*. Esta especie fue detectada en ocho provincias del país en las variedades canilla, FR-28, tusón, TGH, P-7928 y en el híbrido HDT-66. En ninguna de las muestras analizadas se detectaron ni oosporas ni micelio de *S. macrospora*. El presente trabajo constituye el primer informe para Cuba del carbón de la espiga del maíz causado por *S. reiliana* (Martínez de la Parte *et al.*, 2016).

Los trabajos en torno al tizón foliar se han desarrollado en los Valles Altos del Centro de México, en donde se ubican los estados de Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Morelos, Edo. de México y Ciudad de México, a una altura de 2200 a 2600 msnm, así también se ha atendido en regiones del estado de Sinaloa (Félix-Gastélum *et al.*, 2018). En lo que respecta a Puebla, la enfermedad es una de las principales a controlar, dentro de Comité de

Sanidad Estatal (2014), mientras que, en las costas del norte de Sinaloa, se han tenido pérdidas que representaron el 50% en algunos lotes comerciales de producción (Orduño-Cota *et al.*, 2015).

Ciclo de la enfermedad carbón de la espiga

En la ficha técnica sobre carbón de la espiga de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF, 2020), se describe: el hongo *S. reilianum* f. sp. *zear* inverna como teliosporas en el suelo y ocasionalmente sobre la semilla. La supervivencia del hongo se ve favorecida en suelos con bajo contenido de humedad más que en los húmedos (Matyac y Kommedahl, 1986). Cuando se presentan las condiciones óptimas de temperatura y humedad del suelo, las teliosporas germinan dando origen a un filamento corto llamado promicelio o probasidio, en el cual el núcleo diploide migra y experimenta la meiosis dando como resultado cuatro células, cada una con un núcleo haploide. Estas células dan origen a basidiosporas, las cuales dan origen a otras y así sucesivamente formando cadenas de células haploides denominadas esporidias (DGSV-CNRF, 2020).

Las esporidias tienen la característica de poseer tipos de acoplamiento opuestos (+ y -), generalmente producidos en igual número (Ingold, 1994; Téféri *et al.*, 1989). Esporidias con tipos de acoplamiento opuesto se unen dando origen a hifas infectivas dicarióticas (binucleadas). Estas hifas dicarióticas infectan a las plántulas de maíz vía mesocotilo o raíz (Martínez *et al.*, 2002) e invaden sistémicamente los tejidos del meristemo y el tejido floral indiferenciado (Martínez *et al.*, 1999). Durante la floración, tanto en la espiga como en la mazorca, aparecen soros, los cuales se forman por la aglutinación de gran cantidad de micelio (Pataky, 1999) (DGSV-CNRF, 2020). Posteriormente las células binucleadas de las hifas (presentes en los soros) se agrandan y gelatinizan, subsecuentemente se separan y se forma una gruesa pared celular alrededor de cada una, dando origen a teliosporas diploides uninucleadas. La fusión nuclear (cariogamia) ocurre en algún punto durante la formación de la teliospora (Kahmann y Kämper, 2004). Al madurar, los soros se rompen y dejan expuesta la masa de teliosporas que es dispersada por el viento y lluvia (Montes y Díaz, 2006) (DGSV-CNRF, 2020).

Ciclo de la enfermedad tizón foliar

Esta enfermedad es provocada por un hongo considerado cosmopolita y ocurre particularmente en zonas con alta humedad relativa y temperaturas moderadas (18 a 27 °C) durante el periodo de crecimiento del cultivo. Se trata de un hongo hemibiotrófico, es decir, infecta inicialmente a las células vivas y, en una siguiente fase, se nutre del tejido muerto (Hurni *et al.*, 2015). Se encuentra generalmente como micelio o en su fructificación asexual (conidios), en residuos de cultivos anteriores, principalmente gramíneas, por lo que puede sobrevivir por varios ciclos en un mismo terreno (White, 2004). Se ha encontrado que este hongo está asociado a la semilla, por lo que se considera la vía de dispersión a largas distancias, así como la principal entrada a los lotes, dado que puede ser introducido a los campos, provocando lesiones en plántulas, que se convierten en fuente de inóculo secundario, para después infectar al resto del follaje y a las plantas vecinas (Hooker, 1977).

Este hongo produce conidios grandes que son de color gris-olivo-café, posee de tres a ocho septos de forma ovaladas con un hilum que exhibe su germinación en un extremo del conidio. Tiene micelio septado, cilíndrico, con una membrana externa fina y una interna hialina (White, 2004). Los conidióforos que presenta son de color café amarillento, se producen de manera individual o en grupos de 2 a 6. Otra de sus características es su sensibilidad al fotoperiodo, presenta un crecimiento vegetativo en los ciclos de luz prolongada, deteniéndose hasta la formación de conidióforos, mientras que bajo ciclos de luz-oscuridad, se reduce su crecimiento vegetativo y la aparición de conidióforos y conidios maduros es más rápida (Flaherty y Dunkle, 2005).

Síntomas

Se presentan la siguiente información, con base a la ficha técnica sobre carbón de la espiga de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF, 2020), el principal síntoma de la enfermedad es el desarrollo de soros en la espiga (flor masculina) y en la mazorca (flor femenina), los cuales sustituyen la formación de grano y polen ocasionando pérdidas en la producción (Figura 1) (Njuguna, 1998). Un soro es una masa compacta de teliosporas, cubierto con una delgada membrana de color grisácea la cual al madurar se rompe y libera las teliosporas. También se han observado síntomas tempranos como el desarrollo de manchas cloróticas en



Figura 1. Síntomas del carbón en maíz causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*. A) Carbón en la espiga, B) Carbón en la mazorca. DGSV-CNRF, (2020).

hojas de plántulas infectadas, acumulación de antocianina en el tallo (Matyac y Kommedhal, 1985) y enanismo de plantas ocasionado por el acortamiento de entrenudos (Stromberg *et al.*, 1984; Halisky, 1963).

En el caso del tizón foliar, los síntomas consisten en la aparición de manchas o lesiones pequeñas, ligeramente ovaladas que se producen en las hojas inferiores de la planta, extendiéndose a las hojas intermedias de la planta (Figura 2). Estas manchas se convierten en zonas necróticas alargadas, cuyo número incrementa a medida que se desarrolla la planta (De León, 1984; Félix-Gastélum *et al.*, 2018). Aunque el tizón foliar del maíz causado por *Exserohilum turcicum*, es una de las enfermedades foliares más importantes en el maíz sembrado en México, hoy en día no existe suficiente evidencia científica acerca de la etiología de la enfermedad, aunque los productores de maíz y asesores de campo demuestran interés en determinar su etiología.

La presencia de este hongo puede ocasionar la disminución del rendimiento y en la calidad de la semilla. Si la enfermedad se presenta antes de la etapa de floración, puede provocar pérdidas en la producción del grano de hasta el 50 % (Raymundo y Hooker, 1981). Si se trata de una infección moderada o



Figura 2. Plantas de maíz en donde se detectó la presencia del tizón A); Hojas de maíz con presencia de los síntomas causados por *Exserohilum turcicum* B y C). Fuente: Martínez-Núñez (2017).

se presenta posterior a la floración, la reducción del rendimiento es menor o nula (Sillón, 2008).

La gravedad de esta enfermedad incide a que afecta el área foliar, reduciéndola e interfiriendo en el proceso de fotosíntesis de la planta, por lo que los fotoasimilados resultan insuficientes para el llenado del grano, y es cuando la planta comienza a utilizar reservas existentes en el tallo, provocando la movilización de nutrientes, lo que conduce a un debilitamiento de éste, lo que provoca la ruptura o acame del tallo, así como la aparición de enfermedades fúngicas en tallo y raíz (Santori *et al.*, 2015)

Variedades de maíz y su tolerancia a carbón de la espiga

En Metepec, Estado de México en los años 2011 a 2014, se determinó el promedio general de la infección de la enfermedad en diferentes genotipos de maíz durante el ciclo agrícola primavera verano de 2011 a 2014 (CESAVEM,

2015). La presencia del carbón de la espiga del maíz en el estado de México hasta el 2014, según el grado de incidencia (nula, baja, moderada y fuerte) se muestra en la Figura 3.

Variedad de maíz	Ciclo vegetativo	Infección (%) 2011	Infección (%) 2012	Infección (%) 2013	Infección (%) 2014
AS-722	Tardío			1.98	0.58
A-7573	Intermedio			0.46	0.55
H-50	Intermedio	0	0	0	0
H-48	Intermedio		0.16	0.16	0.16
PUMA 1075	Intermedio	0	0	0	0
Z-60	Intermedio		0.5	0.5	0
ASGROW 210	Intermedio	0.24	0.2	0.2	0
ASGROW 7410	Intermedio	0	0	0	0.1
PANTERA	Intermedio	0	0	0	0
NIEBLA	Intermedio		0.04	0.02	0.02
FAISÁN	Intermedio		0.37	1.58	0.68
HIC-8	Intermedio		0	0.9	0.9
PIONEER	Intermedio	0	0	0	0
CRIOLO BLANCO	Tardío	0	0	0.65	0.75
TORNADO	Precoz	0	0	0.6	1.46

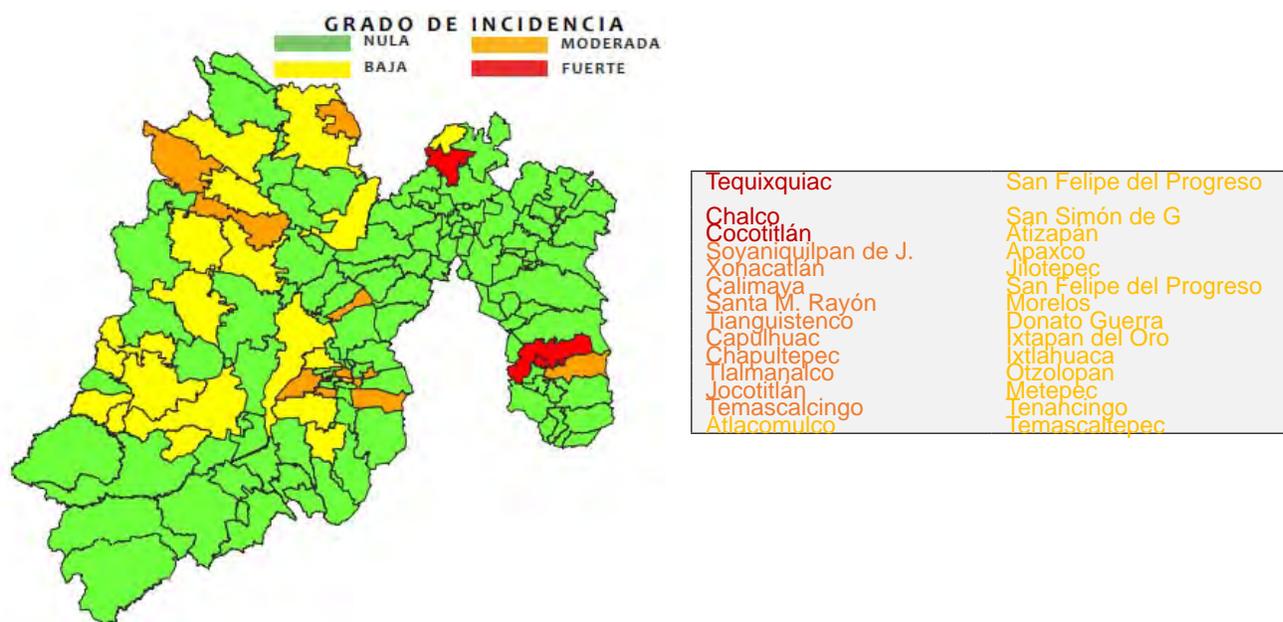


Figura 3. Presencia del carbón de la espiga del maíz en el Estado de México en un periodo de 2011 hasta 2014. Fuente: CESAVEM (2015).

Variedades de maíz y su tolerancia al tizón foliar

Los resultados de la colaboración entre la FESC-UNAM y el CEVAMEX-INIFAP, en el año 2011, el INIFAP logró la inscripción ante el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) del híbrido de maíz H-51 AE (Espinosa *et al.*, 2012), posteriormente, en 2015 se lograron los registros y títulos de obtentor de los híbridos trilineales H47 AE (Espinosa *et al.*, 2020), H49 AE (Espinosa *et al.*, 2022) y H53 AE (CNVV, 2023). En 2013, la FESC-UNAM registró el híbrido trilineal TSÍRI PUMA (Tadeo *et al.*, 2016) y en 2017 a Atziri Puma (Tadeo *et al.*, 2022) y Tlaoli Puma (Tadeo *et al.*, 2021) todos, bajo el esquema de androesterilidad para la producción de semilla.

En 2016 se evaluaron cinco híbridos experimentales de maíz, así como el híbrido trilineal TSÍRI PUMA en sus versiones androestériles (AE) y fértiles (F), los cuales se sometieron a tratamientos de inoculación artificial del hongo *Exserohilum turcicum* y sin inoculación (incidencia natural), en el CEVAMEX-INIFAP y la FESC-UNAM. El diseño experimental fue de bloques completos al azar, con dos tratamientos de inoculación, tres repeticiones por tratamiento. Para la inoculación, se aisló el patógeno de hojas de plantas de dos meses que presentaban síntomas del tizón, es decir, cuando las plantas mostraban lesiones necróticas de color verde-grisáceo o café, de tamaño pequeño y ahusadas, principalmente en las hojas inferiores de la planta (De León, 1984). Posteriormente se realizó la identificación molecular del patógeno, se preparó el inóculo y se realizó la inoculación, esta última se realizó siete días después de iniciada la floración femenina. Los híbridos experimentales se asperjaron con el patógeno durante el atardecer, mientras que las plantas sin inoculación sólo quedaron expuestas a la presencia natural (ambiental) del patógeno en cada localidad (Martínez-Núñez, *et al.*, 2019).

La evaluación de la resistencia al tizón se inició después de una segunda inoculación, a razón de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, así como la severidad de la enfermedad y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Los resultados mostraron que el genotipo con menor severidad final de la enfermedad fue Tsíri Puma. Bajo este contexto, se sugiere necesaria más evaluaciones de los genotipos a través del tiempo para confirmar el nivel de tolerancia de la enfermedad, lo que aportaría más elementos para recomendarlos a los genotipos, y tener mayor certidumbre de elegirlos para la siembra en los Valles Altos del centro de México.

Perspectivas y retos

La incidencia de carbón de la espiga es cíclica en la Zona de Transición El Bajío Valles Altos, a partir de la susceptibilidad de híbridos como H 353, H 366, así como otros materiales de empresas privadas, en los años cincuenta. En la investigación oficial, se obtuvieron líneas tolerantes a esta enfermedad, las cuales participaron como progenitoras de híbridos como H 311, de El Bajío y H 135, H 361, H 153, de la Zona de Transición El Bajío Valles Altos. Estos materiales, fueron alternativas para sustituir híbridos como el H 133, que adquirió susceptibilidad a la enfermedad.

En la segunda década del siglo 21, nuevamente hubo presencia de carbón de la espiga, ahora en los Valles Altos, presuntamente por la movilización de materiales genéticos de regiones diferentes a esta zona, que se emplearon comercialmente. Aun así, la presencia no aumento como se temía, controlándose y definiéndose los híbridos que mostraban susceptibilidad.

La incidencia y severidad de tizón están reportadas en Valles Altos y en ambientes con alta humedad relativa, altitudes medias. En los Valles Altos, la producción de maíz (semilla o grano) se hace en tierras con riego o temporal favorable, donde hay periodos de alta humedad relativa y temperaturas frescas (15 a 25 °C); dichas condiciones son importantes para el desarrollo del tizón norteño, por lo que debe prestarse especial atención a esta enfermedad. Conviene mantener el cuidado durante el mejoramiento genético en la investigación pública que se realiza en el INIFAP, así como en la FESC UNAM, para seleccionar materiales tolerantes a carbón de la espiga, así como al tizón foliar.

LITERATURA CITADA

- Airy JM, Tatum AL y Sorenson JW. 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 Marino, P. y Rodríguez, P. Ed. CECSA. México. 274-285 pp.
- Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A, Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays* L.) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29: 39-49.
- Beck LD y Torres FJL. 2005. Desespigamiento. In: Ortiz TC, Espinosa CA, Azpiroz RHS, Sahagún CS. (Comp.). 2005. Producción y tecnología de semillas de maíz del INIFAP para los Valles Altos y zona de transición. INIFAP-CIRCE. Campo Experimental Valle de Toluca. Zinacantepec, Estado de México, México. Libro técnico Núm. 3. 44-55 pp.

- Catálogo Nacional de Variedades Vegetales en línea (CNVV). 2023. Disponible en: <https://lookerstudio.google.com/reporting/5b7206ba-e190-48fe-9696-73523bfccf58/page/itBWB>
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México. 2015. Carbón de la espiga del maíz *Sporisorium reilianum*=*Sphacelotheca reiliana*. Campaña de Manejo Fitosanitario del Maíz. (CESAVEM). www.cesavem.org
- De León C. 1984. Enfermedades del maíz: una guía para la identificación en el campo. CIMMYT. México, D.F. 114 pp.
- Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV-CNRF). 2020. *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. SADER-SENASICA. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha técnica. Tecámac, Estado de México, 16 p.
- Espinosa CA y Carballo CA. 1987. H-135 Nuevo maíz híbrido de riego para la zona de transición El Bajío - Valles Altos. Folleto Técnico No. 1. CAEVAMEX, INIFAP, SARH, Chapingo, México. p. 16
- Espinosa CA. 1989. El nuevo maíz H 149, el más productivo de México. *Agrosintesis* 20(3): 18-25.
- Espinosa CA, Tadeo RM, Medina H, Gutiérrez JR y Luna FM. 2001. Alternativas para favorecer la polinización y producción de semilla del híbrido H -311 de maíz. *Agronomía Mesoamericana* 12(2): 229-235.
- Espinosa CA, Tadeo RM, Lothrop J y Beck D. 2002. H 153 híbrido para riego en la Zona de Transición El Bajío Valles Altos. *Agricultura Técnica en México* 28(2): 179-181.
- Espinosa CA, Tadeo RM, Sierra MM, Turrent FA, Valdivia BR y Zamudio GB. 2009. Rendimiento de híbridos de maíz bajo diferentes combinaciones de semilla androesteril y fértil en México. *Agron. Mesoam.* 20(2): 211-216.
- Espinosa-Calderón A, Tadeo-Robledo M, Virgen-Vargas J, Rojas-Martínez I, Gómez-Montiel N, Sierra-Macias M, Palafox-Caballero A, Vázquez-Carrillo G, Rodríguez-Montalvo FA, Zamudio-González B, Arteaga-Escamilla I, Canales-Islas EI, Martínez-Yañez B y Valdivia-Bernal R. 2012. 'H-51 AE', híbrido de maíz para áreas de humedad residual, buen temporal y riego en Valles Altos Centrales de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35(4): 347-349. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802012000400011&lng=es&tlng=es.
- Espinosa-Calderón A, Tadeo-Robledo M, Zamudio-González B, Virgen-Vargas J, Turrent-Fernández A, Rojas-Martínez I, Gómez-Montiel N, Sierra-Macias M, López-López C, Palafox-Caballero A, Vázquez-Carrillo G, Rodríguez-Montalvo F, Canales-Islas EI, Zaragoza-Esparza JA, Martínez-Yañez B, Valdivia-Bernal R, Cárdenas-Marcelo AL, Mora-García K y Martínez-Nuñez B. 2018. H-47 AE, híbrido de maíz para Valles Altos de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 41(1): 87-89. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.1.87-89>
- Espinosa-Calderón A, Tadeo-Robledo M, Zamudio-González B, Turrent-Fernández A, Gómez-Montiel N y Sierra-Macias M. 2022. H 49 AE: híbrido de maíz para Valles Altos de México con androesterilidad para producción de semilla. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 13(7): 1333-1338. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i7.1768>
- Flaherty JE and Dunkle LD. 2005. Identification and expresión análisis of regulatory genes induced during conidiation in *Exserohilum turcicum*. *Fungal Genetics and Biology* 42 (5). 471-481 pp.
- Félix-Gastélum R, Lizárraga-Sánchez GJ, Maldonado-Mendoza IE, Leyva-Madriral KY, Herrera-Rodríguez G y Espinoza-Matías S. 2018. Confirmación de la identidad de *Exserohilum turcicum*, agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 468-478. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1803-1>
- Grogan CO, Francis CA and Sarvella PA. 1971. Influence of cytoplasmic male sterility on dry matter accumulation in maize. *Crop Sci.* 5:365-367.
- Hooker A. 1977. A second major gene locus in corn chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Sci.* 17: 132-135
- Hurni S, Scheuermann D, Krattinger SG, Kessel B, Wicker T, Herren G, Fitze MN, 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
- Ingold CT. 1994. Products of teliospore germination in *Sporisorium* spp. *Mycological Research* 98: 467-473.
- Kahmann R, Kämper J. 2004. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* 164: 31-42.
- Liu ZP, Long SO, Weingartner M, Stamp U and Kaeser OP. 2002. APCR assay for rapid discrimination of sterile cytoplasm types in maize. *Crop Sci.* 42:566-569.

- Matyac CA and Kommedahl T. 1985. Occurrence of chlorotic spots on corn seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. *Plant Disease* 69: 251-254.
- Martínez RJL y Ledesma 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.
- Martínez C, Roux C and Dargent R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Biochemistry and Cell Biology* 89: 247-253.
- Martínez CA, Roux C, Jauneau A, Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94: 505-514.
- Martínez de la Parte E, Wilson BDL, Guerrero BME, Dalgis D, García RD, Rodríguez GG, Sierra RP y Gómez LY. 2016. El carbón de la espiga del maíz causado por *Sphacelotheca reiliana* (J. G. Kühn) G. P. Clinton en Cuba *Fitosanidad* 20 (1): 33-38.
- Martínez-Nuñez B, Tadeo-Robledo M, Espinosa-Calderón A, García-Zavala JJ, Silva-Rojas HV, Aguilar-Rincón VH y Miranda-Colín S. 2019. Rendimiento de grano y resistencia a tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) de híbridos fértiles y androestériles de maíz. *Agrociencia* 53(1): 73-88.
- Martínez-Nuñez B. 2017. Rendimiento de grano y resistencia a tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) de híbridos fértiles y androestériles de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Disponible en: http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/3925/Martinez_Nunez_B_MC_Genetica_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Montes GN y Díaz FA. 2006. Fitopatología. pp. 192-213. En: L.A. Rodríguez del Bosque (ed.). *Campo Exptl. Río Bravo: 50 años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos*. Cap. 12. Libro Técnico No. 1. Campo Exptl. Río Bravo. INIFAP. Río Bravo, Tamaulipas, México. 325 p.
- Njuguna J., G. M. (1998). Potential for control of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* in CIMMYT maize germplasm. *Sixth East. South. Africa Reg. Maize Conf. NARC Muguga, Nairobi, Kenya*. pp. 67-68.
- Orduño-Cota FJ, Montiel-García MA, Herrera-Rodríguez G, Ruiz-Guzmán AG y Espinoza-Castillo DF. 2015. Distribución, incidencia, severidad y control del tizón foliar del maíz en el norte de Sinaloa. *Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte, SAGARPA*.
- Palacios-Rangel MI y Ocampo-Ledesma JG. 2018. Ing. Gilberto Palacios de la Rosa. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, Edo de México. 147 pp.
- Pataky JK. 1999. Smuts. pp 33-35. In: White D.G. (ed). *Compendium of corn diseases*. 3rd. Edit. St. Paul, MN. APS Press.
- Peña-Ramos A y Gaytan-Bautista R. 2001. H-361: nuevo híbrido de maíz para la región templada del Norte Centro de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 24(1): 131-132
- Pérez CJP, Bobadilla MM, Velásquez CG, Zacatenco GMA, Espinosa CA. 2006. Logros y aportaciones de la investigación en maíz de riego en el Valle del Mezquital, Hidalgo. pp. 55-65. En: *Memorias de veinte años de investigación y desarrollo tecnológico*. Campo Experimental. Pachuca, Hidalgo, INIFAP, Pachuca, México. pp: 55-65.
- Raymundo AD and Hooker AL. 1981. Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses. *Plant Diseases* 65: 325-327.
- Santori M, Nesci A, García J, Passone MA, 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.
- Sillón M. 2008. Enfermedades del cultivo de maíz. En Satorre, L. *Producción de maíz*. Buenos Aires, Argentina. 132 p.
- Tadeo RM, Espinosa CA, Martínez MR, Solano AM and Piña DVA. 1997. Use of CIMMYT germplasm to develop maize hybrids at the UNAM. The genetics and exploitation of heterosis in crops. *An International Symposium. CIMMYT, Mexico city, Mexico*. 240-241 pp.
- Tadeo RM, Espinosa CA, Serrano RJ, Sierra MM, Caballero HF, Valdivia BR, Gómez MN, Palafox CA, Rodríguez MFA y Zamudio GB. 2010. Productividad de diferentes combinaciones de semilla androestéril y fértil en dos híbridos de maíz. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 1(2):273-287.

- Tadeo-Robledo M, Espinosa-Calderón A, Turrent-Fernández A, Zamudio-González B, Valdivia-Bernal R y Andrés-Meza P. 2014. Productividad de grano de cuatro híbridos trilineales de maíz en versión androesteril y fértil. *Agron. Mesoam.* 25(1):45-52.
- Tadeo-Robledo M, Espinosa-Calderón A, García-Zavala JJ, Lobato-Ortiz R, Gómez-Montiel NO, Sierra-Macías M, Valdivia-Bernal R, Zamudio-González B, Martínez-Yañez B, López-López C, Mora-García KY, Canales-Islas EI, Cárdenas-Marcelo AL, Zaragoza-Esparza J y Alcántar- Lugo HJ. 2016. TSIRI PUMA, híbrido de maíz para Valles Altos con esquema de androesterilidad para producción de semillas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39(3): 331-333.
- Tadeo-Robledo M, Espinosa-Calderón A, Zaragoza-Esparza J, López-López C, Canales-Islas EI, Zamudio-González B, Turrent-Fernández A, Virgen-Vargas J, Sierra-Macías M, Gómez-Montiel NO, Mora-García KY, Andrés-Meza P y Cárdenas-Marcelo AL. 2021. Tlaoli Puma, híbrido de maíz para grano y forraje con androesterilidad y restauración de la fertilidad masculina. *Revista Fitotecnia Mexicana* 44 (2): 265 - 267.
- Tadeo-Robledo M, Espinosa-Calderón A, Canales-Islas E, López-López C, Andrés-Meza P y Zamudio-González B. 2022. Atziri Puma: híbrido de maíz de grano blanco para Valles Altos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 13(7). <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i7.2397>
- Téféri A, Petitprez M, Valles V and Albertini L. 1989. Influence of soil water potential and soil texture on infection of maize by head smut. *Agronomie* 9: 677-682.
- White GD. 2004. *Plagas y enfermedades del maíz*. Tercera edición. Ed. Mundi Prensa. Madrid-Barcelona-México. 78 p.



3.6. Ganancia en ciclos de selección recurrente para rendimiento y resistencia a carbón de la espiga en maíz

¹Gelasino Díaz-Ramírez, ¹Carlos De León-García de Alba*, ¹Daniel Nieto-Ángel, ²Ma. del Carmen Mendoza-Castillo, ¹Programa de Fitosanidad-Fitopatología, ²Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Carretera México- Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230, México. *Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx

Resumen

El basidiomiceto *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* infecta al cultivo de maíz y causa importantes pérdidas en regiones donde existen condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad. En este trabajo se evaluó la respuesta a la selección de seis ciclos de selección recurrente de maíces de endospermo blanco y cinco ciclos de maíces de endospermo amarillo para caracteres agronómicos deseables, rendimiento de grano y resistencia al carbón de la espiga. Los diferentes ciclos en las dos poblaciones se obtuvieron siguiendo el método de selección recurrente de familias S_1 , los cuales fueron evaluados para determinar el avance genético. En un ensayo anexo, las poblaciones fueron inoculadas artificialmente para medir el progreso de la resistencia a la enfermedad y evaluar un nuevo método de inoculación. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones para el ensayo de rendimiento y dos repeticiones para el ensayo inoculado. Los ciclos evaluados en las dos poblaciones mostraron un incremento en la resistencia de 0.94 y 1.2% ciclo⁻¹, una ganancia genética para rendimiento de grano de 272.9 y 620 kg ha⁻¹ ciclo⁻¹ para la población blanca y amarilla, respectivamente. Los resultados mostraron que la selección recurrente de familias S_1 fue eficiente para mejorar el rendimiento de grano y resistencia al carbón de la espiga en ambas poblaciones.

Palabras claves: Familias S_1 , resistencia poligénica, resistencia genética, carbón de la espiga.

El maíz (*Zea mays*) es ampliamente cultivado en el mundo, superando en producción al trigo y al arroz (FAOSTAT, 2018), es el cereal con mayor demanda como producto alimenticio, para consumo humano y animal, así como materia prima para la industria (Eckhoff *et al.*, 2003; Kaul and Olakh, 2019); sin embargo, su producción se ve afectada por plagas y enfermedades. Una de las enfermedades fúngicas de importancia económica es el carbón de la espiga causado por el basidiomiceto *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae* (Basidiomycota, Ustilaginaceae), sin. *Sphacelotheca reiliana*, que se encuentra distribuido en varias regiones del mundo productoras del cereal (Stromberg, 1981; Lynch *et al.*, 1980; Martínez de la Parte *et al.*, 2016; Bernardo *et al.*, 1992; Fullerton *et al.*, 1974). En México, se tienen reportes de su presencia en zonas del Bajío y valles altos (Aquino *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2011).

El inóculo se encuentra en el suelo y en las primeras etapas de infección, la hifa infectiva penetra por la raíz de la plántula e invade los haces vasculares y crece sistemáticamente a través del floema (Kruger, 1962; Qi *et al.*, 2019). En la etapa de crecimiento vegetativo, los síntomas son difíciles de observar; sin embargo, algunos autores han reportado manchas cloróticas en las hojas (Matyac y Kommendhal, 1985; Martínez *et al.*, 2002; Quezada-Salinas *et al.*, 2017) y enanismo (Stromberg *et al.*, 1984; Halisky, 1963). En la etapa reproductiva de la planta los síntomas y signos se hacen visibles en ambas inflorescencias, cuyas flores son reemplazadas por una masa carbonosa pulverulenta compuesta por teliosporas o produciendo filodia en las estructuras afectadas, causando pérdidas de rendimiento (Stromberg *et al.*, 1984; Matyac, 1985; Martínez *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2019). En México, el control de la enfermedad ha sido principalmente con productos químicos, prácticas culturales (CESAVEM, 2015) y por la evaluación de genotipos tolerantes mediante infección natural (Pérez-Camarillo y Bobadilla-Meléndez, 2003 y 2007; Pérez-Camarillo *et al.*, 2009; Aquino *et al.*, 2011). La mayoría de los programas de mejoramiento genético están enfocados a incrementar el rendimiento de grano y existen pocos reportes de programas diseñados para seleccionar resistencia a enfermedades en el cultivo de maíz.

Un esquema de mejoramiento genético eficiente para la generación de cultivares resistentes a plagas y enfermedades es la selección recurrente de familias S_1 . Este método es reconocido ya que incrementa la frecuencia de alelos favorables de uno o más caracteres agronómicos que se heredan de

manera cuantitativa y porque elimina 50% de los alelos indeseables después de cada autofecundación, permitiendo fijar caracteres de interés que se heredan de forma aditiva (Márquez, 1985; Hallauer *et al.*, 2010). Este método es recomendado para caracteres de baja heredabilidad ya que mejora la media poblacional y mantiene la variabilidad genética de la población, lo que permite continuar la selección a través de los ciclos de mejoramiento. Para realizar un ciclo de selección recurrente de familias S_1 se llevan a cabo los siguientes pasos: 1) Obtención de familias S_1 , autofecundando 400 plantas sanas, vigorosas, de una población de amplia base genética, 2) Evaluación de las familias S_1 en diferentes ambientes y 3) Recombinación de las mejores familias S_1 con características superiores o de interés para el mejorador (Márquez, 1985; Hallauer *et al.*, 2010).

También existe la posibilidad de que en un mismo ciclo se lleve a cabo la evaluación y recombinación de las familias S_1 , reduciendo costo y tiempo; sin embargo, se debe considerar si el carácter de interés se expresa antes de la floración (Dhillon y Khehra, 1989). Por lo anteriormente mencionado, el objetivo de éste trabajo fue evaluar seis ciclos de selección recurrente de maíz con endospermo blanco y cinco ciclos con endospermo amarillo para determinar su rendimiento de grano, resistencia al carbón de la espiga y caracteres agronómicos de interés incluyendo severidad en roya mediante infección natural, sincronía floral, relación altura de planta y mazorca y aspecto de planta, entre otros, así como evaluar un método de inoculación que facilite la adherencia de las teliosporas en la semilla y asegurar la distribución del inóculo en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio

La evaluación de la ganancia en los ciclos de selección se llevó a cabo en parcelas del Centro de Innovación y Desarrollo Tecnológico de Cinta Larga, en Mixquiahuala, Estado de Hidalgo (20° 11' N, 99° 14' W, 2100 msnm). La siembra se realizó manualmente el 28 de marzo en el ciclo agrícola primavera-verano 2019, en condiciones de temporal. La evaluación agronómica de campo se realizó en el estado de Hidalgo y las actividades de laboratorios descritas en éste trabajo se hicieron en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México.

Germoplasma de maíz evaluado

Los materiales genéticos evaluados en ésta investigación fueron seis ciclos de mejoramiento (C_0 a C_5) de una población con endospermo blanco y cinco ciclos (C_0 a C_4) de una población con endospermo amarillo. Las poblaciones base de endospermo blanco y amarillo incluyeron 45 y 55 colectas de diverso germoplasma, incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y poblaciones nativas, colectadas en la región del altiplano de México. Los diferentes componentes que entraron en la formación de las poblaciones base se recombinaron en lotes aislados durante dos ciclos consecutivos, en el Ejido Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, Edo. de México ($19^\circ 13' N$, $100^\circ 107' W$, 1740 msnm), sembrando en un lote aislado dos surcos de 10 m de largo de cada uno de los componentes colectados que se usaron como hembras, alternando con un surco de macho que estuvo constituido por un compuesto balanceado de semillas de todos los materiales usados como hembra.

Después de dos ciclos de recombinación en aislamiento para su homogenización, se inició el método de selección recurrente intrapoblacional de familias S_1 en ambas poblaciones. Cada ciclo se completó en dos años. Año uno: en cada una de las poblaciones de grano blanco o amarillo se autofecundaron 400 plantas para obtener las familias S_1 de cada población. Durante el ciclo del cultivo y hasta la cosecha se eliminaron plantas con características indeseables. Año dos: semillas de las mejores 60-70 familias S_1 se inocularon con teliosporas del carbón de la espiga (*S. reilianum*) de acuerdo a Quezada-Salinas *et al.* (2013) y se sembraron en campo donde cada surco constituyó una familia. Del total de familias S_1 en evaluación se aplicó una presión de selección de 33%. Así, se seleccionaron y recombinaron las 60-70 mejores familias S_1 de cada población. Las mejores plantas de cada familia seleccionada, con características deseables, sanas, libres de síntomas de carbón de la espiga y de roya (*Puccinia sorghi*) se recombinaron manualmente con mezcla de polen. Una mezcla mecánica balanceada de semilla de las 60-70 familias recombinadas formaron el siguiente ciclo (C_1). Esta secuencia se repitió para obtener los seis ciclos de la población blanca y los cinco ciclos de la población amarilla, evaluados en este trabajo.

Para los ensayos de evaluación de los diferentes ciclos de selección se utilizó un diseño experimental bloques completos al azar, con tres repeticiones, en surcos de 3 m de largo y 80 cm de distancia entre surcos, 16 cm entre plantas

y 44 plantas por surco, para ajustar a 22, y tener una densidad de 80 000 plantas ha⁻¹. Cada surco constituyó una parcela útil. La preparación del terreno y las labores de manejo del cultivo fueron realizadas por personal del Centro de Innovación y Desarrollo Tecnológico de Cinta Larga, estado de Hidalgo. Después de la siembra se dio un riego rodado y posteriormente uno o dos cada mes dependiendo de las lluvias. El control de maleza se realizó con cuatro aplicaciones del herbicida (sal de potasio del ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico y 6-Cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5, triazina-2,4 diamina). No hubo necesidad de aplicar fertilizante ni realizar control de plagas y enfermedades.

Ensayos con inoculación artificial en la población de maíz blanca y amarilla

Para evaluar las ganancias genéticas por ciclo de mejoramiento de resistencia al carbón de la espiga, se incluyeron dos repeticiones de las poblaciones con semilla inoculada con teliosporas de *S. reilianum*. El inóculo se colectó en septiembre de 2018, a partir de plantas infectadas de maíz del ciclo anterior en el campo de Cinta Larga, Municipio de Mixquiahuala, Hidalgo. Las plantas de donde se obtuvo el inóculo se secaron por siete días en invernadero, recuperando las teliosporas con un tamiz de 117 µm y se almacenaron a 20 ± 2 °C para su uso posterior. Semillas de cada ciclo de ambas poblaciones se trataron con una suspensión de 1x10⁶ teliosporas mL⁻¹ inmersas en pegamento blanco (Acetato de polivinilo= Resistol 85®) diluido a 20% con agua (v/v) secándolas por 2 h a 35 ± 2 °C. La incidencia de carbón se evaluó en los seis ciclos de las poblaciones de endospermo blanco y los cinco ciclos de las de endospermo amarillo. El propósito de éste ensayo fue evaluar la incidencia del carbón de la espiga con inoculación artificial y evaluar la eficiencia del pegamento blanco usado como adherente de las teliosporas a las semillas. Se aplicaron las mismas condiciones, diseño y manejo que para el ensayo de rendimiento.

Para evaluar las diferencias y ganancias obtenidas entre los diferentes ciclos de mejoramiento, se determinaron las siguientes variables:

- 1) Días a floración masculina (antesis): Se determinó el número de días desde la fecha de siembra hasta que 50% de las plantas en la parcela iniciaron la emisión de polen.
- 2) Días a floración femenina (emisión de estigmas): se tomó el número de días desde la fecha de siembra hasta que 50% de las plantas mostraban exposición de estigmas.
- 3) Altura de planta (cm): Se midió la altura desde la base del tallo hasta el nudo de inserción de la inflorescencia masculina.
- 4)

La altura de la mazorca (cm) se midió desde la base del tallo hasta la base de la mazorca principal. 5) Humedad del grano: Se determinó por parcela, tomando 500 g de semillas de la parte central de cinco de las mejores mazorcas. La humedad de grano se determinó con el medidor de humedad Dickey John miniGAC plus. Para el análisis, el rendimiento de grano se ajustó a 15% de humedad y se convirtió a t ha⁻¹. 6) Severidad de la roya. Los datos se tomaron en la etapa de floración usando una escala arbitraria de 1 a 5 en donde 1: No daño (tejido foliar 100% sano), 2: pocas lesiones (90% sano), 3: regular (80% sano), 4: malo (60 - 70% sano) y 5: muy malo (0 - 60% sano). 7) Incidencia del carbón de la espiga. La respuesta a la infección se determinó unos días después de la emisión de ambas inflorescencias. La incidencia se determinó en porcentaje (No. de plantas enfermas entre el número total de plantas de cada parcela x 100). Las variables estudiadas se realizaron de acuerdo a IBPGR (1991) y Edmeades *et al.* (2000).

Análisis estadísticos

Todos los datos se analizaron con el software estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.4) (SAS Institute Inc., 2013), usando el procedimiento PROG GLM y PROG REG para la obtención de la regresión lineal. Se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias DMS con $\alpha \geq 0.05$.

RESULTADOS

Ensayo de rendimiento en la población blanca y amarilla

Por problemas de baja germinación no se incluyó el ciclo dos (C₂) de las dos poblaciones. El Cuadro 1 muestra las medias para los diferentes caracteres evaluados. Para las variables altura de planta y mazorca e incidencia del carbón de la espiga no hubo diferencias significativas con base en la prueba de medias DMS (0.05) en ambas poblaciones. Para los caracteres días a floración masculina y femenina se observaron diferencias significativas entre los ciclos de selección en las dos poblaciones. Para la población de endospermo amarillo las variables severidad en roya y rendimiento de grano mostraron diferencias significativas, no así, en la población de endospermo blanco. De

Cuadro 1. Medias para los diferentes caracteres evaluados en la población de maíz de endospermo blanco y amarillo.

Ciclos de selección	Días a floración masculina	Días a floración femenina	Población endospermo blanco				Rendimiento t ha ⁻¹
			Altura de planta (cm)	Altura de mazorca (cm)	Severidad en roya (1-5)	Incidencia carbón de la espiga (%)	
C ₀	87.3 a	91.0 a	180.0 b	113.3 a	2.8 a	12.6 a	11.2 a
C ₁	79.3 b	82.6 b	195 ab	113.3 a	1.6 b	10.7 a	11.4 a
C ₃	77.0 b	81.6 b	190 b	108.3 a	1.5 b	10.2 a	12.2 a
C ₄	79.6 b	82.3 b	196.6 ab	116.6 a	1.5 b	8.5 a	11.6 a
C ₅	79.6 b	83.3 b	196.6 ab	120.0 a	1.8 ab	9.0 a	12.4 a
DMS (0.05)	2.9	2.6	19.9	23	1	16.6	4.5
			Población endospermo amarillo				
C ₀	87.3 a	91.3 a	208.3 a	121.6 b	3.6 a	14.2 a	12.5 b
C ₁	79.0 bc	83.3 bc	206.6 a	121.6 b	2.0 b	8.3 a	12.3 b
C ₃	78.6 bc	81.0 bc	215.0 a	138.3 a	1.5 b	12.5 a	12.2 b
C ₄	82.0 b	84.6 b	220.0 a	123.3 b	1.6 b	8.8 a	14.6 a
DMS (0.05)	3.6	4	35	13.4	1	28	2

las variables que no mostraron una respuesta estadísticamente significativa, los ciclos avanzados de selección expresan una mejora con respecto a los ciclos iniciales. Para una mejor apreciación del comportamiento de los caracteres evaluados de los diferentes ciclos en ambas poblaciones, los datos se sometieron a un análisis de regresión lineal para realizar el cálculo correspondiente de ganancia promedio por ciclo (Cuadro 2). Para el carácter altura de mazorca se observó un incremento de 3.5 y 4.3 cm ciclo⁻¹ y para altura de planta también hubo un incremento de 1.7 y 2.2 cm ciclo⁻¹ en la población de endospermo blanco y amarillo, respectivamente. Para días a floración masculina se observó una disminución de -1.51 y -1.6 días ciclo⁻¹ y para floración femenina

Cuadro 2. Respuesta a la selección en las poblaciones de endospermo blanco y amarillo.

Carácter	Población endospermo blanco			Población endospermo amarillo		
	^x b	^y I	^z R ²	b	I	R ²
Días a floración masculina	-1.51	85.0	0.4	-1.63	85.8	0.30
Días a floración femenina	-1.8	88.9	0.4	-2.24	90.6	0.50
Altura de planta (cm)	3.48	181.2	0.61	4.35	201.6	0.82
Altura de mazorca (cm)	1.67	109.3	0.4	2.18	120.7	0.20
Severidad roya (1-5)	-0.21	2.47	0.4	-0.65	3.80	0.75
Incidencia del carbón (%)	-0.94	13.02	0.86	-1.2	13.95	0.30
Rendimiento (t ha ⁻¹)	0.2729	10.9	0.63	0.62	11.35	0.5

^x Coeficiente de regresión (b); ^y intercepto (I); ^z coeficiente de determinación (R²).

-1.8 y -2.2 días ciclo⁻¹ en las dos poblaciones, lo que indica que conforme se avanza en los ciclos de selección las poblaciones tienden a ser precoces. En severidad de roya se obtuvo una reducción de -0.2 y -0.6 ciclo⁻¹ (Figura 1). Para la variable incidencia del carbón de la espiga se encontró una disminución de -0.9% ciclo⁻¹ en la población de endospermo blanco y -1.2% ciclo⁻¹ en la de endospermo amarillo (Figura 1). Para el carácter rendimiento de grano hubo un incremento de 0.3 y 0.6 t ha⁻¹ por ciclo para la población blanca y amarilla, respectivamente (Figura 1).

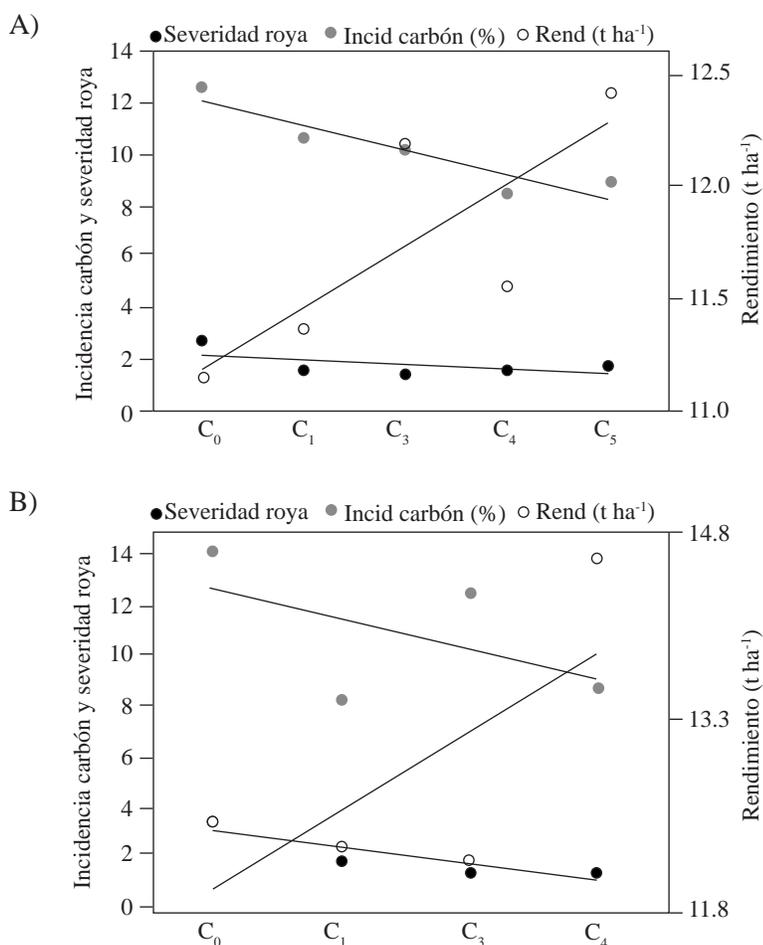


Figura 1. Regresión lineal para las variables severidad en roya, incidencia del carbón de la espiga y rendimiento de grano. Población de maíz de endospermo blanco (A) y población de maíz endospermo amarillo (B).

DISCUSIÓN

La selección S_1 recurrente fue efectiva para la mayoría de los caracteres evaluados en las poblaciones blanca y amarilla, principalmente para rendimiento de grano y resistencia al carbón de la espiga (*S. reilianum*). Resultados similares se han encontrado en otros trabajos donde el método de mejoramiento también fue la selección recurrente de familias S_1 . Rodríguez y Hallauer (1988) evaluaron 10 poblaciones usando diferentes métodos de selección, concluyeron que el método de familias S_1 fue mejor que los otros métodos evaluados. La respuesta a la selección para rendimiento de grano fue inferior a la obtenida por Ruiz de Galarreta y Álvarez (2007), pero similar a lo reportado por Tanner y Smith (1987) y Maya-Lozano y Ramírez-Díaz (2002), quienes reportan al menos una respuesta negativa a la selección similar a lo obtenido en éste trabajo, donde altura de planta y mazorca no mostraron una respuesta a la selección.

También, existen reportes en los que se indica que dependiendo del tamaño de la población base, la evaluación de las progenies y el método de recombinación empleado son variables que modifican la respuesta a la selección (Hallauer *et al.*, 2010). Kebede (2001) sugiere que, para evitar la deriva genética, se deben usar 30 familias en caso de pretender llevar a cabo cinco, o más ciclos de selección. Weyhrich *et al.* (1998), mencionan que la deriva genética es más fuerte cuando se usan menos de 10 familias en la recombinación. En éste trabajo se seleccionaron 60-70 familias por ciclo, lo que asegura mantener la variabilidad genética.

Con respecto a la resistencia al carbón de la espiga (*S. reilianum* f. sp. *zea*), esta se hereda de forma aditiva y es parcialmente dominante (Whythe y Gevers, 1988). En el presente trabajo se obtuvo un incremento en la resistencia de 0.94 % ciclo⁻¹ en la población blanca y 1.2 % ciclo⁻¹ en la población amarilla. Lo que indica que conforme se avanzan en los ciclos de mejoramiento se van acumulando genes de manera aditiva con cada ciclo obtenido. La resistencia está dada por los genes *zmWAK*, *zmNL* y *GRMZM2G047152* que se expresan en las primeras etapas del proceso de infección en donde inhiben la dispersión de la hifa infectiva del hongo *Sporisorium reilianum* f. sp. *zea* (Zuo *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

El método de selección recurrente de familias S_1 fue efectivo para incrementar el rendimiento de grano 272.9 kg ha ciclo⁻¹ y la resistencia al carbón de la espiga 0.94 % ciclo⁻¹ en la población de endospermo blanco y 620 kg ha ciclo⁻¹ y 1.2 % ciclo⁻¹ en la resistencia al carbón de la espiga para la población de endospermo amarillo.

Todas las otras variables consideradas en la presente investigación mostraron una respuesta positiva a la selección, excepto para altura de planta y altura de mazorca en las dos poblaciones, por lo que el manejo de las poblaciones para obtener los siguientes ciclos se debe aplicar una mayor presión de selección hacia estos caracteres.

La inoculación artificial a la semilla usando pegamento blanco a 20 % v/v como adherente fue eficiente para inducir una infección uniforme en campo.

LITERATURA CITADA

- Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A y Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays* L.) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29: 39-49. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000100004
- Bernardo R, Bourrier M and Oliver JL. 1992. Generation means analysis of resistance to head smut in maize. *Agronomie* 12(4): 303-306. <https://doi.org/10.1051/agro:19920403>
- CESAVEM (Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México). 2015. Campaña manejo fitosanitario del maíz. 8p. <http://www.cesavem.mx/img/fitosanitariodelmaiz/maiz2.pdf>
- Dhillon BS and Khehra AS. 1989. Modified S_1 recurrent selection in maize improvement. *Crop Science* 29: 226-228. <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900010049x>
- Eckhoff SR, Paulsen MR and Yang SC. 2003. Maize. pp 3647-3653. In: Caballero B, Finglas P and Toldra F. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd Edition. Academic Press. 6000p. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00725-2>
- Edmeades GO, Bolaños J, Elings A, Ribaut JM, Bänziger M and Westgate ME. 2000. The role and regulation of the anthesis silking interval in maize. In: Westgate M, Boote K, Kniewel D and Kiniry J (eds.). *Physiology and modeling kernel set in maize*. Crop Science Society of America and the American Society of Agronomy 48: 65-80. <https://doi.org/10.2135/cssaspepub29.c4>
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database). 2018. Producción mundial de maíz. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.
- Fullerton RA, Scott DJ and Graham GJ. 1974. Effect of fungicides on the control of head smut of maize and the relationship between infection level and crop yield. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* 2: 177-179. <https://doi.org/10.1080/03015521.1974.10425757>
- Hallauer AR, Carena MJ and Miranda JB. 2010. *Quantitative Genetics in Maize Breeding, Handbook of Plant Breeding*. New York: Springer Science and Business Media. 663p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0766-0>

- Halisky PM. 1963. Head smut of sorghum, sudan grass, and corn, caused by *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. *Journal of Agricultural Science* 34(8): 287-304. <http://dx.doi.org/10.3733/hilg.v34n08p287>
- IBPGR. 1991. Descriptors for Maize. International Maize and Wheat Improvement Center, México City/International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 85p.
- Kaul J, Jain K and Olakh D. 2019. An overview on role of yellow maize in food, feed and nutrition security. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(2): 3037-3048. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.802.356>
- Kebede PM. 2001. Response to S_1 recurrent selection and estimation of genetic parameters in effective population sizes of the BS11 maize population. Retrospective theses and dissertations. 663p. <https://doi.org/10.31274/rtd-180813-14332>
- Kruger W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. I. Infection and control studies. *South African Journal of Agricultural Science*. 5: 43-56. https://hdl.handle.net/10520/AJA05858860_650
- Lynch KV, Edgington LV and Busch LV. 1980. Head smut, a new disease of corn in Ontario. *Canadian Journal Plant Pathology* 2: 176-178. <https://doi.org/10.1080/070606680095014371B>
- Márquez SF. 1985. Genotecnia vegetal: Métodos, teoría, resultados. Tomo I. México D.F. AGT Editor, S. A. 357p.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology* 75: 577-581. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n05_577.PDF
- Martínez CA, Roux A, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94: 505-514. <http://dx.doi.org/10.1080/15572536.2003.11833215>
- Martínez-de la Parte E, Wilson BD, Lorenzo ME, Guerrero BD, García RD, Rodríguez GG, Sierra RP y Gómez LY. 2016. El carbón de la espiga del maíz causado por *Sphacelotheca reiliana* (J|G. Kühn) GP. Clinton en Cuba. *Fitosanidad* 20(1): 3-38. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209157223005>
- Maya-Lozano JB y Ramírez-Díaz JL. 2002. Selección recurrente en tres poblaciones de maíz para el subtropico de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25(2): 201-207. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/25-2/11a.pdf>
- Pérez-Camarillo JP y Bobadilla-Meléndez M. 2007. Carbón de la espiga de maíz. Síntesis de resultados del ciclo agrícola P.V. 2006. Valle del Mezquital, Hgo. Desplegable Técnica Número 15. Centro de Investigación Regional Centro. INIFAP-Hidalgo. 2 p.
- Pérez-Camarillo JP y Bobadilla-Meléndez M. 2003. Carbón de la espiga de maíz. Síntesis de resultados del ciclo agrícola P.V. 2002. Valle del Mezquital, Hgo. Desplegable Técnica Número 6. Centro de Investigación Regional Centro. INIFAP-Hidalgo. 4 p.
- Pérez-Camarillo JP, Martínez-Ruiz E y Bobadilla-Meléndez M. 2009. Carbón de la espiga de maíz. Síntesis de resultados del ciclo agrícola P.V. 2008. Valle del Mezquital, Hgo. Desplegable Técnica Número 21. Centro de Investigación Regional Centro. INIFAP-Hidalgo. 4 p.
- Quezada-Salinas A, De León-García De Alba C, Hernández-Anguiano AM y Nava-Díaz C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2): 80-90. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n2/v31n2a1.pdf>
- Quezada-Salinas A, Moreno-Velázquez M, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C, Solano-Báez AR. 2017. Resistencia genética a *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en líneas seleccionadas de maíz (*Zea mays* L.) con endospermo blanco y amarillo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 534-548. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1705-2>
- Qi F, Zhang L, Dong X, Di H, Zhang J, Yao M, Dong L, Zeng X, Liu X, Wang Z and Zhou Y. 2019. Analysis of Cytology and Expression of Resistance Genes in Maize Infected with *Sporisorium reilianum*. *Plant Disease* 103(8): 2100-2107. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1687-RE>
- Ramírez Dávila JF, Sánchez Pale JR y De León C. 2011. Estabilidad espacio temporal de la distribución del carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum*) en el Estado de México, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29: 1-14. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n1/v29n1a1.pdf>
- Rodríguez OA and Hallauer AR. 1988. Effects of recurrent selection in corn populations. *Crop Science* 28: 276-280. <https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183X002800050015x>

- Ruiz de Galarreta JI and Álvarez RA. 2007. Six cycles of S_1 recurrent selection in two Spanish maize synthetics. Spanish Journal Agriculture Research 5(2): 193-198. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2007052-239>
- SAS (Statistical Analysis System). 2013. The SAS system. Version 9.4. SAS OnlineDoc. HTML. Format, SAS Institute, Cary, NC, USA
- Stromberg EL, Stienstra WC, Kommedahl T, Matyac CA, Windels CE and Geadelmann JL. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. Plant Disease 69: 880-884. <https://doi.org/10.1094/PD-68-880>
- Stromberg EL. 1981. Head smut of maize, a new disease in Minnesota. Phytopathology 71: 906.
- Tanner AH and Smith OS. 1987. Comparison of half-sib and S_1 recurrent selection in the Krug yellow dent maize populations. Crop Science 27: 509-513. <https://doi.org/10.2135/cropsci1987.0011183X002700030016x>
- Weyhrich RA, Lamkey KR and Hallauer AR. 1998. Effective population size and response to S_1 progeny selection in the BS11 maize population. Crop science 38(5): 1149-1158. <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800050008x>
- Whyte IV and Gevers HO. 1988. Diallel analysis of resistance of eight maize inbred lines to *Sphacelotheca reiliana*. Phytopathology 78: 65-68. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n01_65.PDF
- Zuo W, Chao Q, Zhang N, Ye J, Tan G, Li B, Xing Y, Zhang B, Liu H, Fengler K, Zhao J, Zhao X, Chen Y, Lai J, Yan J and Xu M. 2015. A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut. Natural Genetic 47: 151-57. <https://doi.org/10.1038/ng.3170>

3.7. 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; **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.

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 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).

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%), predominando 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, Ustilagi-

naceae) 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 distribuida en las zonas productoras de maíz con clima subtropical del mundo (Martínez *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 diplode. 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 (Martínez *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 (Martínez *et al.*, 2002). Posteriormente, mediante el apareamiento de células compatibles, se forma la fase parasítica diploide (Martínez *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 (Martínez *et al.*, 2001). El micelio crece sistémicamente con el meristemo hasta que, después de la esporogénesis, las inflorescencias son remplazadas total o 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 identifica-

ción 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. *zcae*. 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. *zcae*. 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.

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-Liconá *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).

Cuadro 1. Origen geográfico de las 55 poblaciones de maíz nativo colectadas y caracterizadas por 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

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 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 Macrogen Europe, Amsterdam, Holanda. La calidad de las secuencias se determinó mediante la observación de los electroferogramas usando el software 4peaks[®] Nucleobytes (Griekspoor y Groothuis, 1994), mientras que las secuencias 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-Liconá *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" 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 escases 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 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* 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 obscuridad 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-Licona *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

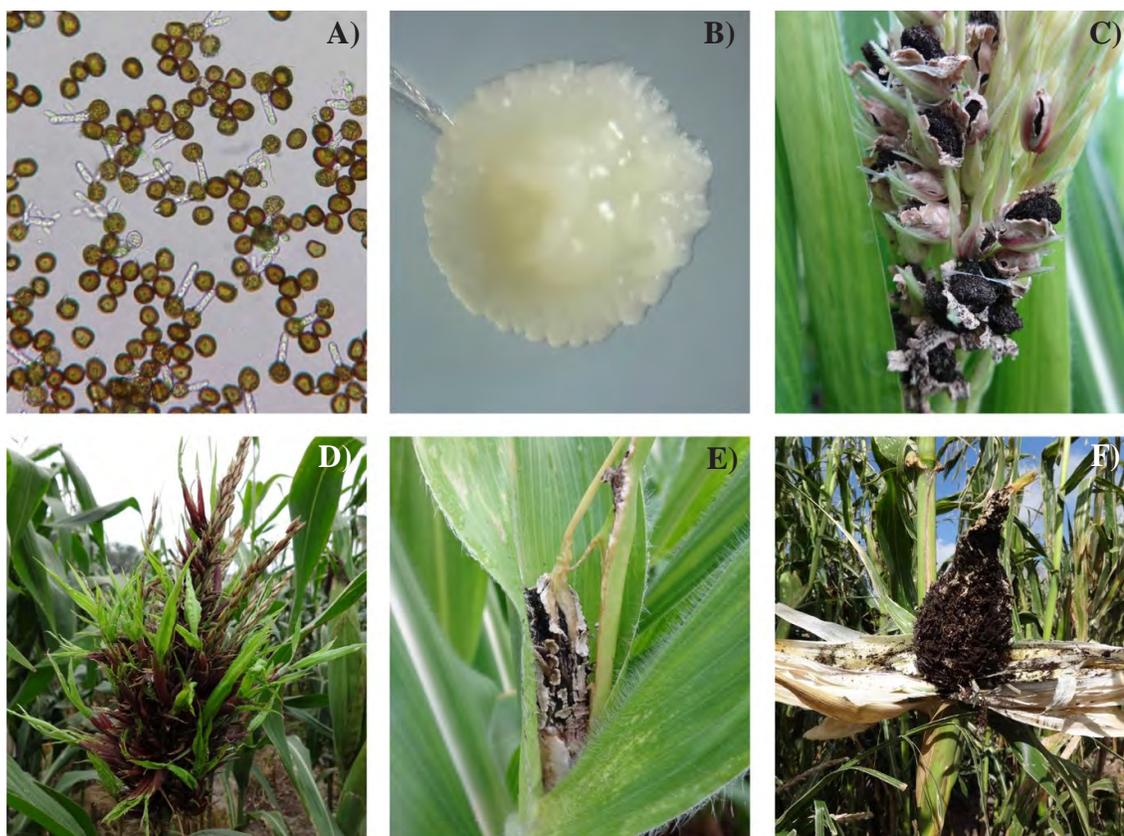


Figura 1. *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae*. A) Teliosporas germinadas en PDA 24 h después de la siembra. B) Cultivo monobasidial en PDA 5 días después de la siembra. C) Reemplazo parcial de la inflorescencia masculina. D) Síntomas de filodia en plantas enfermas. E) Atrofia de la inflorescencia masculina.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

suelo, mientras que las plantas provenientes de semilla inoculada mostraron formación de soros llenos de teliosporas que reemplazaron 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).

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 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 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

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).

Estado	Líneas enfermas (2015)					Líneas enfermas (2016)				
	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.

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 × 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.

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).

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		

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 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

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.

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.

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.

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).

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 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 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 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

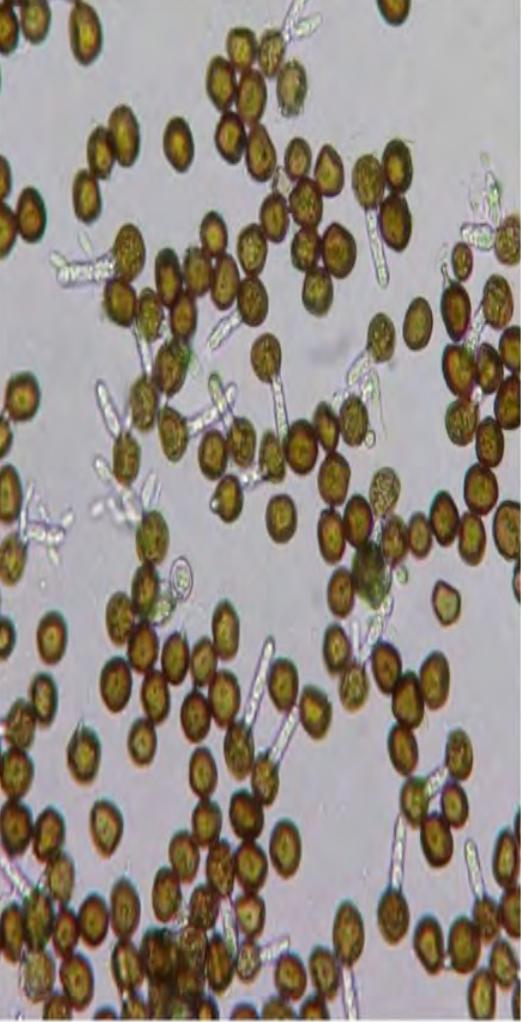
Existe variación en la respuesta de germoplasma nativo de maíz a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae*. dependiendo de su origen geográfico. La variación en la respuesta de las poblaciones a la infección sugiere la presencia de genes de resistencia al patógeno en las poblaciones que no fueron 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 Fitopatología* 29: 39–49. 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, Eguiarte 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=C rZQYgEACAAJ&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/
- 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-Madrugal 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, Kolalík 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>
- Martinez 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>
- Martinez 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>
- Martinez C, Roux C, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94(3): 505–514. <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
- 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&pid=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
- 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=0ahUKEwj02MrVw4TpAhVEI6wKHWeZAN0Q6AEIJzAA>
- 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
- 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>



3.8. Resistencia genética a *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* en líneas seleccionadas de maíz (*Zea mays* L.) con endospermo blanco y amarillo

Andrés Quezada-Salinas, Magnolia Moreno-Velázquez, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Unidad Integral de Diagnóstico, Servicios y Constatación. Carretera Federal México-Pachuca km. 37.5, Tecámac, Edo. Méx., C.P. 55740, México; Carlos De León-García de Alba*, Cristian Nava-Díaz, Alma Rosa Solano-Báez, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. Méx., C.P. 56230, México. *Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Resumen

El carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) del maíz (*Zea mays* L.) es una enfermedad de gran importancia que se presenta en zonas productoras de maíz, incluyendo los Valles del Mezquital y Toluca. El objetivo del presente estudio fue identificar líneas C₂-S₁ y C₂-S₂ de maíz adaptadas al Altiplano de México para ser utilizadas en un programa de mejoramiento de resistencia y buenas características agronómicas. Semillas de cada línea se inocularon con una suspensión de 1.7x10⁷ mL⁻¹ teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* en 1% de carboximetilcelulosa de sodio y se sembraron en invernadero. Las plantas fueron monitoreadas hasta la formación de espiga, donde se evaluó la incidencia. En 258 líneas C₂-S₁ de endospermo blanco se presentó hasta 92.3% de incidencia y hasta 41.7% en 71 líneas de endospermo amarillo. Con base en la incidencia y características agronómicas, se seleccionaron y autofecundaron en campo 38 líneas C₂-S₁ de endospermo blanco y 24 de endospermo amarillo. Un total de 123 y 114 líneas C₂-S₂ de endospermo blanco y amarillo, respectivamente, fueron inoculadas con teliosporas del patógeno y presentaron una incidencia de la enfermedad de hasta 42.8% y 28.5%, respectivamente. La inoculación con teliosporas y siembra en invernadero permitió identificar líneas de maíz con diferente porcentaje de infección y seleccionar las líneas resistentes, probando la eficiencia de ésta técnica.

Palabras clave: *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, *Zea mays*, carbón de la espiga, inoculación de semilla, líneas resistentes.

INTRODUCCION

El maíz (*Zea mays* L.) es susceptible a enfermedades en diferentes etapas de su desarrollo. El carbón de la espiga, causado por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon y Fullerton, sinónimo *Sphacelotheca reiliana* (Khün) Clint. (Matyac y Kommedahl, 1985a; Matyac y Kommedahl, 1985b) es un problema serio desde la década de 1970 en EE.UU., México, Australia, China, Sudáfrica y Francia (Stromberg, 1981; Bernardo *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 2000).

Los síntomas del carbón de la espiga son visibles en la floración, aun cuando el patógeno infecta la raíz durante la germinación y primeras etapas de desarrollo de la plántula (Martínez *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2015). El micelio infectivo invade sistémicamente los tejidos, hasta llegar al meristemo apical (Frederiksen y Reyes, 1980; Martínez *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2015). El daño principal lo ocasiona durante la floración, cuando el micelio establecido en el meristemo produce soros que reemplazan granos en mazorca (inflorescencia femenina) y anteras. Al madurar, los soros liberan las teliosporas, que caen al suelo y el aire las transporta a distancias cortas (Montes y Díaz, 2006; Ghareeb *et al.*, 2011).

Debido a que el inóculo se encuentra en el suelo de cultivo, los esfuerzos por combatir a ésta enfermedad se enfocan en evitar la infección durante el desarrollo de la plántula. Para esto, se utilizan estrategias de control como el tratamiento de semilla con fungicidas (Stienstra *et al.*, 1985; Martínez y Ledesma, 1990; Pradhanang y Ghimire, 1996; Wright *et al.*, 2006), prácticas culturales (Mack *et al.*, 1984; Matyac y Kommedahl, 1985a) y la resistencia del hospedante (Baggett y Koepsell, 1983; Stromberg *et al.*, 1984; Song *et al.*, 2000; Aquino *et al.*, 2011). Esta última es la estrategia más conveniente evitando daños ecológicos y reducir costos de producción.

Entre los estudios efectuados para identificar genotipos resistentes al carbón de la espiga destacan los realizados en Sudáfrica (Krüger, 1962), EE.UU. (Baggett y Koepsell, 1983), Kenya (Njuguna y Odhiambo, 1989), Francia (Lübbertstedt *et al.*, 1999) y China (Duan *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2008). En México, a pesar de ser una enfermedad importante en los Valles Altos (Estados de Hidalgo y de México), los programas de mejoramiento no contemplan la selección para resistencia y solamente se han enfocado a determinar porcentajes de incidencia en híbridos y variedades de maíz (Pérez y Bobadilla, 2002

y 2003; Aquino *et al.*, 2011), en condiciones de infección natural (Quezada *et al.*, 2013).

En 2006 y 2007, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria (SENASICA), la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) y el Colegio de Postgraduados (CP), crearon los proyectos de mejoramiento genético PM0531 y PM0542 en los que se incluyó la selección de poblaciones y líneas de maíz con resistencia al carbón de la espiga para los Valles Altos. En los Estados de México e Hidalgo se formaron poblaciones de maíz con amplia base genética de endospermo blanco y amarillo con el propósito de seleccionar materiales resistentes a *S. reilianum* f. sp. *zcae* implementando un programa de selección recurrente.

Los métodos de selección recurrente de progenies o líneas autofecundadas S_1 y S_2 , son los más usados para mejorar la resistencia a plagas y enfermedades; además de incrementar su eficiencia aumentando la frecuencia de genes favorables de una o más características agronómicas bajo selección y mantiene la variabilidad genética para continuar la selección (Hallauer y Miranda, 1988; Hallauer, 1992). La variación genética presente en las líneas autofecundadas permite seleccionar diferente nivel de susceptibilidad al patógeno. Así, el objetivo del presente estudio fue el de evaluar el nivel de resistencia o susceptibilidad de líneas C_2-S_1 y C_2-S_2 de maíz inoculadas artificialmente con teliosporas del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Hospedante

La formación de poblaciones base de maíz de endospermo blanco y amarillo se inició (C_0) en el ciclo primavera-verano de 2007 recombinando varias fuentes de germoplasma deseable en un vivero en el ejido de Cinta Larga, Hgo. ($20^{\circ} 13' 47''$ N, $99^{\circ} 12' 52''$ O), seleccionado por la alta incidencia de carbón de la espiga (panoja) en condiciones naturales. En el ciclo otoño-invierno 2007/08, en un vivero establecido en el municipio de Valle de Bravo, Méx. ($19^{\circ} 11' 42''$ N, $100^{\circ} 07' 52''$ O), se sembraron las mazorcas de medios hermanos, se autofecundaron las mejores plantas y se obtuvo la semilla C_0-S_1 . El vivero en Valle de Bravo, Méx. se estableció por la presencia de carbón de la

espiga y para avanzar una temporada de siembra en condiciones subtropicales sin heladas.

A partir de éste ciclo, se siguió el método de mejoramiento poblacional de S_1 recurrente recombinando las familias S_1 en el ciclo primavera-verano en Hidalgo y generando nuevas líneas S_1 en el ciclo otoño-invierno en Valle de Bravo, Méx.

En 2009 se completaron dos ciclos de mejoramiento obteniéndose semilla C_2-S_1 , con un total de 258 líneas de endospermo blanco y 71 de endospermo amarillo. En éstas líneas se evaluó la respuesta a la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* mediante inoculación artificial de semillas y siembra en invernadero.

En 2010, en el vivero en el Estado de Hidalgo, se sembraron las líneas C_2-S_1 , las cuales se recombinaron y autofecundaron y se obtuvo semilla C_3 y C_2-S_2 . Para obtener la semilla C_2-S_2 , se seleccionaron las mejores líneas C_2-S_1 en base a características agronómicas con una presión de selección al carbón de la espiga entre 0 a 7.7% de incidencia en las líneas de endospermo blanco y de 0 a 12.5% en las de endospermo amarillo. El porcentaje de incidencia fue el resultado de la evaluación en condiciones de invernadero previamente descrito. Seis o siete plantas de las líneas seleccionadas se autofecundaron para obtener semilla C_2-S_2 . Después de cosecha, semillas de 123 y 114 mazorcas C_2-S_2 de endospermo blanco y amarillo, respectivamente, se inocularon, se sembraron en invernadero y se evaluaron por su resistencia al patógeno.

Patógeno

En el estudio se usaron teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zeae* obtenidas de espigas y mazorcas de plantas de maíz infectadas naturalmente en el estado de Hidalgo. Las teliosporas se desinfestaron en una solución de 1% de $CuSO_4$ por 24 h, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril y se recuperaron en papel filtro para su secado.

Para determinar la viabilidad del inóculo se preparó una suspensión de teliosporas con una concentración de 50,000 teliosporas mL^{-1} en agua destilada estéril. 0.5 mL de la suspensión se colocó y dispersó en cajas de Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron a 25 °C en obscuridad. El porcentaje de germinación se determinó a las 96 h en 4 campos de microscopio compuesto (40X), registrando el porcentaje de teliosporas germinadas.

Inoculación del hospedante

Una suspensión de teliosporas a una concentración de 1.7×10^7 esporas mL^{-1} se preparó en agua destilada estéril con carboximetilcelulosa de sodio como adherente (NaCMC; Droguería Metropolitana, México, D. F.). Las semillas de maíz (22 por cada línea), se sumergieron por 1 min en esta suspensión y se secaron a $22\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h. Como testigo y fuente de comparación se usaron semillas del híbrido susceptible AS-910.

Las semillas inoculadas se sembraron en macetas con suelo esterilizado, a una profundidad de 2 cm. El suelo tenía pH 8.0, conductividad eléctrica de 5.08 dSm^{-1} , 3.23% de materia orgánica y textura franco-arenosa (arena 75.6%, limo 14.5% y arcilla 9.9%). Las macetas (40 cm de ancho x 40 cm de altura) se colocaron en invernadero distribuidas en un diseño completamente al azar, los tratamientos fueron 123 líneas de endospermo blanco y 114 de endospermo amarillo. La unidad experimental fue una maceta con 22 plantas y dos repeticiones por tratamiento. Después de la siembra, las macetas se regaron a capacidad de campo. Temperatura y humedad dentro del invernadero y del suelo se midieron con un registrador de datos (WatchDog Micro Station, Spectrum Technologies Inc.).

Evaluación de la incidencia de la enfermedad

En líneas $C_2\text{-}S_1$ y $C_2\text{-}S_2$, la susceptibilidad y resistencia se registraron durante la floración por observación visual de síntomas del carbón tanto en la mazorca como en la espiga de las plantas de cada línea. Una planta susceptible fue aquella con presencia de soros en la espiga, en la mazorca o ambas.

El porcentaje de incidencia se determinó como el cociente entre plantas con síntomas y el total de plantas en la unidad experimental multiplicado por 100; después se transformaron por arcoseno para homogeneizar las varianzas. De acuerdo a la incidencia, las líneas se clasificaron siguiendo la escala: 0%=altamente resistente, 11-25%= moderadamente resistente, 26-50%= moderadamente susceptible, 51-75%= susceptible y 76-100%= altamente susceptible. Los datos se analizaron utilizando el sistema de análisis SAS y comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las teliosporas de *S. reilianum* f. sp. *zcae* utilizadas como inóculo presentaron germinación de 31% después de 96 h de incubación en oscuridad a 25 °C. La infección por *S. reilianum* f. sp. *zcae* se identificó por la presencia de soros en la espiga, en donde las flores fueron reemplazadas por masas de teliosporas. En plantas infectadas se observaron espigas compactas (Figura 1A), con proliferación de espiguillas y presencia de teliosporas de color negro. Para observar la infección en la mazorca, fue necesario cortarlas a la mitad en sentido longitudinal; en las mazorcas infectadas se desarrollaron soros, dentro de estos teliosporas agrupadas en una masa de color negro (Figura 1B). Los síntomas y signos observados en la espiga y mazorca coinciden con los reportados por White (1999) y Baggett and Kean (1989).

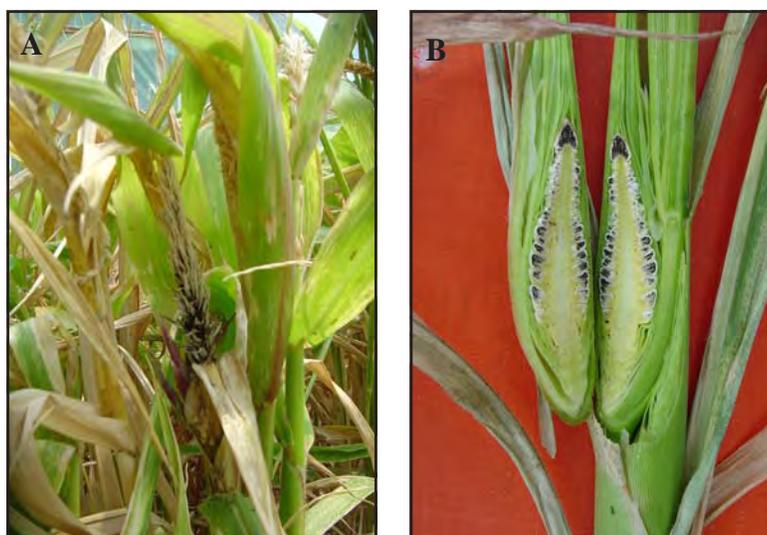


Figura 1. Síntomas y signos del carbón de la espiga presentes en plantas de maíz provenientes de semilla inoculada con una suspensión de teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zcae* de 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} a 1% de carboximetilcelulosa de sodio y sembradas en invernadero. A) Formación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

Las plantas que presentaron síntomas y signos sirvieron para determinar el porcentaje de incidencia de la enfermedad en las líneas C_2-S_1 y C_2-S_2 evaluadas.

Evaluación de incidencia en líneas C_2S_1

Entre las líneas con endosperma blanco solamente una fue altamente susceptible a la enfermedad presentando una incidencia de 92.3%. En las líneas de endospermo amarillo, los valores más altos de incidencia fueron de moderadamente susceptibles con valores de 28.6, 30, 33.3 y 40%. La frecuencia de la enfermedad en las 258 líneas C_2S_1 de endospermo blanco y 71 líneas C_2S_1 de endospermo amarillo se presenta en las Figuras 2 y 3 y los valores del análisis de varianza se incluyen en el Cuadro 1, mostrando que solamente una línea de endospermo blanco presentó un valor promedio de incidencia de 92.3% superando al testigo que mostró un valor de 77.8% de incidencia de la enfermedad.

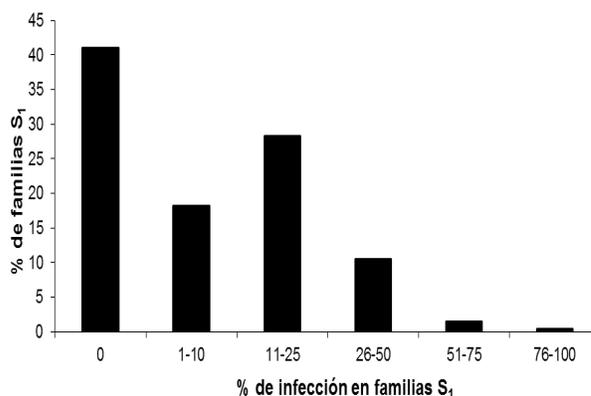


Figura 2. Frecuencia de la incidencia de carbón de la espiga en líneas C_2S_1 de endospermo blanco.

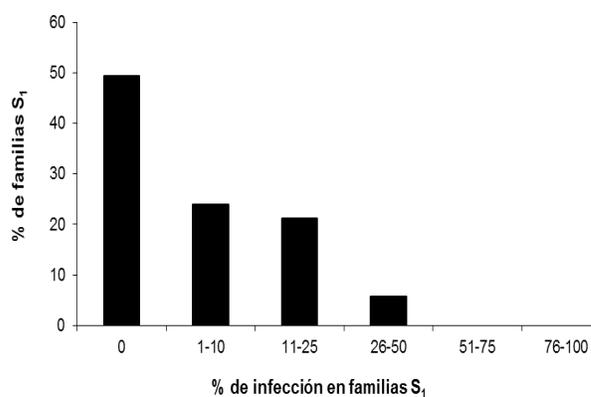


Figura 3. Frecuencia de la incidencia de carbón de la espiga en líneas C_2S_1 de endospermo amarillo.

Cuadro 1. Respuesta de líneas S_1 de endospermo blanco y amarillo a la infección por carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) con inoculación artificial de la semilla.

Incidencia de la enfermedad (%)	Líneas de endospermo blanco (258)	Líneas de endospermo amarillo (71)
0	106	35
1-10	47	17
11-25	73	15
26-50	27	4
51-75	4	0
76-100	1	0
Incidencia media	11.2	10.18
Incidencia mínima	0	0
Incidencia máxima	92.3	40.0
Desviación estándar	15.91	14.32
DMS (5%)	34.3	34.58
CV (%)	64.19	77.74
R^2	0.89	0.84

Las temperaturas promedio para suelo y ambiente fueron de 19.4 y 22.1 °C, respectivamente, y una humedad relativa de 70%, condiciones adecuadas para el desarrollo de la enfermedad.

Las líneas más susceptibles a la enfermedad presentaron valores de hasta 92.3 y 40% de incidencia en maíz de endospermo blanco y amarillo, respectivamente. Estos resultados sugieren que maíces con endospermo blanco son más susceptibles que los de endospermo amarillo.

La frecuencia de la enfermedad en las 258 líneas de endospermo blanco inoculadas fue: 106 líneas (41.1%) no presentaron la enfermedad, 47 (18.2%) con incidencia de 1-10%, 58 (22.5%) con incidencia de 11-20%, 46 (17.8%) con incidencia entre 21-70%, solamente una línea presentó un valor promedio de incidencia de 92.3% superando al testigo que mostró un valor de 77.8% de incidencia de la enfermedad.

En el caso de las 71 líneas S_1 de endospermo amarillo, la distribución de la incidencia fue: 35 líneas (49.3%) no presentaron la enfermedad, 17 (23.9%) con incidencia entre 1-10%, 13 (18.3%) con incidencia entre 11-20% y 6 (8.4%) con incidencia entre 21-40%. Los valores promedio de temperatura

fueron de 19.4 y 22.1 °C para el suelo y ambiente, respectivamente, con una humedad relativa de 70%. Estos valores fueron conductivos para el desarrollo de la enfermedad.

Evaluación de incidencia en líneas C₂-S₂

La mayor incidencia del carbón de la espiga en líneas C₂-S₂ con endospermo blanco fue 42.8% y hasta 28.5% en las líneas de endospermo amarillo, mientras que en el testigo la incidencia fue 86.1%.

De las 123 líneas de endospermo blanco, 98 (79.7%) no mostraron la enfermedad y en las 114 líneas de endospermo amarillo, 84 (73.7%) no presentaron la enfermedad (Cuadro 2). La frecuencia de la enfermedad en las líneas S₂ de endospermo blanco y amarillo se presenta en las Figuras 4 y 5. El análisis de varianza se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Respuesta de líneas C₂-S₂ de endospermo blanco y amarillo a la infección por carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) bajo inoculación artificial de la semilla.

Incidencia de la enfermedad (%)	Líneas de endospermo blanco (123)	Líneas de endospermo amarillo (114)
0	98	84
1-10	21	22
11-25	2	6
26-50	2	2
51-75	0	0
76-100	0	0
Incidencia media	4.06	3.01
Incidencia mínima	0	0
Incidencia máxima	42.8	28.5
Desviación estándar	14.03	6.42
DMS (5%)	4.15	6.1
CV (%)	22.5	45.46
R ²	0.92	0.97

Durante el desarrollo del ensayo en invernadero se registraron temperaturas promedio de 18.47 °C en el suelo y 21.61 °C en el ambiente, además de una humedad relativa promedio de 69.76%.

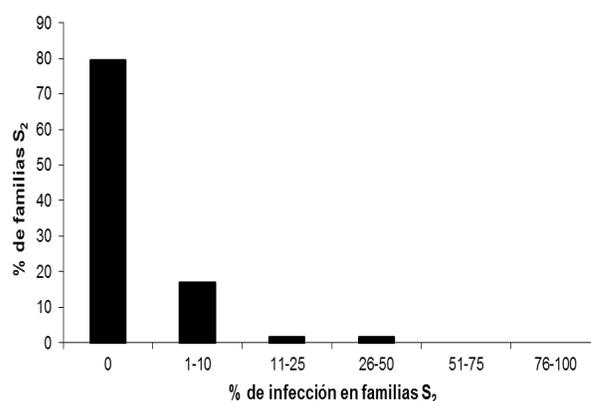


Figura 4. Distribución de la incidencia de carbón de la espiga en líneas C₂-S₂ de endospermo blanco.

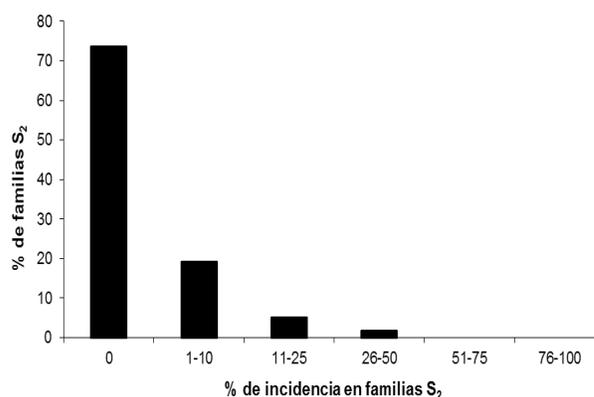


Figura 5. Distribución de la incidencia de carbón de la espiga en líneas C₂-S₂ de endospermo amarillo.

La respuesta de plantas de maíz a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zear* ha sido evaluada con el objetivo de identificar germoplasma resistente. Para esto se utilizan diferentes métodos de inoculación de semilla al momento de la siembra. Njuguna y Odhianbo (1989) reportan incidencias de hasta 62.8% al depositar teliosporas sobre la semilla. Stromberg *et al.* (1984), mediante inoculación a la semilla con sustrato contaminado con teliosporas, obtuvieron incidencias máximas de 56% y de 35.5% en líneas e híbridos de maíz, respectivamente. En el presente estudio en el que la inoculación de semilla se realizó con una suspensión de 1% de NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹ (Quezada *et al.*, 2013), y se obtuvieron incidencias en líneas C₂-S₁ de hasta 92.3% en los materiales de endospermo blanco y de hasta 40% en las de endospermo amarillo. Mediante la inoculación de semilla se simulan las condiciones naturales

de la infección asegurando que el patógeno entre en contacto con el hospedante durante el proceso de germinación de la semilla (Prom *et al.*, 2011).

Al avanzar las líneas C_2-S_1 a C_2-S_2 , la proporción de líneas que presentaron algún grado de incidencia disminuyó y la proporción de líneas con 0% de incidencia se incrementó de 41.1 a 79.7% y de 49.3 a 73.7%, para el caso de maíz blanco y amarillo, respectivamente. Estos resultados muestran que este método de inoculación propicia niveles de infección y selección confiables en un programa de selección de germoplasma resistente al carbón de la espiga y permite identificar líneas que difieren en la respuesta a la infección. La presencia o ausencia de soros en la mazorca o en la espiga fue usada como indicador de la resistencia o susceptibilidad en nuestro estudio. De acuerdo con Zhao *et al.* (2015), la resistencia está determinada por la supresión de la invasión dentro de la planta y no con la supresión de la penetración del patógeno.

Además de contar con un método de inoculación eficiente, la temperatura y humedad del suelo son factores importantes en la epidemia. En nuestro estudio se encontró una excelente germinación de teliosporas e infección del hospedante a 18.47 y 19.4 °C, lo cual difiere con Matyac y Kommedahl (1985a) y Baier y Krüger (1962), quienes reportan que temperaturas entre 23 y 30 °C son ideales para la germinación de las teliosporas e infección de las plántulas. Los resultados obtenidos pueden explicarse debido a las temperaturas más bajas en el Altiplano de México, donde se presenta la enfermedad durante la germinación de las semillas y primeras etapas de desarrollo de las plántulas que es la etapa crucial para la infección o a la presencia de diferentes razas, las cuales varían en su comportamiento dependiendo de las condiciones ambientales y el genotipo de su hospedante (Pecina *et al.*, 2004). El contenido de humedad del suelo en promedio se mantuvo en 26.18 kPa, equivalentes a 0.2618 bar, resultando en una incidencia de hasta 92.3% en el primer ciclo de evaluación. Este nivel de humedad difiere a lo consignado por Matyac y Kommedahl (1985a) quienes reportan que una humedad del suelo de 1.5 bar propicia un mayor número de plantas infectadas, con incidencias de 32%.

En la mayoría de los programas de mejoramiento genético en maíz la evaluación y selección contra enfermedades se realiza en condiciones de campo. En nuestro estudio se mostró que es posible combinar el uso de invernadero (mayor presión de selección en condiciones controladas) y hacer el trabajo de mejoramiento en campo solamente con germoplasma previamente evaluado en invernadero.

Por último, las líneas seleccionadas en el presente estudio se han utilizado en la formación de variedades sintéticas con buen comportamiento agronómico y resistencia genética al carbón, además de ser incorporadas en programas de mejoramiento genético para resistencia al carbón de la espiga en el Estado de México y el estado de Hidalgo.

CONCLUSIONES

El programa de selección S1-S2 recurrente probó ser eficiente en la generación y selección de líneas con diferente grado de susceptibilidad al carbón de la espiga.

La técnica de inoculación utilizada fue eficiente para discriminar genotipo resistente del susceptible.

La selección en campo de líneas de maíz con características agronómicas deseables y evaluación de la infección por *S. reilianum* f. sp. *zea* en invernadero, son metodologías complementarias para la generación de líneas resistentes en un programa de mejoramiento genético.

Agradecimientos

Al proyecto PM 0531 y PM 0542 “Desarrollo de cultivares de maíz (*Zea mays*) para el Altiplano de México con alto rendimiento y resistencia al carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zea*)”, financiado por la Dirección General de Sanidad Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 176171 para el primer autor.

LITERATURA CITADA

Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A y Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays* L.) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 29:39-49. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000100004

- Baggett JR and Kean D. 1989. Reduction on plant height by head smut infection in sweet corn cultivars. *HortScience* 24:497-499.
- Baggett JR and Koepsell PA. 1983. Field inoculation of sweet corn with the head smut pathogen (*Sphacelotheca reiliana*). *HortScience* 18:67-68. Disponible en línea: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19840032591>
- Baier W and Krüger W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. II. Field studies on the effect of soil conditions. *South African Journal of Agricultural Science*. 5:183-190. Disponible en línea: http://hdl.handle.net/10520/AJA05858860_789
- Bernardo R, Bourrier M and Oliver JL. 1992. Generation means analysis of resistance to head smut in maize. *Agronomie* 12: 303-306. <https://doi.org/10.1051/agro:19920403>
- Duan YZ, Li XX, Ai FZ, Yang JH and Li FM. 1992. Selection and identification on resistance resource of corn head smut of Shanxi Province. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*. 1:83-86. Disponible en línea: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-XBNX199204019.htm
- Frederiksen RA and Reyes L. 1980. The head smut program at Texas A&M. p. 367-372. In: Williams, R. J., R. A. Frederiksen, L. K. Mughogho, and G. D. Bengston (eds). *Sorghum Diseases: A World Review*. ICRISAT. Patancheru, A. P. India.
- 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: 2037-2052. DOI: 10.1104/pp.111.179499
- Hallauer AR. 1992. Recurrent selection in maize. *Plant Breeding Reviews*. 9:115-119.
- Hallauer AR and Miranda JB. 1988. Quantitative genetics in plant breeding. 2nd ed. Iowa State Univ. Ames, IO. Disponible en línea: http://majidi.iut.ac.ir/sites/majidi.iut.ac.ir/files//files_course/quantitative_genetics_in_maize_breeding.pdf
- Jin QM, Li JP, Zhang XW, Wang GX, Song SY, Liu YC, and Wang LX. 2000. Establishment IPM of system of corn diseases and pest insects in the spring corn belt. *J. Maize Sci*. 8:84-88. Disponible en línea: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-YMKX200002024.htm
- Krüger W. 1962. *Sphacelotheca reiliana* on maize. I. Infection and control studies. *South African Journal of Agricultural Science*. 5:43-56. Disponible en línea: <http://journals.co.za/docserver/fulltext/sajags/5/1/651.pdf?expires=1501296467&id=id&acname=guest&checksum=B06F86322D5C9D77F5A385962E0632DD>
- Lübberstedt T, Xia XC, Tan G, Liu X and Melchinger AE. 1999. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reiliana* in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. 99:593-598. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs001220051273>
- Mack HJ, Baggett JR and Koepsell PA. 1984. Effects of cultural practices on the incidence of head smut in sweet corn. *HortScience* 19:77-78. Disponible en línea: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19850004321>
- Martínez CA, Roux C and Dargent R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Phytopathology* 89:247-253. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.3.247>
- Martínez CA, Jauneau C, Roux C, Savy C and Dargent R. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Protoplasma* 213:83-92. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01280508>
- Martínez CA, Roux A, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94:505-514. <http://dx.doi.org/10.1080/15572536.2003.11833215>
- Martínez-Ramírez JL y Ledesma-Medrano J. 1990. Control químico del carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en el Valle de Zapopan, Jalisco. México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 8:68-70.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985a. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on corn. *Phytopathology* 75:577-581. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n05_577.PDF
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985. Occurrence of chlorotic spots on corn seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. *Plant Disease*. 69:251-254. DOI: 10.1094/PD-69-251
- Montes GN y Díaz AF. 2006. Fitopatología. p. 192-213. In: *Campo Experimental Río Bravo: 50 años de Investigación Agropecuaria en el Norte de Tamaulipas, Historia, Logros y Retos*. Rodríguez del Bosque, L. A. (ed). Libro Técnico No. 1, INIFAP. Río Bravo, Tamaulipas, México.

- Njuguna JGM. and Odhiambo RO. 1989. Head smut distribution, expression and genetic resistance of maize to *Sphacelotheca reiliana* in Kenya. East African Agricultural and Forestry Journal. 55:81-83. Disponible en línea: <http://www.kalro.org:8080/repository/bitstream/0/2082/1/KARI%20EAAF%20JULY%20-%20OCTOBER1989%20VOL%20LV%20NOS%201%20-%202%20Split%2012.pdf>
- Pecina-Quintero V, Williams-Alanis H, Montes-García N, Rodríguez-Herrera R, Rosales-Robles E y Vidal-Martínez VA. 2004. Incidence of head smut *Sporisorium reilianum* (Kühn) Langdon and Fullerton in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] hybrids with A₁ and A₂ cytoplasms. Revista Mexicana de Fitopatología. 22:315-319. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/publication/237037476_Incidence_of_Head_Smut_Sporisorium_reilianum_Kuhn_Langdon_and_Fullerton_in_Sorghum_Sorghum_bicolor_L_Moench_Hybrids_with_A1_and_A2_Cytoplasms
- Pérez-Camarillo JP y Bobadilla-Meléndez M. 2003. Carbón de la espiga de maíz. Síntesis de resultados del ciclo agrícola 2002. Valle del Mezquital, Hgo. Desplegable Téc. 6. CIRCE. INIFAP.
- Pérez-Camarillo JP y Bobadilla-Meléndez M. 2004. Carbón de la espiga de maíz. Resultados de los ciclos agrícolas Pv 2002 y 2003. Foll. Informativo 1. CIRCE. INIFAP.
- Pradhanang PM and Ghimire SR. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. Trop. Agric. 73:325-328. Disponible en línea: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302866937>
- Prom LK, Perumal SR, Erattaimuthu JE, Erpelding N, Montes GN, Odvody C, Greenwald Z, Jin R, Frederiksen R and Magill CW. 2011. Virulence and molecular genotyping studies of *Sporisorium reilianum* isolates in sorghum. Plant Disease. 95:523-529. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-10-0720>
- Quezada S.A., De León-G. C., Hernández A.M. y Nava-D. C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. Revista Mexicana Fitopatología. 31:80-90. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n2/v31n2a1.pdf>
- Song SY, Sun XH, Guo WG and Liu JR. 2000. Identification of germplasm for resistance to head smut in maize. Agric. Sci. Jilin 25:32-33.
- Stienstra WC, Kommedahl T, Stromberg EL, Matyac CA, Windels CE and Morgan F. 1985. Suppression of Corn head smut with seed and soil treatments. Plant Disease. 69:301-302. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1985Articles/PlantDisease69n04_301.pdf
- Stromberg EL. 1981. Head smut of maize, a new disease in Minnesota. Phytopathology 71:906
- Stromberg EL, Stienstra WC, Kommedahl T, Matyac CA, Windels CE and Gadelman JL. 1984. Smut expression and resistance of corn to *Sphacelotheca reiliana* in Minnesota. Plant Disease. 68:880-884. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1984Articles/PlantDisease68n10_880.pdf
- 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. Disponible en línea: http://www.maydica.org/articles/53_047.pdf
- White DG. 1999. Smuts. In: Compendium of corn diseases. 3rd. Ed. APS Press. Saint Paul, MN. USA. 33 p.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1080/01140671.2006.9514383>
- Zhao X, Yea J, Weia L, Zhanga N, Xingc Y, Zuoa W, Chaoa Q, Tanc G, and Xua M. 2015. Inhibition of the spread of endophytic *Sporisorium reilianum* renders maize resistance to head smut. The Crop Journal. 3:87-95. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.02.001>

3.9. Inducción de resistencia a *Puccinia sorghi* y complejo mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* y otros) en maíz (*Zea mays*)

Federico Díaz Morales, Carlos De León García de Alba*, Cristian Nava Díaz, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Posgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; **María del Carmen Mendoza Castillo**, Posgrado en Genética, Colegio de Posgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. *Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Resumen

Para demostrar la eficiencia de productos inductores de la resistencia a enfermedades en maíz, en 2016 y 2017 se establecieron ensayos en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Toluca, con el híbrido de maíz comercial BG1384W, donde se estudió la eficiencia de seis agroquímicos como inductores de resistencia, incluyendo Fosetil-Al, Acibenzolar-S-metil, *Bacillus subtilis*, Tebuconazole + Trifloxystrobin, Proteína Harpin y Clotianidin + *Bacillus firmus*, para controlar la roya común (*Puccinia sorghi* Schw.) y el complejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl. y otros), con dos formas de aplicación (al suelo y foliar) y tres dosis (comercial recomendada, mitad de la recomendada y recomendada más 50%) para cada agroquímico. Se registraron datos agronómicos en un ensayo de rendimiento y la severidad de las mencionadas enfermedades. En 2016, la severidad no fue afectada por ninguno de los agroquímicos, aunque se incrementó el rendimiento con las aplicaciones de Fosetil-Al y Acibenzolar-S-metil. En 2017, *Bacillus subtilis* disminuyó la severidad de la roya, mientras que Fosetil-Al redujo la severidad del complejo mancha de asfalto, pero mostró el rendimiento más bajo.

Palabras clave: inductores, resistencia, maíz, Fosetil-Al, *Bacillus subtilis*

El maíz es el cultivo más importante de México, desde el punto de vista alimenticio, industrial, político y social (Saint y López, 1997). En 2017, la superficie cosechada en el país fue de 1 144 590 ha, con un rendimiento de grano promedio de 6.477 t/ha (SIAP, SAGARPA, 2017). El maíz tiene varios problemas fitosanitarios, destacando entre los más importantes el carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), que afecta la espiga y la mazorca, el carbón común (*Ustilago maydis*) que afecta principalmente a la mazorca, la roya común (*Puccinia sorghi* Schwein) y el complejo mancha de asfalto (CMA) (*Phyllachora maydis* Maubl. y otros) que atacan al follaje (CIMMYT, 2005). El CMA se reportó por primera vez en México por Maublanc (1904); posteriormente, se determinó que el CMA es causado por varios hongos, donde *P. maydis* es el primero que se establece para luego llegar *Monographella maydis* Müller y Samuels y por último, dentro de los estromas de *P. maydis* se asienta el hiperparásito *Coniothyrium phyllachorae* Maubl. (Hock *et al.*, 1992). Esta enfermedad puede causar pérdidas hasta del 100% (Martínez y Espinosa, 2014). La roya está ampliamente distribuida en climas subtropicales y templados con alta humedad relativa (CIMMYT, 2005).

Es necesario utilizar alternativas de control de enfermedades de plantas que se han venido implementando para controlar enfermedades en otros patosistemas, especialmente en cultivos remunerativos como los hortícolas. En gramíneas, existen pocos estudios sobre inducción de resistencia. El tratamiento de plantas con varios agentes, incluyendo fitopatógenos virulentos o avirulentos, no patógenos, extractos de plantas y químicos sintéticos, pueden inducir resistencia al ataque de patógenos (Walters y Fountaine, 2009). La inducción de resistencia se define como el incremento de la expresión de mecanismos de defensa natural de las plantas que las incita a protegerse de enfermedades e insectos que incluyen tanto respuestas locales como sistémicas (Riveros, 2001; Edreva, 2004) que van desde las barreras físicas hasta las reacciones bioquímicas que alertan las células entre sí, para producir sustancias tóxicas que eliminan o inhiben la colonización por parte de la plaga (Riveros, 2001). Esta resistencia se incrementa cuando se estimula apropiadamente por factores exógenos (Choudhary *et al.*, 2007) sin alteración del genoma de la planta (Kilian *et al.*, 2000).

La resistencia inducida puede desencadenarse tanto por la pre-inoculación con agentes patógenos, no patógenos, simbiosis y saprófitos, o bien por la

aplicación de determinados inductores abióticos, como el ácido salicílico o los metabolitos microbianos que estimulan a la planta para producir sustancias naturales de defensa contra patógenos (Quintero y Castaño, 2012). Cuando éstos son reconocidos por moléculas endógenas, tienen la función de activar o aumentar el nivel de resistencia de las plantas, tanto a nivel local o en puntos distantes al sitio de infección, así como de participar de otras actividades fisiológicas (Schreiber y Desveaux, 2008). El interés en las moléculas estimuladoras de los mecanismos naturales de defensa de la planta, surgió a partir de su intervención en el control de patógenos y plagas, ya que presentan el potencial de disminuir y/o evitar el riesgo de emergencia de poblaciones de patógenos o plagas resistentes a productos químicos, contrarrestar parcialmente los daños químicos ocasionados por los plaguicidas y causar un incremento del rendimiento de las cosechas (Guimarães *et al.*, 2008).

El primer químico activador de resistencia, Probenazole, se registró en Japón en 1975, como Oryzemat[®] y desde entonces muchos otros activadores han sido desarrollados, como el Acibenzolar-S-metil (ASM), registrado como Actigard[®] (Syngenta), Proteína Harpin como Messenger[®] (Plant Health Care), entre otros (Walters *et al.*, 2013). En plantas de fresa, Fosetil-Al[®] (Bayer) indujo resistencia al disminuir la severidad de la pudrición de la corona (*Phytophthora cactorum*) y la pudrición de las raíces (*P. fragariae*) (Eikemo *et al.*, 2003) y en tubérculos de papa mostró una mayor acumulación e incremento de las enzimas β -1,3-glucanasas y proteasas, fitoalexinas y compuestos fenólicos (Andreu *et al.*, 2006). El ASM, originalmente comercializado para el control de la cenicienta polvorienta (*Oidium* sp.) en trigo y cebada (Gorlach *et al.*, 1996), en la actualidad se utiliza para inducir resistencia contra un extenso rango de fitopatógenos, como roya (*Uromyces viciaefabae*) y quemadura por ascochyta (*Ascochyta fabae*) en haba, en condiciones de campo e invernadero (Sillero *et al.*, 2012). En el cultivo de pera, redujo la severidad de la roña (*Venturia nashicola*) con una eficiencia en el control de 42% (Faize *et al.*, 2004) y en plátano Dominico-Hartón (Musa AAB) fue eficiente al reducir la severidad de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y amarilla (*M. musicola*) en 80% (Márquez y Castaño, 2007). La mezcla de Tebuconazole[®] con Trifloxystrobin[®], combinación de un triazol y una estrobilurina, generaron incremento en rendimiento respecto al testigo (Couretot *et al.*, 2013). La aplicación de inductores de resistencia en plántulas de Dominico-Hartón contra Sigatoka, incluyendo Propiconazol[®], del grupo de los triazoles, demostró reducir el tamaño de las lesiones y bajos índices de severidad de esta enfermedad (Mogollón *et al.*, 2011), debido a la

inhibición de la demetilación del C-14 del lanosterol, un precursor del ergosterol de la membrana celular del patógeno (Köller, 1992).

Las especies en el género *Bacillus* son consideradas factores microbianos para la producción de varias moléculas biológicamente activas, algunas potencialmente inhibidoras del crecimiento de hongos (Schallmey *et al.*, 2004). *Bacillus subtilis* es extremadamente tolerante a estreses ambientales, incluyendo factores del suelo y almacenamiento a largo plazo (Brannen y Kenney, 1997). La cepa QTS 713 de *B. subtilis*, es antagonista de muchos hongos fitopatógenos, con efecto en la competencia por nutrientes, la exclusión del sitio, colonización y la unión de las bacterias al hongo. También, puede detener la germinación de las esporas de hongos fitopatógenos, interrumpiendo el crecimiento del tubo germinativo e inhibiendo la adhesión del patógeno a la hoja (EPA, 2006), debido a compuestos que muestran actividad fungicida. AgraQuest, reporta que la cepa QST 713 de *B. subtilis* induce resistencia sistémica de las plantas contra bacterias fitopatógenas. Otra especie importante del género *Bacillus* es *B. firmus*, reportada para el control de nemátodos, un proceso basado en varias interacciones, ya sea de la bacteria con los nemátodos o a través del hospedante, pero aún no se entienden completamente dichas interacciones supuestamente basadas en varios mecanismos que comprenden acción enzimática, degradación de exudados de raíz y producción de la fitohormona ácido indol-acético (EFSA, 2012). Este microorganismo, combinado con Clotianidin, es efectivo contra una variedad de especies de insectos (Coleóptera, Thysanóptera, Lepidóptera y Díptera).

La Proteína Harpin fue descubierta por Wei *et al.* (1992), como elicitador de la respuesta de hipersensibilidad provocada por *Erwinia amylovora*. Actualmente, el producto Messenger[®] de la empresa Planth Health, con base en la Proteína Harpin, activa un mecanismo natural de defensa en las plantas, referido como resistencia sistémica adquirida (EPA). Dong *et al.* (1999), reportaron que Harpin elicitor de resistencia sistémica a *Peronospora parasitica* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar agroquímicos reportados como inductores de resistencia a enfermedades y obtener información preliminar del efecto inductor de resistencia en maíz contra la roya común y el complejo mancha de asfalto.

MATERIALES Y METODOS

El primer ensayo se sembró en el Campo Experimental de El Cerrillo, de la Universidad Autónoma del Estado de México (19° 10' 25" N - 99° 37' 02" O), el 7 de abril de 2016. Se utilizó un diseño experimental de parcelas sub-subdivididas, en donde las parcelas mayores incluyeron seis agroquímicos (Aliette, Actigard, Poncho Votivo, Serenade, Messenger y Consist Max) y un testigo absoluto. Como subparcelas se incluyeron dos métodos de aplicación (foliar y al suelo), haciendo la aplicación al suelo con aspersion al fondo del surco al momento de la siembra y la aplicación foliar se hizo vía aspersion a los 50 días de emergida la planta. Las sub-subparcelas consistieron de 3 dosis de los productos: 1. dosis recomendada en la etiqueta del producto, 2. dosis baja con 50% de la dosis recomendada y, 3. dosis alta con la dosis recomendada más 50% de ésta (Cuadro 1). La unidad experimental fue de dos surcos de 3.0 m de largo y 0.80 m entre surcos, con un área de 4.8 m² y tres repeticiones. Se utilizó semilla del híbrido comercial de maíz BG1384W (Biogene). Los tratamientos testigos consistieron de agua solamente. La infección fue de incidencia natural.

El segundo ciclo de siembra (5 de abril de 2017), se estableció en el mismo Campo Experimental. Debido a una baja emergencia de plantas por al ataque del gusano de la semilla de maíz (*Hylemia* sp.), el ensayo se resembró en su totalidad el 10 de mayo, repitiendo el mismo diseño experimental. Para registrar la severidad de las enfermedades, se emplearon escalas para roya común (*Puccinia sorghi*) y el complejo mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* y otros). En roya y mancha de asfalto, la severidad se estimó usando una escala visual de 1-5, donde: 1=Resistente (con pústulas en 10% del área foliar), 2=Moderadamente resistente (pústulas en 20-30% del área foliar), 3=Moderadamente

Cuadro 1. Agroquímicos y dosis utilizadas en las evaluaciones TO-2016 y TO-201.

Ingred. activo	Nombre comercial	Baja (B)	Dosis Media (M)	Alta (A)
1. Fosetil-Al 80%	Aliette	625 g/ha	1250 g/ha	1875 g/ha
2. Acibenzolar-S-metil 500 g/l	Actigard	30 g/ha	60 g/ha	90 g/ha
3. Trifloxystrobin + tebuconazole	Consist Max	125 mL/ha	250 mL/ha	375 mL/ha
4. Cloatianidin 500 g/l + <i>Bacillus firmus</i>	Poncho Votivo	40 mL/ha	80 mL/ha	120 mL/ha
5. <i>Bacillus subtilis</i> 1 x 10 ⁹ UFC/g	Serenade	2.5 L/ha	5 L/ha	7.5 L/ha
6. Proteína Harpin 3%	Messenger	75 g/ha	150 g/ha	225 g/ha
7. Testigo		~~~~~	~~~~~	~~~~~

susceptible (pústulas en 40-50 % del área foliar), 4=Susceptible (pústulas en 60-70% del área foliar) y 5=Muy susceptible (pústulas en 100% del área foliar). Se colectaron datos agronómicos de un ensayo de rendimiento (CIMMYT, 1985; IBPGR, 1991), incluyendo días a 50% de floración masculina y femenina, altura de planta y mazorca, aspecto de planta y de mazorca, número de mazorcas sanas y podridas, peso de grano fresco en cosecha ajustado a 15% de humedad para obtener rendimiento de grano por hectárea. Las variables registradas fueron sometidas a un análisis de varianza (ANAVA) y los valores obtenidos se sometieron a una prueba de comparación de medias de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ciclo de siembra TO-2016. Acibenzolar-s-metil y Tebuconazole + Trifloxystrobin y *Bacillus subtilis* retrasaron la floración femenina, en cambio las parcelas tratadas con Fosetil-Al y Cloatianidin + *Bacillus firmus* mostraron una aceleración en la floración femenina (Cuadro 2). La floración masculina

Cuadro 2. Separación de medias de agroquímicos, vía de aplicación y dosis por el método Tukey ($\alpha=0.05$) para la variable características agronómicas y severidad de las enfermedades. TO-2016.

	FM	FF	RFM	AIP	AIM	BMP	AsM	MP	RG	SCMA	SR
Aliette	108.2 a*	109.4 b*	1.0 b*	178.7 a*	94.0 a*	0.5 ab*	1.9 a*	1.1 a*	5.7 a	1.6 a*	1.2 ab*
Testigo	108.2 a	110.2 ab	1.0 a	165.2 abc	78.0 bc	0.4 c	2.2 a	0.1 b	4.7 abc	1.2 b	1.0 b
Serenade	108.4 a	110.2 a	1.0 a	159.0 bc	81.5 abc	0.5 abc	2.2 a	0.3 ab	4.7 abc	1.3 ab	1.1 ab
Poncho Votivo	108.0 a	109.4 b	1.0 a	174.4 ab	87.1 abc	0.5 bc	2.3 a	0.7 ab	5.6 ab	1.6 a	1.3 a
Messenger	108.4 a	110.0 ab	1.0 a	153.3 c	74.5 c	0.5 bc	2.5 a	0.4 ab	3.3 c	1.3 ab	1.1 ab
Actigard	108.4 a	110.3 a	1.0 a	171.9 abc	88.3 ab	0.5 abc	2.4 a	0.7 ab	5.9 a	1.3 ab	1.3 ab
Consist Max	108.4 a	110.3 a	1.0 a	154.3 c	84.7 abc	0.5 a	2.5 a	0.5 ab	3.4 bc	1.4 ab	1.2 ab
Suelo	108.3 a	110.0 a	1.0 a	165.3 a	83.2 a	0.5 a	2.2 a	0.5 a	4.6 a	1.3 a	1.2 a
Foliar	108.3 a	110.0 a	1.0 a	165.1 a	84.9 a	0.5 a	2.4 a	0.6 a	5.0 a	1.4 a	1.2 a
Alta	108.3 a	110.0 a	1.0 a	165.4 a	86.65 a	0.5 a	2.2 a	0.6 a	4.8 a	1.4 a	1.1 b
Media	108.2 a	109.9 a	1.0 a	164.1 a	82.09 a	0.5 a	2.4 a	0.6 a	4.9 a	1.4 a	1.2 ab
Baja	108.4 a	110.0 a	1.0 a	166.1 a	86.65 a	0.5 a	2.3 a	0.4 a	4.7 a	1.4 a	1.23 a
CV	0.6	0.7	0.7	6.8	13.4	11.7	23.7	118.8	27.4	22.7	21.2
Media	108.3	109.9	1.0	165.2	84.0	0.5	2.3	0.5	4.8	1.4	1.2

*Valores seguidos de la misma letra no son diferentes entre ellos .

FM=días a 50% de floración masculina, FF=días a 50% de floración femenina, RFM=relación floración femenina/masculino, AIP=altura de planta, AIM=altura de mazorca, BMP=balance de mazorca/planta, AsM=aspecto de mazorca, MP=mazorcas podridas, RG=rendimiento de grano ajustado, SCMA=severidad de complejo mancha de asfalto, SR=severidad de roya común.

fue uniforme en las unidades experimentales. La diferencia en días entre floración masculina y femenina fue de dos días, lo que, de acuerdo con López (1991), un desfase mínimo entre la emisión de polen y la aparición de los estigmas garantizan una buena polinización y el buen llenado de grano. Mientras que para ASI (Anthesis-silking interval), Fosetil-Al mostró el valor más bajo que, de acuerdo a Uribe Larrea *et al.* (2002), es una característica deseable ya que un valor alto de ASI provoca reducción del rendimiento debido a fallas en la polinización de los estigmas.

Las parcelas tratadas con Fosetil-Al mostraron un incremento estadísticamente significativo en altura de planta y mazorca, mientras que la Proteína Harpin las disminuyó. Para el balance de planta, todos los agroquímicos tuvieron los valores de 0.50, valor deseable en el cultivo para tener un balance adecuado de planta para evitar el acame.

En aspecto de mazorca, estadísticamente no hubo diferencias. Se observó que entre los tratamientos, el testigo (parcelas sin tratar) presentó el valor más bajo de número de mazorcas podridas, mientras que las parcelas tratadas con Fosetil-Al presentaron el mayor número de mazorcas podridas. A pesar de esto, Fosetil-Al y Acibenzolar-S-metil mostraron un rendimiento estadísticamente más alto con 5.7 y 5.9 t ha⁻¹, respectivamente. El rendimiento más bajo se obtuvo con la Proteína Harpin.

En base a la escala de severidad utilizada para evaluar daño por roya común y el CMA, las plantas mostraron menor severidad por estas dos enfermedades foliares. Para CMA, el producto Clotianidin + *Bacillus firmus* y Fosetil-Al mostraron la mayor severidad de 1.6 (Cuadro 2) comparado con la media de 1.4 y el testigo con 1.2. De igual manera, para la severidad de la roya, las plantas de las parcelas tratadas con Clotianidin + *Bacillus firmus* tuvieron, estadísticamente, un valor de severidad más alto (1.3), comparado con la media de 1.2 y el testigo de 1.0. El Cuadro 2 muestra que, a pesar de esta observación, las parcelas tratadas con Clotianidin + *Bacillus firmus* tuvieron mayor rendimiento comparado con el testigo que tuvo el valor menor de severidad. Esto se puede atribuir a las características de *Bacillus*, dado que estos organismos contribuyen a la productividad de los cultivos al localizarse en la rizósfera y colonizar las raíces de las plantas promoviendo el crecimiento de rizobacterias que contribuyen a una mayor absorción de nutrientes Schallmey *et al.* (2004).

Ciclo de siembra TO-2017. Se determinó que Fosetil-Al aceleró la floración, mientras que Acibenzolar-S-metil y Trifloxystrobin + Tebuconazole la retrasaron (Cuadro 3). Para la variable relación de floración femenina/masculina se obtuvo que tanto para agroquímicos, vía de aplicación y dosis, tuvieron el mismo efecto, indicando un desfase mínimo entre la emisión de polen y la aparición de los estigmas, garantizando el buen llenado del grano (López, 1991). Acibenzolar-S-metil registró la mayor altura de planta con 173.5 cm, seguido de Tebuconazole + Trifloxystrobin con 172.3 cm., mientras que *Bacillus subtilis* presentó la menor altura con 152.4 cm. Sin embargo, no presentaron diferencia significativa en altura de mazorca. En el balance de planta, Tebuconazole + Trifloxystrobin y Acibenzolar-S-metil tuvieron el valor deseable de 0.5.

El aspecto de plantas se vio afectado de manera negativa con el fungicida Fosetil-Al, en cambio las plantas de las parcelas no tratadas presentaron el mejor aspecto. En aspecto de mazorcas, éste fue igual en todas las parcelas a pesar de que algunas tuvieran o no plantas con aspecto deseable. Esto concuerda

Cuadro 3. Separación de medias de tratamientos, vía de aplicación y dosis por el método Tukey ($\alpha=0.05$) para la variable características agronómicas y severidad de las enfermedades. TO-2017.

Factor	FM	FF	RFM	AIP	AIM	BMP	AsP	AsM	MP	RG	SCMA	SR1	SR2
Aliette	103.4 a	104.2 a	1.0 a	152.6 a	68.8 a	0.4 a	2.6 a	3.6 a	0.7 a	3.6 b	1.9 b	1.6 ab	1.9 a
Testigo	103.0 ab	104.3 a	1.0 a	171.0 a	78.9 a	0.4 a	1.9 b	2.5 a	1.2 a	5.3 ab	2.7 a	1.5 ab	1.8 a
Serenade	102.9 ab	104.0 a	1.0 a	152.4 a	67.7 a	0.4 a	2.3 ab	3.2 a	0.9 a	4.3 ab	2.2 ab	1.4 b	1.9 a
Poncho Votivo	102.8 ab	103.9 a	1.0 a	160.7 a	70.9 a	0.4 a	2.1 ab	2.9 a	1.1 a	4.8 ab	2.1 ab	1.7 ab	1.8 a
Messenger	102.7 ab	103.6 a	1.0 a	155.9 a	69.7 a	0.4 a	2.1 ab	3.2 a	1.1 a	5.2 ab	2.4 ab	1.6 ab	1.8 a
Actigard	102.5 b	103.9 a	1.0 a	173.5 a	80.5 a	0.5 a	2.1 ab	2.9 a	1.2 a	5.3 ab	2.6 ab	2.0 a*	2.0 a
Consist Max	102.4 b	104.0 a	1.0 a	172.3 a	80.3 a	0.5 a	2.1 ab	2.6 a	1.0 a	5.7 a	2.5 ab	1.8 ab	1.9 a
Suelo	102.9 a	104.0 a	1.0 a	164.7 a	74.7 a	0.4 a	2.2 a	3.0 a	1.0 a	4.8 a	2.4 a	1.7 a	1.9 a
Foliar	102.7 a	103.9 a	1.0 a	161.2 a	72.9 a	0.4 a	2.2 a	3.0 a	1.0 a	5.0 a	2.3 a	1.6 a	1.8 a
Alta	102.9 a	103.9 a	1.0 a	159.9 a	72.2 a	0.4 a	2.2 a	3.0 a	0.9 a	4.9 a	2.3 a	1.7 a	1.9 a
Media	102.8 a	104.0 a	1.0 a	166.3 a	75.7 a	0.4 a	2.1 a	2.9 a	1.3 a	5.0 a	2.5 a	1.6 a	1.9 a
Baja	102.7 a	104.0 a	1.0 a	161.7 a	73.5 a	0.4 a	2.2 a	3.1 a	0.9 a	4.7 a	2.3 a	1.7 a	1.7 a
CV	0.9	0.9	0.9	9.6	16.3	11.3	24.7	26.8	107.9	22.3	27.8	25.7	30.1
Media	102.8	104.0	1.0	162.6	73.8	0.4	2.2	3.0	1.0	4.9	2.3	1.7	1.9

*Valores seguidos de la misma letra no son diferentes entre ellos.

FM=días a 50% de floración masculina, FF=días a 50% de floración femenina, RFM=relación floración femenino/masculino, AIP=altura de planta, AIM=altura de mazorca, BMP=balance de mazorca/planta, AsP=aspecto de planta, AsM=aspecto de mazorca, MP=mazorcas podridas, RG=rendimiento de grano ajustado, SCMA=severidad de complejo mancha de asfalto, SR=severidad de roya común primera evaluación, SR2=severidad de roya común segunda evaluación.

con Guimarães *et al.* (2008), quienes reportan que la utilización de inductores puede conducir a efectos fisiológicos, como sucedió al aplicar Acibenzolar-S-metil en plantas de algodón que presentaron una reducción de altura de planta, peso fresco y seco de brotes, debido a que la activación de la resistencia impone demanda de energía de la planta (Dietrich *et al.*, 2005) y reducción de metabolitos para el crecimiento y otros procesos fisiológicos importantes (Heil *et al.*, 2002).

El mayor rendimiento de grano se obtuvo con Tebuconazole + Trifloxystrobin (5.7 t ha⁻¹) y el menor con Fosetil-Al (3.6 t ha⁻¹). Los resultados obtenidos en rendimiento con el tratamiento de Tebuconazole + Trifloxystrobin coinciden con lo reportado por Couretot *et al.* (2013) quienes mencionan que la mezcla de triazoles y estrobilurinas incrementa el rendimiento.

Para éste ciclo, se realizaron dos evaluaciones de la severidad de *P. sorghi*, las que, al igual que en el primer ciclo, las medias indican que las plantas de las parcelas van de moderadamente resistentes a resistentes (Cuadro 3). En la primera evaluación, Serenade[®] (*Bacillus subtilis*) redujo la severidad de la roya, lo que coincide con lo reportado por la compañía AgraQuest quienes indican que *B. subtilis* induce resistencia natural de las plantas. También, Maget y Pypoux (1994) mencionan que compuestos denominados Iturines, generados por éste organismo, muestran actividad contra muchos hongos fitopatógenos. Diversos reportes indican que esta bacteria puede detener la germinación de las esporas de los patógenos al interrumpir el crecimiento del tubo germinativo e inhibir la unión del patógeno a la hoja de la planta (EPA, 2006).

En la segunda evaluación de roya, no se encontraron diferencias en las severidades de las plantas tratadas, sin embargo, Serenade[®] (*Bacillus subtilis*), que en la primera evaluación resultó con el menor valor de severidad, se encuentra en el mismo grupo estadístico con los otros productos. Posiblemente, para mantener el efecto previamente observado sea necesario realizar otra aplicación, tal como mencionan Rohilla *et al.* (2001), quienes indican que el grado de protección que proporciona la aplicación de un fungicida, ya sea al suelo o foliar, disminuye con el tiempo. También, existen varios reportes de elicitores de resistencia que no proporcionan un control significativo de la enfermedad comparado con el testigo (Mogollón y Castaño, 2011) debido a que, en campo, la expresión de la resistencia inducida está influenciada por el ambiente, el genotipo y la nutrición (Walters *et al.*, 2005).

Fosetil-Al mostró mayor eficiencia al disminuir la severidad del complejo mancha de asfalto presentando el valor más bajo, comparado con el testigo que tuvo el valor más alto de severidad (Cuadro 3). El ingrediente activo de éste producto está reportado como inductor de resistencia en varios cultivos incluyendo fresa, al disminuir la severidad de la pudrición de la corona (*P. cactorum*) y pudrición de raíces (*P. fragariae*) (Eikemo *et al.*, 2003) y en tubérculos de papa, al aplicarlo para el control de *P. infestans*, en donde mostró una mayor acumulación e incremento de las enzimas β -1,3-glucanasas, proteasas, fitoalexinas y compuestos fenólicos (Andreu *et al.*, 2006), relacionadas con defensas de las plantas. Aunque Fosetil-Al mostró el valor más bajo de severidad de CMA, no aumentó el rendimiento en grano. Guimarães *et al.* (2008), mencionan que inducir resistencia en plantas puede tener costos fisiológicos debido a que la activación de la resistencia impone altas demandas de energía a la planta (Dietrich *et al.*, 2005) y reducción de metabolitos para el crecimiento y otros procesos importantes para la planta (Heil y Baldwin., 2002).

CONCLUSIONES

Las dos enfermedades en que se evaluaron los inductores de resistencia se presentaron en los dos ciclos de siembra. En el ciclo TO-2016, ninguno de los agroquímicos redujo la severidad de la roya y mancha de asfalto, pero el Tebuconazole + Trifloxystrobin incrementaron el rendimiento de grano. Para el ciclo TO-2017, Serenade mostró ser el mejor agroquímico para reducir la severidad de *P. sorghi*, mientras que Fosetil-Al mostró el mejor efecto en reducción de la severidad del CMA, pero Tebuconazole + Trifloxystrobin indujo un mayor rendimiento de grano. La severidad de las enfermedades no se vio afectada por el método de aplicación. Hubo diferencias significativas entre dosis ya que la severidad de la roya disminuyó al utilizar dosis altas de los agroquímicos.

LITERATURA CITADA

- Andreu BA, Guevara GM, Wolski E, Daleo G, and Caldiz D. 2006. Enhancement of the natural disease resistance of potatoes by chemicals. *Pest Management Science* 62:162-170.
- Brannen PM, and Kenney DS. 1997. Kodiak®-a successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19:169-171.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 1985. Managing trials and reporting data for CIMMYT's international maize testing program, Mexico, D.F. Disponible en línea: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/697/13201.pdf>

- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 2005. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en campo. Disponible en línea: <https://repository.cimmyt.org/xmlui/bitstream/handle/10883/715/25905.pdf>
- Choudhary DK, Prakash A, and Johri BN. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology* 47:289-297.
- Couretot L, Parisi L, Hirsch M, Suarez ML, Magnone G. y Ferraris G. 2013. Principales enfermedades del cultivo de maíz en las últimas campañas y su manejo. 7 p. Disponible en línea: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_pergamino_principales_enfermedades_del_cultivo_d.pdf
- Dietrich R, Ploss K, and Heil M. 2005. Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. *Plant, Cell and Environment* 28:211-222.
- Dong H, Delaney TP, Bauer DW, and Beer SV. 1999. Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *The Plant Journal* 20(2):207-215. Disponible en línea: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-313x.1999.00595.x>
- Edreva A. 2004. A novel strategy for plant protection: Induced resistance. *Journal of cell and Molecular Biology* 3:61-69. Disponible en línea: <https://pdfs.semanticscholar.org/a974/c0471debbdc5b0d53d70a59923d842e4f50.pdf>
- Eikemo H, Stensvand A, and Tronsmo AM. 2003. Induced resistance as a possible means to control diseases of strawberry caused by *Phytophthora* spp. *Plant Disease* 87(4):345-350. Disponible en línea: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PDIS.2003.87.4.345>
- Environmental Protection Agency (EPA). 2006. Bacillus subtilis Strain 713 (006479) Biopesticide. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/tech_006479.html (consulta, mayo 2018)
- European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus firmus* I-1582. *EFSA Journal* 10:2868.
- Faize M, Faize L, Koike N, Ishizaka M, and Ishii H. 2004. Acibenzolans-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense responses. *Phytopathology* 94:604-612.
- Guimarães BMA, Laranjeira D, and Barbosa RS. 2008. Physiological cost of induced resistance in cotton plants at different nitrogen levels. *Summa Phytopathologica* 34:338-342.
- Gorlach J, Volrath S, Knauf F, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, and Ryals J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629-643.
- Heil M, and Baldwin IT. 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* 7:61-67.
- Hock J, Dittrich U, Renfro BL, and Kranz J. 1992. Sequential development of pathogens in the maize tar spot disease complex. *Mycopathologia* 117:157-161.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), 1991. Descriptors for maize. International Maize and Wheat Improvement Center. México City. 88p. Disponible en línea: https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/104.pdf
- Kilian M, Steiner U, Krebs B, Junge H, Schmiedeknecht G, and Hain R. 2000. FZB24 *Bacillus subtilis*-mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 53:72-93.
- Köller W. 1992. Antifungal agents with target sites in sterol functions and biosynthesis. p.119-206. In: Koller W. Target Sites of Fungicide Action. CRC Press. Boca Raton, Florida. 328 p. Disponible en línea: <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=Or1HDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT183&dq=Antifungal+agents+with+target+sites+in+sterol+functions+and+biosynthesis&ots=8UcS3RIWfM&sig=bIHRbeUnQw9H9FMY8VYLDwSRluQ#v=onepage&q=Antifungal%20agents%20with%20target%20sites%20in%20sterol%20functions%20and%20biosynthesis&f=false>
- López L. 1991. Cultivos herbáceos "Cereales". Vol I. Ediciones Mundi-Prensa. España. 539 p.
- Maget DR, and Peypoux F. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87:151-174.

- Martínez SJ y Espinosa PN. 2014. Sugerencias para el control del “complejo mancha de asfalto” del maíz en la Frailesca, Chiapas. Folleto para productores No. 13. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo experimental centro de Chiapas Ocozocoautla, Chiapas, México. 15 p. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/publication/271586181_Sugerencias_para_el_control_del_complejo_mancha_de_asfalto_del_maiz_en_La_Frailesca_Chiapas DOI:10.13140/2.1.3799.5842
- Márquez C, Castaño ZJ. 2007. Inducción de resistencia a sigatokas en plántulas de plátano Dominico-Hartón. *Agronomía* 15(2):49-57. Disponible en línea: https://kipdf.com/inducion-de-resistencia-a-sigatokas-en-plantulas-de-platano-dominico-harton_5afd547d8ead0e41128b4633.html
- Maublanc, A. 1904. Espèces nouvelles de champignons inférieurs. *Bulletin de la Société Mycologique de France*. 20(2):70-74. Disponible en línea: <https://ia800703.us.archive.org/0/items/mobot31753002525548/mobot31753002525548.pdf>
- Mogollón OA y Castaño ZJ. 2011. Efecto de inductores de resistencia en plántulas de plátano dominico hartón (*Musa balbisiana* AAB) contra *Mycosphaerella* spp. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 35:463-472.
- Quintero VC y Castaño ZJ. 2012. Evaluación de inductores de resistencia para el manejo de nematodos fitoparásitos en plántulas de plátano. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 36:575-586.
- Riveros AS. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Manejo integrado de plagas* 61: 4-11. Disponible en línea: www.sidalc.net/REPDOC/A2124E/A2124E.PDF
- Rohilla R, Singh US, and Singh RL. 2001. Mode of action of Acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Pest Management. Science* 58:63-69.
- Saint G y López PMA. 1997. Producción de maíz y políticas agrícolas en Centro América y México CIMMYT. San José, Costa Rica. 39p. Disponible en línea: libcatalog.cimmyt.org/Download/cim/64574.pdf
- SIAPS-SAGARPA. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesca- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://datos.gob.mx/busca/dataset/datos-estadisticos-de-la-produccion-agricola-generada-a-nivel-nacional/resource/91fb244e-4f49-4c97-9f6d-eae06a4fdb74> (consultado, mayo 2018).
- Schallmeyer M, Singh A, and Ward OP. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology* 50:1-17.
- Schreiber K, and Desveaux D. 2008. Message in a bottle: Chemical biology of induced resistance in plants. *The Plant Pathology Journal* 24:245-268.
- Sillero JC, Rojas MM, Avila CM, and Rubiales D. 2012. Induction of systemic acquired resistance against rust, ascochyta blight and broomrape in faba bean by exogenous application of salicylic acid and benzothiadiazole. *Crop Protection* 34:65-69.
- Uribelarrea M, Cárcova J, Otegui ME, and Westgate ME. 2002. Pollen production, pollination dynamics, and kernel set in maize. *Crop Science* 42:1910-1918.
- Walters DR, Walsh D, Newton A, and Lyon G. 2005. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *The American Phytopathological Society* 95:1368-1373.
- Walters DR, and Fountaine JM. 2009. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *Journal of Agricultural Science* 147:523-535.
- Walters DR, Ratsep J, and Havis ND. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* 64:1263-1280.
- Wei Z, Laby R, Zumoff C, Bauer D, Ho SY, Collmer A, and Beer S. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257:85-88.

3.10. CP-Elvia 3, nuevo maíz blanco resistente al complejo de la mancha de asfalto para subtrópico de México

Carlos De León-García de Alba, Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230. Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Resumen

En la producción de maíz, el agricultor se encuentra ante la alternativa de sembrar semilla comercial de maíz híbrido o de polinización libre, incluyendo variedades mejoradas o nativas. La semilla de maíz híbrido es costosa y es necesario comprarla en cada nuevo ciclo de siembra, mientras que una variedad mejorada de polinización libre ofrece varias ventajas ya que puede sembrarse por varios años, puede competir en rendimiento con los híbridos, es de menor costo y se difunde entre agricultores. Una variedad sintética ofrece ventajas adicionales sobre otras variedades incluyendo uniformidad en floración y fenotipo, mejor rendimiento de grano y resistencia a enfermedades. En éste trabajo se muestra la obtención de la variedad sintética de maíz de grano blanco CP-Elvia 3, con buen comportamiento agronómico y resistente al complejo de mancha de asfalto y que se obtuvo mediante un programa de selección recurrente de familias S_1 .

Palabras clave: variedad sintética, selección recurrente de familias S_1 , mancha de asfalto.

La enfermedad del maíz ‘mancha de asfalto’ causada por *Phyllachora maydis*, fue inicialmente identificada en muestras originarias de México (Maublanc, 1905; CIMMYT, 2004). Actualmente, se ha propuesto el “complejo mancha de asfalto”, debido a la asociación etiológica de los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* (Garrido-Ramírez, E. Com. Personal, 2020). La enfermedad, en etiología simple o como complejo, se ha diseminado o reemergido por todo México y en otros países tanto en áreas productoras de maíz de clima cálido y húmedo como en regiones subtropicales y hasta 2600 msnm

(Hock *et al.*, 1989; Garrido-Ramírez, E. Com. Personal, 2020); pero su daño principal se presenta en cultivos de maíz de las costas de Tabasco, Veracruz, Jalisco, Tamaulipas, Chiapas, Oaxaca, Michoacán, Guerrero y Jalisco, además se reportan daños en otras regiones no costeras del altiplano de México como Morelos, México e Hidalgo, pero su distribución puede ser aún más extensa (Hock, 1991). Por otra parte, *Coniothyrium phyllachorae* también se encuentra asociado al ‘complejo mancha de asfalto’ considerado como hiperparásito de *Phyllachora* (Garrido-Ramírez, E. Com. Personal, 2020). La enfermedad, en cualquiera de su condición etiológica, causa pérdidas de producción de acuerdo a la susceptibilidad y la etapa fenológica del maíz en que se presenta. La enfermedad, en condición de complejo, inicia con la presencia de *P. maydis*, con la producción de una manchita negra, brillante, levantada y dura sobre hojas de maíz, con apariencia al asfalto, seguida de la aparición de *M. maydis* alrededor de la mancha de asfalto (Quiroga-Madrugal *et al.*, 2017). El desarrollo de la infección foliar avanza de hojas inferiores hacia las superiores y, en estados avanzados de desarrollo del cultivo después de floración, la infección resulta en un follaje severamente atizonado (Figura 1A). Infección severa puede afectar la formación y calidad del grano (Figura 1B).



Figura 1. Signos y síntomas del ‘complejo mancha de asfalto’; A) signos y síntomas en hojas de maíz y B) daños en mazorca de maíz (Fotos: C. De León).

Como alternativa para minimizar los efectos de la mancha de asfalto en el rendimiento de grano de maíz, se buscó generar variedades sintéticas de polinización libre de maíz con buenas características agronómicas y resistencia genética a la enfermedad. La resistencia genética se considera la forma más eficiente y económica de control de esta y otras enfermedades de los cultivos (Pandey y Gardner, 1992).

El programa de mejoramiento para desarrollar germoplasma de maíz con caracteres agronómicos deseables y resistencia genética a la mancha de asfalto, se inició con la integración de una población de maíz de amplia base genética de endospermo blanco. Esta población base de grano blanco, se formó en 2008, recombinando 37 diferentes genotipos de maíz de grano blanco con buen comportamiento agronómico incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y nativas colectadas en el altiplano de México. Estos materiales se recombinaron en lotes aislados por dos ciclos para lograr su estabilidad genética. Los lotes de recombinación se establecieron en terreno de un agricultor en el ejido de Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, Estado de México (19° 43' N, 98° 53' W, 1700 msnm). Después del segundo ciclo de recombinación (C_0) se inició un programa de selección recurrente de familias S_1 (Pandey y Gardner, 1992), autofecundando aproximadamente 400 plantas deseables y generando líneas S_1 en cada ciclo de mejoramiento. En el C_3 de mejoramiento, se sembró semilla de familias S_1 seleccionadas, bajo la modalidad de mazorca por surco, en un vivero establecido en lote de un agricultor en Metztitlán, Hidalgo (20° 45' N; 98° 39' W; 900-2700 msnm), en donde la enfermedad mancha de asfalto se presenta en forma severa en condiciones naturales. Así, las líneas se evaluaron y seleccionaron por resistencia a la mancha de asfalto en condiciones de incidencia severa de campo.

En éste vivero, se seleccionaron siete grupos de 10-12 líneas S_1 con sincronía en días a floración masculina y femenina (días a floración femenina - días a floración masculina), altura de planta y mazorca (índice de altura = producto de dividir altura de mazorca entre altura de planta), aspecto de planta, desarrollo fenológico, tiempo a cosecha y resistencia a enfermedades foliares que se midieron con valores de severidad de 1 (no daño) a 5 (daño severo) por severidad de daño en el follaje ocasionado por mancha de asfalto y enfermedades incluyendo roya común, mancha gris, *Curvularia*, entre otras. Cada uno de éstos siete grupos de líneas se recombinaron en un dialelo para generar la F_1 de nuevas variedades sintéticas experimentales que se avanzaron a F_2 para ser

incluidas en ensayos agronómicos con otras variedades obtenidas e híbridos comerciales y medir su comportamiento agronómico y rendimiento de grano.

En dos ensayos de rendimiento establecidos en 2016 y 2017 en el ejido Cinta Larga (CL) en Mixquiahuala, Hidalgo (20° 13' N, 99° 13' W, 2100 msnm) con semilla F₂ de variedades experimentales obtenidas de líneas del ciclo C₃-S₁, la variedad experimental CL16-TSR-2 fue seleccionada por sus caracteres sobresalientes sobre otros materiales incluidos en los mismos ensayos (Cuadro 1). En 2017, estas mismas variedades se sembraron en un ensayo en bloques al azar con tres repeticiones en Metztitlán, Hidalgo, para evaluar su resistencia a la mancha de asfalto (Cuadro 1). A fines de 2017, ésta variedad se propuso ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semilla (SNICS) para su registro y aprobación como la nueva variedad CP-Elvia 3, la cual fue entregada al Colegio de Postgraduados al que se le asignó el título de Obtenedor No. 2167 para su distribución y comercialización (Figura 2).

La variedad sintética de maíz CP-Elvia 3 (Cuadro 1) es de alto rendimiento de grano (72% mayor que el testigo comercial), tiene buena sincronía floral, tiene planta de altura media y su semilla es de bajo costo (aproximadamente la mitad del costo de semilla híbrida), se puede volver a sembrar por varios años, facilita la diseminación de su semilla entre agricultores y posee resistencia genética al complejo de la mancha de asfalto.

Cuadro 1. Comportamiento agronómico de la variedad sintética de maíz blanco CP-Elvia 3 (CL-17). Segundo ensayo para registro en SNICS.

Genealogía	Origen (CL-16)	Sincronía floral	Índice de altura	Aspecto de planta (1-5) ^a	Aspecto de mazorca (1-5)	Rendimiento de grano (t ha ⁻¹)	Severidad mancha asfalto (1-5) (Metztitlán, Hidalgo)
CL16-INS	2 #	3.0 ab ^y	0.5 a	2 a	1.8 a	6.9 ab	2.7 b
IBS 1	5 #	3 ab	0.46 a	2 a	1.8 a	7.4 ab	4.0 bc
ITSR 1	7 #	3.6 b	0.46 a	2.3 a	2 a	8.6 ab	3.3 bc
ITSR 2	8 #	2.6 ab	0.46 a	1.8 a	2 a	7.6 ab	1.5 a
CL16-TSR	12-2#	1.8 a	0.69 a			12.4 a	1.1 a
CL16-TSR-2	12-1#	2.2 a	0.71 a			11.6 a	1.8 a
Testigo	BG1384W		0.67 a			8.9 ab	3.2 bc
Promedio		2.7	0.56			7.78	
DMS (5%)		1.24	0.28	1.52	1.52	4.33	
CV (%)		0.65	.009	0.28	0.28	20.3	

^aSeparación de medias por Tukey (Valores seguidos por letras similares indican no diferencias entre ellas). ¹1 = muy bueno; 5 = muy malo.



Figura 2. Semilla de la variedad sintética CP-Elvia 3.

El impacto de éste proyecto hacia la sociedad, es el incremento de ingreso del agricultor debido al bajo costo de la semilla y al incremento de la productividad del maíz por su buen rendimiento y resistencia a la enfermedad que puede evitar su diseminación en áreas productoras de maíz.

LITERATURA CITADA

- CIMMYT. 2004. Enfermedades de maíz. Una guía para identificación en el campo. 4ª ed. CIMMYT, El Batán, México.
- Hock J, Kranz J y Renfro BL. 1989. El “complejo mancha de asfalto” de maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7: 129-135.
- Hock J. 1991. Requisitos ambientales para el desarrollo del “complejo de la mancha de asfalto” que ataca al maíz en México. *Phytopathology* 81: 643-645.
- Quiroga-Madrugal RR, Garrido-Ramírez ER, Rosales-Esquinca MA y Salazar-Pinacho WM. 2017. Manejo integrado del complejo mancha de asfalto del maíz en México. Manual técnico. Univeridad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutierrez, Chiapas, México. 39 p.
- Maublanc A. 1904. Espèces nouvelles de Champignons inferius. *Bulletin Societe Mycologie Francaise* 20: 72.
- Pandey S. and Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. *Advances Agronomy* 28: 1-87.



3.11. CP-Vero 1, variedad sintética de maíz (*Zea mays*) blanco, resistente a carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zearae*) para el altiplano de México

Carlos De León-García de Alba, Especialidad de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP.56230. *Correo para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Resumen

En la producción de maíz, el agricultor se encuentra ante la alternativa de sembrar semilla comercial de maíz híbrido o semilla de polinización libre incluyendo variedades mejoradas o poblaciones nativas. La semilla de maíz híbrido tiene un alto costo, es necesario comprar semilla nueva para cada siembra mientras que la semilla de una variedad mejorada puede sembrarse por varios años, puede competir en rendimiento con un híbrido, es de bajo costo y puede compartirse entre agricultores. Una variedad sintética ofrece ventajas adicionales sobre una variedad mejorada común, con buen rendimiento de grano y uniformidad en floración y fenotipo. Este trabajo presenta actividades involucradas en la obtención de la variedad sintética de maíz de endospermo blanco CP-Vero 1 siguiendo un programa de selección recurrente de líneas S_1 para obtener buenas características agronómicas y resistencia al carbón de la espiga.

Palabras clave: Resistencia genética, selección S_1 recurrente.

La enfermedad del carbón de la espiga, causada por el basidiomiceto *Sporisorium reilianum* f. sp. *zearae*, se ha diseminado por varias regiones del país en localidades de Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas y Aguascalientes, pero su distribución puede ser aún más extensa (Aquino-Martínez *et al.*, 2011). Recientemente, se ha reportado en los valles del Mezquital y de Toluca en donde se siembran semillas de maíces híbridos que han mostrado susceptibilidad a la enferme-

dad. La enfermedad invade la planta en forma sistémica y los síntomas de su infección son visibles con daños en mazorca y/o la espiga (Figura 1).

Como parte del control de ésta enfermedad, se inició el proyecto para generar variedades de polinización libre de maíz con buenas características agronómicas y con resistencia genética a la enfermedad. La resistencia genética se considera la forma más eficiente y económica para el control de ésta y otras enfermedades en los cultivos (Pandey y Gardner, 1992).



Figura 1. Signos y síntomas del carbón de la espiga en partes reproductivas del maíz.

El programa de mejoramiento para desarrollo de una variedad sintética que contenga caracteres agronómicos deseables y resistencia genética al carbón de la espiga se inició con el desarrollo de una población de maíz con endospermo blanco con amplia base genética. Esta población se formó recombinando en lotes aislados, por dos ciclos, un total de 45 colectas de maíces del altiplano de México con buen comportamiento agronómico, incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y nativas. Para evitar autofecundaciones, el germoplasma colectado se recombinó sembrando cada componente en 2 surcos de 5 m de largo que se desespigaron y cada 2 surcos se sembró con una mezcla balanceada de todas las entradas como macho. Los lotes de recombinación se

establecieron en terreno de un agricultor en el ejido de Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, México (19° 13' N, 100° 107' W, 1740 msnm). Después de dos ciclos de recombinación se formó la población base (C0), sobre la cual se inició un programa de selección recurrente de S_1 (Pandey y Gardner, 1992), autofecundando aproximadamente 400 plantas deseables en cada ciclo de mejoramiento y generando semilla S_1 en cada ciclo. La semilla de familias S_1 seleccionadas se inoculó con una suspensión acuosa de 1% de carboximetilcelulosa con 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} del patógeno (Quezada-Salinas *et al.*, 2013). La semilla inoculada se sembró, mazorca por surco, sin repeticiones, en un vivero establecido en el ejido Cinta Larga, en Mixquiahuala, Hidalgo (20° 11' N, 99° 14' W, 2100 msnm) en donde se presenta la enfermedad en condiciones naturales.

Aproximadamente 33% de las líneas S_1 inoculadas y seleccionadas de acuerdo a caracteres agronómicos deseables y resistencia a la enfermedad, se recombinaron planta a planta para iniciar un nuevo ciclo de mejoramiento de la población base. Simultáneamente, en cada ciclo de evaluación de líneas S_1 , se seleccionaron grupos de 10-12 líneas con un carácter específico deseable, como son uniformidad en fecha de floración, altura de planta y mazorca, precocidad, etc. Estos grupos de líneas se cruzaron mediante el esquema dialélico con cruza directa para generar la F_1 de nuevas variedades sintéticas experimentales que se avanzaron a F_2 para ser incluidas en ensayos agronómicos con otras variedades obtenidas en ese u otros ciclos, e híbridos comerciales y medir su comportamiento agronómico y rendimiento de grano. Este proceso de mejoramiento poblacional es continuo.

En ensayos de rendimiento establecidos con semilla F_2 de variedades experimentales obtenidas de líneas del ciclo C_3-S_1 , la variedad experimental Blanca 13 fue seleccionada por sus caracteres sobresalientes, incluyendo mejor calidad y aspecto de grano y llenado de mazorca sobre otros materiales considerados en los mismos ensayos (Cuadro 1). En 2017, ésta variedad seleccionada se sometió ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) para aprobación como nueva variedad denominada CP-Vero 1, fue entregada al Colegio de Postgraduados al que se otorgó el título de obtentor número 1831. Semilla certificada de ésta variedad se encuentra en producción en lotes de agricultores con buenos resultados (Figura 2).

Cuadro 1. Promedio de dos ensayos agronómicos de evaluación de caracteres agronómicos de tres variedades experimentales y un testigo en dos localidades. 2015. (Segundo ensayo para registro en el SNICS).

Origen Toluca 15	Rendimiento (tha ¹)	Días polen	Días estigmas	Altura planta (cm)	Altura mazorca (cm)
Blanca 13	8.6 a ^z	85 a	89 a	198 b	103 ab
Test.BG1384W	8.1 ab	86 a	89 a	204 a	101 ab
Blanca 18	8.6 a	86 a	89 a	201 ab	95 a
Blanca 7	8.5 a	85 a	89 a	201 ab	95 a
Media	8.4	85.5	88.7	201.8	99.2
CV (%)	13.9	1.29	1.56	2.9	4.99
DMS (0.05 %)	1.1	2.2	2.7	11.9	9.9

^z Letras similares, estadísticamente los tratamientos son iguales.



Figura 2. Lote de producción de semilla certificada de la variedad sintética CPVero 1. Huejotzingo, Puebla 2019.

La variedad sintética de maíz CP-Vero 1 es de alto rendimiento, de grano blanco, con resistencia genética al carbón de la espiga, es de bajo costo y se puede volver a sembrar por varios años. El impacto de éste proyecto hacia la sociedad, es el incremento de ingreso del agricultor debido al bajo costo de la semilla y al incremento de la productividad del maíz por su buen rendimiento y resistencia a la enfermedad, con lo que se evita su diseminación. Esta variedad sintética está registrada en el SNICS y es propiedad del Colegio de Postgraduados para su distribución y comercialización.

El programa de mejoramiento de selección S_1 recurrente implementado involucra el mejoramiento de una población inicial con amplia base genética de la que se generan líneas S_1 , que se evalúan por comportamiento agronómico y resistencia al carbón de la espiga usando inoculaciones artificiales del patógeno, permitiendo la generación de nuevas variedades experimentales en cada ciclo de mejoramiento.

LITERATURA CITADA

- Aquino-Martínez JG, Sánchez-Flores A, González-Huerta A y Sánchez-Pale JR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. Revista Mexicana de Fitopatología 29:39-49. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n1/v29n1a4.pdf>
- Pandey S and Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. Advances in Agronomy 28:1-87. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60935-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60935-9)
- Quezada-Salinas A, De León-García de Alba C, Hernández-Anguiano AM y Nava-Díaz C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kuhn) Langdon & Fullerton. Revista Mexicana de Fitopatología 31:80-90. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n2/v31n2a1.pdf>



3.12. CP- Hilda 2, nueva variedad sintética de maíz (*Zea mays*) de grano amarillo y resistente al diente de caballo (*Claviceps gigantea*) para el altiplano de México

Carlos De León-García de Alba, Especialidad de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230. *Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Resumen

En producción de maíz, la semilla de variedades de polinización libre ofrecen al agricultor obtener un precio más bajo que la semilla de híbridos comerciales, no es necesario comprar semilla nueva cada año, por su estabilidad genética puede sembrarse varios años, ofrecen más estabilidad en rendimiento de grano y tipo de planta, es más fácil de conseguir, puede competir en rendimiento con un híbrido y puede propagarse entre agricultores. El presente trabajo es resultado de actividades desarrolladas para la obtención de la variedad sintética de maíz de endosperma amarillo CP-Hilda 2, con buen comportamiento agronómico y resistencia genética a la enfermedad “diente de caballo”, siguiendo un programa de selección recurrente con líneas S_1 .

Palabras clave: CP-Hilda 2, variedad sintética, selección S_1 recurrente

La enfermedad del diente de caballo, causada por el ascomiceto *Claviceps gigantea* (Fuentes *et al.*, 1964), fase sexual del anamorfo *Sphacelia* sp., se ha diseminado de las regiones donde se reportó inicialmente que se consideran el valle de Toluca en el Estado de México y la sierra de Pátzcuaro, Michoacán, a diferentes localidades en los estados de Puebla e Hidalgo, todas con alta humedad relativa y bajas temperaturas. En todas estas localidades, la enfermedad causa pérdidas en la producción del cereal en donde se siembran semillas de maíces híbridos o variedades locales que son susceptibles a la enfermedad.

La enfermedad se inicia cuando al madurar los granos de maíz infectados por el hongo desarrollan esclerocios, estructuras de reposo que les permite invernar. Durante la cosecha, los esclerocios caen al suelo y permanecen en estado dormante durante el invierno para reactivar su metabolismo en la siguiente temporada de lluvias. Al reactivarse en condiciones favorables de humedad y temperatura, los esclerocios germinan formando estípites (tallos) con cabezuelas en el ápice en las que se forman peritecios que contienen ascas con ascosporas las cuales son las estructuras infectivas del hongo que penetran la mazorca e infectan estigmas frescos. En su fase asexual, los esclerocios también desarrollan micro y macroconidios, los cuales también pueden penetrar en la mazorca e infectar los estigmas frescos (Osada, 1984).

Como parte del manejo integrado de esta enfermedad, se inició el proyecto para generar variedades de polinización libre de maíz con buenas características agronómicas y resistencia genética a la enfermedad. La resistencia genética se considera la forma más eficiente y económica de control de ésta y otras enfermedades de cultivos (Pandey y Gardner, 1992).

El programa de mejoramiento para desarrollo de germoplasma con caracteres agronómicos deseables y resistencia genética al diente de caballo se inició en 2009 con el desarrollo de una población de maíz con endospermo amarillo y amplia base genética. Esta población base de maíz se formó recombinando un total de 55 diferentes maíces colectados en el altiplano de México con buen comportamiento agronómico, incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y nativas en lotes aislados durante dos ciclos. Los lotes de recombinación se establecieron en terreno de un agricultor en el ejido de Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, México (19°13' N, 100°07' W, 1870 msnm). Después de dos ciclos de recombinación inicial (C0), se inició un programa de selección S_1 recurrente (Pandey y Gardner, 1992), autofecundando aproximadamente 400 plantas deseables en cada ciclo de mejoramiento y generando semilla S_1 en cada uno de tres ciclos de mejoramiento y generando semilla S_1 en cada ciclo. Semilla de las S_1 obtenidas, se sembraron mazorca por surco en un vivero establecido en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, México (19°24' N, 99°41' W, 2667 msnm), donde se presenta la enfermedad en condiciones naturales. Mazorcas de familias S_1 seleccionadas por caracteres agronómicos se inocularon con una suspensión acuosa de 1×10^5 macrosporas mL^{-1} del patógeno *Sphacelia* sp. (Figura 1).



Figura 1. Micro y macroconidios de *Sphacelia* sp., anamorfo de *Claviceps gigantea*.

Aproximadamente 33% de las líneas S_1 inoculadas y seleccionadas por caracteres agronómicos deseables y resistencia a la enfermedad, se recombinaron para iniciar un nuevo ciclo de mejoramiento de la población base. Este proceso de mejoramiento poblacional es continuo. Simultáneamente, en cada ciclo de evaluación de las líneas S_1 , se seleccionaron grupos de 10-12 líneas con un carácter específico deseable, como son uniformidad en fecha de floración, altura de planta y mazorca, precocidad, etc. Estos grupos de líneas se cruzaron en diseño dialélico para generar la F_1 de nuevas variedades sintéticas experimentales, que se avanzaron a F_2 para ser incluidas en ensayos agronómicos con otras variedades obtenidas en ese u otros ciclos, e híbridos comerciales y medir su comportamiento agronómico y rendimiento de grano.

En ensayos de rendimiento establecidos con semilla F_2 de variedades experimentales obtenidas de líneas del ciclo C_3 - S_1 , la variedad experimental Amarilla 2 fue seleccionada por sus caracteres sobresalientes sobre otros materiales incluidos en los mismos ensayos (Cuadro 1). En 2018, esta variedad se sometió ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) para aprobación como la nueva variedad CP-Hilda 2, la cual se entregó al Colegio de Postgraduados que fue reconocido con el título de obtentor

Cuadro 1. Comportamiento agronómico promedio de la variedad sintética de maíz amarillo CP-Hilda 2 (Toluca, 2017 y 2018) para registro en el SNICS.

Genealogía	Origen Toluca 13	ASI ¹	Índice altura ²	Aspecto planta (1-5) ³	Aspecto mazorca (1-5) ³	Rendimiento de grano (t ha ⁻¹) ⁴
Amarilla 2	14	1.0 a	0.45 a	1.3 a	1.2 a	9.1 a
Amarilla 1	12	2.5 a	0.49 ab	1.4 ab	1.1 a	8.9 a
Amarilla 3	11	2.5 a	0.49 ab	2.0 b	1.4 a	8.8 a
Amarilla 4	13	2.5 a	0.48 ab	1.8 ab	1.2 a	8.3 b
Testigo (Blanco)	BG1384W	3.2 a	0.50 ab	1.6 ab	1.2 a	8.8 a
Promedio		2.34	0.48	1.62	1.22	8.78
DMS (5%)		2.6	0.03	.633	0.3	1.1
CV (%)		17.8	22.3	19.4	28.4	18.7

¹ASI=Anthesis-Silking Interval= Días a floración femenina menos días a floración masculina.

² Índice de altura= Relación entre altura de mazorca y altura de planta.

³ Aspecto: 1= Muy bueno, 5= muy malo.

⁴ Rendimiento de grano ajustado a 15% de humedad.

En cada columna valores seguidos de la misma letra indican no hay diferencia significativa (0.05%).

2166. Semilla certificada de esta variedad se encuentra en producción en lotes de agricultores con buenos resultados (Figura 2).

La variedad sintética de maíz CP-Hilda 2 es de grano amarillo, de alto rendimiento, con potencial de 10 t ha⁻¹, posee resistencia genética al diente de caballo, su semilla es de bajo costo y se puede sembrar durante varios años sin afectar su rendimiento de grano. El impacto de este proyecto hacia la sociedad, es el incremento de ingreso económico del agricultor debido al bajo



Figura 2. Lote de producción de semilla certificada de la variedad sintética CP-Hilda 2 en Huejotzingo, Puebla, México, durante el año 2019.

costo de la semilla y al incremento de la productividad del maíz por su buen rendimiento y resistencia a la enfermedad, la cual ayuda a evitar la diseminación de esta. La variedad sintética CP-Hilda 2 está registrada en el SNICS y es propiedad del Colegio de Posgraduados para su distribución y comercialización.

LITERATURA CITADA

- Fuentes SF, de la Isla ML, Ullstrup AJ, and Rodríguez AE. 1964. *Claviceps gigantea* a new pathogen of maize in Mexico. *Phytopathology* 54:379-381.
- Osada SK. 1984. Estudio sobre la germinación del cornezuelo del maíz e interacción hospedante-parásito (*Zea mays* L.-*Claviceps gigantea* Fuentes *et al.*). Tesis doctoral. Especialidad de Fitopatología, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Estado de México. 86p.
- Pandey S and Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. *Advances in Agronomy* 28:1-87. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60935-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60935-9)



3.13. CP-Tania 5, variedad de maíz blanco resistente al diente de caballo (*Claviceps gigantea*) para el altiplano de México

Carlos De León-García de Alba*, Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230; Alma Rosa Solano-Báez, Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, Boulevard. Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n, Los Mochis, Sinaloa, CP 81223, México; Guillermo Márquez-Licona, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, Calle CeProBi No. 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731, México; Jesús Ricardo Sánchez-Pale, Facultad de ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Cerritos, Toluca, Estado de México.
*Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Resumen

En el Colegio de Postgraduados se desarrolló la variedad sintética de maíz de grano blanco con buenas características agronómicas y resistencia al diente de caballo para zonas de transición y altiplano de México. *C. gigantea* ha sido reportado solo en México, sin embargo, se ha distribuido en zonas productoras de maíz en el altiplano y zonas de transición con clima fresco y alta humedad. La variedad se generó recombinando 10 líneas S_1 generadas a partir de una población base de maíz con endospermo blanco y amplia base genética. La población se mejoró siguiendo un programa de selección recurrente en líneas S_1 . Las líneas obtenidas se seleccionaron después de inocular con macroconidios del hongo y las mejores se recombinaron para generar variedades sintéticas, entre las cuales la variedad CP-Tania 5 fue sobresaliente. Esta variedad sintética ofrece rendimiento de grano que compite con el de híbridos comerciales, la semilla es de menor costo, puede sembrarse por varios ciclos en condiciones limitantes y puede distribuirse entre agricultores.

Palabras clave: Variedad sintética, selección S_1 recurrente

La enfermedad del diente de caballo es causada por el estado teleomorfo del ascomiceto *Claviceps gigantea* (Fuentes *et al.*, 1964) cuyo estado anamorfo

Sphacelia sp. tiene una amplia distribución en condiciones de campo. La enfermedad se ha reportado únicamente en México, inicialmente en el valle de Toluca, Edo. Mex. y la sierra tarasca en Pátzcuaro, Michoacán (Fuentes *et al.*, 1964) pero se ha diseminado a localidades de Puebla e Hidalgo (De León-García de Alba *et al.*, 2017), donde prevalecen condiciones de alta humedad relativa y bajas temperaturas. En estas regiones, en donde se establecen tanto maíces híbridos como variedades locales con susceptibilidad a la enfermedad, se han reportado pérdidas de hasta 100 % de la producción de grano (Meléndez-Carbajal, 2015).

La enfermedad se origina cuando, al madurar los granos de maíz infectados por el hongo, se desarrollan en forma de esclerocios (Figura 1A), estructuras de reposo que les permite invernarse. Durante la cosecha, estos esclerocios caen al suelo y permanecen en estado de dormancia durante el invierno para reactivar su metabolismo en la siguiente temporada de siembra con la estación de lluvias. Al reactivarse, los esclerocios germinan formando estípites (tallos) con cabezuelas en el ápice en las que se forman peritecios que contienen ascas con ascosporas (Figura 1B). Estas ascosporas son las estructuras infectivas del hongo que penetran la mazorca infectando estigmas frescos. En su fase asexual, los esclerocios desarrollan micro y macroconidios que también pueden penetrar en la mazorca infectando los estigmas frescos (Moreno-Moreno, 2016).

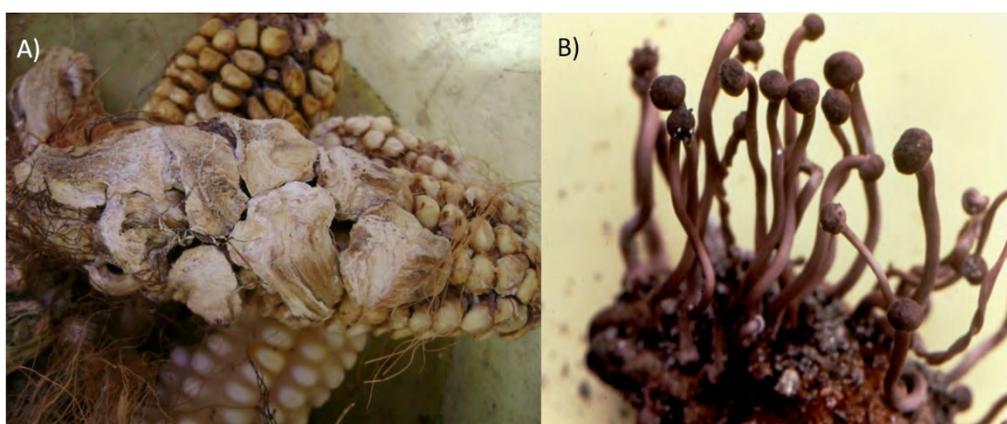


Figura 1. Esclerocios del diente de caballo en mazorcas de maíz (A) y germinación de esclerocios de *C. gigantea* en que se forman peritecios con ascosporas (B).

Como parte del control de esta enfermedad y objetivo de la investigación, se inició un programa de mejoramiento para desarrollar variedades sintéticas de polinización libre de maíz con buenas características agronómicas y resistencia genética a la enfermedad. La resistencia genética se considera la forma más eficiente y económica de control de ésta y otras enfermedades de cultivos (Pandey y Gardner, 1992).

Programa de mejoramiento. El programa de mejoramiento para desarrollar germoplasma con caracteres agronómicos deseables y resistencia genética al diente de caballo se inició con la formación de una población de maíz con endospermo blanco de amplia base genética. Esta población base de endospermo blanco se formó recombinando en lotes aislados, por dos ciclos, un total de 45 diferentes maíces colectados en el altiplano con comportamiento agronómico deseable, incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y nativas. Los lotes de recombinación se establecieron en terreno de un agricultor en el ejido de Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, Edo. Mex. (19° 13' N, 100° 07' W, 1880 msnm, Humedad Relativa media 65%). Después de la recombinación inicial (C_0), se inició un programa de selección recurrente con líneas S_1 (Pandey y Gardner, 1992), con la autofecundación de aproximadamente 400 plantas deseables en cada ciclo de selección y generando semilla S_1 en cada ciclo. Semilla de las S_1 obtenidas, se sembraron una mazorca por surco en un vivero establecido en el Campo Experimental de la Universidad Autónoma del Estado de México en la localidad de El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, Edo. Mex. (19° 24' N, 99° 4' W, 2660 msnm), donde se presenta la enfermedad en condiciones naturales. Mazorcas provenientes de familias S_1 seleccionadas por caracteres agronómicos fueron inoculadas con una suspensión acuosa de 100 000 macrosporas mL^{-1} del patógeno *Sphacelia* sp. obtenidas en medio T2 (Pažoutová *et al.*, 2004).

Aproximadamente 33% de las líneas S_1 inoculadas y seleccionadas por características agronómicas deseables y resistencia a la enfermedad, se recombinaron para iniciar un nuevo ciclo de selección de la población base. Este proceso de mejoramiento poblacional fue continuo. Simultáneamente, en cada ciclo de evaluación de S_1 , se seleccionaron grupos de 10 a 12 líneas con un atributo específico deseable, como sincronía en floración masculina y femenina, altura de planta y mazorca, precocidad y resistencia a enfermedad. Estos grupos de líneas se cruzaron en dialelo para generar la F_1 de nuevas variedades sintéticas experimentales, que se avanzaron a F_2 para ser incluidas en ensayos

agronómicos con otras variedades obtenidas e híbridos comerciales y medir su comportamiento agronómico y rendimiento de grano.

En ensayos de rendimiento establecidos con semilla F_2 de variedades experimentales obtenidas de líneas del ciclo C_3S_1 , la variedad experimental Blanca 13 fue seleccionada por sus características sobresalientes sobre otros genotipos incluidos en los mismos ensayos (Cuadro 1). En 2018, esta variedad seleccionada se sometió ante el SNICS para aprobación como nueva variedad, llamada CP-Tania 5, fue entregada al Colegio de Postgraduados, que fue reconocido con el título de Obtentor No. 2559, registro en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales-CNVV (MAZ-2179-210220) para su distribución y comercialización. Semilla básica de ésta variedad se produjo en 2019 en el Campo Experimental del Colegio de Postgraduados en Montecillos, Edo. de Mex. (Figura 2).

Cuadro 1. Comportamiento agronómico de la variedad sintética de maíz blanco CP-Tania 5 (Toluca, Estado de México 2017). (Segundo ensayo requerimiento del SNICS).

Genealogía	Origen CL-16	ASI ^a	Índice altura	Aspecto planta (1-5)	No. mazorcas podridas	Rendimiento (t ha ⁻¹)
Blanca 13	EV 3	0.95 a	0.52 a	1.2 a	0.7 a	8.6 a
Testigo	BG1384W	0.96 a	0.49 ab	1.5 ab	0.7 a	8.7 a
Blanca 18	EV 2	0.96 a	0.48 ab	1.7 b	0.0 a	7.6 a
Blanca 7	EV 1	0.95 a	0.47 ab	1.9 b	0.7 a	7.5 b
Promedio		0.95	0.49	1.57	0.52	8.1
DMS (5%)		0.2	0.03	0.583	0.2	0.98
CV (%)		16.7	21.2	17.4	29.5	17.7

^aAnthesis Sillking Interval.



Figura 2. Lote de producción de semilla básica de la variedad sintética de maíz CP-Tania 5. Montecillo, Edo. Méx. 2019.

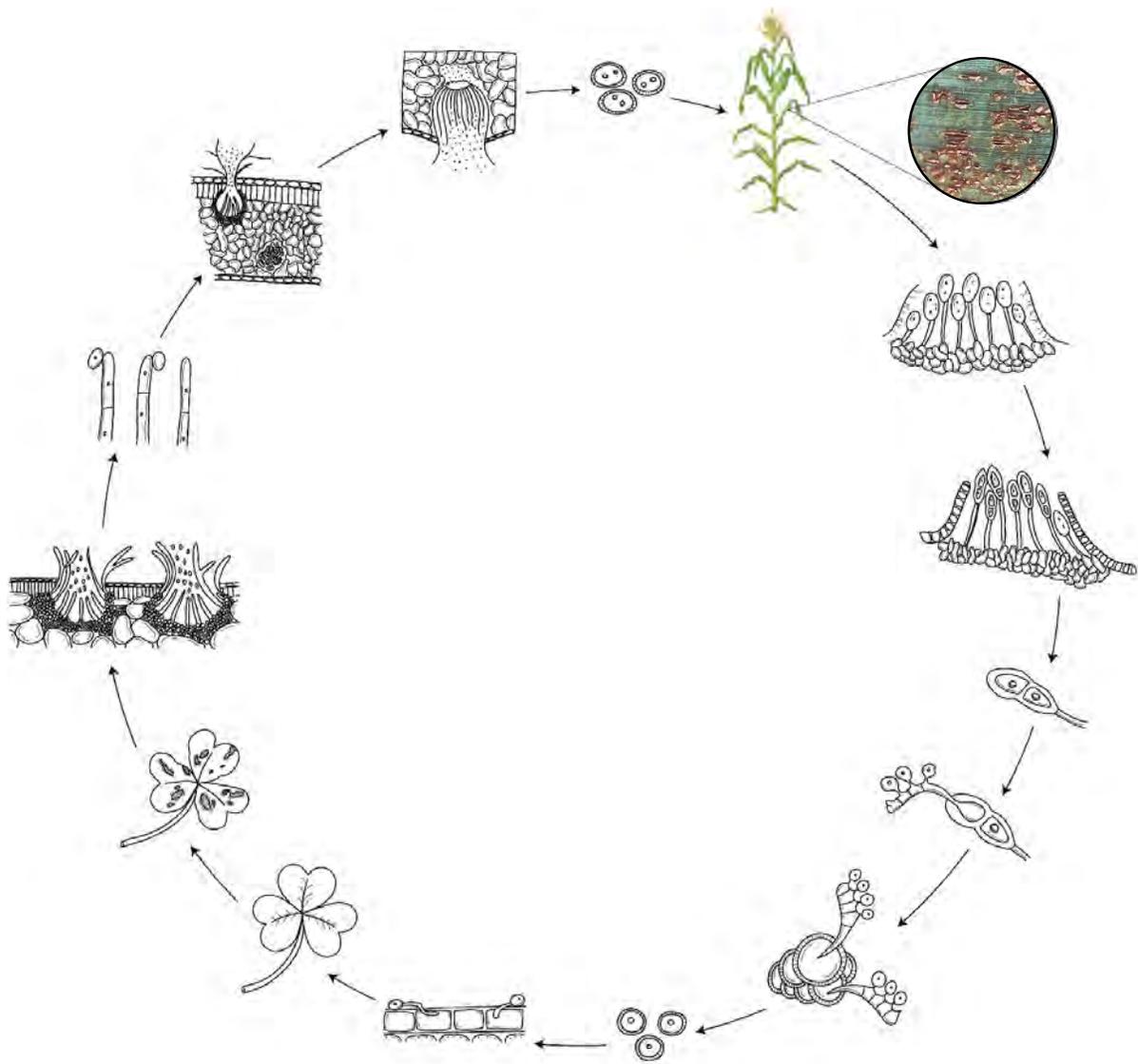
La variedad sintética de maíz CP-Tania 5 es de alto rendimiento (8.6 t ha⁻¹), posee resistencia genética al diente de caballo, es de bajo costo y se puede sembrar por varios años. La incorporación de esta variedad en la producción puede conducir a importantes beneficios como el incremento de ingreso del agricultor debido al bajo costo de la semilla y al incremento de la productividad del maíz por su buen rendimiento y resistencia a la enfermedad, evitando de esta forma la diseminación de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- De León-García de Alba C, Solano-Báez AR y Sánchez-Pale JR. 2017. Identificación y desarrollo de cultivares de maíz con alto rendimiento y resistencia al diente de caballo del maíz (*Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez). Reporte de Proyecto a SENASICA. 8 p.
- Fuentes SF, De la Isla ML, Ullstrup AJ and Rodríguez AE. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of maize in México. *Phytopathology* 54(4): 379-381.
- Meléndez-Carbajal B. 2015. Control biológico de *Claviceps gigantea* Fuentes *et al.* y *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg con hongos antagonistas nativos del valle de Toluca, México, en condiciones *in vitro*. Tesis. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Campus El Cerrillo. Piedras Blancas, Municipio de Toluca, México. 82 p.
- Moreno-Moreno CE, De León-García de Alba C, Nava DC and Sánchez-Pale JR. 2016. Germinación de esclerocios y formación de ascosporas de *Claviceps gigantea* Fuentes, De la Isla, Ullstrup y Rodríguez. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(3): 223-241 <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-2>
- Pandey S and Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. *Advances Agronomy* 28: 1-87.
- Pažoutová S, Kolarík M and Kolínská R. 2004. Pleomorphic conidiation in *Claviceps*. *Mycological Research* 108(2): 126-135. <https://doi.org/10.1017/S0953756203009067>

Segunda parte

El Frijol



Capítulo 1

Etiología de enfermedades de frijol

1.1. Hongos asociados a la marchitez del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Costa Rica

María del Milagro Granados-Montero* Centro de Investigación en Protección de Cultivos y Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas, Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica; **Néstor Chaves-Barrantes**, Programa de Leguminosas, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit, Universidad de Costa Rica. 183-4050 Alajuela, Costa Rica; **Priscila Chaverri**, ¹Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, 11501-2060, San José, Costa Rica y Department of Plant Sciences and Landscape Architecture, University of Maryland, College Park, Maryland, 20742, U.S.A.; **Juan Carlos Hernández-Fonseca**, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), 382-1007 Centro Colón, Costa Rica; ¹**Efraín Escudero-Leyva**. *Autor para correspondencia: maria.granadosmontero@ucr.ac.cr.

Resumen

Las pudriciones radicales limitan el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris*), y aunque en Costa Rica son frecuentes, la identidad de los hongos asociados a ellas es incierta. El objetivo de esta investigación fue identificar molecularmente los hongos asociados a las pudriciones radicales y marchitez del frijol en las dos principales zonas productoras del país. Entre 2017 y 2020, se recolectaron 120 plantas en 20 fincas de las regiones Huetar Norte y Brunca. Se muestrearon líneas experimentales (IBC 302-29 y ALS 0536-6) y variedades comerciales (Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí y Tayní). Se describieron los síntomas observados en campo y se efectuaron aislamientos en agar agua rosa de bengala cloranfenicol, luego cultivos puros de punta de hifa en agar agua, que se transfirieron a papa dextrosa agar para determinar morfotipos con el uso de claves taxonómicas. Los hongos aislados también se identificaron mediante secuenciación de la región ITS del ADN nuclear ribosomal. Se calculó el porcentaje de frecuencia relativa de morfotipos. Los más frecuentes fueron *Macrophomina phaseolina* (26.7%), *Fusarium oxysporum* (13.6%) y *Athelia rolfsii* (5.6%). A partir de los síntomas de marchitez observados en campo se aislaron los hongos comúnmente descritos en frijol para esas

patologías. Es necesario realizar pruebas de patogenicidad para confirmar que son los agentes causales.

Palabras clave: Patógenos de la raíz, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Athelia rolfsii*.

El frijol es consumido por el 97 % de la población costarricense, es un grano fundamental para la seguridad alimentaria y nutricional del país, y su producción está principalmente en manos de pequeños productores (<5 ha) (Hernández-Fonseca, 2009; Rodríguez-González y Fernández-Rojas, 2015). El cultivo enfrenta una serie de limitantes, como las enfermedades, que pueden reducir significativamente la productividad (Schoonhoven y Voysset, 1994). Entre ellas, los patógenos de la raíz como *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp. y *Pythium* sp. tienen el potencial de causar pérdidas entre un 80 y 100% en rendimiento (Singh y Schwartz, 2010; Méndez-Aguilar *et al.*, 2013).

La manera más eficiente de combatir los problemas patológicos, y en especial las enfermedades del suelo, es a través de la generación de cultivares resistentes (Mendes *et al.*, 2019). Desde 1995, en Costa Rica se trabaja bajo la metodología de fitomejoramiento participativo, lo que ha permitido generar variedades con mayor resistencia a problemas bióticos y abióticos, alta productividad y mejor adaptadas a las condiciones de pequeño productor (Hernández *et al.*, 2018).

El cambio en el uso de variedades comerciales, las alteraciones en el clima y la incorporación de nuevas áreas de cultivo, han favorecido el progreso de epidemias de pudrición radicular en Costa Rica, asociadas principalmente a *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Athelia rolfsii* (sin. *Sclerotium rolfsii*) y *Macrophomina phaseolina* (Araya y Hernández, 2003; Araya y Hernández, 2006). Sin embargo, la presencia de dichos agentes causales no se ha demostrado, y las publicaciones existentes se basan únicamente en la comparación de síntomas de campo con los reportados en la literatura; no hay referencias de aislamientos ni de identificación a nivel molecular. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue identificar morfológica y molecularmente los hongos asociados a las pudriciones radicales y marchitez del frijol común en las principales zonas productoras de Costa Rica.

Para este trabajo, se recolectaron 120 plantas en diferentes estados fenológicos (desde plántulas a plantas en llenado de vainas), distribuidas en ocho fincas de la región Brunca (2017 y 2018) al sureste de Costa Rica, y 12 de la región Huetar Norte (2019 y 2020), al norte del país. Se muestreó en parcelas de las líneas experimentales ALS 0536-6 e IBC 302-29, así como de las variedades comerciales Brunca, Cabécar, Chánguena, Guaymí, Nambí y Tayní (Hernández-Fonseca y Araya-Villalobos, 2009; Hernández-Fonseca y Chaves-Barrantes, 2016).

Se recolectaron tres plantas con síntomas y tres asintomáticas de cada finca. Las plantas asintomáticas se colectaron para aislar hongos endófitos con posible capacidad antagónica. Se tomaron secciones de tejido y se lavaron con agua y jabón, luego se desinfectaron con alcohol al 70% por 1 min y se realizaron aislamientos en medio de cultivo agar-agua-rosa de bengala-cloranfenicol, se incubaron por siete días en oscuridad, entre 23 y 25 °C. Se realizaron cultivos de punta de hifa en agar-agua 30 g L⁻¹ (3%) y la identificación de morfotipos en papa dextrosa agar (PDA), de acuerdo con las descripciones de Leslie y Summerell (2006) y Seifert *et al.* (2011). Con estos datos se calculó el porcentaje de frecuencia relativa (% FR) de acuerdo con Mueller *et al.* (2004), mediante la fórmula: % FR = (número de aislamientos de cada especie/número total de aislamientos) x 100. Se seleccionaron los más frecuentes para realizar la identificación molecular.

El ADN se extrajo con el kit Prepman Ultra y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores ITS-5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS-4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de la región del espaciador interno transcrito del ADN nuclear ribosomal (nrDNA ITS por sus siglas en inglés) (Schoch *et al.*, 2012). Se preparó una reacción de PCR (25 µL) según White *et al.* (1990), los productos se enviaron a Macrogen (USA) para su purificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon con el uso de Geneious, versión 10.2.3, y se compararon con las disponibles en GenBank por medio del algoritmo BLASTn. Se consideró como identificación positiva de especie si las secuencias obtuvieron similitudes de 100%, como posible especie si obtuvieron 99% (se anotó el sufijo cf.) y si obtuvieron entre 96-98% como especie relacionada (se anotó el sufijo aff.) (Hofstetter *et al.*, 2019). Para el rango de género se consideró una similitud del 97% (López *et al.*, 2017).

Los 155 aislamientos recuperados, tanto de plantas con síntomas como asintomáticos, se clasificaron en nueve morfotipos (Figura 1). Los hongos con mayor porcentaje de frecuencia relativa fueron *M. phaseolina* (26.7), *F. oxysporum* (13.6) y *A. rolfsii* (5.6).

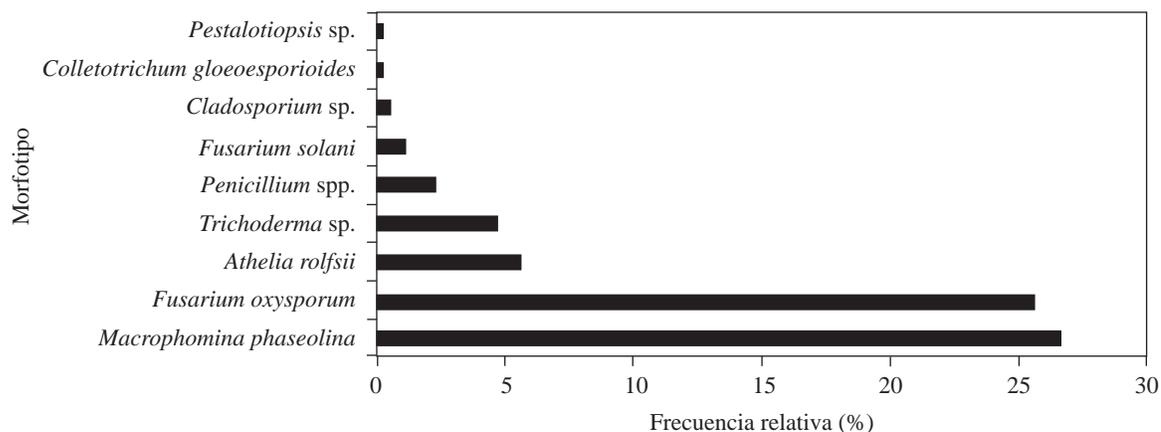


Figura 1. Frecuencia relativa (%) de morfotipos de hongos aislados de plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en las regiones Huetar Norte y Brunca, Costa Rica durante el año 2017-2020.

Los hongos recuperados variaron de acuerdo al año y a la región de muestreo. Por ejemplo, *A. rolfsii* fue posible recuperarlo los cuatro años de muestreo en ambas regiones, mientras que *M. phaseolina* solo se aisló en el 2019 en la región Huetar Norte (Cuadro 1).

Cuadro 1. Frecuencia relativa (%) de morfotipos por región productora, año de recolecta y estado de la planta (con síntoma/sin síntoma) de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Costa Rica. Año 2017-2020.

Morfotipo	Brunca ^x (21.3)				Huetar Norte (78.7)			
	2017 ^y		2018		2019		2020	
	16.77		4.51		40.64		38.06	
	€ ^z	⊘ ^z	€	⊘	€	⊘	€	⊘
	7.74	9.03	2.58	1.93	21.29	19.35	37.42	0.64
<i>Athelia rolfsii</i>	0.64	0.00	1.29	0.00	0.64	0.00	9.68	0.00
<i>Cladosporium</i> spp.	0.00	0.00	0.00	1.29	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Fusarium oxysporum</i>	2.58	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	23.87	0.64
<i>Fusarium solani</i>	0.64	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	1.29	0.00
<i>Macrophomina phaseolina</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	20.65	19.35	0.00	0.00
<i>Penicillium</i> spp.	0.64	4.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Trichoderma</i> sp.	3.23	3.23	0.64	0.00	0.00	0.00	2.58	0.00

^x Región productora; ^y Año; ^z€: plantas con síntomas, ⊘: plantas asintomáticas.

En plantas con síntomas de marchitez, *M. phaseolina* y *F. oxysporum* fueron aislados con mayor frecuencia en la variedad Cabécar, mientras que, *A. rolfsii* se encontró con mayor frecuencia en las variedades Nambí, Brunca y Chánguena (Cuadro 2). En general, se encontró *F. oxysporum*, *F. solani* y *A. rolfsii* como hongos asociados a plantas con problemas de marchitez, en casi todas las variedades comerciales y líneas experimentales muestreadas.

Cuadro 2. Frecuencia relativa (%) de morfotipos por variedad de frijol común (*Phaseolus vulgaris*), recuperados a partir de plantas con y sin síntomas de marchitez. Regiones Huetar Norte y Brunca, Costa Rica. Año 2017-2020.

Morfotipo	Variedad															
	Brunca		Cabécar		Chánguena		Guaymí		IBC 302-29		ALS 0536-6		Nambí		Nd ^v	Tayní
	€ ^z	€	€ ^z	€	€	€	€	€	€	€	€	€	€	€	€	
<i>Athelia rolfsii</i>	3.23	0.00	0.00	3.23	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.52	0.00	0.64	0.00		
<i>Cladosporium</i> sp.	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
<i>Fusarium oxysporum</i>	2.58	13.55	1.29	0.00	0.00	0.00	1.29	1.29	0.00	4.52	0.00	0.00	3.23			
<i>Fusarium solani</i>	1.29	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00			
<i>Macrophomina phaseolina</i>	0.00	20.65	9.68	0.00	0.00	9.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
<i>Penicillium</i> spp.	0.00	0.00	4.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00			
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
<i>Trichoderma</i> sp.	0.00	2.58	2.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.93	0.64	0.64	0.00			

^z€: plantas con síntomas, €: plantas asintomáticas, Nd: no dato, no se conoce la variedad.

La secuenciación de la región ITS mostró que los morfotipos de *Fusarium* se ubicaron en las unidades taxonómicas operativas *F. fujikuroi*, *F. solani* y *F. oxysporum*. El hongo clasificado preliminarmente como *M. phaseolina*, obtuvo un porcentaje de similitud del 100%. Los aislamientos tentativamente definidos como *Penicillium* spp. se clasificaron como *P. crustosum*, *P. simplicissimum*, *Penicillium* sp. y *Talaromyces pinophilus* (Cuadro 3). No se realizó secuenciación del ADN proveniente de *A. rolfsii*, porque las características morfológicas se consideraron suficientes para su identificación, y coincidieron con las descritas por Kamil *et al.* (2020), micelio blanco algodonoso con presencia de fíbulas, tanto en planta como en medio de cultivo PDA y, el desarrollo de esclerocios esféricos de aproximadamente de 1 mm, de coloración blanca al inicio y café claro cuando maduran.

Cuadro 3. Identificación molecular, porcentaje de similitud, accesión y longitud de la secuencia de ITS de morfotipos recuperados a partir de plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con y sin síntomas de marchitez, según región productora y variedad. Regiones Huetar Norte y Brunca, Costa Rica. 2017-2020.

Identificación	% de similitud	Secuencias de referencia disponibles en GenBank	# accesión en GenBank	Longitud de la secuencia (pares de bases)	Región productora	Variedad	Estado de la planta
<i>Fusarium</i> cf. <i>fujikuroi</i>	99.8	KT192406	MW449097	514	Brunca	IBC302-29	Con síntoma
<i>Fusarium</i> cf. <i>oxysporum</i>	99.5	MK156682	MW449096	503	Brunca	ALS 0536-6	Con síntoma
<i>Fusarium</i> cf. <i>solani</i>	99.9	MK817031	MW449094	503	Brunca	Cabécar	Con síntoma
<i>Macrophomina phaseolina</i>	100.0	MK968305	MW449091	536	Huetar Norte	Guaymí	Con síntoma
<i>Colletotrichum</i> sp.	99.6	KX721643	MW449095	515	Brunca	Cabécar	Sin síntoma
<i>Penicillium</i> aff. <i>crustosum</i>	98.3	KF938410	MW449099	489	Brunca	Cabécar	Sin síntoma
<i>Penicillium</i> cf. <i>simplicissimum</i>	99.7	KM104597	MW449100	490	Brunca	Cabécar	Sin síntoma
<i>Penicillium</i> sp.	100.0	KY552262	MW449093	537	Brunca	Nambí	Sin síntoma
<i>Talaromyces</i> cf. <i>pinophilus</i>	99.5	CP017345	MW449092	527	Brunca	Cabécar	Sin síntoma
<i>Trichoderma</i> cf. <i>harzianum</i>	99.7	MK387946	MW449098	550	Brunca	Nambí	Sin síntoma

Las especies con mayor frecuencia de aislamiento, *M. phaseolina*, *F. oxysporum* y *A. rolfsii* (Figura 1) están asociadas a pudriciones radicales y marchitez vascular en frijol común alrededor del mundo (Xue *et al.*, 2015; Yesil y Bastas, 2016; Al-Jaradi *et al.*, 2018; Sendi *et al.*, 2019). En Costa Rica fueron reportadas con anterioridad (Echandi, 1967; Araya y Hernández, 2003; Villalobos *et al.*, 2009); sin embargo, en ninguno de los trabajos previos se realizó una identificación morfológica o algún análisis molecular para confirmar la identidad del agente patógeno asociado al daño descrito.

Los síntomas observados en campo para la pudrición carbonosa provocada por *M. phaseolina*, coincidieron con los reportados por Sun *et al.* (2019) para esta patología e incluyeron clorosis, marchitez y muerte de plantas adultas con hojas completamente deshidratadas unidas al tallo (Figura 2 A y D), así como decoloración y pudrición en la base del tallo. De acuerdo con Araya y Hernández (2003), esta especie se presenta con frecuencia en la región Huetar Norte, no así en la región Brunca, comportamiento que se repitió en este estudio (Cuadro 1).

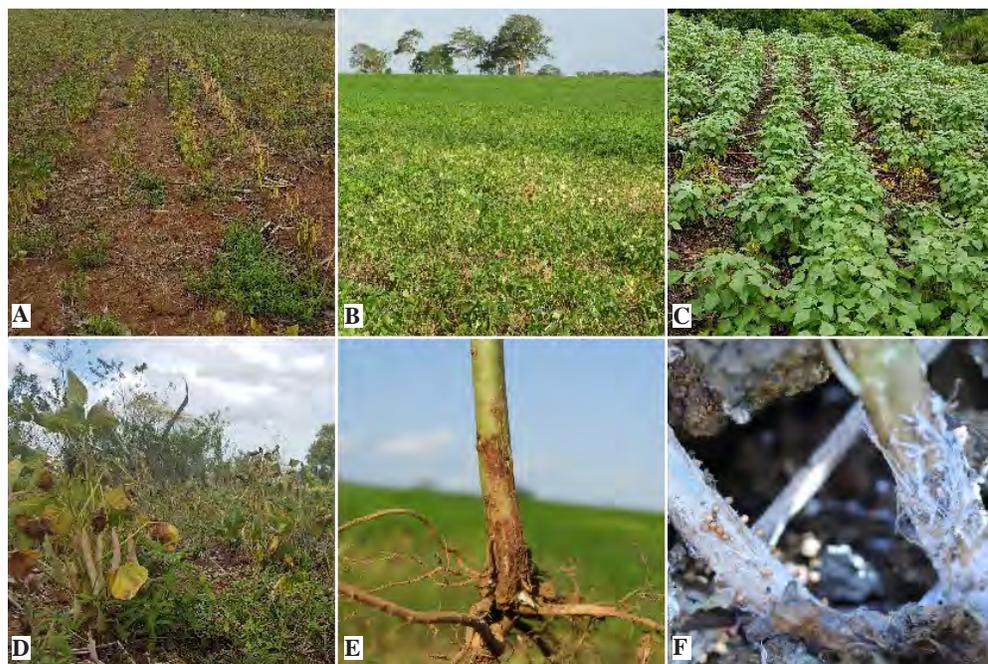


Figura 2. Plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) con síntomas de marchitez de las que se aislaron A) y D) *Macrophomina phaseolina*; B) y E) *Fusarium oxysporum*; C) y F) *Athelia rolfsii*. Regiones Brunca y Huetar Norte, Costa Rica. 2018-2020.

Durante el ciclo productivo del 2019 en la región Huetar Norte se presentaron condiciones de sequía y altas temperaturas, propias de un año bajo influencia del fenómeno del Niño (Fernández y Ramírez, 1991; Alvarado, 2019), que favorecieron o predispusieron la infección por *M. phaseolina* (Dhingra y Chagas, 1981), debido a las alteraciones fisiológicas que sufre el hospedante, como reducción de la tasa de transpiración y la conductancia estomática (Mayek-Pérez *et al.*, 2002). Estas condiciones explicarían porque solo en ese año fue posible recuperar dicho patógeno de plantas marchitas en esa región; mientras que, en los demás años de muestreo no fue aislado. Al respecto, en 2018 se tuvieron condiciones lluviosas propias de un año bajo el fenómeno de la Niña (Fernández y Ramírez, 1991; Alvarado, 2018), y 2017 y 2020 fueron años neutros, según el Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (Alvarado, 2017; Alvarado, 2020).

Por otro lado, *F. oxysporum* se aisló a partir de plántulas y plantas adultas, de lesiones longitudinales y hundidas, de coloración rojiza (Figura 2 B y E).

Los síntomas en campo se distribuyeron en parches, aunque en ocasiones se encontraron de forma aleatoria. Los daños observados concordaron con los indicados para marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop) en varias investigaciones: plantas con retardo de crecimiento, amarillamiento gradual, defoliación y decoloración de tejidos vasculares de raíces y tallos (Kendrick y Snyder, 1942; Schwartz, 1989; Saremi *et al.*, 2011; Edel-Hermann y Lecomte, 2019). La marchitez por Fop se considera una de las principales enfermedades del frijol común a nivel mundial (Xue *et al.*, 2015).

Tanto *Macrophomina* como *Fusarium* pueden ser transmitidos por semilla. El último, puede localizarse en la superficie y en el interior, especialmente en los cotiledones (Kendrick, 1934; Singh y Schwartz, 2010; Marcenaro y Valkonen, 2016). En esta investigación se aislaron estos patógenos de plantas asintomáticas, lo que podría indicar que se encuentran latentes en la semilla, al igual que lo encontrado por Parsa *et al.* (2016), quienes encontraron estos dos hongos de forma endófito en semillas sanas y desinfectadas.

La enfermedad que provoca *Athelia rolfsii* en frijol es conocida mundialmente como añublo sureño, los síntomas incluyen marchitez y lesiones en la base de la planta, que gradualmente la desecan. Además, frecuentemente, se presenta el desarrollo de micelio grueso, blanco y algodonoso en la lesión, con presencia de esclerocios esféricos de coloración café (Abawi y Pastor-Corrales, 1990; Mahadevakumar *et al.*, 2015), síntomas y signos observados en esta investigación (Figura 2 C y F). *Athelia rolfsii* se obtuvo solo de plantas adultas con colapso completo y al igual que *Fusarium*, presentó distribución agregada.

A partir de los síntomas observados en campo se aislaron los hongos comúnmente descritos en frijol para esas patologías. Sin embargo, es necesario realizar pruebas de patogenicidad para corroborar que son los causantes de las infecciones. Adicionalmente, se debe realizar una identificación molecular más precisa, de los géneros *Fusarium*, *Trichoderma* y *Talaromyces*, con marcadores como EF-1 α , rpb2 y el gen de la β -tubulina, especialmente, para resolver con mayor exactitud cuáles especies o formas especiales están presentes. Sobre todo, si se toma en cuenta lo hallado por Marcenaro y Valkonen (2016), Edel-Hermann y Lecomte (2019) y Guido-Monge (2020), que reportan la presencia de otras especies de *Fusarium* relacionadas con el frijol común. Así como, lo documentado por Otadoh (2011), Carvalho *et al.* (2014) y Abdel-Rahim y Abo-Elyousr (2018), que indican que *Trichoderma* y *Talaromyces* podrían ser agentes de biocontrol.

Las variedades comerciales y líneas experimentales avanzadas muestreadas fueron susceptibles a estos patógenos. Por el potencial de causar pérdidas en rendimiento que éstos tienen (Singh y Schwartz, 2010), el programa de mejoramiento genético de frijol en Costa Rica debe poner mayor atención a estas patologías.

Esta investigación corroboró mediante el aislamiento e identificación molecular basada en ITS, la identidad de los hongos asociados a la marchitez del frijol en las principales zonas productoras de Costa Rica, lo que permite desarrollar mejores estrategias de combate de estos patógenos. Se sugiere realizar trabajos de pruebas de patogenicidad e identificación molecular con marcadores como EF-1 α , rpb2 y el gen de la β -tubulina.

Agradecimientos

A la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTACORI), proyecto F14-17, y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR), proyecto B7514, por el financiamiento parcial de esta investigación; al Centro de Investigación en Protección de Cultivos (UCR) por permitir el uso de las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología, y al Ing. Álvaro Ulate Hernández de la Oficina Nacional de Semillas, por su apoyo en la recolección de muestras.

LITERATURA CITADA

- Abawi GS and Pastor-Corrales MA. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies. CIAT. Cali, Colombia. 114 p. https://books.google.ca/books?id=YxGqzISYtcMC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&hl=es#v=onepage&q&f=false
- Abdel-Rahim IR and Abo-Elyousr KAM. 2018. *Talaromyces pinophilus* strain AUN-1 as a novel mycoparasite of *Botrytis cinerea*, the pathogen of onion scape and umbel blights. *Microbiological Research* 212-213:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.004>
- Al-Jaradi A, Al-Mahmooli I, Janke R, Maharachchikumbura S, Al-Saady N and Al-Sadi AM. 2018. Isolation and identification of pathogenic fungi and oomycetes associated with beans and cowpea root diseases in Oman. *PeerJ-Life and Environment* 6: e6064. <https://doi.org/10.7717/peerj.6064>
- Alvarado, LF. 2017. Informe 10. Boletín del ENOS No. 101. Fase actual: Neutra. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 2p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/431236/%23%20101>
- Alvarado, LF. 2018. Informe 3. Boletín del ENOS No. 112. Fase actual: La Niña. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 4p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/450551/%23%20112>

- Alvarado, LF. 2019. Informe 10. Boletín del ENOS No. 119. Fase actual: El Niño. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 5p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/470467/%23119>
- Alvarado, LF. 2020. Informe marzo 2020. Boletín del ENOS No. 129. Fase actual: Neutra. Instituto Meteorológico Nacional de Costa Rica (IMN). San José, Costa Rica. 2p. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/486374/%23129>
- Araya CM y Hernández JC. 2003. Distribución agroecológica de enfermedades del frijol en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 68: 26-33. <http://hdl.handle.net/11554/6067>
- Araya CM y Hernández JC. 2006. Guía para la identificación de las enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). San José, Costa Rica. 44p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H20-5247.pdf>
- Carvalho DC, Lobo-Junior M, Martins I, Inglis PW and Mello SCM. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology* 39(5): 384-391. <https://doi.org/10.1590/s1982-56762014000500005>
- Dhingra OD and Chagas D. 1981. Effect of soil temperature, moisture, and nitrogen on competitive saprophytic ability of *Macrophomina phaseolina*. *Transactions of the British Mycological Society* 77(1): 15-20. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(81\)80173-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(81)80173-8)
- Echandi E. 1967. Amarillamiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f. *phaseoli*. *Turrialba* 17(4): 409-411.
- Edel-Hermann V and Lecomte C. 2019. Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology* 109(4): 512-530. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>
- Fernández W y Ramírez P. 1991. El Niño, la Oscilación del Sur y sus efectos en Costa Rica: una revisión. *Tecnología en Marcha* 11(1): 3-10. https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/2631
- Guido-Monge, AZ. 2020. Prevalencia de especies micotoxigénicas de *Fusarium* en frijol negro producido en Costa Rica y determinación de su capacidad toxigénica. [Tesis de Licenciatura sin publicar]. Universidad de Costa Rica.
- Hernández-Fonseca JC. 2009. Zonas de cultivo y épocas de siembra. Pp:18. In: Hernández JC y Ramírez L (eds.). *Cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris)*. Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). San José, Costa Rica. 80p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9533.pdf>
- Hernández-Fonseca JC y Araya-Villalobos R. 2009. Cultivo. Pp:19-26. In: Hernández JC y Ramírez L (eds.). *Cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris)*. Manual de recomendaciones técnicas para el cultivo de frijol. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). San José, Costa Rica. 80p. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9533.pdf>
- Hernández-Fonseca JC y Chaves-Barrantes N. 2016. Nambí. Variedad de frijol resistente a la sequía terminal. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) y Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa. Alajuela, Costa Rica. Plegable. 6p.
- Hernández JC, Chaves NF, Araya R y Beebe S. 2018. “Diquís”, variedad de frijol común rojo brillante. *Agronomía Costarricense* 42(1): 127-136. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v42n01_127.pdf
- Hofstetter V, Buyck B, Eyssartier G, Schnee S and Gindro K. 2019. The unbearable lightness of sequenced-based identification. *Fungal Diversity* 96: 243-284. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00428-3>
- Kamil D, Bahadur A, Debnath P, Kumari A, Choudhary SP and Prameeladevi T. 2020. First report of *Athelia rolfsii* causing stem rot disease on Vasaka (*Justicia adhatoda*). *Australasian Plant Disease Notes* 15(1): 33. <https://doi.org/10.1007/s13314-020-00402-y>
- Kendrick JB. 1934. Seed transmission of fusarium yellows of beans. *Phytopathology* 24(10): 1139.
- Kendrick JB and Snyder WC. 1942. *Fusarium* yellows of beans. *Phytopathology* 32(11): 1010-1014.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. Morphological characters. Pp:111-119. In: Leslie JF and Summerell BA. (eds.). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388p.

- López R, Gómez S, De la Rosa S and Garrido E. 2017. The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology* 26: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.11.004>
- Mahadevakumar S, Tejaswini GS, Janardhana GR and Yadav V. 2015. First report of *Sclerotium rolfsii* causing southern blight and leaf spot on common bean (*Phaseolus vulgaris*) in India. *Plant Disease* 99(9): 1280-1280. <https://doi.org/10.1094/pdis-01-15-0125-pdn>
- Marcenaro D and Valkonen JPT. 2016. Seedborne pathogenic fungi in common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. INTA Rojo) in Nicaragua. *PLOS ONE* 11(12): e0168662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168662>
- Mayek-Pérez N, García-Espinosa R, López-Castañeda C, Acosta-Gallegos JA and Simpson J. 2002. Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60(4): 185-195. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0388>
- Mendes LW, de Chaves MG, Fonseca MC, Mendes R, Raaijmakers JM and Tsai SM. 2019. Resistance breeding of common bean shapes the physiology of the rhizosphere microbiome. *Frontiers in Microbiology* 10: 2252. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02252>
- Méndez-Aguilar R, Reyes-Valdés MH y Mayek-Pérez N. 2013. Avances y perspectivas sobre el mapeo genético de la resistencia a las pudriciones de la raíz en frijol común. *Phyton* 82:215-226. http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol82/MENDEZ_AGUILAR.pdf
- Mueller G, Bills G and Foster M. 2004. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. London, UK. 777p.
- Otadoh JA, Okoth SA, Ochanda J and Kahindi JP. 2011. Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Tropical and subtropical agroecosystems* 13(1): 99-107. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tsa/v13n1/v13n1a15.pdf>
- Parsa S, García-Lemos AM, Castillo K, Ortiz V, López-Lavalle LAB, Braun J and Vega FE. 2016. Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Fungal Biology* 120(5): 783-790. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.017>
- Rodríguez-González S y Fernández-Rojas SE. 2015. Prácticas culinarias asociadas al consumo de frijoles en familias costarricenses. *Agronomía Mesoamericana* 26(1): 145-151. <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16937>
- Saremi H, Amiri ME and Ashrafi J. 2011. Epidemiological aspects of bean decline disease caused by *Fusarium* species and evaluation of the bean resistant cultivars to disease in Northwest Iran. *African Journal of Biotechnology* 10(66): 14954-14961. <https://doi.org/10.5897/AJB11.258>
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16): 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schoonhoven A y Voysest O. 1994. El frijol común en América Latina y sus limitaciones. Pp:39-66. In: Pastor-Corrales M y Schwartz HF (eds.). *Problemas de producción del frijol en los trópicos*. 2 ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 805p. <https://core.ac.uk/download/pdf/132664941.pdf>
- Seifert K, Morgan-Jones G, Gams W and Kendrick B. 2011. The genera of Hyphomycetes. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, The Netherlands. 997 p.
- Sendi Y, Romdhane SB, Mhamdi R and Mrabet M. 2019. Diversity and geographic distribution of fungal strains infecting field-grown common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology* 153(3):947-955. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01612-y>
- Singh SP and Schwartz HF. 2010. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Science* 50:2199-2223. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.03.0163>
- Sun SL, Zhu ZD, Duan CX, Zhao P, Sun F, Deng D and He YH. 2019. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on faba bean in China. *Plant Disease* 103(6): 1415. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1660-PDN>

- Schwartz HF. 1989. Occurrence of fusarium wilt of beans in Colorado. *Plant Disease* 73(6): 518. <https://doi.org/10.1094/PD-73-0518D>.
- Villalobos JL, Cárdenas FA y Cordero JM. 2009. Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas y forestales de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Servicio Fitosanitario del Estado. Diagnóstico Fitosanitario. San José, Costa Rica. 118 p.
- White T, Bruns S y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp: 315-322. In: Innis M, Gelfand DH, Sninsky JJ y White TJ (eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York. 482p.
- Xue R, Wu J, Zhu Z, Wang L, Wang X, Wang S and Blair MW. 2015. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *PLOS ONE* 10(6): e0127698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127698>
- Yesil S and Bastas KK. 2016. Genetic variability of *Macrophomina phaseolina* isolates from dry beans in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 4(4):305. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i4.305-312.572>



Capítulo 2

Epidemiología de enfermedades de frijol

2.1. Etiología y epidemiología de putativos síntomas virales y fungoso en el frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)

María José Armenta-Cárdenas, Norma Ávila-Alistac¹, María del Carmen Zúñiga-Romano, Alfonso Muñoz-Alcalá, Rene Gómez-Mercado, Juan José Coria-Contreras, Diana Gutiérrez-Esquivel, Serafín Cruz-Izquierdo, Ivonne García-González, Oscar Bibiano-Nava, Gerardo Acevedo-Sánchez, Coral Mendoza Ramos, Gustavo Mora-Aguilera*. Programa de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México; ¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5, 56230 Texcoco, México. *Autor de correspondencia: morag@colpos.mx.

El género *Phaseolus* (familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae), originario de América está ampliamente distribuido en el viejo y nuevo mundo (Graham y Ranalli, 1997). Este género, contiene varias especies domesticadas donde el frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) es la tercera especie de mayor importancia económica después del frijol común (*P. vulgaris*) y frijol ancho (*Phaseolus lunatus*) (De Ron y Santalla, 2013; Santalla *et al.*, 2004). *P. coccineus*, tiene mayor relevancia económica en América Central, Sur de América, África y Europa (Giurca, 2009), no solo por la fuente de proteína, sino por las propiedades agronómicas, tolerancia a condiciones climáticas (condiciones frías y zonas altas) y tolerancia a enfermedades como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Xanthomonas campestris*, que comparado con *P. vulgaris* muestra mayor vigor y resistencia a enfermedades (Abawi *et al.*, 1978; Giurca, 2009; Vargas *et al.*, 2014).

Dentro de la diversidad de agentes fitopatógenos que causan enfermedades en *Phaseolus*, hay escasos reportes de enfermedades en frijol ayocote. Solo se tiene registro de *Pythium myriotylum*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Xanthomonas campestris* (Abawi *et al.*, 1978; Giurca, 2009; Watanabe y Tojo, 2006). Por otro lado, en *P. vulgaris* se ha reportado la cenicilla (*Erysiphe diffusa*) como una de las enfermedades severas con al menos 10% del área sembrada en Sinaloa (Félix-Gastélum *et al.*, 2016). La cenicilla, también conocida como mildiu polvoriento es una enfermedad común e importante en cultivos de importancia

económica. Dentro de las medidas de manejo, se ha implementado el uso de productos químicos y biológicos; sin embargo, el uso de cultivares resistentes puede aumentar la efectividad en el manejo. Se debe hacer un manejo integral para reducir la incidencia de esta enfermedad, así como de otras plagas y fitopatógenos eventualmente presentes en el cultivo (Deng *et al.*, 2022). Mora-Aguilera *et al.* (2021) enfatiza en hacer estudios sistémicos e integrales que articulen sanidad, genotecnia y producción, para generar un impacto y transformar un paradigma que implique una visión regional, multidimensional y multiplaga con el fin de analizar procesos parasíticos y epidemiológicos asociados a riesgos productivos y en consecuencia garantizar la seguridad alimentaria. La cenicilla presente en frijol ayocote en Montecillo, Texcoco, presenta un patrón de distribución agregado debido al estado avanzado fenológico del cultivo (floración) y con orientación al ingreso principal de los vientos por lo que se puede encontrar un gradiente en dicha dirección. Por lo anterior, los objetivos de la presente investigación fueron: a) determinar el hongo asociado y el patrón de dispersión de la cenicilla en el cultivo de frijol ayocote, b) desarrollar y validar una escala logarítmica diagramática para la cenicilla e c) identificar el y/o los agentes asociados a enfermedades virales y/o fitoplasmas observados en el cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Unidad experimental. En julio 2022, ciclo verano-otoño, se seleccionó una parcela experimental (50 x 62 m) de frijol ayocote en etapa de floración ubicada en el Colegio de Postgraduados campus Montecillo Texcoco, Estado de México (19°46'80" N, 98°89'76" O) para realizar un diagnóstico epidemiológico de plagas asociadas al cultivo (Figura 1). Se tomó una imagen de 13mpx mediante un vuelo vertical de 50m con drone Phantom 3 DJI®. La parcela se caracterizó con densidad de siembra irregular, heterogeneidad en cobertura, manejo agronómico bajo (no tecnificado), control químico de malezas y riego por inundación. La parcela se dividió en 80 cuadrantes de 6x6 m y 720 subcuadrantes de 2x2 m (Figura 1A) para evaluación en campo. La delimitación de cuadrantes en campo se realizó con estacas de madera y una red de listón de rafia (Figura 1B). En el centroide de la parcela se colocó un sensor climático HOBO u23 Pro v2 para medición de humedad relativa (HR) y temperatura (°C) a intervalos de 30 min entre 16-julio y 11-agosto de 2022.

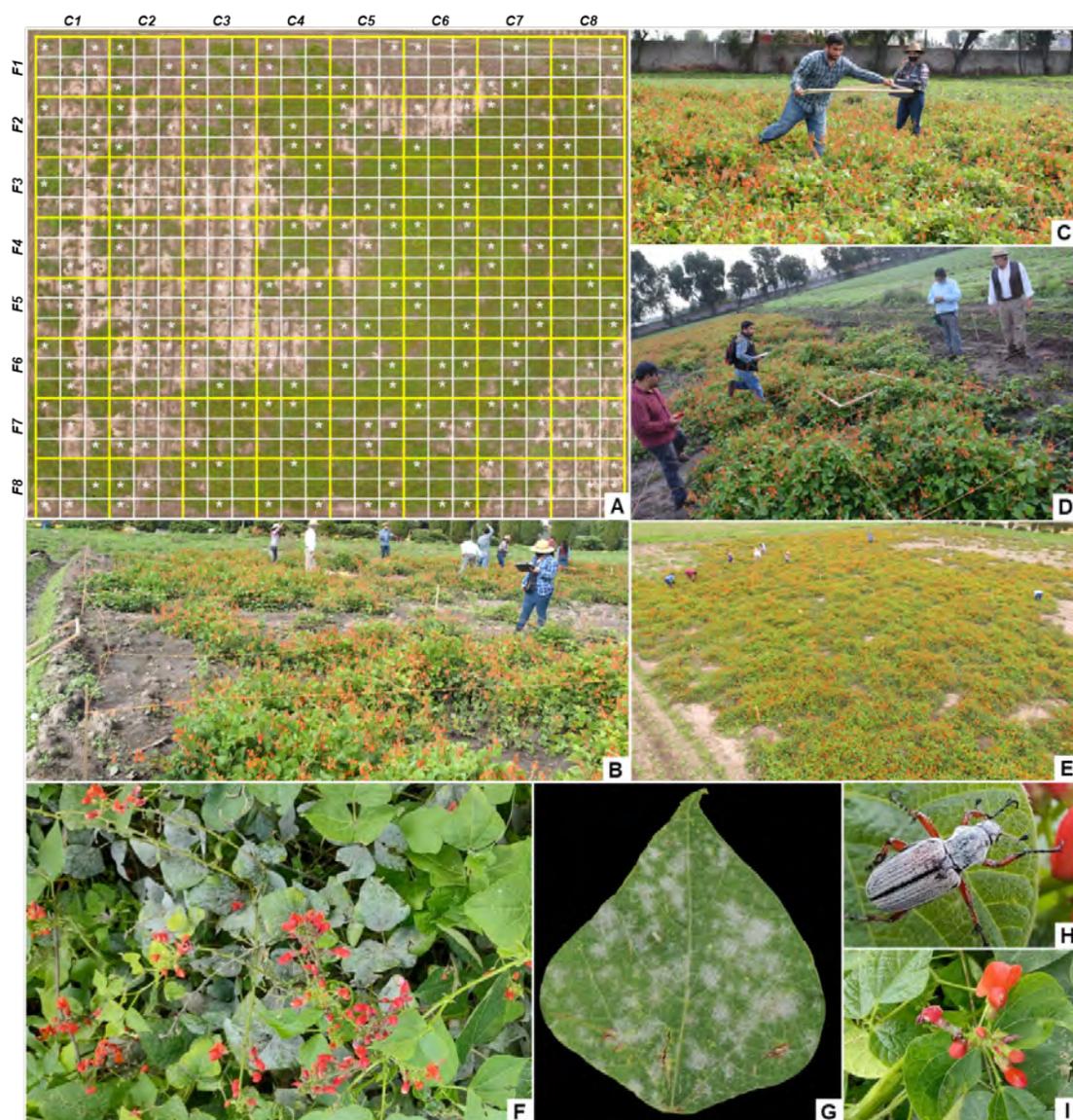


Figura 1. Proceso epidemiológico-metodológico para evaluación de síntomas fungosos y virales en *Phaseolus coccineus*. **A.** Imagen de 13mpx 50m con dron Phantom 3 DJI®, muestra la cuadrantización de la parcela experimental. En amarillo cuadrantes de 6x6 m, y en blanco subcuadrantes de 2x2 m. Asteriscos indican subcuadrantes/cuadrante seleccionados aleatoriamente. **B.** Instalación de grid para delimitación de cuadrantes en campo. **C.** Selección de subcuadrante colocando marco de 1x1 m como referencia de evaluación. **D.** Evaluación de síntomas fungosos y virales, e incidencia de *Macrodactylus* sp. mediante App-Monitor v1.0. **E.** Parcela demarcada en su totalidad muestra evaluación y colecta de material vegetal. **F.** Síntomas fungosos a nivel planta. **G.** Foliolo con signo de cenicilla. **H.** Presencia de *Macrodactylus* sp. en el cultivo. **I.** Flor de *P. coccineus*.

Identificación etiológica y genómica del hongo

Identificación morfológica del hongo. Se realizó un muestreo dirigido en cuatro plantas (tres hojas trifoliadas) con síntomas de cenicilla con diferentes grados de severidad. Mediante la técnica de cinta adhesiva y agua, se observaron las estructuras en el microscopio (40x) para la identificación del hongo con claves taxonómicas (Barnet y Hunter, 1998). Se realizaron mediciones de 60 conidios con el software ImageJ® y se calculó la media \pm desviación estándar de largo y ancho de conidios mediante el software Muestra-N Cuanti v.1 (LANREF, 2020; no publicado).

Extracción de ADN e identificación genómica del hongo. Se colectaron hojas de cinco plantas con signo del hongo para la extracción del ADN. Se raspó micelio de lesiones jóvenes por cada foliolo y se colocaron en tubos Eppendorf que contenía 600 μ L de buffer AP y dos balines 1/8. Se maceró en un disruptor a 30 frecuencias por 15 min. Se retiraron los balines y se agregó 1 μ L de β -mercaptoetanol y se pasó por vórtex por 10 s. Se incubó a 56 °C por 45 min. Después se agregó 400 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó por vórtex. Se centrifugó a 13,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó 500 μ L de la fase acuosa y se agregó 500 μ L de isopropanol y 50 μ L de acetato de amonio, se mezcló por inmersión y se incubó a -20 °C por una la noche. Posteriormente, se centrifugó a 13,500 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó con 500 μ L de etanol al 80 %. Se centrifugó a 13,500 rpm por 3 min. Se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla por 1 h y finalmente se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas y se conservó a -20 °C. Umbrales óptimos de concentración y pureza de ácidos nucleicos se cuantificaron con NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, EUA).

Se utilizaron iniciadores ITS1 e ITS4 (Cuadro 1) que amplifican la región ITS del ADN 10 μ L de cada iniciador, 0.2 μ L de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), 2 μ L de ADN (40 ng μ L⁻¹) y 16.5 μ L agua libre de nucleasas. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min y 31 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 90 s y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron en un fotodocumentador (UVP, Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom). Cuatro de las cinco muestras amplificadas se enviaron a secuenciar a Macrogen®, Corea.

Cuadro 1. Iniciadores, secuencias y tamaño de amplicón para la identificación genómica de *Potyvirus*, *Begomovirus*, Fitoplasmas y microorganismos eucariontes en plantas de frijol ayocote con signos de hongos y síntomas putativos a virus y fitoplasmas.

Organismo	Iniciador	Secuencia	Tamaño (pb)	Referencia
Potyvirus	N1b2F N1b3R	GTITGYGTIGAYGAYTTYAAYAA TCIACIACIGTIGAIGGYTGNC	350	Zheng <i>et al.</i> , 2008
Begomovirus	PBL1v2040 PCR1c	CARTGRTCKATCTTCATACA CATATTTACRARWATGCCA	500~650	Rojas <i>et al.</i> , 1993
	AV494 AC1048	GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG GGRTTDGARGCATGHGTACATG	~550	Wyatt y Brown, 1996
Fitoplasmas	P1 P7	AAGAGTTTGATCCTGCAGGAT CGTCCTTCATCGGCTCTT	1,800	Deng y Hiruki, 1991: Samart <i>et al.</i> , 1996
	FU5 RU3N	CGGCAATGGAGGAAACT TTCAGCTACTCTTTGTAACA	890	Lorenz <i>et al.</i> , 1995
Hongo	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	~500	White <i>et al.</i> , 1990

Análisis filogenético. Las cuatro secuencias obtenidas (ambos sentidos) se editaron con el programa SeqAssem (<https://acortar.link/r0FdRx>) y se compararon en BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con secuencias del banco de genes (GenBank) para determinar identidad con base a similitud comparativa expresado en porcentaje de identidad y e-value. Para determinar relación filogenética con otras especies de *Erysiphe* y confirmar la identificación, las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias descargadas del GenBank (Cuadro 2) usando el algoritmo MUSCLE en Mega 11. El análisis filogenético se realizó en el mismo programa bajo el método estadístico Máxima verosimilitud (ML) y el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano con

Cuadro 2. Secuencias del banco de genes del NCBI utilizadas para generar el árbol filogenético y comparar con secuencias de este estudio.

Especies de cenicilla	No. Genbank	Planta hospedante	Lugar y Fecha de recolección	Referencia
<i>Erysiphe diffusa</i>	FJ378880	<i>Glycine max</i>	Australia, 2006	Attanayake <i>et al.</i> , 2012
<i>E. fallax</i>	LC228618	<i>Carica papaya</i>	USA, 2017	Braun <i>et al.</i> , 2017
<i>E. manihoticola</i>	MT106660	<i>Manihot esculenta</i>	Argentina	Bradshaw and Tobin, 2020
<i>E. pisi</i>	KR912079	<i>Pisum sativum</i>	China, 2016	Sun <i>et al.</i> , 2016
<i>E. vignae</i>	MW293895	<i>Vigna radiata</i>	Australia, 2019	Kelly <i>et al.</i> , 2021
<i>E. vignae</i>	MT628286	<i>V. radiata</i>	Australia, 2019	Kelly <i>et al.</i> , 2021
<i>Erysiphe</i> sp.	JQ730709	<i>Senna septemtrionalis</i>	México, 2012	Rodríguez-Alvarado <i>et al.</i> , 2012
<i>Oidium</i> sp.	EU377475	<i>Knautia arvensis</i>	USA, 2009	Jankovics <i>et al.</i> , 2009

1000 replicaciones Bootstrap. Se incluyó a *Oidium* sp (número de accesión: EU377475) como grupo externo. El análisis involucró 12 secuencias de nucleótido con un total de 561 posiciones en el conjunto de datos final. Las secuencias fueron registradas en GenBank, con número de acción OQ448664 (FAC6), OQ448665 (FAC7), Q448666 (FAC8) y OQ448667 (FAC9).

Identificación genómica de virus y Fitoplasmas

Colecta de material vegetal. De acuerdo a las características sintomatológicas que se observaron en campo, se realizó un muestreo dirigido a plantas putativas a *Potyvirus*, *Begomovirus* y Fitoplasmas (mosaicos, deformación foliar, amarillamiento, clorosis, reducción foliar, coloración violácea en follaje). Las plantas seleccionadas fueron marcadas con estacas y etiquetas con un ID para su posterior muestreo. Se realizaron dos muestreos en diferentes tiempos; en el primer muestreo, se colectaron dos hojas trifoliadas de 32 plantas, cada hoja como repetición (64 muestras) y en el segundo muestreo se colectaron 31 plantas.

Extracción de ácidos nucleicos (ARN y ADN). Del primer muestreo, se realizó el macerado con nitrógeno líquido de las 64 muestras. Solo se pesó 0.1 g de 32 muestras, y se realizó extracción de ARN de acuerdo al método ARN total modificado (Green y Sambrook, 2012). Para el segundo muestreo, se realizó la extracción del ARN total y ADN por el método de CTAB 2% (Yu, 2012; modificado por LANREF, 2021). La concentración y pureza de los ácidos nucleicos fueron cuantificados con el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific 2000, EUA).

Identificación genómica de *Potyvirus*. Se consideraron 28 de 32 muestras del primer muestreo y 18 muestras del segundo muestreo, donde se usaron iniciadores Nib2F y Nib3R (Cuadro 1) que amplifican parte de la región codificadora para la proteína B de inclusión nuclear (NIB) de *Potyvirus* (350 pb) (Zheng *et al.*, 2008). Primeramente, se realizó la síntesis de ADNc a partir de ARN total (RT-PCR) y posteriormente la PCR de acuerdo al protocolo de González-Cruces *et al.* (2022). Se realizó una mezcla de reacción de pre RT-PCR con 9.75 μ L de H₂O libre de nucleasas, 500 nM por iniciador y 2.5 μ L de ARN total, incubado a 85 °C durante 3 min. Para la RT-PCR, se añadió a la reacción en pre RT-PCR una mezcla con: 2 mM de mix dNTP's, 1X buffer-RT y 100 U de la enzima transcriptasa inversa (M-MLV-RT) todos de Promega

Corp. EUA para obtener un volumen total de reacción de 25 μ L. Las condiciones de RT-PCR fueron a 44 °C durante 60 min para incubación, seguido de 92 °C durante 10 min. La PCR se realizó con un volumen de reacción final de 25 μ L constituido por: 12.5 μ L de mix Gotaq® G2 Hot star, 500 nM de cada iniciador y 2.5 μ L de ADNc. Se ejecutó el programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min y 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 45 s, alineamiento a 45 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 45 s y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Identificación genómica de begomovirus. Se analizaron 16 muestras (segundo muestreo) de material vegetal y se utilizaron dos pares de iniciadores: PBL1v2040 / PCR1c (Rojas *et al.*, 1993) y Av494 / Ac1048 (Cuadro 1) (Wyatt y Brown, 1996). Para la síntesis de cADN se realizó una mezcla de reacción con: 9.75 μ L de agua libre de nucleasas, 500 nM por iniciadores (para cada par de iniciadores) y 2.5 μ L de ARN total, incubado a 85 °C por 3 min en un termociclador T100 (Bio-Rad). Posteriormente, se añadió a la reacción una mezcla de: 2 mM de mix dNTP's, 1X buffer-RT, 100 U de la enzima transcriptasa inversa (M-MLV-RT) y 10 U del inhibidor de la ribonucleasa (RNAsin), todos de Promega Corp. EUA. El volumen total de reacción fue de 20 μ L incubada a 44 °C durante 60 min, seguido por una temperatura de 92 °C durante 10 min.

La mezcla de PCR con los iniciadores PBL1v2040 / PCR1c se realizaron con un volumen final de 25 μ L: 1X de buffer GoTaq®, 0.2 mM de mix dNTP's, 300 nM de los iniciadores PBL1v2040 - PCR1c, 0.5 U de GoTaq® G2 y 2 μ L de ADN. El volumen final se aforó con agua libre de nucleasas hasta obtener 25 μ L. El programa fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min y 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 50 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 45 s, y una extensión final de 72 °C por 5 min. La PCR se realizó en el termociclador Arktik Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific).

Para el caso de los iniciadores AV494 / AC1048, la mezcla de PCR consistió en un volumen final de 25 μ L: 15 μ L de H₂O, 5 μ L de Buffer Green 5X, 2 μ L de MgCl₂ (7.5 mM), 0.5 μ L de dNTPs (10 mM), 0.5 μ L de cada iniciador (10 mM), 0.25 μ L de GoTaq® DNA Polimerasa (U μ L⁻¹) (Promega) y 2 μ L de ADN. Las condiciones de PCR consistieron de: desnaturalización inicial a 95 °C por 4 min y 30 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 1 min,

alineamiento a 55 °C por 2 min, extensión a 72 °C por 60 s, y una extensión final de 72 °C por 10 min.

Identificación genómica de fitoplasmas. Se utilizaron los iniciadores P1 / P7 (Deng y Hiruki, 1991; Samart *et al.*, 1996). La mezcla de PCR se preparó para un volumen final de 25 µL integrada por: 12 µL de H₂O libre de nucleasas, 2.5 µL de Buffer 1X, 0.6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de cada iniciador (10 mM), 0.4 µL de Taq DNA Polimerasa (U µL⁻¹) (Invitrogen) y 5 µL de ADN. Se ejecutó un programa que consistió en: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, alineamiento a 52 °C por 75 s, extensión a 72 °C por 90 s y extensión final a 72 °C por 10 min. La PCR se realizó en el termociclador T-100 (BioRad).

PCR-anidada. Se utilizaron los iniciadores FU5 y RU3N dirigidos a la región amplificada 16S (Lorenz *et al.*, 1995). Los productos obtenidos en la PCR-directa se diluyeron (1:30) con agua destilada estéril y se utilizó como ADN molde con las mismas concentraciones anteriormente descritas. Se ejecutó un programa que consistió en: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 s, alineamiento a 56 °C por 40 s, extensión a 72 °C por 90 s y extensión final a 72 °C por 5 min. La PCR se realizó en el termociclador T-100 (BioRad).

Todos los productos de PCR (Potyvirus, Begomovirus, Fitoplasmas y hongo) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV en el fotodocumentador (UVP, Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom).

Análisis epidemiológico

Método de muestreo. Por cuadrante, se seleccionaron 3/9 subcuadrantes como unidades de muestreo para la evaluación de variables epidemiológicas. La selección de subcuadrantes se hizo mediante un método completamente al azar con MS Excel Aleatoriza v1.0 (CP-LANREF, 2022. No publicado) (Figura 1A). En el centroide de cada unidad de muestreo, se colocó un cuadrado de madera portátil de 1x1 m como referencia para evaluación de variables (Figura 1C-D). En unidades de muestreo con menos del 25% de cobertura foliar, el muestreo se realizó de forma dirigida priorizando el orden secuencial 4-9 de los subcuadrantes.

Variabes de estudio. Se utilizó la App-Monitor® v1.1 Android®, disponible en PlayStore® (CP-LANREF, 2021) para caracterización de la parcela y registro de variables. Se registró las coordenadas geográficas, estado, municipio, localidad, nombre del cultivo, superficie, fenología, tecnificación, riego y densidad de plantación. Se configuró un muestreo de severidad de cenicilla, daño de flor y vigor de planta mediante una escala aritmética de 5-clases: 1=0%, 2=0.01-25%, 3=25.01-50%, 4=50.01-75% y 5=75.01-100% (Figura 1F-G, I). Adicionalmente, se contabilizó el número de adultos de *Macrodactylus* sp. (Figura 1H).

Diseño de escala logarítmica-diagramática (ELD) de severidad para cenicilla. Se colectaron y digitalizaron un total de 250 foliolos apicales del estrato medio de la planta garantizando representatividad de la parcela (Figura 1E). Un total de 50 imágenes fueron desechadas por baja resolución y calidad. El criterio de colecta fue dirigido a grados de severidad que representaran el progreso de la enfermedad de Y_0 (sano) a Y_{max} (daño máximo). Las imágenes digitalizadas se procesaron en GIMP v2.10.32 para eliminación de fondo y cuantificación del área total (AT), dañada (AD) o signos del hongo asociado a Cenicilla. El porcentaje de severidad (%sev) por foliolo se obtuvo aplicando la fórmula: %sev = 100 * [AD / AT]. Para diseño de escalas, el punto medio de clase (PMC), límite inferior (Li) y superior (Ls) se obtuvieron ingresando el número de clases y daño máximo en 2Log-Epidem v.2.0 por el método Hosfall y Barrat (1945) (Mora-Aguilera y Acevedo-Sánchez, 2022. No publicado).

Validación de escalas de severidad en entorno controlado (VEC). Se realizaron dos validaciones de ELD-7 y ELD-8 clases. En la primera, se validó la versión 1 de cada escala, y en la segunda una versión con correcciones y actualizaciones, p.e., cambio de imagen. Del acervo total con 200 imágenes de foliolos digitalizados, se seleccionaron 30 con diferentes grados de severidad. Se colocaron en tamaño uniforme al centro de una diapositiva de PowerPoint® 2016. Se programó el archivo con un macro de aleatorización de 30 s por foliolo, usando Microsoft® Visual Basic® 2016. Al final de cada foliolo, se mostró el valor real de severidad (R_{sev}). En Validar-PER v1.5 (LANREF, 2022. No publicado), que permite determinar la exactitud (β , pendiente) y precisión (R^2 , coeficiente de determinación) ajustando un modelo de regresión lineal ($y = \beta_0 + \beta_x + e$), cada evaluador configuró las escalas de evaluación registrando el número de la Clase (#Clase) y PMC. En aula se proyectó el archivo a nueve evaluadores para la asignación de la clase severidad (C_{sev}) de

cada foliolo con base en las escalas logarítmica-diagramáticas. Cada evaluador registró en Validar-PER v1.5 valores de C_{sev} y R_{sev} de 30 foliolos. Al finalizar cada evaluación, se generaron automáticamente coeficientes de β y R^2 (Nutter Jr. y Schultz 1995) asociados a una escala arbitraria de exactitud para medir sesgo del valor real respecto al observado ($\beta < 0.96$, *subestimado*; $\beta = 0.96$ a 1.05 , *perfecta*; y $\beta > 1.06$, *sobreestimado*), y precisión para el sesgo en el conjunto de valores reales respecto a observados en la evaluación total ($R^2 < 0.69$, *no aceptable*; $R^2 = 0.7$ a 0.8 , *baja*; $R^2 = 0.81$ a 0.9 , *media*; $R^2 = 0.91$ a 0.95 , *alta*; $R^2 > 0.96$, *muy alta*). La reproducibilidad fue el indicador de la consistencia de la evaluación entre evaluadores (Nutter Jr. y Schultz 1995), y se estimó en RStudio® 2023.06.2 mediante coeficiente de correlación de Pearson (r) de una matriz con valores de C_{sev} . Se obtuvo la concordancia entre evaluadores *versus* el real mediante kappa de Cohen (k) y kappa ponderada (k_w) para determinar el grado de acuerdo: no concordancia (< 0), insignificante ($0.0 - 0.2$), bajo ($0.2 - 0.4$), moderado ($0.4 - 0.6$), bueno ($0.6 - 0.8$) y muy bueno ($0.8 - 1.0$).

Validación de escalas de severidad en campo (VCa). Las escalas logarítmicas-diagramáticas de 7 y 8 clases con mejor calificación en r , β y R^2 , se seleccionaron para VCa. Así mismo, cuatro de los nueve evaluadores fueron seleccionados considerando contrastes de perfil y en parámetros finales β y R^2 de las pruebas de entorno controlado. En campo, se seleccionaron aleatoriamente 240 foliolos (30 por escala y evaluador), para determinación de C_{sev} y su digitalización para determinar $\%_{sev}$ con el método previamente descrito en la sección de diseño de escala logarítmica-diagramática. Análogamente al proceso VEC, se usó Validar-PER v1.5 para configurar las escalas de evaluación. Cada evaluador registró valores de C_{sev} y R_{sev} de 30 foliolos por escala. Se generaron los parámetros de β , R^2 y r asociados a su escala arbitraria de acuerdo con el método descrito en la sección respectiva.

Análisis jerárquico de conglomerados para VEC y VCa. Se integró una matriz independiente para el proceso VEC y VCa para nueve y cuatro evaluadores respectivamente, incluyendo las evaluaciones de C_{sev} y R_{sev} de 30 foliolos. En Rstudio® 2023.06.2, por proceso y escala de severidad se generaron mapas de calor mediante la función *Heatmap* para representar C_{sev} y r_c entre evaluadores mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r). Los valores de r entre -1 a 1 se consideraron el nivel de reproducibilidad, donde los valores positivos cercanos a 1 fueron de alta reproducibilidad. Por cada *heatmap* y variable (evaluador y hoja) se generó un *Hierarchical cluster analysis* (HCA) agru-

pado por el método ‘complete’ y distancia ‘Euclidiana’ (d). Se asoció una colorimetría en gradiente de verde – amarillo – rojo para representar transición de sano a dañado mediante C_{sev} y r . Los valores C_{sev} y R_{sev} por proceso, escala y evaluador se graficaron usando la función *ggplot* adicionando un ajuste de la ecuación de regresión lineal para determinar parámetros β , R^2 y p -value mediante la función *stat_poly_eq*.

Análisis geoestadístico parcelario. Para análisis geoestadístico en *Golden Surfer*® v10, la matriz de evaluación completa generada con *App-Monitor*® v1.1 se estructuró en formato espacial de tipo: X = filas, Y = columnas y Z = variables epidemiológicas. Para obtener un valor por cuadrante de los tres subcuadrantes evaluados, se empleó el criterio de máxima inductividad de la escala aritmética de 5-clases para severidad de cenicilla, daño de flor y vigor de planta. Para *Macroductylus* sp., se obtuvo el acumulado de insectos por cuadrante. El análisis geoestadístico se realizó con el método Kriging representado en mapas de contornos. La dependencia y autocorrelación espacial se calculó con variogramas omnidireccionales (360°) ajustados a un modelo esférico. Por cada variable evaluada se obtuvieron los indicadores variográficos *lag-distance* y *sill* o meseta (σ^2 -s) para determinar el nivel de dependencia espacial a nivel parcela (González-Cruces *et al.*, 2021).

Estimación de vigor de cobertura y severidad mediante imágenes de dron. Se seleccionó un bloque de nueve cuadrantes (Columna 8:10, Fila 1:3) por criterio de máxima inductividad de cenicilla mediante exploración visual. En el centroide del bloque, se capturaron 10 imágenes RGB (13 mpx) con el dron Phantom 3 DJI® a una altura de 27 m. Una imagen testigo por cuadrante a 5 m se capturó para mayor resolución de síntomas. En *ArcMap*® v10.3, se realizó un análisis de ‘segmentación de imagen’ en dos etapas mediante clasificación supervisada y máxima probabilidad: 1) *Entrenamiento en una imagen-muestra* con resolución a 5 m, para diseño de una ‘firma RGB’ con capacidad de discriminación entre categorías de clasificación i.e., severidad cenicilla (*sev*), suelo (*s*), tejido foliar (*t*) y floración (*f*); y 2) *Segmentación de imagen* extrapolando la ‘firma RGB’ del entrenamiento a la imagen de resolución 27 m correspondiente al bloque completo. Se obtuvo la superficie por categoría de clasificación y la superficie total del bloque ($ST = sev + s + t + f$). La estimación de severidad cenicilla del bloque se calculó como: $sev_b = 100 * (sev / ST)$; y el vigor de cobertura como $vc_b = 100 * [(sev + t + f) / ST]$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica y génica del hongo. Se observaron manchas irregulares polvorientas de color blanco en el haz de las hojas. En síntomas avanzados, se observaron lesiones de color amarillento debido al efecto del daño por el hongo. Los síntomas y signos se observaron en los estratos medios y bajos principalmente (Figura 2A-B). En hojas jóvenes, se observó una ligera reducción del área foliar debido a la severidad del hongo. También se observó alta incidencia de frailecillos, plaga para algunos cultivos de importancia económica como el maíz y frijol (Aragón *et al.*, 2021).

En microscopio se observaron hifas, conidióforos y conidios. Conidióforos cilíndricos y erectos con célula basal recta o ligeramente curva seguidas por dos células apicales más cortas (Figura 2B-C) con conidiogénesis tipo pseudidium (maduración de conidios uno a la vez). Conidios hialinos, ovoides a elipsoides de $31.74 \pm 0.3419 \mu\text{m} \times 15.11 \pm 0.1579 \mu\text{m}$ sin presencia de cuerpos de fibrosina (Figura 2A-E). Tubos germinativos con una longitud de uno o dos veces el largo de los conidios, con desarrollo terminal o subterminal y ápices lobulados (Figura 2D). De acuerdo a las características morfológicas, se determinó que el hongo pertenecía al género *Erysiphe* (Cook y Braun, 2009; Glawe, 2008; Takamatsu, 2014). No se observaron estructuras sexuales.

Las secuencias obtenidas en este estudio y comparadas con secuencias del GenBank mediante BLASTn, determinaron que el agente causal de la cenilla en frijol ayocote era *Erysiphe vignae* con un porcentaje de similitud del 100% y un e-value de 0 para las cuatro secuencias analizadas. Asimismo, las secuencias de estudio compartieron un ancestro común, con un valor de confiabilidad (Bootstrap) del 94%, con secuencias pertenecientes a *Erysiphe vignae* (MW293895, MT628286) provenientes de muestras de *Vigna radiata* en Australia (Figura 2H). Los resultados genómicos y morfológicos de este estudio fueron comparados con las características reportadas para esta especie por Kelly *et al.* (2021) y Deng *et al.* (2022).

Se ha identificado a *E. vigna* en diferentes especies de la familia *Fabaceae* como en soya verde (*Vigna radiata*) y frijol negro (*V. mungo*) en Australia, espolón (*Vigna unguiculata*) en Brasil y en frijol común (*P. vulgaris*) en sur América y China (Deng *et al.*, 2022; Kelly *et al.*, 2021). En México, Félix-Gastélum *et al.* (2011), reporta a *E. diffusa* como el agente causal de la cenilla en frijol

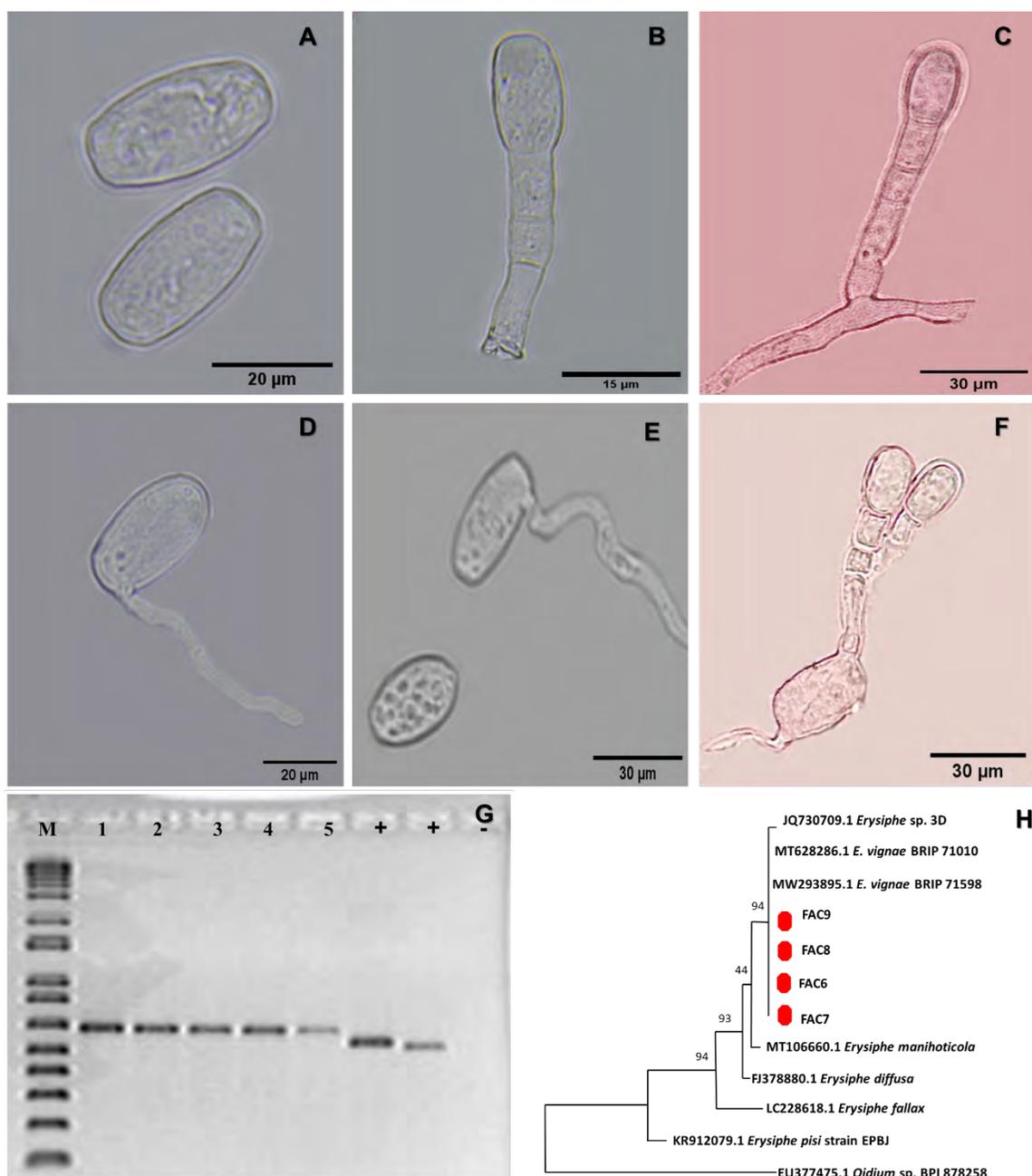


Figura 2. Identificación morfológica y genómica de la cenicilla en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*). A) conidios hialinos, ovoides a elipsoides; B-C) conidióforos cilíndricos y erectos; D-F) conidios en germinación; G) Amplificación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) del ADN ribosómico nuclear (~ 500 pb) de cinco muestras de ADN de cenicilla (1-5), controles positivos de PCR (+) pertenecientes a la región ITS del género *Alternaria* y *Fusarium* respectivamente, marcador de peso molecular (M) de 1 kb plus Invitrogen y control negativo de PCR (-); H) árbol filogenético realizado por Máxima verosimilitud (ML) y el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano con 1000 repeticiones Bootstrap, basado en la región ITS de secuencias de hongos pertenecientes al género *Erysiphe* (Cuadro 2). Las secuencias de estudio son: FAC6, FAC7, FAC9 y FAC9 (punto rojo). Se incluyó a *Oidium* sp (número de accesoión: EU377475) como grupo externo.

común en Sinaloa, sin presentar fase sexual. Sin embargo, no existen registros de *E. vigna* afectando a fabáceas en México (Schoch *et al.*, 2020). En este trabajo se identificó por primera vez a *E. vigna* en cultivo de frijol Ayocote.

Se ha estudiado ampliamente el frijol ayocote con lo que respecta a la resistencia y tolerancia a plagas, enfermedades y condiciones abióticas (climas fríos) (Osorno *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2014; Schwember *et al.*, 2017). Por ejemplo, Ruíz-Salazar *et al.* (2019), resaltan que el frijol ayocote presenta resistencia al tizón común (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*) y antracnosis (*Colletotrichum lindemutianum*). No obstante, en este estudio se observó que la cenicilla puede ser un problema para el cultivo si se presentan las condiciones ambientales favorables; aunado a ello, se desconoce el impacto productivo que puede implicar la incidencia y severidad de la cenicilla, sin considerar otras plagas de tipo insectil, fúngica, viral y fitoplasmas.

En México, la siembra del frijol ayocote se ubica principalmente en Puebla, Oaxaca y Chiapas, con limitación en su consumo solo en las zonas donde se produce (CIAD, 2022). La cenicilla es uno de los principales factores limitantes del rendimiento en algunas regiones productoras de frijol común en el mundo, como Brasil, México, España y Estados Unidos, y puede causar pérdidas hasta un 69 % en el rendimiento (Deng *et al.*, 2022); por lo que es importante conocer el potencial epidemiológico de esta nueva especie identificada por primera vez en frijol ayocote en México.

Identificación genómica de virus y fitoplasmas. Se analizaron 46 folíolos de ambos muestreos, donde se observaron síntomas de mosaicos, amarillamiento, deformación foliar y aclaramiento de nervaduras; no obstante, no se detectó la presencia de *Potyvirus*. En frijol común se han reportado alrededor de 23 virus que incluyen nueve géneros (*Potyvirus*, *Comovirus*, *Nepovirus*, *Sobemovirus*, *Alfamovirus*, *Cucumovirus*, *Tobamovirus*, *Begomovirus* y *Curtovirus*), predominando 11 especies del género *Potyvirus* como principales enfermedades virales en frijol (Meziadi *et al.*, 2017). En frijol ayocote solo se ha reportado a *Bean common mosaic virus* (BCMV) (CAB International, 2022); sin embargo, no suele ser un problema en esta especie, debido a la resistencia y/o tolerancia que puede presentar el cultivo para algunos virus. Osorno *et al.* (2007) han sugerido que *P. coccineus* presenta resistencia en *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), debido a dos genes que tiene la planta. Un gen recesivo, que confiere resistencia a la clorosis foliar y un gen dominante que evita la deformación de las vainas en presencia de BGYVM.

Para el análisis genómico del género *Begomovirus*, 16 de 31 muestras analizadas del segundo muestreo, no amplificaron el fragmento esperado, por lo que se descartó la presencia de begomovirus en esta investigación. Por otro lado, de las plantas muestreadas se observaron síntomas putativos a Fitoplasmas, los síntomas observados fueron deformación foliar, coloración café o violeta, con evidente coloración violácea en las nervaduras del envés de las hojas más jóvenes, achaparramiento, ligero amarillamiento en hojas del estrato medio y retraso en la floración comparado con el resto de la población de frijol (Figura 3). De acuerdo al análisis genómico (corroboración de dos repeticiones), se

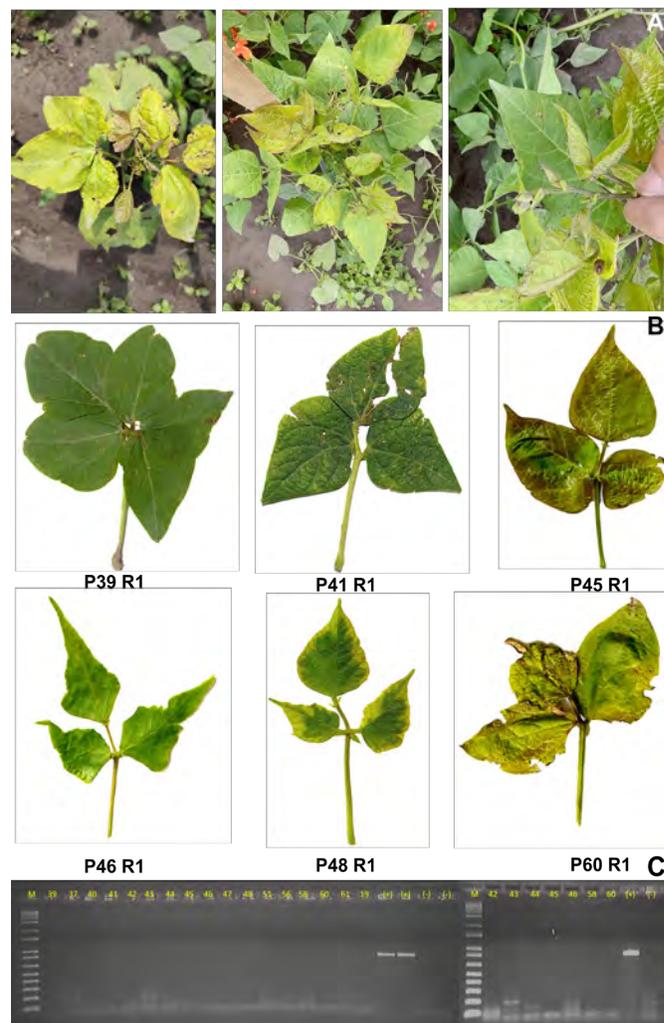


Figura 3. Síntomas en campo asociados a putativos virus y fitoplasmas A) Síntomas observados en campo putativos a fitoplasmas en el cultivo de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*); B) Selección de seis hojas trifoliadas con síntomas putativos a fitoplasmas; A) análisis de electroforesis de 17 muestras de folíolos con síntomas de putativos a fitoplasmas.

descartó la presencia de fitoplasmas en las muestras analizadas. Actualmente, solo se ha reportado la presencia de ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ en las fabáceas *Macroptilium lathyroides* (Alves *et al.*, 2018) y *Crotalaria juncea* (Bianco *et al.*, 2014). Los síntomas que reporta son reducción foliar, amarillamiento y atrofia. En la presente investigación se observaron síntomas similares y además de una coloración violácea en los foliolos, pero sin corroborar la presencia de fitoplasmas. Por otro lado, Sánchez-Castro *et al.* (2016) reportan las chicharritas *Empoasca kraemeri*, *E. fabae* y *E. papayae* como putativos vectores de fitoplasmas en el cultivo de frijol común. En Zacatecas se ha reportado *E. kraemeri* como principal plaga en frijol durante todas las etapas fenológicas, observándose mayor susceptibilidad en la etapa de floración y desarrollo de vainas (Lozano-Gutiérrez *et al.*, 2017). Durante el muestreo, se observó altas poblaciones de chicharritas (no identificados morfológicamente) en el cultivo. Esto sugiere hacer futuras investigaciones de la identificación morfológica de las chicharritas y el análisis genómico del fitoplasma en mayor número de muestras vegetales, así como corroborar la presencia del fitopatógeno en el insecto. Esto es importante porque no hay evidencias científicas de la presencia de fitoplasmas en el cultivo de ayocote.

Diseño de escalas logarítmica-diagramáticas de severidad (ELD). Recientes revisiones de 105 artículos científicos enfocados en el diseño de ELD publicados entre 1991 – 2017, muestran diversos enfoques para generar escalas y análisis paramétricos para determinar su confiabilidad (Del Ponte *et al.*, 2017). En este análisis, 5/127 ELDs en tres publicaciones de *Phaseolus* sp fueron diseñadas para *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculats*, *Phaeoisariopsis griseola*, *Pseudocercospora griseola* y *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Libreton *et al.*, 2015; Godoy *et al.*, 1997). Excepto en *Pseudocercospora griseola*, los umbrales de severidad entre 0.1 – 60% se dividieron en 6 – 9 clases mediante el principio de Weber-Fechner y diseño de escala basado en foliolos dibujados en blanco-negro (Del Ponte *et al.*, 2017; Godoy *et al.*, 1997).

En este estudio se generaron ocho escalas totales, dos de 7-clases y dos 8-clases, con dos repeticiones por escala, las cuales se encuentran en el rango de clases usado por estudios cuyo objetivo es diseñar de escalas (5 – 12, $M_o = 6$; Del Ponte *et al.*, 2017). La imagen representativa por clase se seleccionó con base en umbral de L_i y L_s obtenido en 2Log-Epidem v.2.0. Las versiones finales de las escalas se integraron con la imagen-clase asociada al L_i , PMC y L_s (Figura 4). Se obtuvieron los valores 0, 0.5, 2.1, 6.2, 16.6, 41.7 y 100% como

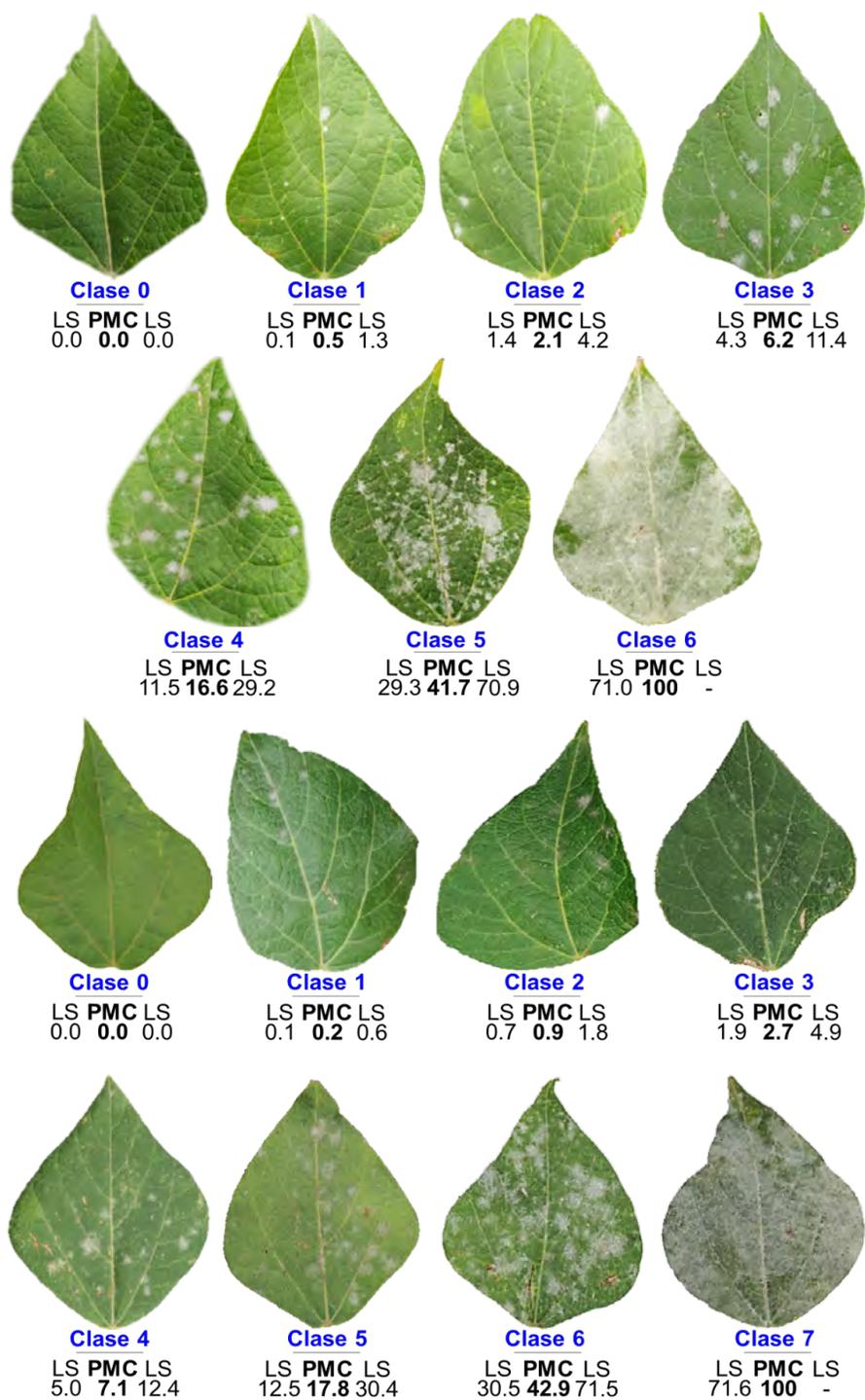


Figura 4. Versiones finales de escalas logarítmicas-diagramáticas de severidad foliar para evaluación de Cenicilla en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), seleccionadas para validación en campo. A. ELD-7c. B. ELD-8c.

PMC de ELD-7c (Figura 4A); y 0, 0.2, 0.9, 2.7, 7.1, 17.8, 42.9 y 100% para ELD-8c (Figura 4B). Las tendencias recientes al menos desde 2007, el diseño de escalas basado en Horsfall & Barrat y la ley Weber-Fechner están siendo sustituidos por modelos lineales o aritméticos (Del Ponte *et al.*, 2021; 2017; Godoy *et al.*, 1996). Se percibe en estos nuevos enfoques que los principios epidemiológicos se comprometen por cubrir ajustes estadísticos, p.e., coeficiente de determinación (R^2). No obstante, este estudio se diseñó con enfoque epidemiológico, por tanto, las escalas tienen fines de manejo preventivo de enfermedades en *Phaseolus coccineus*, lo cual implica priorizar las primeras clases de daño que se asocian a procesos patogénicos de intervención oportuna (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

Primera validación de ELD-7c para un entorno controlado (VEC). La evaluación en ELD-7c mostró coeficientes de β , R^2 y r en rango de 0.99 – 1.02, 0.80 – 0.94 y 0.81 – 0.87, respectivamente, reportados como aceptables-óptimos en estudios de diseño y validación de escalas (Ortega-Acosta *et al.*, 2016; Libreton *et al.*, 2015; Godoy *et al.*, 1996). La escala *v1 – rep2* con $\beta = 1.07$ (sobreestimado en 7%), $R^2 = 0.93$ (alta) y $r = 0.87$ (moderada) tuvo la mejor evaluación integral. Aunque *v2 – rep1* tuvo coeficientes β y R^2 similares, obtuvo la r más baja con 0.81 (Cuadro 3). Por el contrario, los coeficientes de ELD-8c fueron notablemente menores $\beta = 0.81 - 0.97$, $R^2 = 0.80 - 0.85$ y $r = 0.79 - 0.94$ (Cuadro 3). La escala mejor evaluada fue *v1 – rep1* con $\beta = 0.97$ (perfecta), $R^2 = 0.85$ (media) y $r = 0.87$ (moderada) (Cuadro 3). Por lo tanto, *v1 – rep2*

Cuadro 3. Promedio de exactitud (β), precisión (R^2) y reproducibilidad (r) por versión, repetición y escala logarítmica-diagramática de severidad para evaluar cenicilla en *Phaseolus coccineus*.

Versión (v) / Repetición (rep)	Exactitud (β)	Categoría cualitativa de b	Precisión (R^2)	Categoría cualitativa de R^2	Reproducibilidad (r, Rango)
ELD 7 clases					
<i>v1 – rep1</i>	0.99	perfecta	0.81	media	0.83 (0.60 – 0.98)
<i>v1 – rep2</i>	1.07	sobreestimado	0.93	alta	0.87 (0.67 – 0.99)
<i>v2 – rep1</i>	1.08	sobreestimado	0.94	alta	0.81 (0.61 – 0.98)
<i>v2 – rep2</i>	1.02	perfecta	0.80	baja	0.86 (0.72 – 0.94)
ELD 8 clases					
<i>v1 – rep1</i>	0.97	perfecta	0.85	media	0.87 (0.77 – 0.97)
<i>v1 – rep2</i>	0.81	subestimado	0.84	media	0.94 (0.81 – 1.00)
<i>v2 – rep1</i>	0.96	perfecta	0.81	media	0.79 (0.62 – 0.99)
<i>v2 – rep2</i>	0.87	subestimado	0.80	baja	0.79 (0.62 – 0.99)

* En negritas se muestran las escalas seleccionadas por mejor calificación en los parámetros evaluados.

(*ELD-7c*) y *v1 - rep1* (*ELD-8c*) fueron seleccionadas para validación en campo (Figura 4, Cuadro 3).

Segunda validación de *ELD-7c* para un entorno controlado (VEC). El HCA conformó un *clúster* principal integrado por evaluadores 4 - 9 ($p = 0.94$), mientras que evaluadores 1 - 3 formaron *clústeres* independientes ($p > 0.75$) (Figura 5A2). La *exactitud* (β) estuvo en el rango de 0.82 - 0.99, y *perfecta* en el *clúster* principal ($\beta > 0.96$). Los evaluadores 1 - 3 subestimaron 10 - 18% de severidad diferencialmente en las clases 2-5 ($\beta = 0.82 - 0.97$) (Figura 5A1, 5A2 y Cuadro 4). La *precisión* (R^2) osciló entre 0.82 - 0.99, la cual fue *muy alto* ($R^2 > 0.94$) en el *clúster* principal, *moderado* en los *clústeres* independientes ($R^2 = 0.82 - 0.89$) (Figura 5A2, Cuadro 4). La reproducibilidad (r) de cada evaluador con respecto al real fue análogo a la *precisión*. En el *clúster* principal fue *muy alta* ($r = 0.97 - 0.99$) y *alta* en *clústeres* independientes ($r = 0.92 - 0.94$) (Figura 5A2, Cuadro 4). Interesantemente, el índice kappa en el *clúster* principal fue *muy bueno* ($\kappa > 0.8$; $\kappa_w > 0.96$), mientras que los *clústeres* independientes fue *moderado - bueno* ($\kappa < 0.68$; $\kappa_w < 0.96$).

Segunda validación de *ELD-8c* para un entorno controlado (VEC). Se conformaron dos *clústeres* estadísticamente diferentes ($p < 0.001$). El *clúster* principal sin diferencias ($p = 0.96$) con la evaluación *real* se integró por los evaluadores 2, 3, 6 y 9, y aunque los evaluadores 4 ($p = 0.78$) y 6 ($p = 0.56$) estuvieron cercanos fueron estadísticamente diferentes por subestimar la clase 4 (Figura 5B1 y 5B2). Los evaluadores 1, 5 y 7 conformaron el segundo *clúster* ($p = 0.56$). La *exactitud* en general fue menor respecto de *ELD-7c* ($\beta = 0.51 - 0.99$), siendo casi *perfecta* en el *clúster* principal ($\beta > 0.98$). Los evaluadores 5 y 7 subestimaron 10 - 15 % la clase 4 de severidad ($\beta = 0.68 - 0.80$), mientras que el evaluador 1 fue el más inexacto ($\beta = 0.51$) con mediciones erráticas de subestimación y sobreestimación en clases 3-6 (Figura 5A1, 5A2 y Cuadro 4). La *precisión* fue similar que *ELD-7c* con $R^2 = 0.64 - 0.97$, siendo *muy alto* ($R^2 > 0.95$) en el *clúster* principal, excepto en evaluadores 4 y 8 ($R^2 = 0.89$), y *media a no aceptable* para evaluadores 1, 5 y 7 ($R^2 = 0.64 - 0.82$) (Figura 5A2, Cuadro 4). La reproducibilidad (r) de esta escala fue *alta - muy alta* ($r > 0.93$) en evaluadores del *clúster* principal y *media* en el segundo ($r = 0.80 - 0.91$) (Figura 5A2, Cuadro 4). El grado de acuerdo de cada evaluador respecto al real fue notablemente más bajo en comparación con *ELD-7c* ($\kappa = 0.38 - 0.79$; $\kappa_w = 0.80 - 0.97$). Solo en evaluadores del *clúster* principal fue *bueno* ($\kappa = 0.58 - 0.79$) y *moderado* en el segundo ($\kappa < 0.58$) (Cuadro 4).

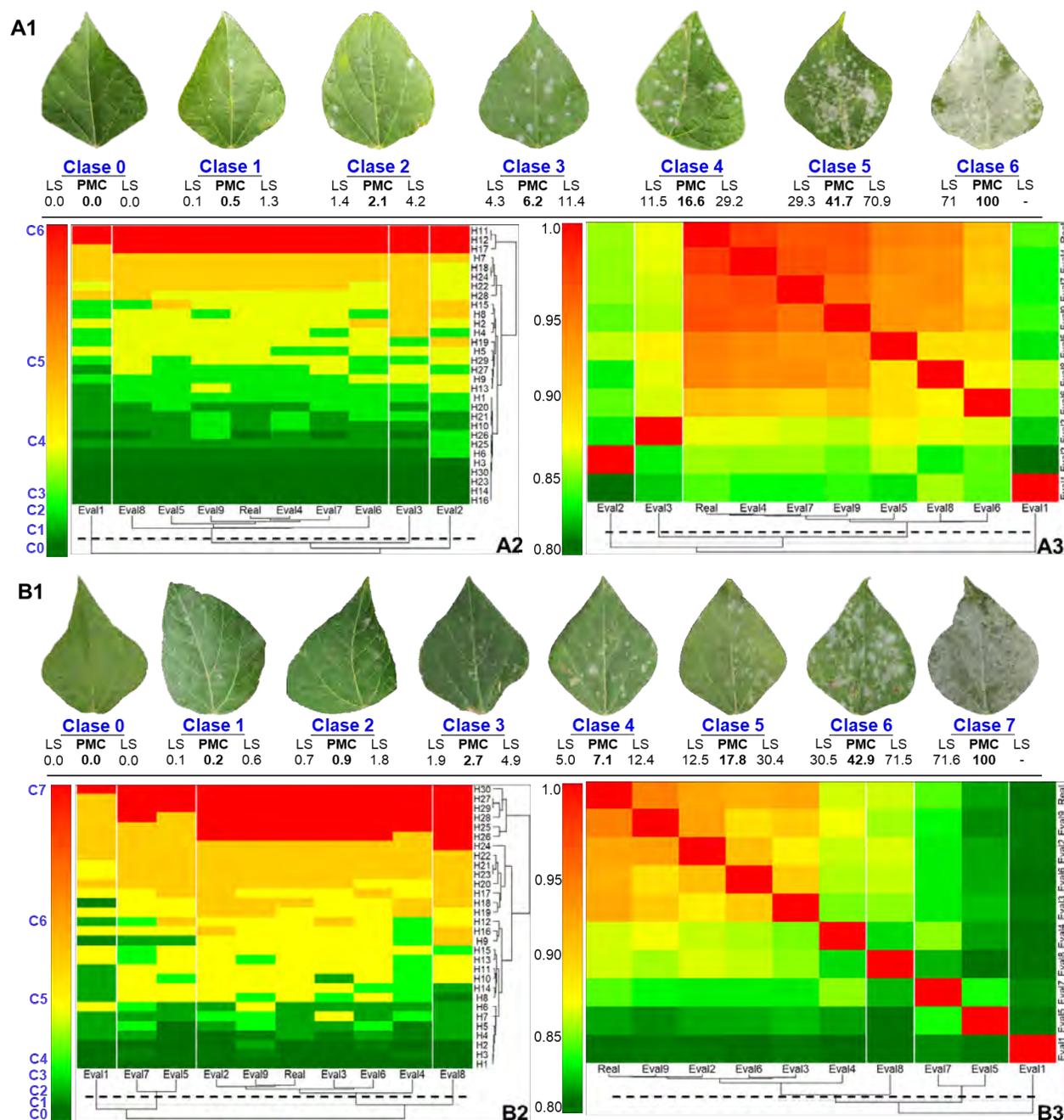


Figura 5. A1 y B1. Escala logarítmica-diagramática de 7 y 8 clases para evaluación de severidad de cenicienta en folíolos de frijol ayocote (*P. coccineus*), durante el proceso VEC de 30 hojas en por nueve evaluadores. A2 y B2. Heatmap del coeficiente de correlación de Pearson (r) entre nueve evaluadores por escala de severidad. Los valores de $r = 0.8 - 1$ indican la reproducibilidad de cada escala entre evaluadores. A3 y B3. Heatmap de clase de severidad en 30 hojas evaluadas por escala y evaluador. El color representa el valor de la clase asignada por el evaluador para cada hoja. Por evaluador y hojas se traza un *Hierarchical cluster analysis* agrupado por el método 'complete' y distancia *Euclidiana*.

Cuadro 4. Comparación de parámetros entre evaluadores con respecto al real, para evaluación de exactitud (βx), precisión (R^2) y nivel de concordancia entre evaluadores (κ , κ_w) por clase de severidad evaluada durante el proceso de validación en entorno controlado (VEC) y en campo (VCa).

Etapa	Modelo [y = x]	β_0	βx	r	R^2	p-value	κ	κ_w
<i>ELD 7 Clases</i>								
VEC	Eval8 vs Real	1.0	0.99	0.98	0.97	<0.001	0.88	0.99
	Eval4 vs Real	0.1	0.99	0.99	0.99	<0.001	0.84	0.98
	Eval5 vs Real	0.8	0.99	0.98	0.97	<0.001	0.84	0.98
	Eval7 vs Real	-0.1	0.99	0.99	0.99	<0.001	0.84	0.98
	Eval9 vs Real	0.8	0.96	0.99	0.99	<0.001	0.80	0.96
	Eval6 vs Real	0.7	0.96	0.97	0.94	<0.001	0.68	0.96
	Eval3 vs Real	5.0	0.97	0.94	0.89	<0.001	0.61	0.95
	Eval1 vs Real	-0.2	0.82	0.91	0.82	<0.001	0.57	0.95
	Eval2 vs Real	3.1	0.90	0.92	0.84	<0.001	0.48	0.90
	\bar{x}	.	0.95	0.96	0.93	.	0.73	0.96
CI	.	0.91-0.99	0.94-0.98	0.89-0.98	.	0.63-0.82	0.94-0.98	
<i>ELD 8 Clases</i>								
VEC	Eval2 vs Real	3.9	0.96	0.97	0.95	<0.001	0.79	0.97
	Eval3 vs Real	0.2	0.98	0.97	0.95	<0.001	0.74	0.94
	Eval6 vs Real	-0.3	0.98	0.97	0.95	<0.001	0.74	0.97
	Eval8 vs Real	3.1	0.99	0.93	0.87	<0.001	0.67	0.92
	Eval7 vs Real	0.9	0.80	0.91	0.82	<0.001	0.59	0.93
	Eval9 vs Real	1.8	0.98	0.98	0.97	<0.001	0.58	0.91
	Eval5 vs Real	5.2	0.68	0.84	0.70	<0.001	0.54	0.92
	Eval4 vs Real	-1.9	0.92	0.93	0.87	<0.001	0.39	0.93
	Eval1 vs Real	2.1	0.51	0.80	0.64	<0.001	0.38	0.80
	\bar{x}	.	0.87	0.92	0.86	.	0.60	0.92
CI	.	0.76-0.98	0.88-0.96	0.78-0.94	.	0.51-0.70	0.89-0.95	
<i>ELD 7 Clases</i>								
VCa	Eval1 vs Real	1.7	0.86	0.94	0.88	<0.001	0.84	0.96
	Eval4 vs Real	-1.2	0.99	0.98	0.96	<0.001	0.76	0.97
	Eval2 vs Real	2.6	0.98	0.98	0.97	<0.001	0.72	0.96
	Eval3 vs Real	3.3	0.97	0.97	0.95	<0.001	0.72	0.96
	\bar{x}	.	0.95	0.97	0.94	.	0.76	0.96
	CI	.	0.91-0.99	0.96-0.98	0.91-0.97	.	0.72-0.80	0.96-0.97
<i>ELD 8 Clases</i>								
VCa	Eval3 vs Real	0.5	0.99	0.99	0.99	<0.001	0.88	0.99
	Eval4 vs Real	-0.3	1.01	0.99	0.99	<0.001	0.84	0.98
	Eval1 vs Real	-1.2	0.99	0.99	0.98	<0.001	0.84	0.98
	Eval2 vs Real	1.3	0.98	0.99	0.98	<0.001	0.84	0.98
	\bar{x}	.	0.99	0.99	0.99	.	0.85	0.98
	CI	.	0.98-1.0	0.99	0.98-0.99	.	0.84-0.86	0.98-0.99

A un intervalo de confianza $\alpha = 0.05$, comparativamente *ELD-7c* fue 15% más exacta, con una ligera subestimación del daño por cenicilla en clases 4 - 6 y sobreestimación en clases 1 - 3 ($\beta = 0.91 - 0.99$) (Cuadro 4). Por el contrario, en *ELD-8c* la subestimación en clases 1 - 7 fue más evidente ($\beta = 0.76 - 0.98$). En términos de precisión y correlación con respecto al real, *ELD-7c* 9% más precisa con valores principalmente en categorías *alta* a *muy alta* ($R^2 = 0.89 - 0.99$ vs. $R^2 = 0.78 - 0.94$) (Cuadro 4). Los índices de concordancia fueron notablemente mejores para *ELD-7c* ($\kappa = 0.63 - 0.82$) con el 60% de evaluadores con un grado de acuerdo *muy bueno* con respecto al real, en contraste con *ELD-8c* que tuvo 50% de evaluadores en grado de acuerdo *moderado* y 22% en *muy bajo* ($\kappa = 0.51 - 0.7$) (Cuadro 4).

Validación de *ELD-7c* en campo (VCa). El *clúster* principal se integró por la evaluación real vinculada con evaluadores 2 - 4 ($p = 0.93$), en contraste con el evaluador 1 que formó un clado significativamente diferente ($p > 0.93$) (Figura 6A2). La *exactitud* (β) mantuvo el promedio con respecto a VEC ($\bar{x} = 0.95$, $0.86 - 0.99$), de los cuales 2/3 evaluadores tuvieron exactitud casi perfecta ($\beta > 0.97$). El evaluador 1 tuvo una exactitud *baja* ($\beta = 0.86$) con tendencia a subestimar clases 5 - 6, aunque interesantemente tuvo el grado de acuerdo mayor con respecto al real ($\kappa = 0.84$) (Figura 6A1, 6A2 y Cuadro 4). La *precisión* incrementó ligeramente a un rango $0.88 - 0.98$, siendo *muy alto* ($R^2 > 0.95$) en el *clúster* principal (Figura 6A2, Cuadro 4). Análogamente, la reproducibilidad fue *muy alta* entre evaluadores del *clúster* principal ($r = 0.95 - 0.97$) y *moderada* del evaluador 1 con respecto al real ($r = 0.86$) (Figura 6A3, Cuadro 4). En general, el grado de acuerdo (kappa) tuvo un incremento promedio marginal ($\kappa = 0.76$), no obstante, en el *clúster* principal bajó de categoría a *bueno* ($\kappa = 0.72 - 0.76$; $\kappa_w > 0.96$) y únicamente el evaluador 1 tuvo grado de acuerdo *muy bueno* ($\kappa = 0.84$) (Cuadro 4). Lo anterior sugiere una pérdida de exactitud, precisión y concordancia en la evaluación bajo condiciones de campo.

Validación de *ELD-8c* en campo (VCa). Esta escala tuvo mejores métricas con respecto al proceso VEC, e incluso que *ELD-7c* en campo. Se conformó un *clúster* principal con evaluación real y evaluadores 3 - 4 ($p = 0.999$), mientras que evaluador 1 - 2 conformaron clados independientes, pero no estadísticamente diferentes ($p > 0.85$) (Figura 6B2). La *exactitud* mejoró considerablemente y fue *casi perfecta* entre evaluadores ($\beta = 0.98 - 1.01$). Las principales inconsistencias de evaluaciones fue subestimación en clases 4 - 6 (Figura 6B1, 6B2 y Cuadro 4). La *precisión* también incrementó notablemente a nivel muy

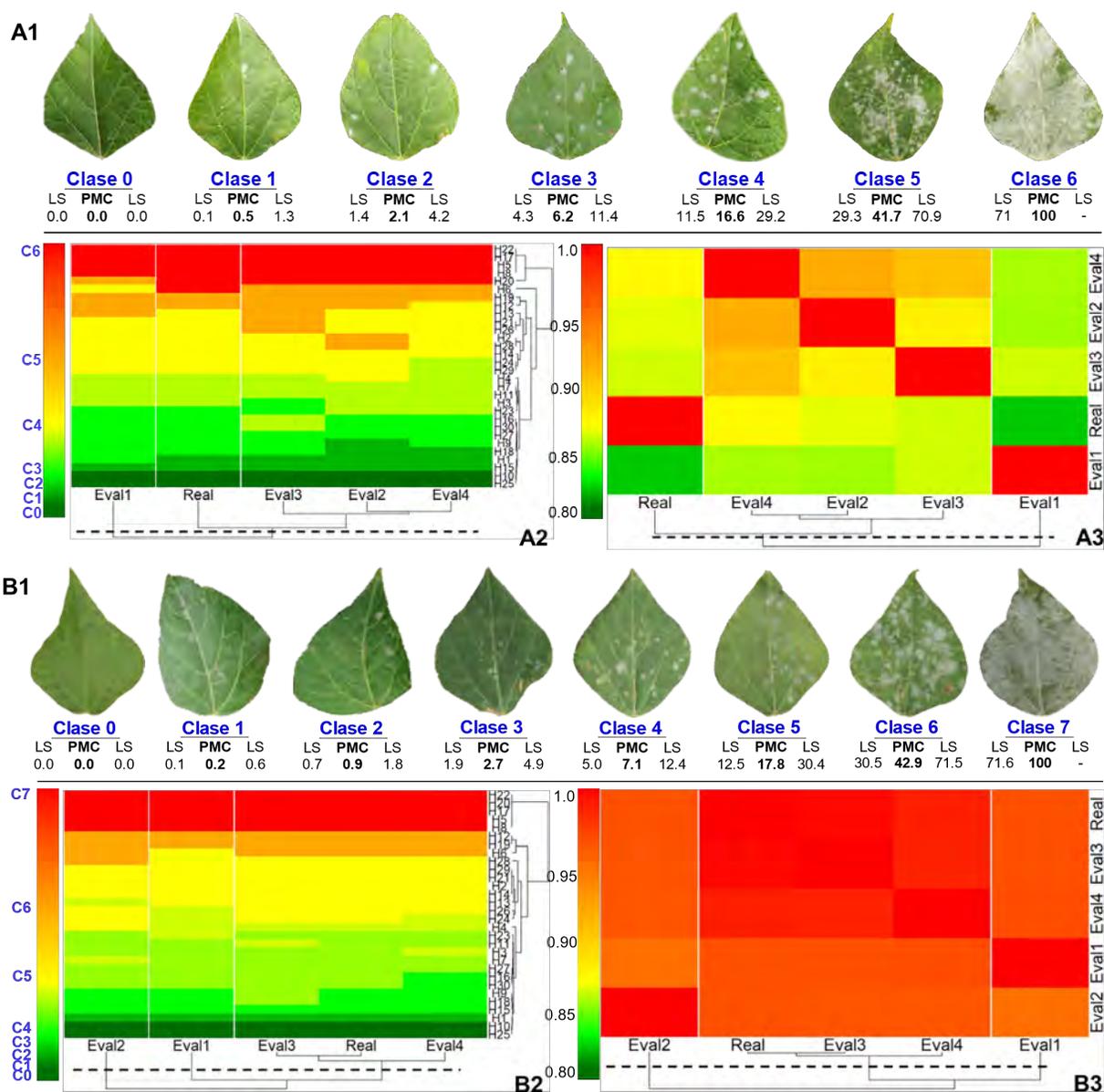


Figura 6. A1 y B1. Escala logarítmica-diagramática de 7 y 8 clases para evaluación de severidad de cenicilla en folíolos de frijol ayocote (*P. coccineus*), durante el proceso de validación de 30 hojas en campo por cuatro evaluadores seleccionados. A2 y B2. Heatmap del coeficiente de correlación Spearman (ρ) entre nueve evaluadores por escala de severidad. Los valores de $\rho = 0.8 - 1$ indican el nivel de reproducibilidad de cada escala entre evaluadores. A3 y B3. Heatmap de clase de severidad en 30 hojas evaluadas por escala y evaluador. El color representa el valor de la clase asignada por el evaluador para cada hoja. Por evaluador y hojas se traza un *Hierarchical cluster analysis* agrupado por el método 'complete' y distancia *Euclidiana*.

alto 0.98 - 0.99 en los cuatro evaluadores, evidenciando una mejora significativa en el uso de 8-clases a nivel campo (Figura 6B2, Cuadro 4). La reproducibilidad los niveles más altos con respecto al real ($r = 0.99$) a pesar de la subestimación en las primeras clases (Figura 6B3, Cuadro 4). En general, el índice Cohen de kappa fue el mejor de VEC y VCa alcanzado el grado de acuerdo *muy bueno* (máxima categoría) en los cuatro evaluadores con respecto al real ($\kappa = 0.85$) validando la mejora en las métricas de exactitud, precisión y reproducibilidad con respecto a *ELD-7c* (Cuadro 4).

Análisis espacial-parcelario de la cenicilla. De acuerdo con el análisis geostatístico Kriging y variogramas omnidireccionales se seleccionaron los valores máximos para captar la mayor inductividad epidémica de cenicilla y resto de las variables en estudio. Se determinó que el cultivo presentaba una heterogeneidad en vigor de planta ($\text{lag}=4$ y $\sigma^2\text{-s}= 470$) (Figura 7D) esto se debió a que hubo áreas con ausencia de plantas. Por otro lado, la severidad de cenicilla exhibió patrones de distribución en focos agregados con una dependencia espacial de aproximadamente cuatro cuadrantes para el foco principal y uno a dos cuadrantes para focos discontinuos ($\text{lag}= 3.5$ y $\sigma^2\text{-s}= 450$) (Figura 7C). El foco principal de mayor inductividad se observó en la orilla de la parcela.

Análisis exploratorio de imagen con Dron Phantom 3 DJI®, proporcionó una estimación del porcentaje de severidad de cenicilla, y se observó diferencias con los resultados espaciales. De acuerdo al análisis de imágenes se estimó un promedio de 14.4% de severidad de la cenicilla y una cobertura de vigor de 0.92. En la zona donde no había presencia de plantas (bloque 1, cuadrante 8) se determinó un valor alto de severidad (99.4%) con baja cobertura foliar (0.41), debido a que el programa de análisis determinó el color de suelo similar al color de la cenicilla (Figura 8), generando un valor superior de severidad de la cenicilla en zonas sin plantas (99.4%) con las imágenes tomadas por el Dron. Contrario a lo mencionado, también se puede presentar subestimación de la severidad de cenicilla debido a su forma de distribución en la planta (presencia en la parte media y baja). No obstante, este tipo de análisis puede tener implicaciones favorables en otros patosistemas como virosis y tizón en frijol para cálculo de índice de vigor y uso como factor de corrección del índice de daño integrado (Gonzalez-Cruces *et al.*, 2022).

En este estudio, se determinó que el uso de imágenes tomadas con el Dron, no puede ser efectivo para el patosistema cenicilla-frijol en referencia a la se-

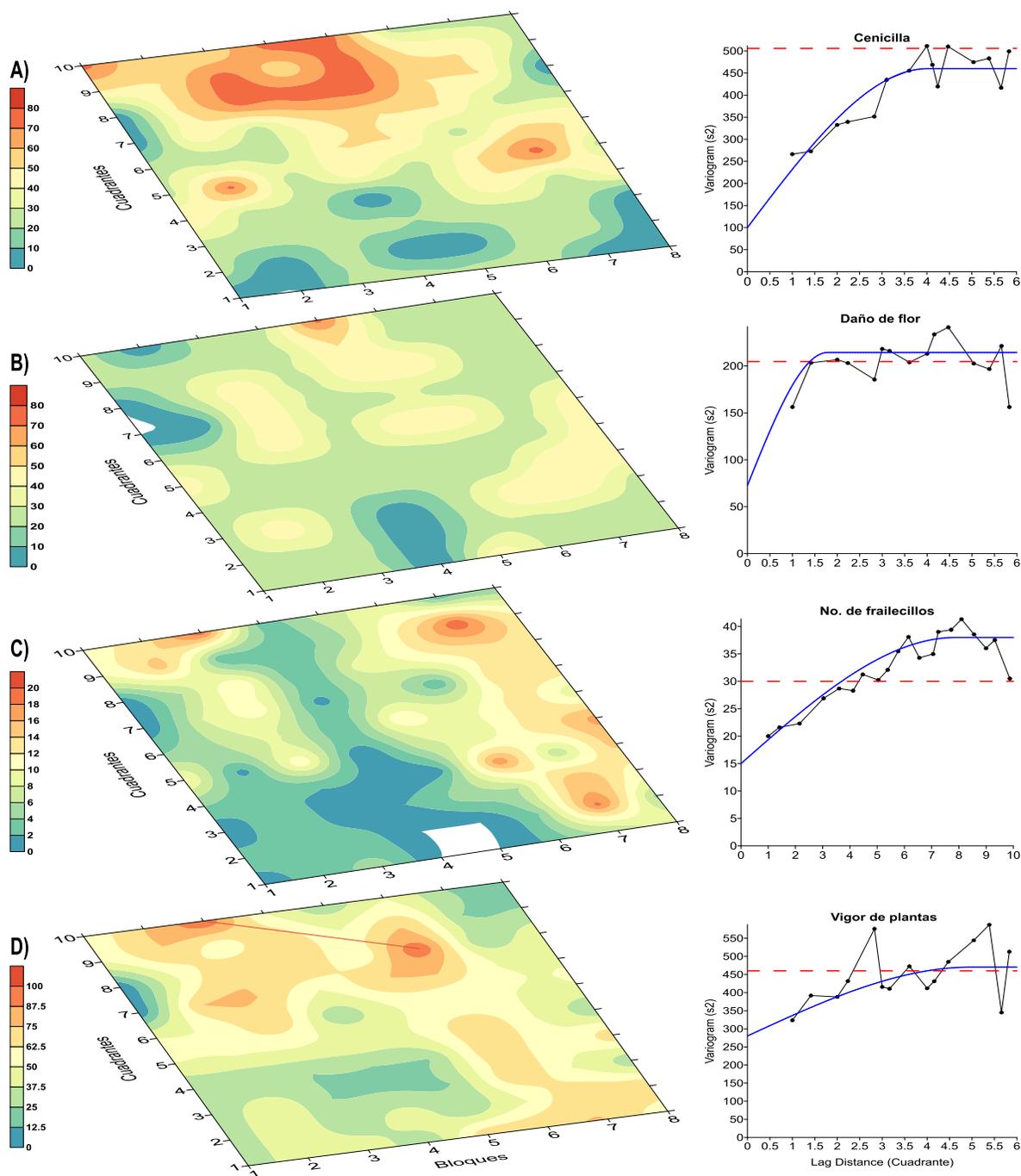


Figura 7. Análisis geoestadístico Kriging y semivariogramas del patosistema del frijol: A) Poblaciones de frailecillos (*Macroductylus* sp.), B) Daño en flor, C) Severidad de cenicilla y D) Vigor de planta del frijol ayocote. Para el análisis de frailecillos se obtuvo la suma de los tres subcuadrantes analizados por cuadrante. Para el análisis de daño de flor, severidad de cenicilla y vigor de planta se consideró el valor máximo de los tres subcuadrantes de cada cuadrante. Semivariogramas omnidireccionales por método esférico. Eje X= Lag de distancia en cuadrantes y Y= la varianza (σ^2).

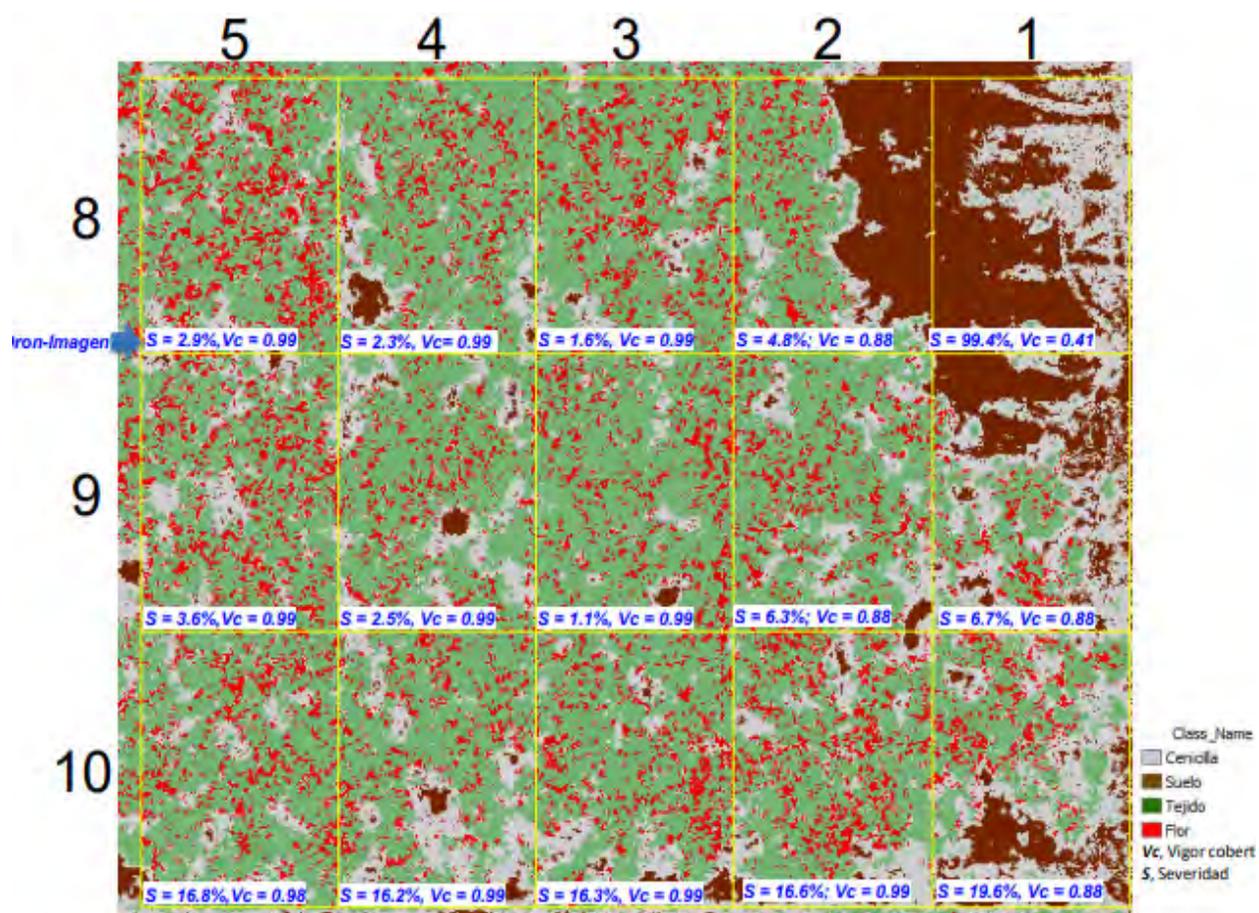


Figura 8. Estimación de severidad de cenicilla y cobertura de vigor asistido por imágenes aéreas digitales RGB capturadas con dron Phantom 3 DJI® a 27 m de altura. Eje X=bloques 1-5, Y=cuadrantes 8-10.

veridad; no obstante, puede proporcionarnos datos con respecto a incidencia de la misma. Con relación a daño de flor, se obtuvo una distribución aleatoria entre rangos de daño de 0 a 50% de acuerdo a la escala aritmética de evaluación de 5-clases aplicada en campo ($\text{lag} = 1.5$ y $\sigma^2-s = 250$) (Figura 3B). En el caso del número de frailecillos, se observó una distribución de focos aleatorios con efecto de borde principalmente entre los bloques 6-8 y a lo largo de los 10 cuadrantes (Figura 3A). Por otro lado, se observó que en el área donde se presentó mayor porcentaje de vigor de planta (entre 50-75%), también se presentó mayor porcentaje de severidad de cenicilla (Figura 3C-D) principalmente en el estrato bajo y medio de las plantas. Esta relación puede deberse al tipo de vida parasitario biotrófico de la cenicilla (Hückelhoven y Panstruga,

2011) y su forma de distribución en la planta que puede estar relacionado con la inhibición de germinación de los conidios por la luz directa solar, temperatura y humedad en la parte superior de la planta (Craig y Weyne, 2012) generando un microclima propicio en el dosel medio y bajo del cultivo, fenómeno observado en campo.

El sistema epidemiológico se expresó en la integración de diferentes subsistemas (suelo arcilloso, alta humedad, presencia de otras plagas y enfermedades, etc.) en el área donde se observó mayor severidad y en consecuencia puede ser una fuente de inóculo primario para el cultivo de frijol (etapa vegetativa) aledaño a esta parcela de investigación. Por otro lado, de acuerdo a la Figura 3, no presentó una relación con respecto al número de frailecillos y el daño de flor; sin embargo, estos insectos eventualmente pueden dañar las flores, ya que durante la evaluación en campo se observaron principalmente en las inflorescencias. Se ha reportado que *Macrodactylus* sp. en etapas adultas pueden alimentarse de flores, frutos, granos de polen y secreciones de savia dulce de diversos cultivos como maíz y frijol (Aragón *et al.*, 2021). La relación daño de flor y número de frailecillos con respecto a la severidad de cenicilla, no se encontró una dependencia espacial entre estas variables estudiadas (Figura 3A-C) esto puede deberse a que solo se realizó una evaluación, por lo que se sugiere realizar más evaluaciones en el tiempo y espacio para confirmar dicho fenómeno observado.

CONCLUSIONES

Los estudios realizados en la identificación de putativos a virosis y fitoplasmas de las muestras analizadas, no se detectó la presencia de *Potyvirus*, *Begomovirus* o fitoplasmas en este estudio.

De acuerdo al análisis geoestadístico realizado, se observó que la cenicilla presentó una dispersión de forma agregada durante la evaluación (etapa de floración) del cultivo de frijol de ayocote. En referencia a la propuesta de escalas evaluadas, se determinó que la escala de 7 clases (en las dos versiones) se obtuvo mayor exactitud (1.07 y 1.08) y precisión (0.93 - 0.94) durante las dos evaluaciones. A nivel campo, la escala de 8 clases presentó un desempeño mejor en las evaluaciones. Sin embargo, es importante considerar que los resultados no son muy diferentes a la escala de 7 clases evaluada en campo.

Por lo que se podría definir que ambas escalas pueden ser utilizadas en evaluaciones de campo.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de todo el equipo LANREF-COLPOS, al MC Jorge Valdez.

LITERATURA CITADA

- Abawi GS, Provvidenti R, Crosier DC and Hunter JE. 1978. Inheritance of resistance to white mold disease in *Phaseolus coccineus*. The Journal of Heredity 69:200-202. <http://doc.rero.ch/record/295080/files/69-3-200.pdf>
- Alves MS, de Souza AN, Ribeiro GM and Carvalho CM. 2018. First report of a 'Candidatus Phytoplasma asteris' isolate associated with *Macroptilium lathyroides* yellow leaf disease in Brazil. New Disease Reports 37: 11. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.037.011>
- Aragón-Sánchez M, Aragón-García A, Arce-Pérez R, Pérez Torres BC, Cuate-Mozo VA, López-Olguín JF y Jesús Francisco. 2021. Actualización de las especies del género *Macroductylus* Dejean (Coleoptera: Melolonthinae: Macroductylini) para el estado de Puebla, México. Acta zoológica mexicana 37: e3712403. Epub 21 de febrero de 2022. <https://doi.org/10.21829/azm.2021.3712403>
- Barnet HL and Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. American Phytopathological Society. USA. 240p.
- Bianco LF, Martins EC, Toloy RS, Coletti DAB, Teixeira DC and Wulff NA. 2014. First Report of Phytoplasmas Groups 16SrI and 16SrXV in *Crotalaria juncea* in Brazil. Diseases Notes. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1190-PDN>
- Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). 2022. El Ayocote, un gran frijol. <https://www.ciad.mx/el-ayocote-un-gran-frijol>
- Cook RT A and Braun U. 2009. Conidial germination patterns in powdery mildews. Mycological Research 113(5): 616-636. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.01.010>
- Craig A and Weyne WF. 2012. Effects of sunlight exposure on grapevine powdery mildew development. Phytopathology 102(9): 857-866. <https://doi.org/10.1094/PHTO-07-11-0205>
- De Ron AM and Santalla M. 2013. *Phaseolus vulgaris* (Beans). In: Maloy S and Hughes K. Brenner 's encyclopedia of Genetics. Second Edition. Academic Press. Elsevier.
- Deng D, Sun S, Wu W, Duan C, Wang Z, Zhang S and Zhu Z. 2022. Identification of causal agent inciting powdery mildew on common bean and screening of resistance cultivars. Plants 11(7): 7. <https://doi.org/10.3390/plants11070874>
- Deng S and Hiruki C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. Journal of microbiological methods 14(1): 53-61.
- Félix-Gastélum R, Maldonado-Mendoza IE, Beltran-Peña H, Apodaca-Sánchez MA, Espinoza-Matías S, Martínez-Valenzuela MC, Longoria-Espinoza RM and Olivas-Peraza NG. 2017. Powdery mildews in agricultural crops of Sinaloa: Current status on their identification and future research lines. Mexica Journal of Phytopathology 35: 106-129. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1607-4>
- Glawe DA. 2008. The powdery mildews: A review of the World's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 46(1): 27-51. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.081407.104740>
- Gonzalez-Cruces A, Arista-Carmona E, Diaz-Arias KV, Ramirez-Razo K, Hernández-Livera A, Acevedo-Sánchez G, Mendoza-Ramos C and Mora-Aguilera G. 2022. Epidemiology of *Bean common mosaic virus* and *Alternaria alternata* in 12 *Phaseolus vulgaris* genotypes. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 188-220. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2202-8>

- Giurca DM. 2009. Morphological and phenological differences between the two species of the *Phaseolus* genus (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*). *Cercetari Agronomice Moldova* 42: 39-45. http://www.uaiasi.ro/CERCET_AGRO-MOLD/ro/fisiere/2009/V2/CA2-09-04.pdf
- Graham PH and Ranalli P. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Ranalli P and Graham PH. *Field crops Research* 53(1-3): 131-146. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00112-3)
- Hückelhoven R and Panstruga R. 2011. Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Current Opinion in Plant Biology* 14(6): 738-746. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.08.002>
- Kelly LA, Vaghefi N, Bransgrove K, Fechner NA, Stuart K, Pandey AK, Sharma M, Németh MZ, Liu SY, Tang SR, Nair RM, Douglas CA and Kiss L. 2021. One crop disease, How many pathogens? *Podospaera xanthii* and *Erysiphe vignae* sp. nov. Identified as the two species that cause powdery mildew of mungbean (*Vigna radiata*) and black gram (*V. mungo*) in Australia. *Phytopathology* 111(7): 1193-1206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-20-0554-R>
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U and Seemüller E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
- Lozano-Gutiérrez J, España-Luna MP, Lara-Herrera A, Álvarez-Robles F y Martínez-Contreras CA. 2017. La chicharrita *Empoasca kraemeri* (Ross y Moore) (Hemiptera: Cicadellidae) y su parasitoides nativo *Anagnrus* sp. Haliday, 1833 (Hymenoptera: Mymaridae) en el cultivo de frijol en Zacatecas. *Agroecología* 46-49. <https://www.repositorionacionalcti.mx/recursos/oai:localhost:20.500.11845/1438>
- Navarrete-Mapen RZ, Cristóbal-Alejo J, Uc-Vázquez A, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM and Alvarado-López CJ. 2020. Graft response of *Capsicum chinense*-*Capsicum annuum* var. *glabriusculum* to *Begomovirus* in field. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(2): 226-238. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2001-2>
- Meziadi C, Blanchet S, Geffroy V and Pflieger S. 2017. Genetic resistance against viruses in *Phaseolus vulgaris* L.: State of the art and future prospects. *Plant Science* 265: 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.08.009>
- Osorno JM, Muñoz CG, Beaver JS, Ferwerda FH, Bassett MJ, Miklas PN, Olczyk T and Bussey B. 2007. Two genes from *Phaseolus coccineus* confer resistance to *Bean golden yellow mosaic virus* in common bean. *Journal American Society Horticulture Science* 132(4): 530-533. <https://doi.org/10.21273/JASHS.132.4.530>
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russel DR and Maxwell DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0340>
- Ruiz-Salazar R, Vargas-Vázquez MLP, Hernández-Delgado S, Muruaga-Martínez JS y Mayek-Pérez N. 2019. Detección de marcadores genéticos asociados a la resistencia a patógenos en frijol ayocote de Puebla, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(7): 1591-1602. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1956>
- Santalla M, Monteagudo AB, González AM and De Ron AM. 2004. Agronomical and quality traits of runner bean germplasm and implications for breeding. *Euphytica* 135: 205-215. <https://link.springer.com/article/10.1023/B:EUPH.0000014912.07993.e7>
- Schoch, C. L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. 2020. NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Schwember AR, Carrasco B and Gepts P. 2017. Unraveling agronomic and genetic aspects of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Field Crops Research* 206: 86-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2017.02.020>
- Takamatsu S. 2014. Molecular phylogeny reveals phenotypic evolution of powdery mildews (Erysiphales, Ascomycota). *Journal of General Plant Pathology* 79. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0447-5>
- Vargas VMLP, Muruaga MJS, Mayek PN, Pérez GA y Ramírez-Sánchez. 2014. Caracterización de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(2): 191-200.
- Watanabe K and Tojo M. 2006. Stem and root rot of scarlet runner bean (*Phaseolus coccineus*) caused by *Pythium myriotylum*. *Journal Genetic Plant Pathology* 72: 126-128. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-005-0258-4>
- Wyatt SD and Brown JK. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polimerasa chain reaction. *Phytopathology* 86:1288-1293.

Zheng L, Wayper PJ, Gibbs AJ, Fourment M, Rodoni BC and Gibbs MJ. 2008. Accumulating variation at conserved sites in potyvirus genomes is driven by species discovery and affects degenerate primer design. PLoS ONE 3(2): 1586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001586>

2.2. Efecto inhibitorio de bacterias antagonistas contra *Sclerotium rolfsii*, agente causal del tizón sureño del frijol

Juan Carlos Martínez-Álvarez[§], Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología Agrícola, CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Guasave, Sinaloa, México; Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joaquín, C.P. 81101; ¹Flavio Camacho-Angulo[§], ¹Unidad de Investigación en Ambiente y Salud, ²Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Autónoma de Occidente, Los Mochis, Sinaloa, México. Blvd. Macario Gaxiola S/N, Col. Conrado Espinoza, C.P. 81223, México; ³Yolani de Jesús Bojórquez-Armenta ³Universidad Autónoma de Occidente, UR Guasave, Sinaloa, México. Avenida Universidad S/N, C.P. 81048, México; ²Bardo Sánchez-Soto; ³Jesús Damián Cordero-Ramírez; ²Cecilia de los Ángeles Romero-Urías; ²Rubén Felix-Gástelum, ¹Guadalupe Arlene Mora-Romero*. [§]Igual colaboración de autores. *Autor de correspondencia: arlene.mora@uadeo.mx.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue seleccionar cepas bacterianas de la rizósfera del cultivo de frijol y determinar su potencial para el control de *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* e *in planta*. Se recolectaron muestras de suelo en los municipios de Ahome, Guasave y Angostura, Sinaloa, México, durante el ciclo agrícola 2018-2019. Los aislados se evaluaron bajo condiciones *in vitro* y se seleccionaron los mejores para la evaluación *in planta* e identificación molecular (tres aislados) con base a la región 16S del ADN ribosomal. Se evaluaron 65 aislados bacterianos *in vitro* contra *S. rolfsii* con un porcentaje de inhibición de 2.5 a 65%. *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) y *Burkholderia* sp. (GLS06) inhibieron 55, 60 y 65% bajo condiciones *in vitro*; además resultaron no hemolíticas. Solo *Burkholderia* sp. ejerció mayor porcentaje de inhibición *in planta* para el control de *S. rolfsii*, con reducción de incidencia y severidad de la enfermedad en un 40 y 50% respectivamente, y promovió el peso seco de la planta. *A. pittii* o *P. putida* no fueron eficientes para el control del hongo *in planta*. Se sugiere hacer estudios con las bacterias en invernadero y campo.

Palabras clave: antagonista, biocontrol, *Phaseolus vulgaris*

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los principales cultivos en Sinaloa, México. Su producción es afectada por diversos factores, entre los que destacan las enfermedades fungosas como el tizón sureño *Sclerotium rolfsii* (teleomorfo *Athelia rolfsii*), el cual causa pudrición de la raíz y tallo. *S. rolfsii* es un patógeno polífago reportado en zonas tropicales y subtropicales, asociado con pérdidas económicas significativas (Gholami *et al.*, 2019). Para el control de la enfermedad se utilizan tratamientos químicos, pero se requieren esfuerzos para la implementación de estrategias amigables con el ambiente para el manejo de la enfermedad.

Se han reportado microorganismos del suelo con potencial para el control de *S. rolfsii* en algunos cultivos, pero los estudios realizados en el cultivo de frijol son escasos. Volpiano *et al.* (2018) reportaron que el tratamiento con *Rhizobium* spp. (SEMIA 439 y SEMIA 4088) reducen la incidencia en 18.3 y 14.5%. Sin embargo, se recomienda el uso de cepas nativas en el control biológico del patógeno, porque exhiben tolerancia a las condiciones ambientales locales y muestran un mayor potencial en el control de la enfermedad. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue seleccionar cepas bacterianas de la rizósfera del cultivo de frijol recolectadas en los Municipios de Ahome, Guasave y Angostura, Sinaloa, México durante el ciclo agrícola 2018-2019 y determinar su potencial para el control de *Sclerotium rolfsii*.

Aislamiento bacteriano. Se realizaron muestreos dirigidos a cultivos de frijol, en etapa vegetativa, en tres municipios de Sinaloa. Se recolectaron muestras de suelos de la rizósfera de plantas asintomáticas, se incluyeron cuatro localidades (con 10 lotes cada una) en cada uno de los municipios (Ahome, Guasave y Angostura), con un total de 12 muestras compuestas. En el laboratorio se mezclaron 5 g de muestra de suelo en 50 mL de solución salina estéril al 0.85% para realizar diluciones seriales hasta 10^4 ; enseguida 100 μ L de las dos últimas diluciones se distribuyeron por triplicado en cajas Petri con agar nutritivo (AN, BD Bioxon®), las cajas se incubaron a 25 °C durante 24 h. Las colonias se purificaron, con base en su color y forma, y se conservaron a -70 °C en glicerol al 15%.

Aislamiento e identificación de *S. rolfsii*. Los aislados de *S. rolfsii* se obtuvieron a partir de esclerocios presentes en plantas de frijol en campos agrícolas del Municipio de Ahome, Sinaloa, los cuales se desinfectaron, sembraron y

purificaron en medio PDA. La confirmación de la patogenicidad del aislado de *S. rolf sii* utilizado en este estudio, se evidenció a través de la inoculación en semillas de frijol, la corroboración de síntomas a los 13 días después de la inoculación y el re-aislamiento del hongo, bajo condiciones de invernadero. La identificación preliminar del patógeno se efectuó mediante estudios morfológicos de las hifas, colonias miceliales y esclerocios (Nandi *et al.*, 2017). La identidad se confirmó mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento de la región ribososomal, con los oligonucleótidos ITS4/ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' y 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA-CAAGG-3') que amplifican ~ 587 pb (White *et al.*, 1990).

Prueba de antagonismo de bacterias contra *S. rolf sii*. La evaluación del antagonismo *in vitro* de las bacterias en estudio se realizó mediante la técnica de cultivo dual en cajas Petri con PDA (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2011), como testigo se utilizaron cajas Petri con PDA solo con *S. rolf sii*. Las cajas se incubaron a 25 °C hasta que el crecimiento del micelio en el testigo alcanzó 4 cm de diámetro. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PIRG) de acuerdo a los procedimientos descritos por Kumar *et al.* (2011), con la fórmula $PIRG = (R1-R2 / R1)$ multiplicado por 100, donde R1 es el crecimiento radial del patógeno y R2 es el crecimiento radial del patógeno que interactúa con las bacterias.

Pruebas de hemólisis. Se realizaron pruebas de hemólisis (Forbes *et al.*, 2002) a los aislamientos bacterianos que mostraron porcentajes de inhibición mayor a 40%. Se utilizaron cajas de medio de cultivo agar-sangre a las cuales se les realizaron perforaciones de 0.5 cm de diámetro. Los aislados bacterianos se cultivaron en 5 mL de medio Luria Bertani (LB) a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. De cada aislado bacteriano se centrifugó 1 mL a 13,000 rpm por 5 minutos, se tomaron 100 µL del sobrenadante y se colocaron en las perforaciones de las cajas de agar-sangre. Las cajas se incubaron por 24 h a 37 °C. Los criterios de la prueba de hemólisis fueron los siguientes: hemólisis alfa (α -hemólisis) o hemólisis parcial cuando se presenta un halo con obscurecimiento verde en el medio de cultivo; hemólisis beta (β -hemólisis) o hemólisis total cuando se observa un halo claro del medio de cultivo por el efecto de lisis total de los eritrocitos, y hemólisis gama (γ -hemólisis) o no hemolítico si el medio de cultivo no presenta ningún tipo de aclaramiento (Forbes *et al.*, 2002).

Evaluación de bacterias antagonistas *in planta*. Para esta evaluación se seleccionaron los tres aislados con mayor porcentaje de inhibición, no hemolíticos. Se colocó un disco de 0.5 cm de PDA con crecimiento activo del hongo en macetas con vermiculita/arena (1:1, v/v) estéril, sobre éste se sembró la semilla de frijol previamente desinfectada con NaClO al 0.5%. A cada semilla en el sustrato se le agregó 1 mL de suspensión bacteriana (COHUI 06, SANMI 02 o GLS 06) en medio LB, incubada durante 24 h (Densidad óptica a 595 nm = 1.0). Las semillas testigo se trataron con 1 mL de medio LB sin bacteria. Se utilizaron 10 plantas por tratamiento, se distribuyeron en un arreglo completamente al azar y se mantuvieron en condiciones controladas (8 h de luz/16 h de oscuridad, 25 °C) durante 13 días.

La efectividad biológica de los tratamientos en el control de la enfermedad se determinó con base en la incidencia (número de plantas con síntomas entre el total de plantas evaluadas en cada tratamiento por 100) (Cuadro 2). También se evaluó el índice de severidad con la escala de 0 a 4 (Moreno y Acevedo, 2002), donde: 0 = sin daños; 1= 1-25% de hojas amarillas y marchitamiento inicial del tallo; 2= 26-50% de hojas amarillentas y comienzo de la muerte del tallo; 3= 51-75% de hojas necróticas amarillentas y muerte progresiva de tallos y 4= 76-100% de tejido necrótico, micelio en crecimiento y esclerocios. Además, se registraron las variables altura de planta, peso fresco y seco, tanto de la raíz, como de la parte aérea (datos no mostrados). Los datos se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y se recurrió a las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y Mann-Whitney con un valor de $p < 0.05$.

Identificación molecular. Los aislados de bacterias con mayor porcentaje de inhibición se identificaron molecularmente, se partió de ADN genómico extraído con DNAzol® (Invitrogen, Cat. No. 10503-027), que se utilizó como templado para amplificar un fragmento de ~1400 pb de la región 16S rADN por PCR, con los oligos F₂C/C (5´-AGA GTT TGA TCA TGG CTC-3´ y 5´-ACG GGC GGT GTG TAC-3´) (Shi *et al.*, 1997). Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (p/v). Después se realizó la purificación de los productos de PCR, con el kit QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN, Cat. No. 28104), los productos purificados se secuenciaron en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas se compararon con el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.gov>), en la plataforma BLASTn para determinar la

similitud de las secuencias obtenidas con los organismos que mostraran una identidad mayor al 90%. El árbol filogenético se construyó en el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) con el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y el modelo de sustitución de dos parámetros (Kimura, 1980). La solidez de la topología se evaluó mediante la prueba de bootstrap con 1000 réplicas. Se aislaron un total de 65 bacterias de la rizósfera del cultivo de frijol, con un porcentaje de inhibición *in vitro* contra *S. rolfsii* que osciló de 2.5 hasta 65% (Cuadro 1). Solo 14 aislados mostraron un porcentaje de inhibición superior

Cuadro 1. Inhibición del crecimiento micelial del *Sclerotium rolfsii* (*in vitro*) con aislados bacterianos de la rizósfera del cultivo de frijol, colectados de los Municipios de Ahome, Guasave y Angostura, Sinaloa, México.

Aislado	Municipio	Inhibición (%)	Hemólisis	Aislado	Inhibición (%)	Municipio	Hemólisis
ALHU03	Angostura	40	β	GSI 03	7.5	Guasave	
ALHU04	Angostura	22.5		GSI04	12.5	Guasave	
ALHU05	Angostura	17.5		JJR01	15	Guasave	
ALHU06	Angostura	25		JJR03	20	Guasave	
ALHU07	Angostura	20		JJR04	7.5	Guasave	
CAMA01	Ahome	12.5		JJR05	7.5	Guasave	
CAMA02	Ahome	17.5		JJR06	20	Guasave	
CAMA03	Ahome	7.5		JJR07	10	Guasave	
CAMA04	Ahome	12.5		JJR71	15	Guasave	
COHUI02	Ahome	2.5		MS01	27.5	Angostura	
COHUI03	Ahome	15		MS03	17.5	Angostura	
COHUI04	Ahome	20		MS04	25	Angostura	
COHUI41	Ahome	32.5		MS05	45	Angostura	β
COHUI06	Ahome	55	γ	OLLE02	17.5	Angostura	
COHUI05	Ahome	7.5		OLLE71	62.5	Angostura	β
COHUI07	Ahome	22.5		OLLE72	40	Angostura	β
COHUI08	Ahome	17.5		OLLE74	52.5	Angostura	β
COHUI09	Ahome	47.5	γ	PALM01	23.5	Angostura	
EB03	Guasave	25		PALM02	17.5	Angostura	
EB11	Guasave	27.5		SANMI01	45	Angostura	α
EB12	Guasave	12.5		SANMI02	60	Angostura	γ
EBAN01	Angostura	22.5		SANMI03	5	Angostura	
EBAN02	Angostura	22.5		SANMI05	30	Angostura	
EBAN04	Angostura	5		SANMI06	50	Angostura	γ
GLS01	Guasave	25		SANMI07	7.5	Angostura	
GLS02	Guasave	5		ZI 01	27.5	Ahome	
GLS03	Guasave	17.5		ZI 02	25	Ahome	
GLS04	Guasave	22.5		ZI 03	40	Ahome	β
GLS05	Guasave	42.5	α	ZI 04	12.5	Ahome	
GLS06	Guasave	65	γ	ZI 09	7.5	Ahome	
GLS07	Guasave	25		ZI 05	12.5	Ahome	
GSI01	Guasave	15		ZI 06	45	Ahome	γ
GSI02	Guasave	32.5					

β = hemólisis total, α = hemólisis parcial, γ = no hemolítica.

a 40%. En las pruebas de hemólisis (Forbes *et al.*, 2002), seis presentaron hemólisis total (β), dos hemólisis parcial (α) y seis resultaron no hemolíticas (γ) (Cuadro 1).

Los tres aislados, no hemolíticos, con mejor porcentaje de inhibición *in planta*, correspondieron a *Acinetobacter pittii* (COHUI06), *Pseudomonas putida* (SANMI02) y *Burkholderia* sp. (GLS06) (Figura 1). Para la evaluación *in planta*, las plantas originadas de las semillas tratadas con *Burkholderia* sp. mostraron incidencia y severidad de 40 y 50%, respectivamente (Cuadro 2), mientras que las plantas donde se utilizaron *P. putida* y *A. pittii*, aun cuando mostraron inhibición del crecimiento *in vitro*, éstas no ejercieron control de la enfermedad bajo condiciones de invernadero, pues los índices de severidad fueron similares a los de las plantas testigo inoculadas sólo con el patógeno (Cuadro 2). Esto sugiere que los resultados de los efectos de antagonismo observados *in vitro* no siempre correlacionan con los resultados observados *in planta*, como ocurre con *Pseudomonas fluorescentes* contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, donde se observó efecto *in vitro*, pero su eficacia *in vivo* no se manifestó (Elsherif y Grossmann, 1994).

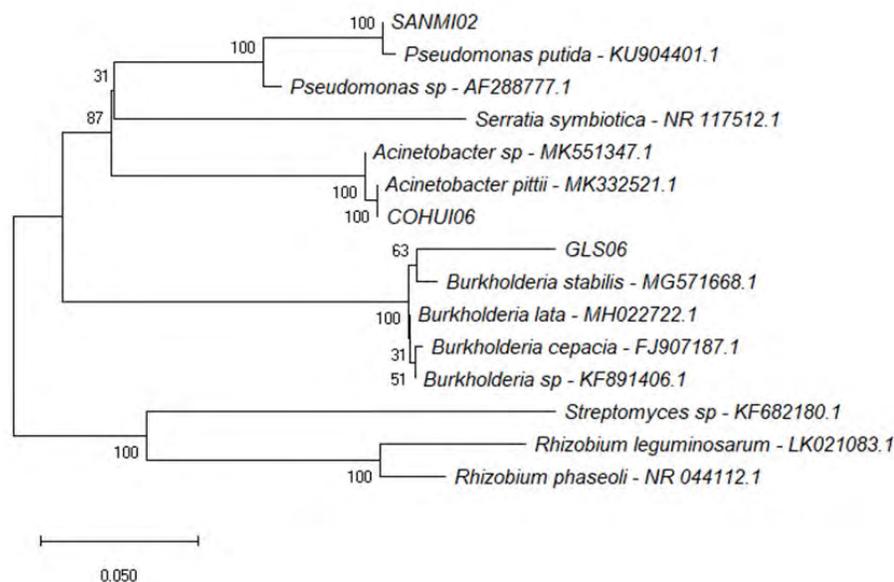


Figura 1. Relación filogenética de los aislados COHUI 06, SANMI 02 y GLS 06 basada en la secuencia del gen 16S rARN y comparada con secuencias de la base de datos de GenBank en NCBI.

Cuadro 2. Efecto de las cepas bacterianas en la incidencia y severidad del tizón sureño (*S. rolfsii*) en plantas de frijol bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Incidencia (%)	Escala 0-4 (%)	Severidad Mediana	Rango
CTRL	0	0.0 (0)	0.0	22.5a ²
COHUI 06	0	0.0 (0)	0.0	22.5a
COHUI 06+SR	100	3.6 (90)	100	62.3bc
GLS 06	0	0.0 (0)	0.0	22.5a
GLS 06+SR	60	1.7 (43)	37.5	42.7ab
SANMI 02	0	0.0 (0)	0.0	22.5a
SANMI 02+SR	100	4.0 (100)	100	65.5c
SR	100	3.7 (93)	100	63.5c

²Letras diferentes, por columnas, indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$), $n = 10$. CTRL (sin bacteria, sin *S. rolfsii*), COHUI 06 (solo bacteria COHUI 06), COHUI 06 + Sr (bacteria COHUI 06 + *S. rolfsii*), GLS 06 (solo bacteria GLS 06), GLS 06 + Sr (bacteria GLS 06 + *S. rolfsii*), SANMI 02 (solo bacteria SANMI 02), SANMI 02 + Sr (bacteria SANMI 02 + *S. rolfsii*) y Sr (solo *S. rolfsii*).

El potencial de los microorganismos para producir compuestos antimicrobianos *in vitro* varía con respecto a lo que ocurre *in situ*; esto debido a que la disponibilidad de nutrientes para las bacterias es mayor en el medio artificial que en la rizósfera (Köhl *et al.*, 2019). Por lo que los metabolitos producidos *in vitro* pueden no expresarse *in situ* o tienen una función menor (Hennessy *et al.*, 2017). Además, los experimentos de antagonismo *in vitro* sin ningún contacto con la planta excluyen otros modos de acción bacteriana, por ejemplo, la capacidad de inducir resistencia sistémica (Köhl *et al.*, 2019) por lo que no se descarta la posibilidad de que los aislados que no mostraron antagonismo *in vitro* puedan inducir otros mecanismos de acción contra *S. rolfsii* en la planta. Tanto especies del género *Pseudomonas* como de *Acinetobacter* se han propuesto como promotoras del crecimiento vegetal por la capacidad para solubilizar fosfato, producir ácido indol acético, fijar nitrógeno y producir sideróforos (Daur *et al.*, 2018; Qessaoui *et al.*, 2019). *A. pittii* JD-14 es eficaz para aumentar el crecimiento, y el peso fresco y seco en alfalfa (Daur *et al.*, 2018), la cepa evaluada en el presente estudio promovió aumento del peso seco de la raíz (dato no mostrado). En el caso de *P. putida* no mostró promoción de crecimiento en la variedad de frijol evaluada (dato no mostrado).

Especies de *Acinetobacter* se han reportado como antagonistas de patógenos de hongos. *Acinetobacter* sp. (5H2) y *A. lwoffii* (A5) inhibieron 69.4 y 62.7% respectivamente, el crecimiento *in vitro* de *Corynespora cassiicola* y redujeron

significativamente la severidad del patógeno en *Hibiscus sabdariffa* (Patricio-Hernández *et al.*, 2020). La especie *A. pittii* evaluada en esta investigación no fue eficiente para el control de *S. rolfsii* *in planta*.

El género *Burkholderia*, de taxonomía compleja, es uno de los dominantes en la microbiota de la rizósfera. El grupo *B. cepacia*, incluye especies promotoras del crecimiento vegetal y agentes de control de fitopatógenos (Eberl y Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019); en frijol se ha aislado y evaluado *B. contaminans* UFLA02-27, esta cepa es capaz de solubilizar fosfato, fijar nitrógeno y presenta antagonismo a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Da Silva *et al.*, 2012). Especies de este grupo tienen potencial biotecnológico en la agricultura porque producen una amplia variedad de enzimas hidrolíticas y compuestos bioactivos pero su uso es restringido por los riesgos que representan como patógenos oportunistas en personas inmunocomprometidas (Eberl y Vandamme, 2016; Rojas-Rojas *et al.*, 2019; Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

Burkholderia sp. (cepa GLS06), la cual resultó no hemolítica (Cuadro 1), comparte alrededor del 95% de homología con secuencias del gen 16S de especies del grupo de *B. cepacia* (GenBank: MG571668.1, MH022722.1, FJ907187.1); se ha reportado que la homología del gen 16S de las especies del grupo *B. cepacia* es alta (>97.5%) (Da Silva *et al.*, 2012), nuestro análisis limita al aislado GLS06 a nivel género; se requiere de análisis concatenado con distintos marcadores para determinar la especie.

Burkholderia sp. (GLS06) aislada de muestras de rizósfera de frijol colectadas en Guasave, Sinaloa, México, mostró potencial en el control de la pudrición sureña del frijol causada por *S. rolfsii*, lo que justifica estudios futuros a nivel invernadero y campo para determinar su potencial como agente de biocontrol en un sistema de manejo integrado de la enfermedad, esto en estricto apego a los criterios éticos relativos al cuidado de la salud humana y el ambiente.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Occidente (PIFIP-2019) y al Instituto Politécnico Nacional (SIP 20196294) por apoyar parte de esta investigación. FCA e YJBA a la beca CONACyT 634315 y 706421, respectivamente.

LITERATURA CITADA

- Da Silva K, Cassetari AES, Lima AS, de Brandt E, Pinnock E, Vandamme P and Moreira FM. 2012. Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. *Systematic and Applied Microbiology* 35(4):253-262. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.04.001>.
- Daur I, Saad MM, Eida A A, Ahmad S, Shah ZH, Ihsan MZ, Muhammad Y, Sohrab SS and Hirt H. 2018. Boosting Alfalfa (*Medicago sativa* L.) production with rhizobacteria from various plants in Saudi Arabia. *Frontiers in microbiology* 9: 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00477>.
- Eberl L and Vandamme P. 2016. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. *F1000Research* 5:1007. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8221.1>.
- Elsherif M and Grossmann F. 1994. Comparative investigations on the antagonistic activity of fluorescent pseudomonads against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *in vitro* and *in vivo*. *Microbiological Research* 149(4): 371-377. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(11\)80084-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80084-4).
- Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 337-359. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00550-1>.
- Forbes BA, Sahn DF and Weissfeld AS. 2002. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th Ed. Mosby, St. Louis, MO. 1136 p
- Gholami M, Ebrahimi A, Mozafari J, Bihanta MR and Rahaie M. 2019. Phenotypic and genotypic screening of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces for resistance to collar rot fungus (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) in North of Iran. *Journal of Plant Pathology* 102: 67-78. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00373-9>.
- Hennessy R C, Glaring MA, Olsson S and Stougaard P. 2017. Transcriptomic profiling of microbe-microbe interactions reveals the specific response of the biocontrol strain *P. fluorescens* In5 to the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *BMC research notes* 10: 376. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2704-8>.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Köhl J, Kolnaar R and Ravensberg W J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science* 10: 845-845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.
- Kumar DDP, Thenmozhi R, Anupama PD, Nagasathya A, Thajuddin N and Paneerselvam A. 2011. Selection of potential antagonistic *Bacillus* and *Trichoderma* isolates from tomato rhizospheric soil against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Research Journal of Biological Sciences* 6(10): 523-531. <https://doi.org/10.3923/rjbsci.2011.523.531>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Moreno B and Acevedo R. 2002. Caracterización patogénica y estudio de los grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum* Berk. *Rev Iberoam Micol* 19: 115-119. <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/115119.pdf>
- Nandi S, Hembaram S, Adhikari A, Tiwari BK and Dutta S. 2017. Host infection beyond the traditional range of *Sclerotium (Athelia) rolfsii* with *Physalis minima*. *Bioinformatics* 13(10):333-338. <https://doi.org/10.6026/97320630013333>.
- Patricio-Hernández A, Ortega-Acosta SA, Ramírez-Peralta A, Ayala-Sánchez A, Palemón-Alberto F, Toledo-Hernández E, Romero-Ramírez Y and Toribio-Jiménez J. 2020. Antagonistic bacteria for biospace control of roselle spot (*Corynespora cassiicola*) of *Hibiscus sabdariffa*. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 450-462. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2006-1>.
- Qessaoui R, Bouharroud R, Furze JN, El Aalaoui M, Akroud H, Amarraque A, Van Vaerenbergh J, Tahzima R, Mayad EH and Chebli B. 2019. Applications of new rhizobacteria *Pseudomonas* isolates in agroecology via fundamental processes complementing plant growth. *Scientific Reports* 9: 12832. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49216-8>.

- Rojas-Rojas FU, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, Méndez-Canarios A, Ibarra JA and Estrada-de los Santos P. 2019. El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología* 51(1): 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.002>.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Shi T, Reeves RH, Gilichinsky DA and Friedmann EI. 1997. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial Ecology* 33: 169-179. <https://doi.org/10.1007/s002489900019>.
- Volpiano CG, Lisboa BB, São José JFB, de Oliveira AMR, Beneduzi A, Passaglia LMP and Vargas LK. 2018. *Rhizobium* strains in the biological control of the phytopathogenic fungi *Sclerotium (Athelia) rolfsii* on the common bean. *Plant and Soil* 432: 229-243. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3799-y>.
- White TJ, Bruns TS, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego, USA. 1990p.
- Yáñez-Mendizábal V, Usall J, Viñas I, Casals C, Marín S, Solsona S and Teixidó N. 2011. Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biocontrol Science and Technology* 21(4): 409-426. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.541554>.

Capítulo 3

Retos del fitomejoramiento para la sanidad del frijol

Innovación en acervos genéticos del INIFAP para la reducción de pérdidas por factores bióticos y abióticos en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en el sureste de México

3.1.

E. Noé Becerra Leor¹, Ernesto López Salinas¹, Jorge A. Acosta Gallagos² y Francisco J. Ugalde Acosta¹. Programa de Sanidad Forestal y Agrícola, Campo Experimental Cotaxtla, INIFAP. Km. 34 carretera Veracruz-Córdoba. 91700. ¹ Apartado Postal 429. Veracruz, Veracruz, México. Programa de frijol, Campo Experimental Cotaxtla. INIFAP. ² Campo Experimental Centro, INIFAP. ³

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es la leguminosa más importante en el mundo. Esta especie fue domesticada en Latinoamérica es un cultivo importante en México, ya que es una fuente importante de proteína y otros nutrientes para la población. En 2022, México produjo 2.2 millones de toneladas de frijol, lo que lo convierte en el quinto productor mundial de este cultivo.

Las enfermedades son uno de los principales problemas en el cultivo de frijol, ya que ocasionan reducción de rendimientos debido a su incidencia en el área foliar disminuyendo la capacidad fotosintética, o en la raíz, causando necrosis y taponamiento de haces vasculares, obstaculizando el transporte de agua y nutrientes dentro de la misma, generando síntomas de amarillamiento y/o marchitez y en ocasiones la muerte inminente. Estas enfermedades pueden estar asociadas a agentes fitopatógenos como microorganismos fúngicos, procariontes agentes infecciosos acelulares, y animales. En este contexto, las enfermedades del frijol pueden reducir los rendimientos de los cultivos y causar pérdidas económicas significativas de hasta el 100% causando pérdidas económicas significativas.

Los patógenos y las plantas de frijol han evolucionado juntos durante miles de años. Este proceso, conocido como coevolución, ha dado lugar a una relación compleja en la que los patógenos se han adaptado a las plantas de frijol y viceversa.

La evidencia de coevolución en los patosistemas del frijol se basa en una variedad de factores, que incluyen:

- **Diferencias morfológicas:** Las plantas de frijol de los dos centros de domesticación, Mesoamérica y la Zona de los Andes, presentan diferencias morfológicas significativas. Estas diferencias incluyen el color y el tamaño del grano, los hábitos de crecimiento de la planta, la forma de las hojas y la forma y el tamaño de las vainas.
- **Diferencias genéticas:** Las plantas de frijol de los dos centros de domesticación también presentan diferencias genéticas significativas. Estas diferencias incluyen el tipo de proteína en las semillas, las respuestas serológicas, el análisis de isoenzimas y los patrones polimórficos de bandas utilizando técnicas moleculares.

La comprensión de la coevolución puede ayudar a los fitomejoradores a desarrollar variedades de frijol más resistentes a los patógenos. El uso de variedades resistentes es la medida más efectiva para controlar las enfermedades de las plantas.

El efecto multivariado edafoclimático puede determinar las características epidémicas de las enfermedades, como el efecto de estrés generada por sequia o aplicación excesiva de insumos agroquímicos, por ello es imprescindible el estudio de rendimiento de genotipos/variedades en diferentes densidades de siembra, para evaluar su adaptabilidad. Así como el desarrollo de cruzamientos para desarrollar resistencia o tolerancia a fitopatógenos.

Generalidades y bases de la resistencia

En un marco de estudio de mejoramiento genético debemos comprender y concebir ciertas bases teóricas para racionalizar las interacciones del genotipo con el patógeno. Por ello se explicará breve y claramente los dos tipos de resistencia vegetal.

La resistencia vertical se caracteriza por ser una resistencia cualitativa en el sentido de que, sin valores intermedios, está presente o ausente. Para que haya resistencia vertical, debe haber genes simples de resistencia en las plantas y también genes simples de habilidad parasítica en el patógeno. Este es una interacción muy importante conocido como relación gene a gene, y es el carácter definitorio de la resistencia vertical (Flor, 1940).

Ahora se sabe que esta relación gene a gene evolución de las plantas como un sistema de salvaguarda. Cada gene de resistencia en el hospedante corresponde a un perno de su cerradura, mientras que cada gene de parasitismo en el patógeno correspondería a una muesca de su llave. Una planta puede tener varios de estos genes de resistencia o pernos, para colectivamente operar como una cerradura bioquímica. Y un parasito individual puede poseer varios de estos genes de parasitismo o muescas, para colectivamente operar como una llave bioquímica. Cuando un parasito individual infecta a un hospedante individual su llave bioquímica ajusta o no con la cerradura. Si la llave ajusta, a la infección se le llama acoplante y se le considera exitosa.

La resistencia horizontal, se caracteriza por no involucrar una relación gene a gene, la resistencia horizontal es heredada por varios genes (poligénica). Esto equivale a expresar que la resistencia horizontal normalmente es cuantitativa en su herencia y también en sus efectos, exhibiendo todos los grados de diferencia entre un mínimo y un máximo. La podemos concebir como la resistencia que invariablemente permanece, después que la resistencia vertical ha sido acoplada. Económicamente la resistencia horizontal es importante ya que esta puede operar igualmente contra todas las razas de un patógeno independientemente de las llaves bioquímicas que pueda poseer.

Uso de agroquímicos

Es apropiado examinar objetivamente cada molécula de agroquímicos. El uso de estos productos tiene una ventaja avasalladora. Esta ventaja estriba en que aún no somos capaces de producir suficiente alimento para alimentar a cada persona del mundo. Este logro depende, incuestionablemente del uso de agroquímicos. Si se prescindiera de ellos el objetivo de la alimentación mundial no podría lograrse. Se requerirían cientos de años para sustituir el uso de agroquímicos y probablemente varias décadas más para alcanzar su máximo reemplazo por la resistencia horizontal. Por ello es imprescindible el esfuerzo

y dedicación de los mejoradores en un marco de manejo integrado de cultivo. Centrando esfuerzos en amalgamar técnicas de mejoramiento con el uso de agroquímicos para el manejo de factores bióticos (enfermedades) y abióticos (condiciones edafoclimáticas).

El correcto accionar bajo el principio de prevención, debe ser usado con todos los elementos a nuestro alcance. El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) mediante equipos de investigación interdisciplinarios trabaja para desarrollar nuevas variedades de frijol resistentes y tolerantes a las múltiples problemas abióticos y bióticos. Estas nuevas variedades se evalúan en diferentes localidades y estados con características edafoclimáticas diferentes para posteriormente ser liberadas como nuevos materiales con el visto bueno del Comité Calificador de Variedades de Plantas (CCVP).

Principales problemas fitosanitarios en zona tropical húmeda

Aun cuando se ha considerado que en algunas localidades se presentan factores bióticos y abióticos específicas, en este capítulo se describen las que se consideran más importantes del frijol presentes en el trópico húmedo. Se describen las características importantes, condiciones edafoclimáticas favorables, síntomas, ciclo de vida y casos prácticos para su manejo. La problemática fitosanitaria del frijol se encuadra en dos grandes grupos: enfermedades foliares y enfermedades de raíz o pudrición del tallo (Figura 1)

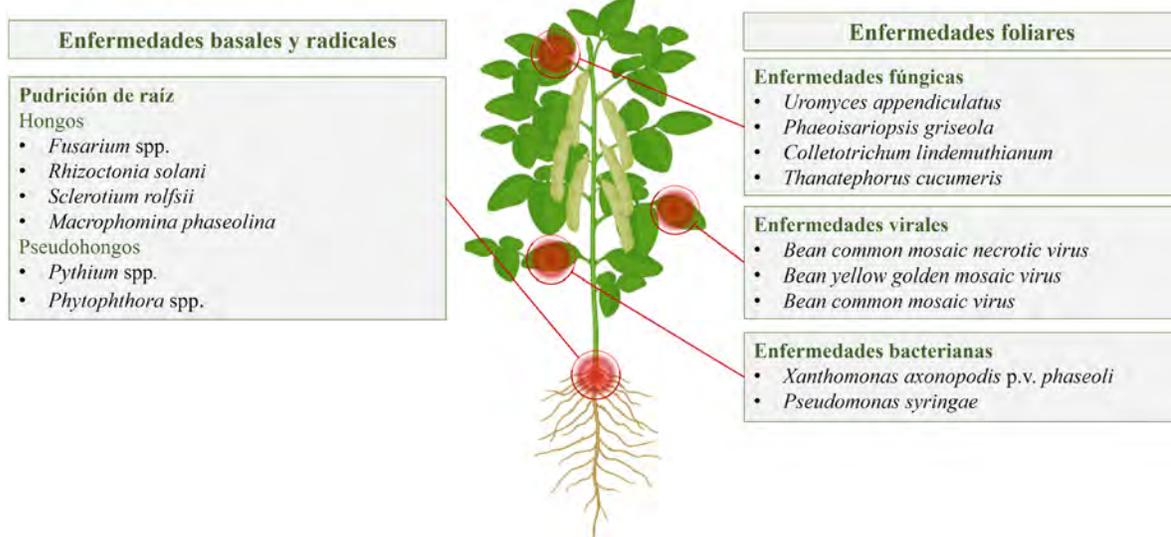


Figura 1. Enfermedades del frijol según el tejido vegetal en el que inciden.

1. Las enfermedades foliares:

Roya (*Uromyces appendiculatus*)

Mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*)

Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*)

Mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris*)

2. Tizones bacterianos:

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli*

Pseudomonas syringae

3. Enfermedades virales:

Virus Mosaico Amarillo Dorado del Frijol (BGYMV)

Virus del Mosaico Común del Frijol (BCMV)

Virus del Mosaico Común Necrótico del Frijol (BCMNV)

4. Enfermedades de raíz:

Pudrición de raíz (*Fusarium* spp.)

Pudrición de raíz y tallo (*Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*)

Pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*).

Damping off en plántulas (*Pythium* spp. y *Phytophthora* spp.)

Todos y cada uno de estos patógenos se presentan en etapas fenológicas específicas, dadas las características fenotípicas del frijol. A continuación, se esquematiza cada patógeno relacionado con la etapa fenológica en la que se incide (Figura 2).

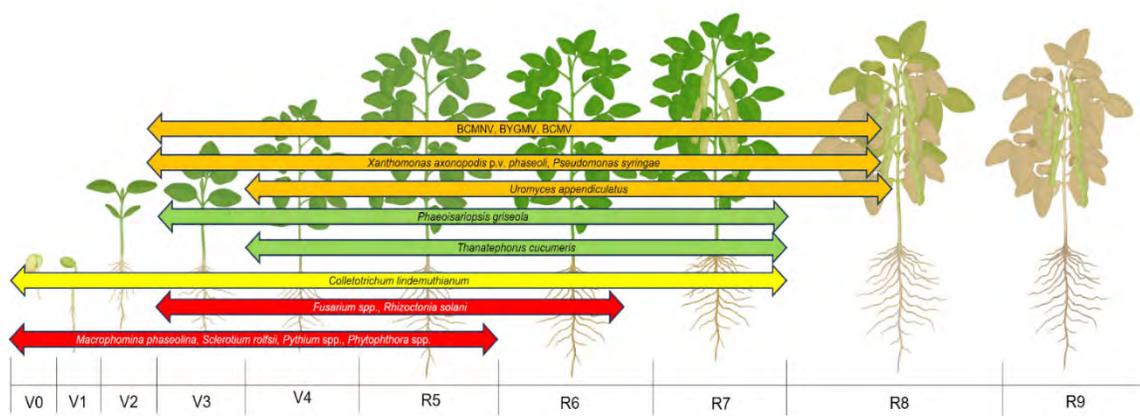


Figura 2. Patógenos incidentes relacionados con la etapa fenológica del frijol.

Las enfermedades foliares son las que causan mayores pérdidas en el cultivo del frijol. Las más importantes son las siguientes:

Enfermedades foliares

Roya

El hongo *Uromyces appendiculatus* var. *typica* causante de la roya del frijol, es un patógeno que ha mostrado extensa variabilidad genética en las áreas productoras de frijol (Stavely *et al.*, 1989) y constituye uno de los factores limitantes en el cultivo de frijol en diversas regiones de México.

Agente causal. *Uromyces appendiculatus* var. *typica*

Condiciones climáticas favorables. La humedad relativa en el ambiente debe ser superior a 90% y temperatura favorable entre 15 y 27°C. Los períodos de lluvias prolongadas, como las que se presentan en la temporada de huracanes, son especialmente favorables para la roya del frijol. En estos períodos, las esporas del hongo pueden dispersarse fácilmente y causar infecciones generalizadas.

Síntomas. Los síntomas de la roya del frijol se manifiestan como pequeñas pústulas errumpentes circulares de color rojizo-marrón que se desarrollan principalmente en hojas (Figura 3), pero también pueden aparecer en tallos,



Figura 3. Síntomas de Roya en frijol. Pústulas errumpentes de color rojizo en el haz de la planta.

peciolos y vainas. Estas pústulas contienen esporas, que se dispersan por el viento y la lluvia. Este patógeno es causante de daños significativos a los cultivos de frijol. Las plantas infectadas pueden perder su capacidad fotosintética, lo que provoca una reducción del rendimiento hasta su muerte

Ciclo de la enfermedad. *Uromyces appendiculatus* completa todo su ciclo de vida en el frijol (autoica) consta de varios estados de esporas: teliosporas, picniosporas aeciosporas y uredosporas (Macrocíclica) todas unicelulares. El estado inicial es la teliospora, que es una espora de resistencia con pared celular gruesa que puede sobrevivir durante el invierno en residuos de cosecha o en el suelo. Cuando las condiciones climáticas son favorables, las teliosporas germinan formando apresorio (anclaje) y haustorio (alimentación) al contacto con el tejido foliar de la planta y producen picnias que se desarrollan como pústulas de color naranja, cada picnia produce picniosporas haploides que funcionan como gametos masculinos e hifas receptoras gametos femeninos incompatibles entre ellos (Heterotalica). La fertilización ocurre cuando las picniosporas y las hifas receptoras se fusionan en pares. El micelio resultante de dicha fertilización tiene características dicarióticas. El micelio dicariótico prolifera en el envés y culmina en la superficie inferior de la misma como una aecia, típicamente formado directamente debajo de la picnia. Las aeciosporas dicarióticas se forman en cadenas dentro de la aecia y se diseminan por el viento o por el hombre a las demás plantas. Las aeciosporas germinan y dan lugar a la uredia conteniendo urediosporas infectivas asexuales. Cuando el cultivo llega a su etapa fenológica final y las condiciones climáticas son desfavorables las urediosporas se transforman en teliosporas. El ciclo de infección se repite N veces en todo el ciclo agrícola (Figura 4).

Manejo. En mejoramiento genético, desde 1980 se han llevado a cabo evaluaciones de líneas avanzadas, pruebas preliminares y ensayos regionales de rendimiento y como resultado se liberaron en 1981 las variedades “Negro Veracruz”, tolerante a roya, y “Negro Huasteco-81”, resistente; y en 1991 se liberó la variedad “Negro Cotaxtla-91”, resistente. En 1990 se iniciaron trabajos de evaluación de fungicidas para el control de la roya en varias localidades. El uso de fungicidas con variedades susceptibles como Jamapa, incrementó los rendimientos en más de 200 kg/ha. Los fungicidas que dieron los mejores resultados fueron: Hexaconazole (0.5 l ha^{-1}), Maneb (3 kg ha^{-1}) y Tebuconazole (0.5 kg ha^{-1}). El costo de la aplicación de fungicidas se pagó con un incremento en el rendimiento de frijol de 75 kg ha^{-1} .

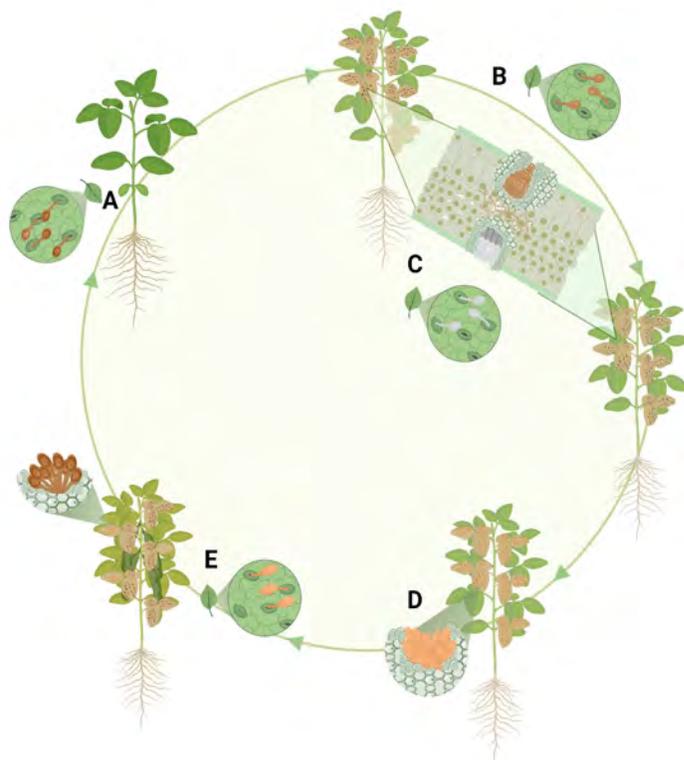


Figura 4. Ciclo de la enfermedad de *U. appendiculatus* en frijol. A) Contacto de teliosporas con lamina foliar por efecto del viento B) Picnia y picnosporas germinando en el haz C) Aecias presentes en el envés y aeciosporas germinando D) Uredia con uredosporas E) Uredosporas germinando y convirtiéndose en telias para crear estructuras de resistencia (teliosporas).

Mejoramiento genético. Como resultado de los trabajos de mejoramiento, en 1981 se liberó la variedad Negro Veracruz, tolerante a la roya. Su promedio de rendimiento fue de 1,517 kg ha⁻¹ en comparación con 1,300 de la variedad Jamapa, susceptible a la roya (López y Vidal, 1981). La variedad Jamapa cuando se liberó en 1963 era tolerante a la roya, pero después de 20 años de uso se tornó susceptible. En 1982 se liberó la variedad Negro Huasteco-81 con rendimiento promedio de 1440 kg/ha en comparación con Jamapa de 950 kg ha⁻¹ y 970 de Negro Veracruz en 24 localidades durante 1980-1981 (Yoshii y Rodríguez, 1982) la diferencia principal es la susceptibilidad al Virus del Mosaico Dorado del frijol (BGMV) de las variedades Jamapa y Negro Veracruz. La variedad Negro Huasteco-81 era resistente a la roya, sin embargo, se ha observado en los últimos años que ha pasado a ser tolerante. En 1991 se liberó la variedad Negro Cotaxtla-91, resistente a la roya (López y Rodríguez, 1992). Al comparar el rendimiento promedio obtenido en diferentes localidades y

por varios años de las variedades liberadas Negro Veracruz, Negro Huasteco-81 y Negro Cotaxtla-91 con el de Jamapa, se encontró que la diferencia de rendimiento es mayor en las variedades liberadas recientemente (Figura 5). Lo anterior puede deberse a una mayor resistencia a la roya de las variedades recién liberadas o a la pérdida de esta resistencia en Negro Veracruz y Negro Huasteco 81.

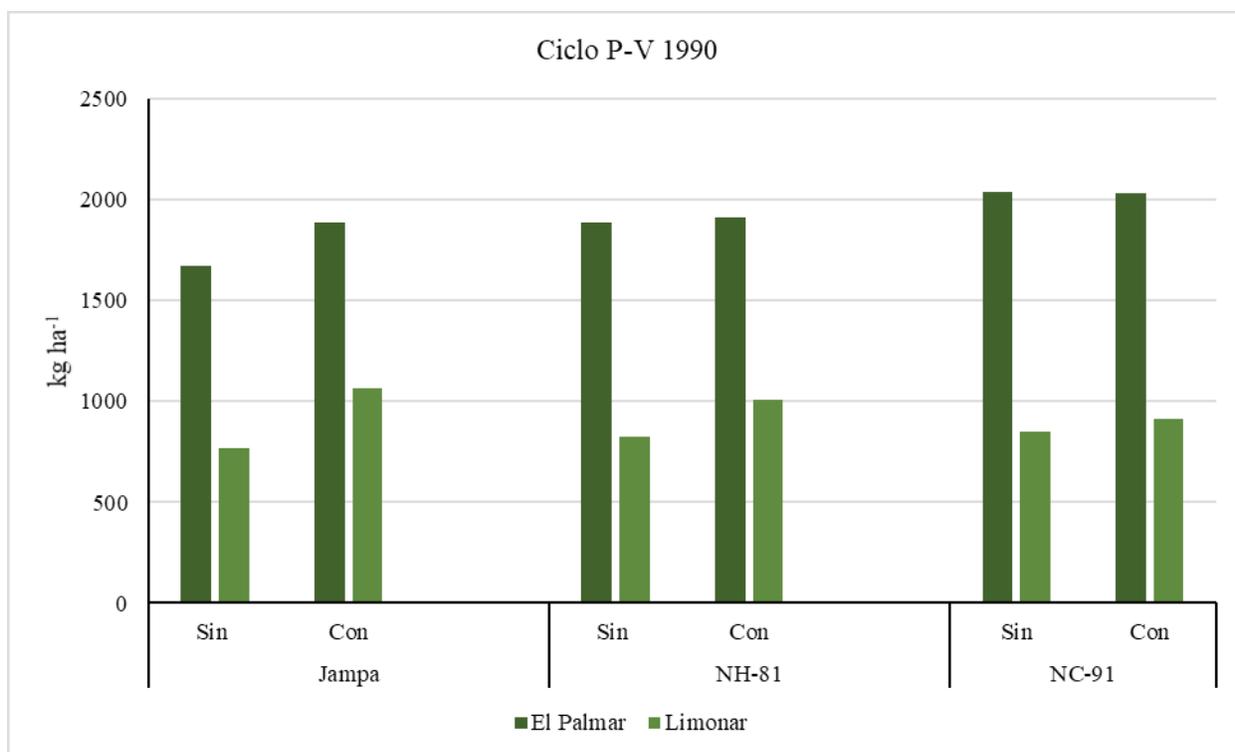


Figura 5. Respuesta varietal de Frijol en diferentes ubicaciones y diferencias en tratamiento con cal en ciclo Primavera-Verano 1990.

Manejo químico y efectos en rendimiento. En el ciclo Primavera-Verano 1990, sólo hubo diferencias altamente significativas entre tratamientos para reacción a la roya. La variedad Jamapa sin protección química, resultó con el valor más alto mientras que con protección química resultó más bajo junto con Negro Huasteco-81 y Negro Cotaxtla-91, pero éstos últimos sin protección química (Figura 5) Negro Huasteco-81 y Negro Cotaxtla-91 resultaron con los valores más bajos. A pesar de que no hubo diferencia significativa entre tratamientos para el rendimiento, hubo diferencias numéricas con y sin la aplicación de fungicidas de 27 a 183 kg ha⁻¹ en la variedad Negro Huasteco-81 y de

215 a 296 en Jamapa (Figura 5). La diferencia entre rendimiento de ambas localidades se debió principalmente a las condiciones de humedad, que fueron mejores en el Palmar, ya que en el Limonar se presentó sequía al momento de llenado de grano. En el caso de la variedad Negro Cotaxtla-91 no es necesario aplicar fungicidas ya que es resistente.

En el ciclo I-P 1991 se encontró en las dos localidades de prueba diferencias significativas para la reacción a roya. En ambas, Jamapa obtuvo los valores más altos con y sin protección química y las demás variedades resultaron similares entre si bajo ambos tratamientos (Figura 6). En la localidad de El Palmar, la incidencia de roya fue ligeramente más alta que en Medellín de Bravo, en este sitio la incidencia del patógeno fue baja debido a condiciones ambientales prevalecientes durante el ciclo del cultivo de baja humedad relativa, menos de 80% y temperaturas menores de 15 o mayores de 30° centígrados. Sin embargo, las variedades presentaron diferentes reacciones a la roya. El rendimiento

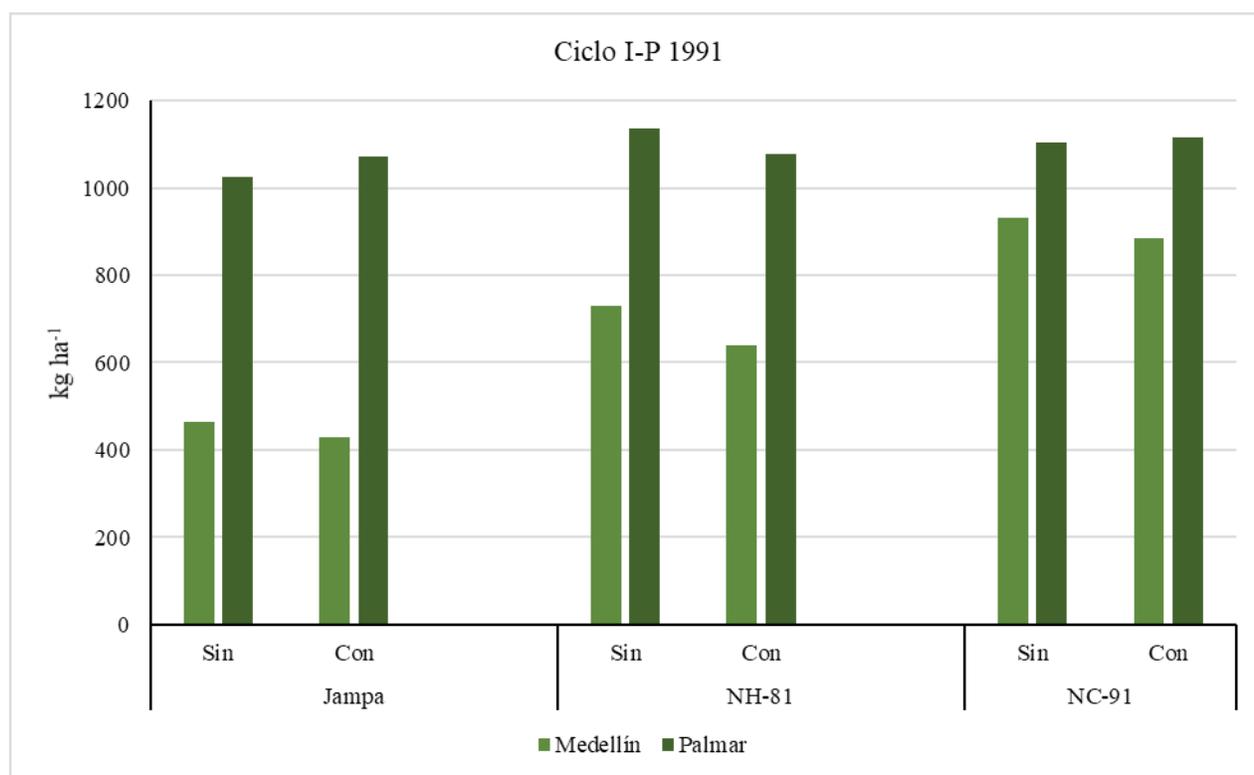


Figura 6. Respuesta varietal de frijol en diferentes ubicaciones, diferencias en tratamiento con cal en ciclo y su efecto en rendimiento. Ciclo Invierno-Primavera 1991.

sólo mostró diferencias significativas en la localidad de Medellín de Bravo. La variedad Jamapa bajo ambos tratamientos obtuvo los más bajos rendimientos, mientras que los más altos los obtuvo Negro Cotaxtla-91 (Figura 6). Estos resultados concuerdan con lo obtenido por López y Rodríguez (1992), quienes encontraron que la variedad Negro Cotaxtla- 91 es más resistente y rinde más que Jamapa y Negro Huasteco-81.

Los resultados obtenidos de la evaluación de cinco fungicidas en el ciclo I-P 1991-92 con la variedad Jamapa, mostraron diferencias significativas para el rendimiento (Figura 7). Los valores más altos para ambas características se obtuvieron con el fungicida Hexaconazole. Los productos que le siguieron en producción fueron Maneb y Tebuconazole, el más bajo rendimiento se obtuvo con el azufre líquido. Este y el Hidróxido cúprico resultaron similares al testigo.

Mancha angular

Agente causal. *Phaeoisariopsis griseola*

Condiciones climáticas favorables. La temperatura favorable para este pató-

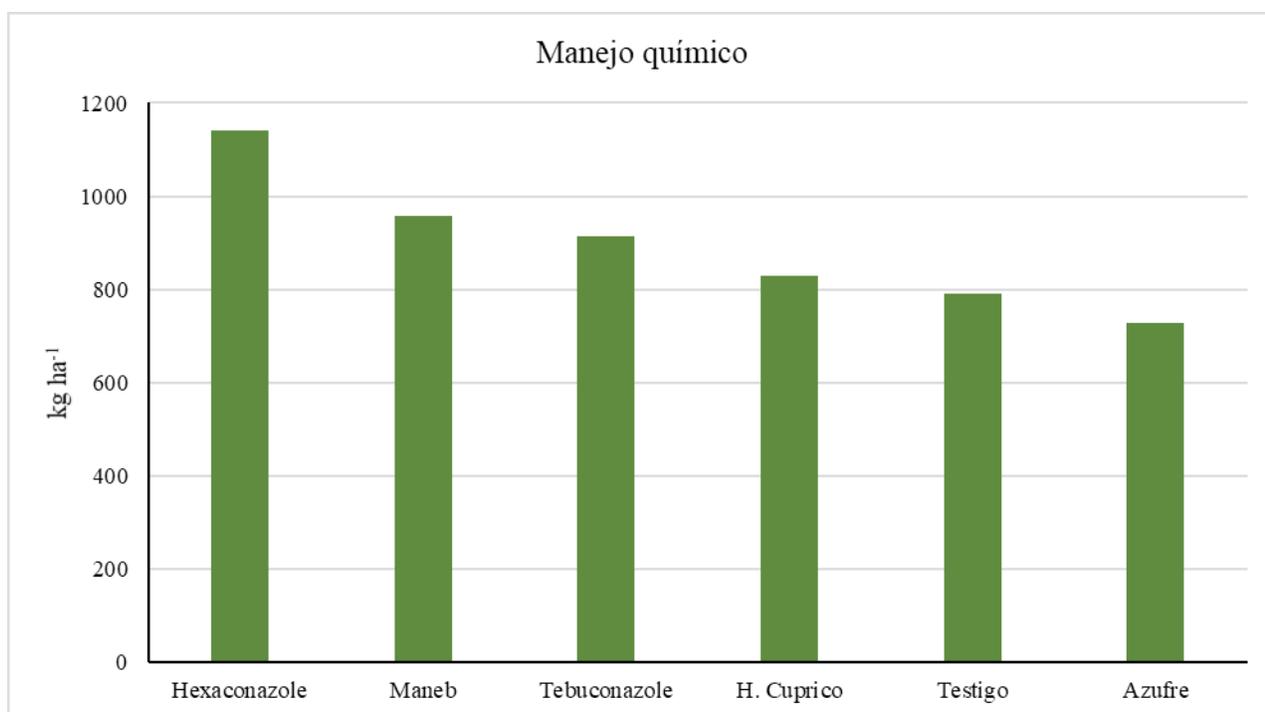


Figura 7. Rendimiento promedio varietal con tratamientos de diferentes fungicidas.

geno es de 16 a 28 °C, con humedad relativa mayor a 95% y días soleados. En general, la mancha angular del frijol es más severa en climas templados y húmedos.

Síntomas. Se caracteriza por la aparición de manchas angulares necróticas de aspecto seco color marrón limitadas por las nervaduras, dichas manchas tienden a coalescer y causar la necrosis total de la hoja. La esporulación del patógeno se produce en el envés de la hoja. Este patógeno puede causar pérdidas de más del 40% (Figura 8) (Tosquy-Valle *et al.*, 2013).



Figura 8. Hojas con manchas necróticas coalescentes angulares rodeadas por halo clorótico.

Ciclo de la enfermedad. El ciclo de la enfermedad depende del hospedante, patógeno y la combinación multivariable del ambiente, se puede completar en 10 días.

La infección se produce por conidios o micelio que reconocen la lámina foliar del frijol. El contacto con la hoja da como resultado una reacción de compatibilidad entre el patógeno y la planta susceptible. El inóculo primario puede llegar de la semilla, residuos de cosecha o suelo. En la testa de la semilla se resguarda el micelio o conidios del hongo. Cuando emergen los cotiledones el hongo puede infectar por las heridas naturales.

En las partículas de suelo puede haber presencia de carga de inóculo, y por consecuencia del viento se puede iniciar la infección en el tejido foliar. Una vez que el hongo ha infectado el tejido, el desarrollo de la enfermedad se produce incluso en una atmósfera relativamente seca. En estas condiciones, se forman estromas en las cavidades subestomáticas. El estroma queda entre el tejido de la hoja después de la destrucción de las células huésped. Cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables, se produce un nuevo crecimiento del hongo, emergen sinemas y finalmente ocurre la esporulación (Figura 9).



Figura 9. Ciclo de la enfermedad de *Phaeoisariopsis griseola*.

Manejo. En Veracruz, se considera que con el uso de variedades mejoradas de mayor potencial de rendimiento que Negro Michigan y la aplicación de fungicidas para el control de mancha angular, es factible incrementar significativamente la productividad del cultivo de frijol. Por lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron: Determinar la reacción a mancha angular, el rendimiento y la rentabilidad de tres genotipos de frijol sin y con aplicación del fungicida mancozeb.

Los factores en estudio fueron: a) Dos niveles del fungicida mancozeb: 0 (testigo regional) y 1.5 kg ha⁻¹ de producto comercial, aplicado en una sola ocasión, al presentarse los primeros síntomas de la enfermedad, cuando las plantas de frijol se encontraban en la etapa de floración.

b) Tres genotipos de frijol de grano negro: Negro Michigan (testigo regional) y las variedades mejoradas Negro Jamapa y Negro Comapa; esta última de más reciente generación por el Programa de Frijol del Campo Experimental Cotaxtla, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (López *et al.*, 2010), las cuales fueron sembradas a una densidad de 250 000 plantas ha⁻¹. La unidad experimental se conformó de seis surcos de 10 m de longitud, separados a 0.80 m de distancia, teniendo como parcela útil los cuatro surcos centrales completos

Para evaluar los efectos de los tratamientos fungicidas y la reacción de los genotipos a esta enfermedad se utilizó la escala de 1 a 9 del CIAT (1987), cuyos valores son: de 1 a 3= resistente, de 4 a 6= tolerante y de 7 a 9 susceptible (Figura 10).

Se detectó efecto significativo en la reacción a mancha angular y en el rendimiento de grano, tanto en las dosis de aplicación de mancozeb, como en los

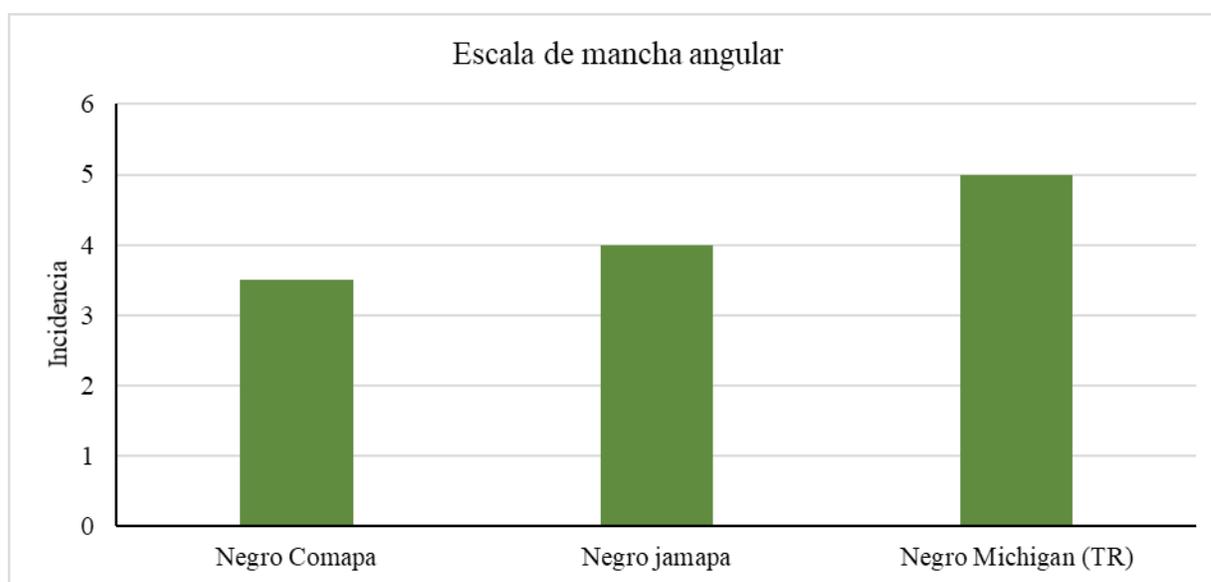


Figura 10. Efectos de tratamiento con tres fungicidas en la incidencia de *Phaeoisariopsis griseola*.

genotipos evaluados, pero no en la interacción de ambos factores. Se mostró que con la aplicación de 1.5 kg ha^{-1} de mancozeb, las plantas de frijol mostraron menores daños de la enfermedad y se obtuvo un rendimiento promedio mayor al 100%, al del tratamiento sin aplicación de fungicida (Figura 11). Estos resultados concuerdan con los de González (1977), quien obtuvo un incremento de 200% en el rendimiento de frijol con la aplicación de mancozeb, con respecto al testigo sin aplicación, con lo cual se corrobora de que el uso de fungicidas es un método efectivo para prevenir y controlar enfermedades fungosas como la mancha angular (Pastor-Corrales, 1985)

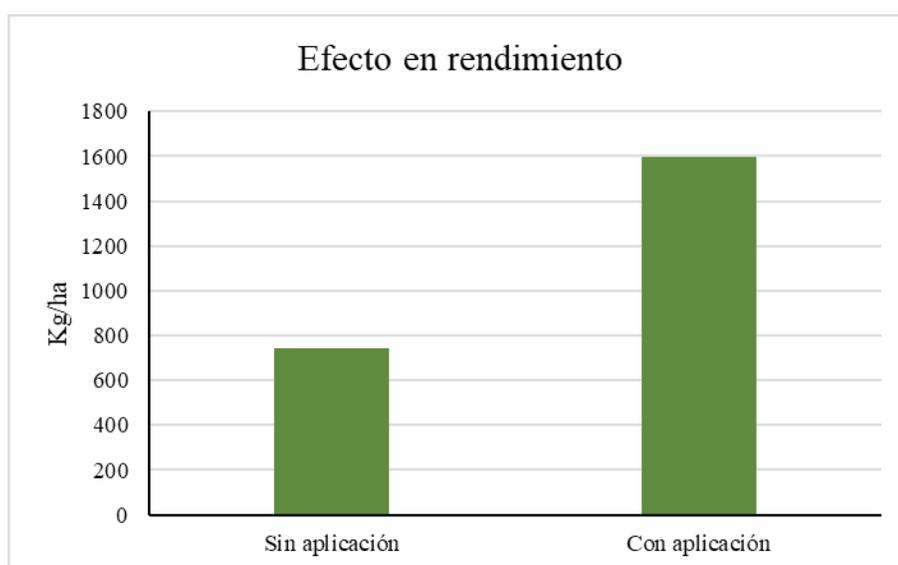


Figura 11. Efecto de la molécula mancozeb en el aumento del rendimiento por efecto de control de *Phaeoisariopsis griseola*.

ANTRACNOSIS

Agente causal. *Colletotrichum lindemuthianum*.

Condiciones climáticas favorables. Las condiciones óptimas para el desarrollo de *Colletotrichum lindemuthianum* son temperaturas de 25 a 30°C y humedad relativa mayor al 80%.

Síntomas. Se caracteriza por la aparición de manchas negras en las hojas, tallos y vainas. Se expresan como lesiones hundidas en las hojas, los tallos y las

vainas. Las lesiones pueden ser de color marrón, negro con hundimiento en el centro. A medida que la enfermedad avanza, las lesiones pueden agrandarse y fusionarse, causando que las hojas o frutos se marchiten y mueran se han reportado pérdidas de 25-100% (Figura 12) (Becerra *et al.*, 2021).



Figura 12. Mancas necróticas hundidas con halo color café en vainas de frijol, síntoma típico de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Ciclo de la enfermedad. El hongo sobrevive en el suelo o residuos de cosecha en forma de micelio o conidios, los tejidos del hongo pueden sobrevivir varios años sin el hospedante. Este patógeno no tiene fase sexual, sin embargo, la recombinación genética en esta especie se hace mediante un proceso de anastomosis entre hifas y conidios mediante mutación simple y heterocariosis. (Roca *et al.*, 2003). Las estructuras propagativas de *C. lindemuthianum* son conidios que se originan de acérvulos caracterizadas por una seta larga. Los conidios se dispersan por el viento o la lluvia a las plantas próximas. Cuando los conidios aterrizan en una planta susceptible, germinan y comienza la infección. Cuando las esporas aterrizan en una planta susceptible, germinan y producen micelio. El micelio crece dentro de la planta y produce toxinas para lisis celular y alimentación del hongo. Los acérvulos se pueden ver en las hojas y vainas de las plantas infectadas como lesiones necróticas. Las vainas infectadas abortan y caen prematuramente, mientras que las que maduran producen semillas infectadas con lesiones necróticas oscuras. El ciclo de vida de la antracnosis se completa en aproximadamente 10 días infectando hojas y vainas.

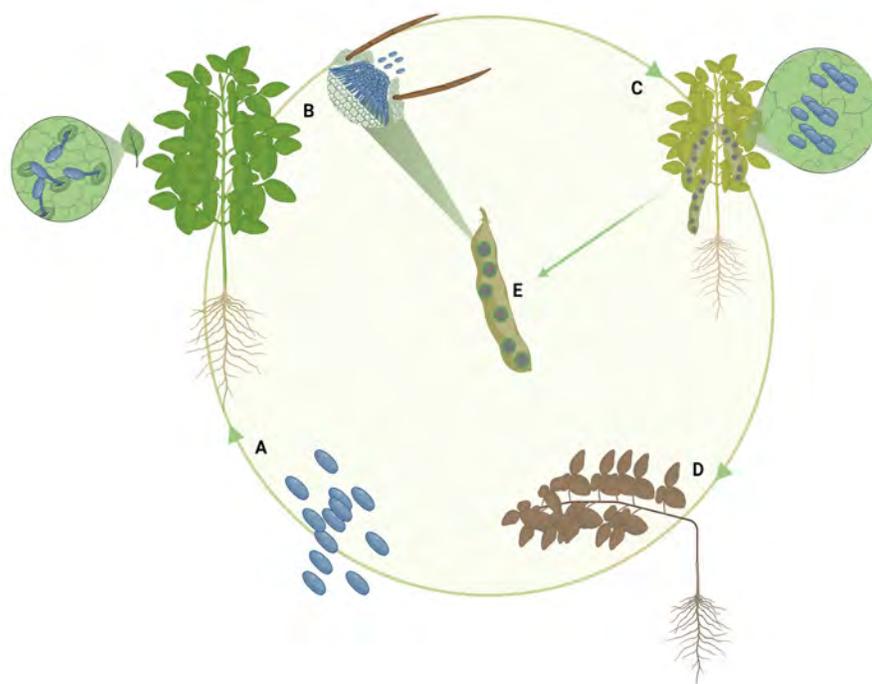


Figura 13. Ciclo de vida de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Manejo. En el 2015 se liberó la variedad Verdín, la cual es tolerante a la sequía terminal, y tiene alto potencial de rendimiento y amplia adaptación en las diferentes áreas en que se produce frijol en los estados de Veracruz y Chiapas. Otra cualidad que destaca en esta variedad es su tolerancia a la antracnosis, que incide en las áreas frijoleras de los estados de Veracruz y Chiapas.

Manejo de roya, mancha angular y antracnosis

En regiones con alta presión por enfermedades es importante el uso de variedades resistentes, mientras que la disponibilidad de variedades que responden eficientemente al uso de insumos permite que el cultivo de frijol en diversas condiciones edáficas, incluyendo siembra en suelos ácidos. En áreas del trópico húmedo, el cultivo de frijol lo realizan productores con poca superficie

En la última década los fitomejoradores han buscado incorporar resistencia horizontal a enfermedades en el frijol, lo que contribuye a disminuir la contaminación del ambiente con agroquímicos y estabilizar los rendimientos en los diversos sistemas de producción. Se registro la reacción de los genotipos

a las enfermedades ocurridas en forma natural durante el ciclo otoño-invierno 1999-2000 (Figura 14). La reacción de los genotipos a las enfermedades se calificó mediante una escala de 1-9 CIAT,1987, cuyos valores fueron: 1 - 3 Resistente, 4 - 6 Tolerante 7 - 9 Susceptible.

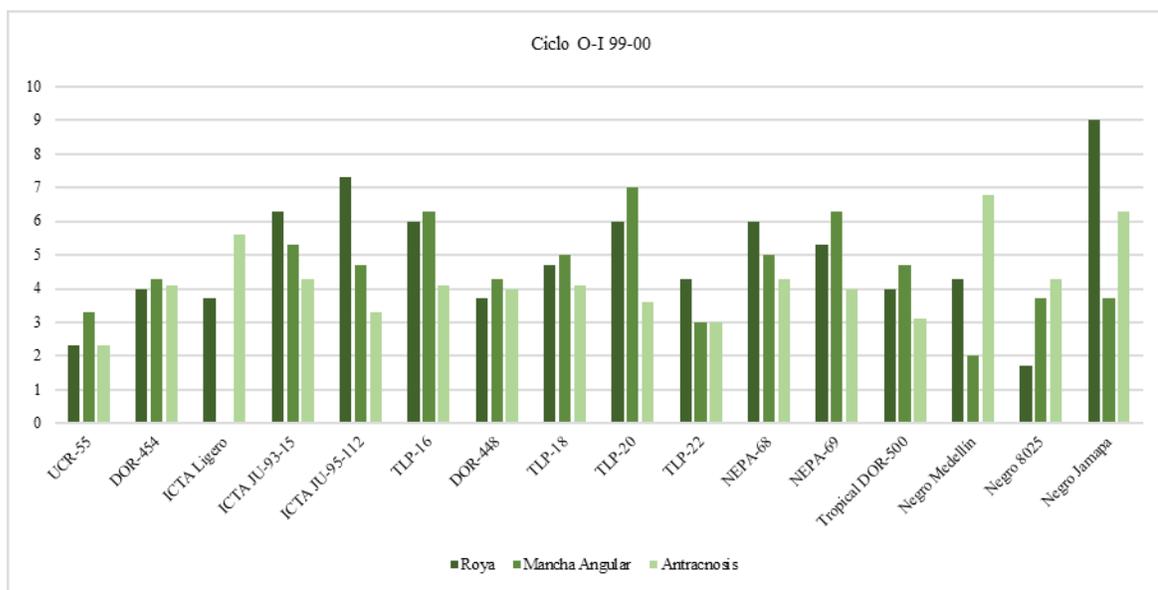


Figura 14. Relación genotipo patógeno en el ciclo agrícola Otoño- Invierno 1999-2000

En las localidades de Isla y Medellín de Bravo en el ciclo 1999-2000 se sembró a finales de octubre debido a las fuertes lluvias ocurridas durante todo el ciclo. En el caso de Isla además la precipitación temperatura fresca y alta humedad relativa fueron las condiciones ideales para la ocurrencia de antracnosis, identificándose por medio de variedades diferenciales a las razas 9 y 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*. En el caso de la roya *U. appendiculatus* y la mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) no se identificaron razas patogénicas.

Los genotipos resistentes a roya fueron Negro 8025 y UCR 55 y 11 resultaron tolerantes en su reacción. Se encontró una correlación intermedia significativa entre el rendimiento y la severidad de la roya. La relación mostrada por la variedad Negro Jamapa, la máxima escala, es indicativa de la presión que mostró la enfermedad y de la alta susceptibilidad de la variedad. La antracnosis y la mancha angular fueron las enfermedades de menor severidad y la de mayor fue la roya. Las líneas Negro 8025, TLP-22 y UCR-55 sobresalieron

por su alto rendimiento y resistencia a las diferentes enfermedades. En cuanto a las variedades resistentes mostraron estabilidad de rendimiento y también amplia adaptación (Figura 15).

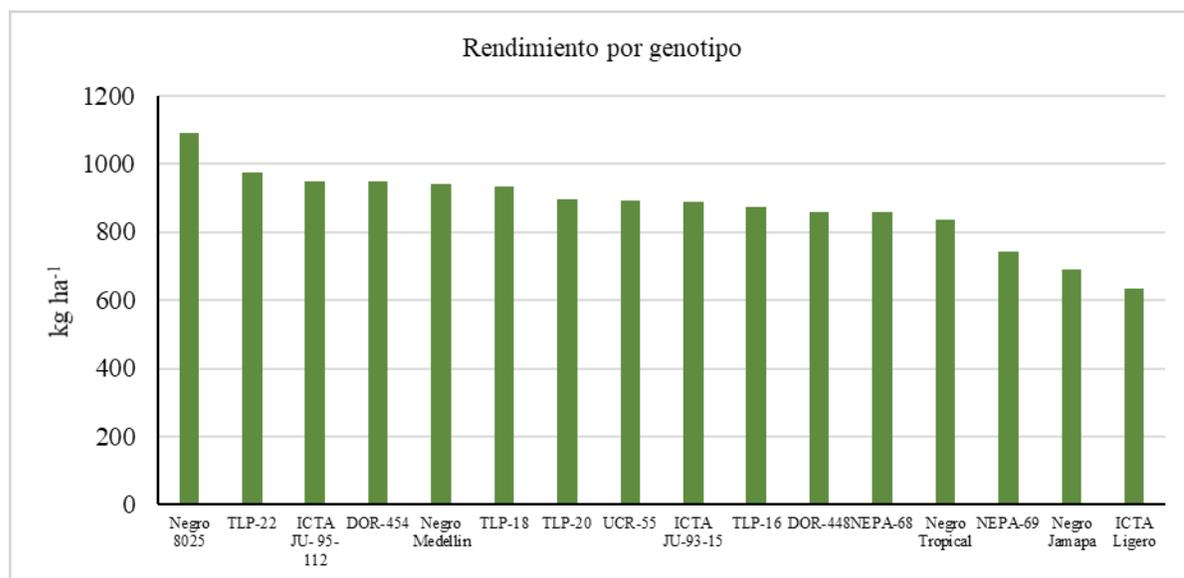


Figura 15. Respuesta genotípica y su rendimiento.

Los genotipos que mostraron los rendimientos superiores fueron Negro 8025, TLP-22, ICTA JU-95-112, DOR-454 y Negro Medellín; además, resultaron superiores a la variedad testigo Negro Jamapa

Las variedades se evaluaron en suelos ácidos en dos experimentos, con aplicación de cal y sin aplicación. Los resultados fueron contundentes al elevarse 30% la producción por la aplicación de cal como mejorador de suelos y labor cultural para prevención de enfermedades (Figura 16).

Mustia hilachosa

Agente causal (Teleomorfo) *Thanatephorus cucumeris*

Condiciones climáticas favorables. Las condiciones óptimas para el desarrollo de *T. cucumeris* son temperaturas de 15 a 32 °C y humedades relativas mayores a 75%.

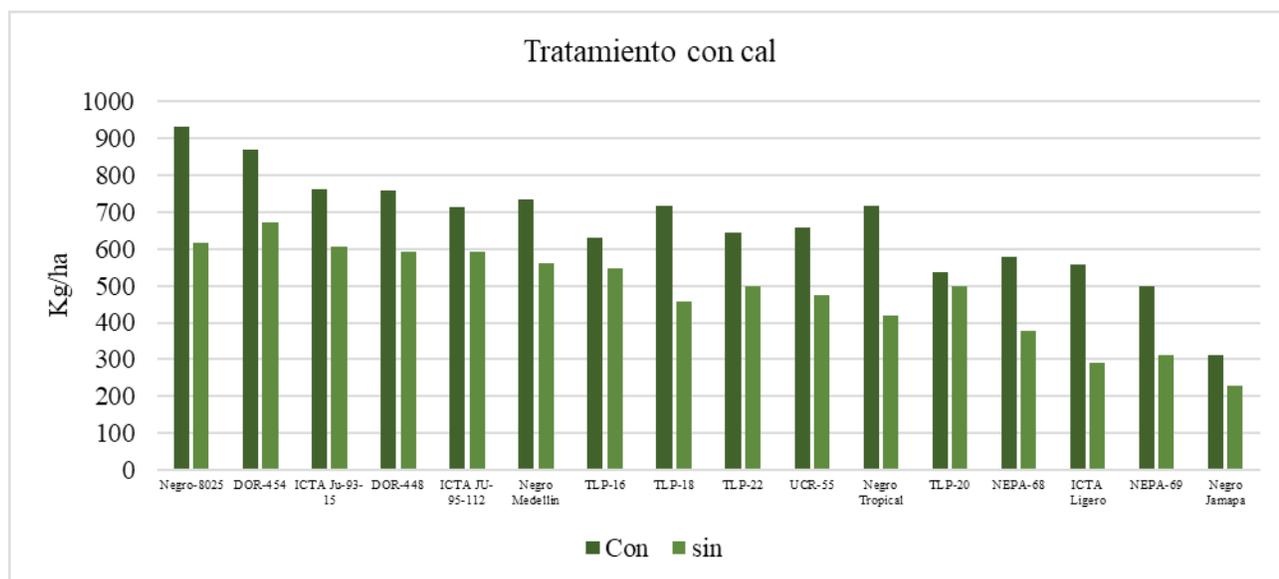


Figura 16. Respuesta varietal en rendimiento y tratamiento con cal.

Síntomas. Este hongo produce toxinas degradadoras de celulosa y pectinas, por ello el síntoma es la perforación total de la lesión necrótica concéntrica con halo marrón derivando en el síntoma típico de este patógeno (Figura 17).



Figura 17. Síntomas de *Thanatephorus cucumeris*, desprendimiento de tejido central de la hoja con margen necrótico.

Ciclo de la enfermedad El ciclo de la enfermedad depende del hospedante, patógeno y la combinación multivariable del ambiente, se puede completar en 10 días. *T cucumeris* es el estado sexual de *Rhizoctonia solani*. Este hongoso sobrevive entre ciclos productivos por medio de esclerocios y basidios en residuos de cosecha como saprofito facultativo. Al tener las condiciones óptimas para su desarrollo los basidios germinan produciendo basidiosporas en donde se realiza la recombinación genética. Estas basidiosporas son dispersadas por el viento y al tener contacto con hojas, vainas y tallos germinan y comienza la infección.



Figura 18. Ciclo de la enfermedad de *Thanatephorus cucumeris*

Tizones bacterianos

Agentes causales. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Condiciones climáticas favorables. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* y *P. syringae* pv. *phaseolicola* se desarrollan óptimamente en temperaturas de 20 a 30°C, con clima nublado y humedad relativa de más del 80%.

Síntomas. Estas bacterias causan manchas amarillas o marrones con halo clorótico de aspecto húmedo en hojas y vainas. Pueden causar pérdidas de rendimiento por decremento de área fotosintética de hasta el 70 % (Figura 19).



Figura 19. Síntoma de tizón foliar con halo clorótico. Se observa que la infección comenzó por estomas o hidatodos.

Ciclo de la enfermedad. El ciclo de enfermedad causado por estas bacterias tiene dos etapas: etapa epifítica y etapa endofítica. La etapa epifítica comienza con la interacción de quimiotropismo entre una célula bacteriana y la hoja o tejido del frijol, comenzando una interacción de adhesión de polisacáridos vegetales y phillis de reconocimiento del procarionte. Después de la colonización comienza la formación del biofilm el cual brinda protección a la bacteria de los cambios bruscos de temperatura y desecación.

La fase endofítica se caracteriza por la entrada de bacterias al tejido vegetal a través de lesiones o estomas y su eventual movimiento por todo el sistema vascular. Las bacterias reaparecen en las superficies de las plantas una vez que su población alcanza el umbral, se produce la transmisión a nuevos huéspedes y se repite el ciclo de infección (Figura 20) (Nakayinga *et al.*, 2021).

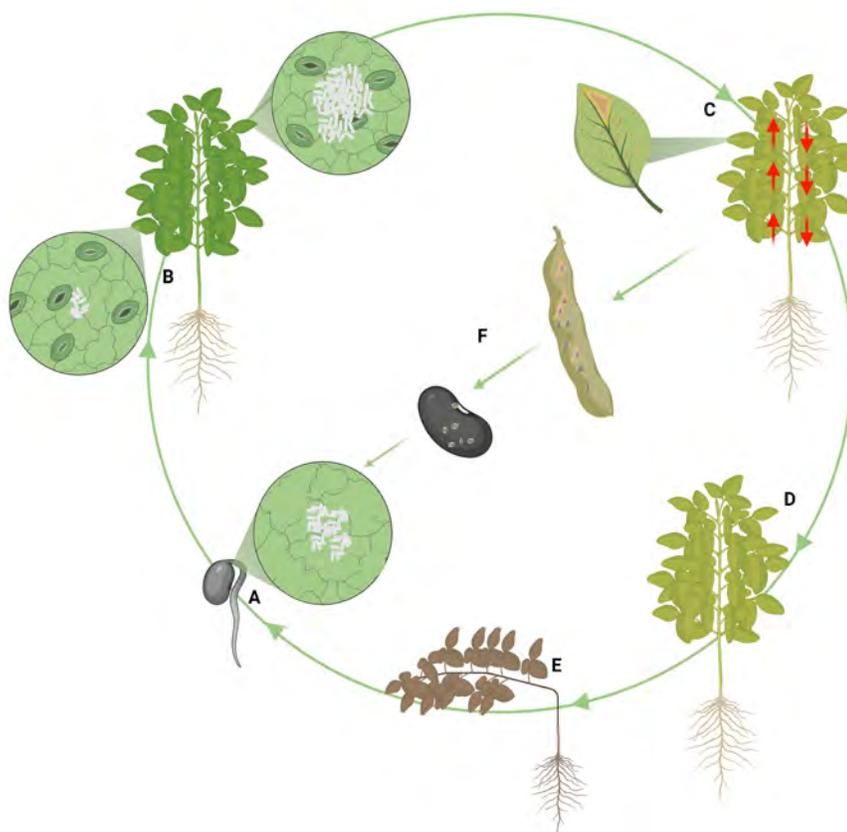


Figura 20. Ciclo de infección del tizones bacterianos.

Virus mosaico amarillo dorado del frijol

Agente causal. *Bean yellow golden mosaic virus* y *Bean golden mosaic virus*

El virus del mosaico amarillo dorado del frijol (*Bean yellow golden mosaic virus*) y el virus mosaico dorado del frijol (*Bean golden mosaic virus*) son virus de ADN monocatenario cuyo genoma tiene dos componentes ambos de que son necesarios para la infectividad de las plantas. Estas moléculas están empaquetadas en partículas geminadas. Los begomovirus están íntimamente asociados a floema no son tan eficientemente transmitidos por semilla. Este virus se replica en los núcleos de las células vegetales afectadas, provocando una importante alteración de los procesos fisiológicos que normalmente provoca importantes pérdidas de rendimiento y la muerte de las plantas.

Síntomas. Los síntomas típicos de estos virus son epinastia causada por un crecimiento anormal de la zona abaxial de la hoja o enrollamiento hacia abajo, además varios grados de malformación y clorosis en patrón de mosaico (Figura 21 A), también deficiencia en desarrollo vegetativo (achaparramiento), ligada al aborto de flores. Este virus se distribuye sistémicamente, por ello los síntomas en vainas de plantas infectadas es el subdesarrollo.

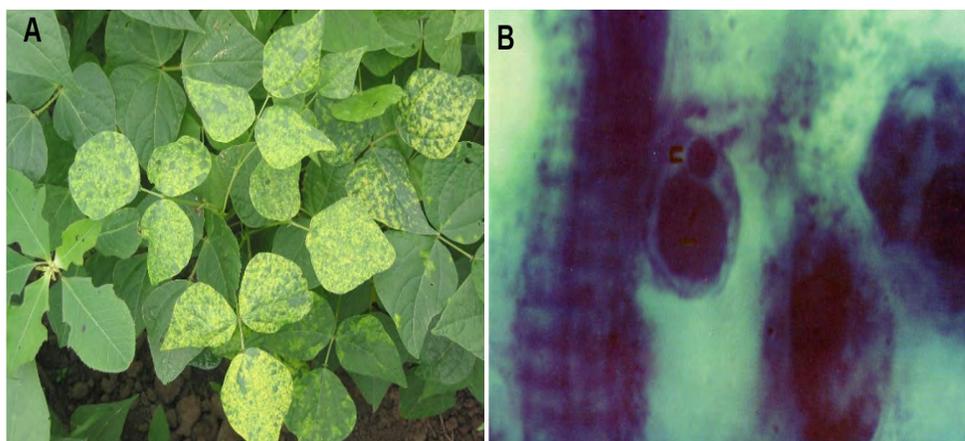


Figura 21. A) Síntoma de mosaico en hojas B) Inclusión densa en el núcleo de células del floema.

Inclusiones. Amorfas como agregados de partículas virales y densas dentro del núcleo de las células del floema. La mayoría de los Geminiviridae estudiados inducen inclusiones virales nucleares en células del floema compuestas por agregados de partículas virales (Figura 21 B).

Interacción virus-vector. La especie *B. tabaci* y *B. argentifolii*, son vectores persistentes del BYGMV ya que lo durante la ingesta de la savia floematica. Las partículas virales atraviesan el estilete, moviéndose a través del tubo digestivo hasta el intestino medio del insecto, posteriormente llegan a la hemolinfa y a las glándulas salivales. Ahí el virus interactúa con compuestos producidos por bacterias presentes en el aparato digestivo, dándole la capacidad de persistir largos periodos en el sistema digestivo del vector hasta que este se alimente de otra planta y así poder ser inoculados exitosamente en el floema (Figura 21).

Manejo. En el 2015 se liberó la variedad Verdín, la cual es tolerante a la sequía terminal, y tiene alto potencial de rendimiento y amplia adaptación en las

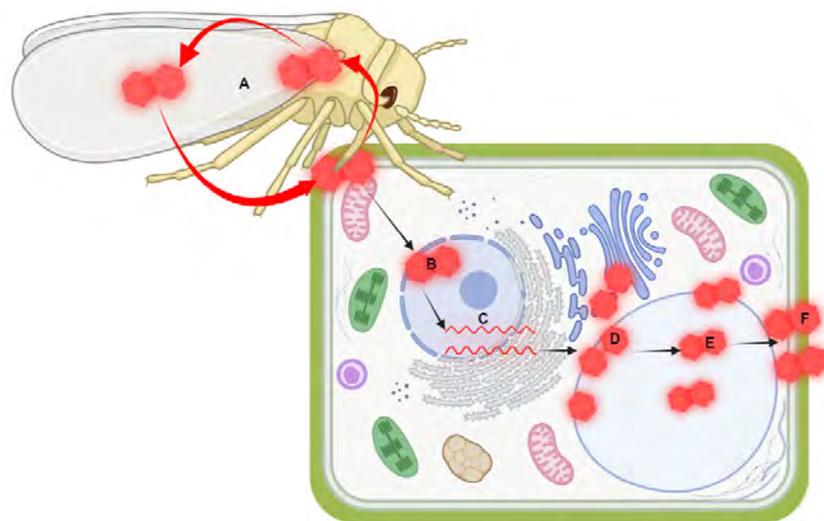


Figura 21. Interacción virus vector

diferentes áreas en que se produce frijol en los estados de Veracruz y Chiapas. Otra cualidad que destaca en esta variedad es su tolerancia a la enfermedad del virus del mosaico amarillo dorado del frijol, que inciden en las áreas frijolerías de los estados de Veracruz y Chiapas.

El uso de aceites minerales para el control de mosquita blanca y se ha dado con frecuencia en varios cultivos principalmente en hortalizas (Simons *et al.*, 1977 y Zitter y Ozaki, 1978); generalmente, se requieren concentraciones de al menos 2%, para obtener una buena eficiencia (Zitter y Simons, 1980). En trabajos de invernadero, las aspersiones de aceite han dado resultados en contra del Virus del Mosaico común y virus del amarillamiento del frijol (Walkley y Dance, 1979). Otro cultivo donde se ha probado el uso de aceites es el tabaco, en contra del virus del jaspeado, usándose concentraciones de 1,5 y 2 % de citrolina, además de los aceites de maíz, olivo, cártamo y soya, siendo mejor el de citrolina al 2% (Martínez, 1986). Las aspersiones han sido efectivas en contra de los siguientes vectores *Myzus persicae*, *Brevicoryne brassicae*, *Aphis fabae*, *A. gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Rhopalosiphum maidis*, *Bemisia tabaci*. El aceite puede también interferir con la transmisión de virus semipersistentes por áfidos. (Zitter y Simons, 1980).

Se establecieron dos experimentos, el primero el 20 de octubre de 1992, bajo condiciones de humedad residual, usando los siguientes ingredientes activos:

1. Aceite citrolina 2%
2. Aceite citrolina 2% + Endosulfan
3. Aceite mineral Saf-t-Add 2%
4. Aceite mineral Saf-t-Add 2% + Endosulfan
5. Testigo sin aplicación

Se encontró para rendimiento diferencias altamente significativas, los tratamientos con los rendimientos más altos fueron: Citrolina + Endosulfan, en la variedad Negro Huasteco-81; Aceite Saf-t-Add + Endosulfan y Saf-t-Add solo en la misma variedad. En la variedad Negro Cotaxtla-91 el mejor tratamiento fue el de Aceite Saf-t-Add + Endosulfan; todos los demás tratamientos fueron iguales para esta variedad (Figura 22)

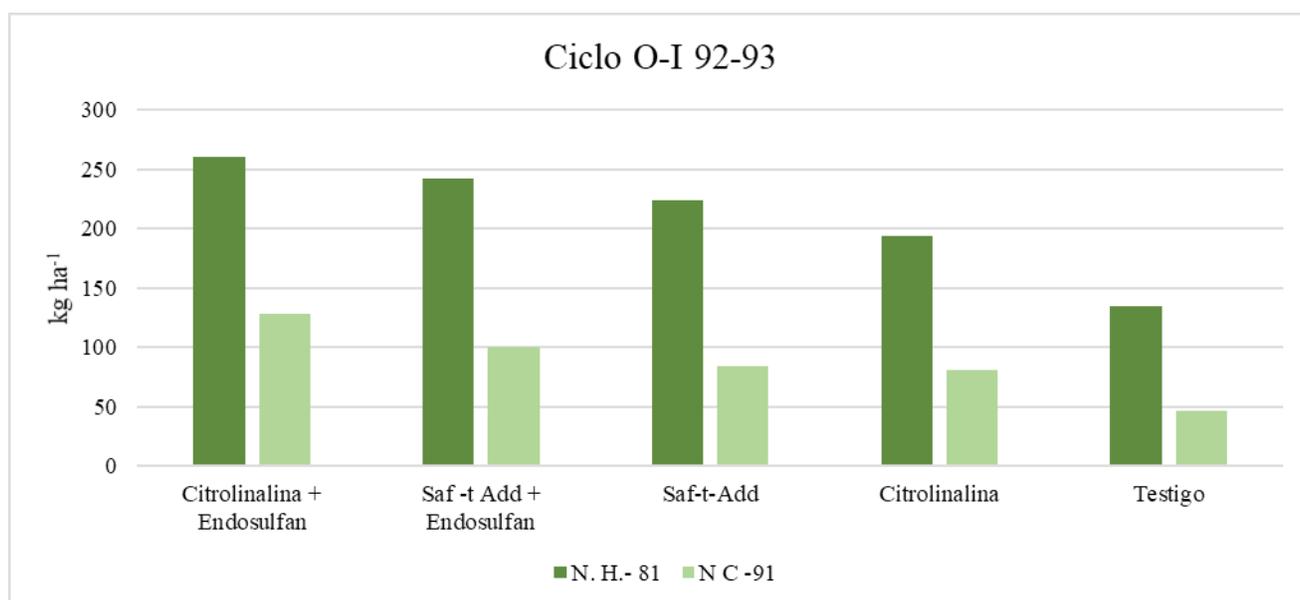


Figura 22. Efecto de combinación de diferentes moléculas agroquímicas y el rendimiento en el ciclo agrícola Otoño-Invierno 1992-1993.

La baja cantidad de rendimiento estuvo influenciada, además de la virosis, por una falta de humedad en las etapas de floración y llenado de vainas, aunado a la presencia de pudriciones radiculares causadas por los hongos

Sclerotium rolfsii y *Rhizoctonia solani*; aún con todo esto, los análisis pudieron detectar diferencias entre los tratamientos.

Paralelamente se realizó una evaluación de incidencia con la siguiente escala:

- 1= síntomas ausentes e incidencia 0%
- 2= síntomas dudosos e incidencia 1-10%
- 3= síntomas débiles e incidencia 11-25%
- 4= síntomas moderados e incidencia 26-40%
- 5= síntomas intermedios e incidencia 41-60%
- 6= síntomas generales e incidencia 61-75%
- 7= síntomas intensos e incidencia 76-90%
- 8= síntomas severos e incidencia 91-99%
- 9= muerte e incidencia de 100%

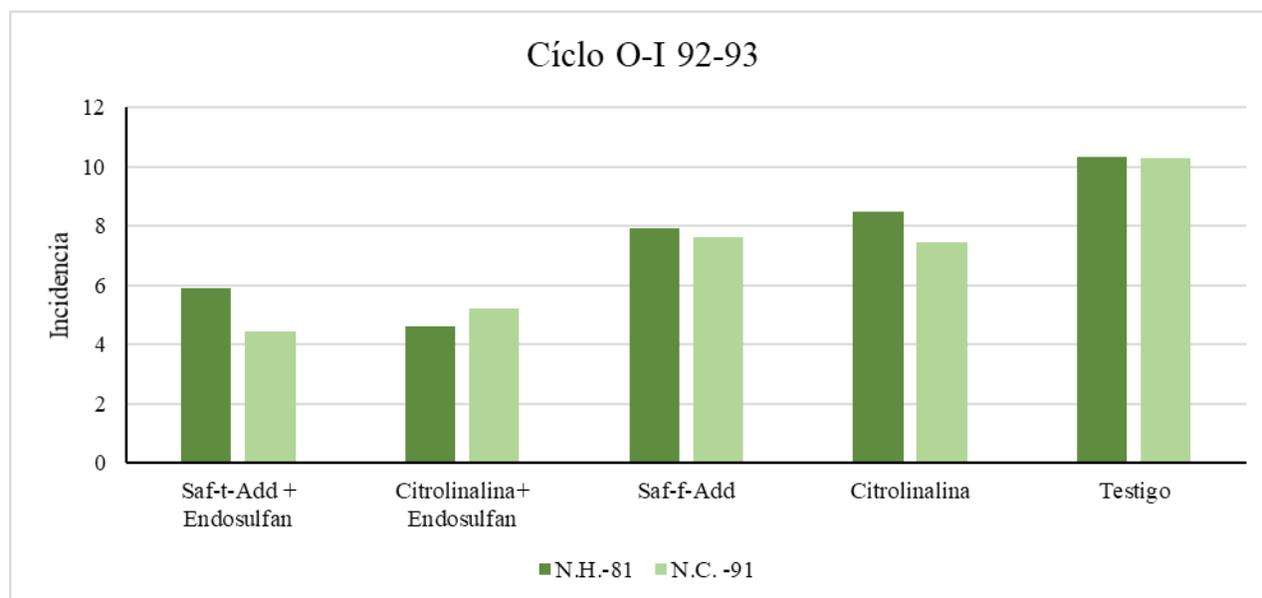


Figura 23. Efecto de combinación de diferentes moléculas agroquímicas y la incidencia en el ciclo agrícola Otoño-Invierno 1992-1993.

En la figura se observa el efecto del aceite Saf-t Add + Endosulfan, el cual presenta los niveles más bajos de incidencia.

En el segundo experimento, ciclo O-I 1993-94 Se encontraron diferencias altamente significativas para la variedad, el producto y la interacción con la incidencia, (Figura 24); el aceite y el testigo presentan los valores más altos, en cambio el Endosulfan y el Imidacloprid combinando las dos formulaciones da

el más bajo, siendo los restantes intermedios; en el caso de rendimiento, no se detectaron diferencias significativas para variedad y producto pero si para la interacción, siendo solamente significativas; aunque el análisis de medias no mostró grupos, se puede observar diferencias de hasta 230 kg, entre la combinación de Imidacloprid y el tratamiento de aceite y de 186 entre el mismo tratamiento y el testigo (Figura 24).

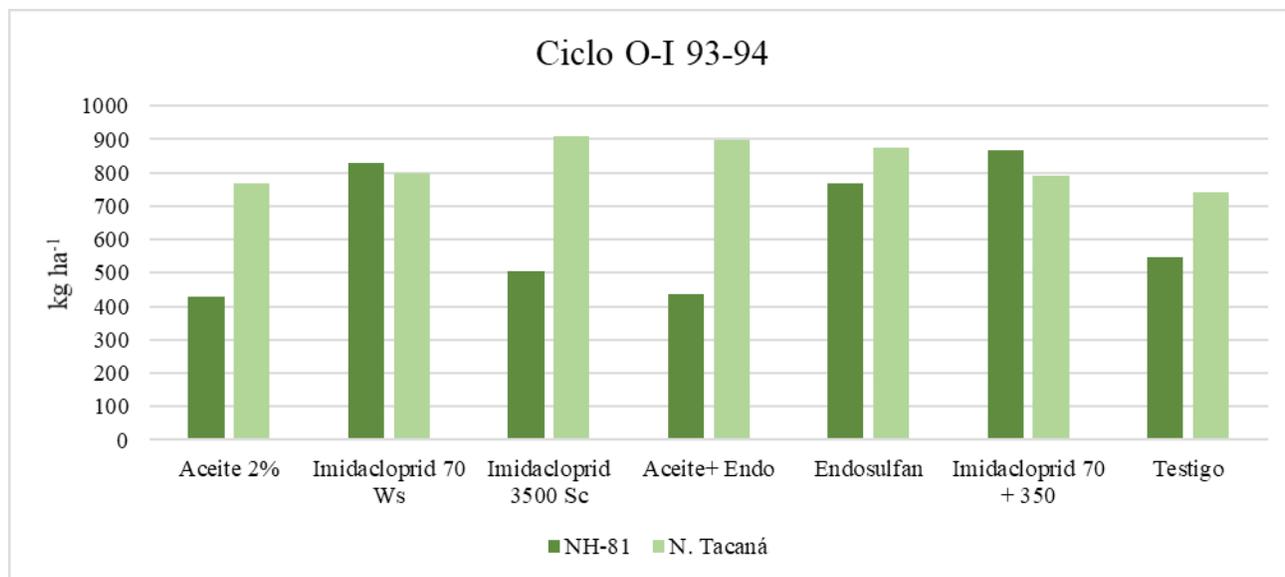


Figura 24.

Al desglosar el efecto del producto sobre la incidencia el análisis de medias se detectó que la variedad Negro Tacana, independientemente del producto aplicado, obtuvo las incidencias más bajas; en tanto los mejores tratamientos en la variedad Negro Huasteco-81 fueron la combinación del Imidacloprid, Endosulfan individual, combinado con aceite y las formulaciones del Imidacloprid individuales, el testigo y el aceite solo, tuvieron los valores más altos (Figura 25).

Virus mosaico común del frijol Y Virus mosaico común necrótico del frijol

Agentes causales. *Bean common mosaic virus* y *Bean common necrotic mosaic virus*
 Estos dos virus se separan en dos grupos con base a sus características serológicas y síntomas causados. Serogrupo A: *Bean common mosaic necrotic virus*.

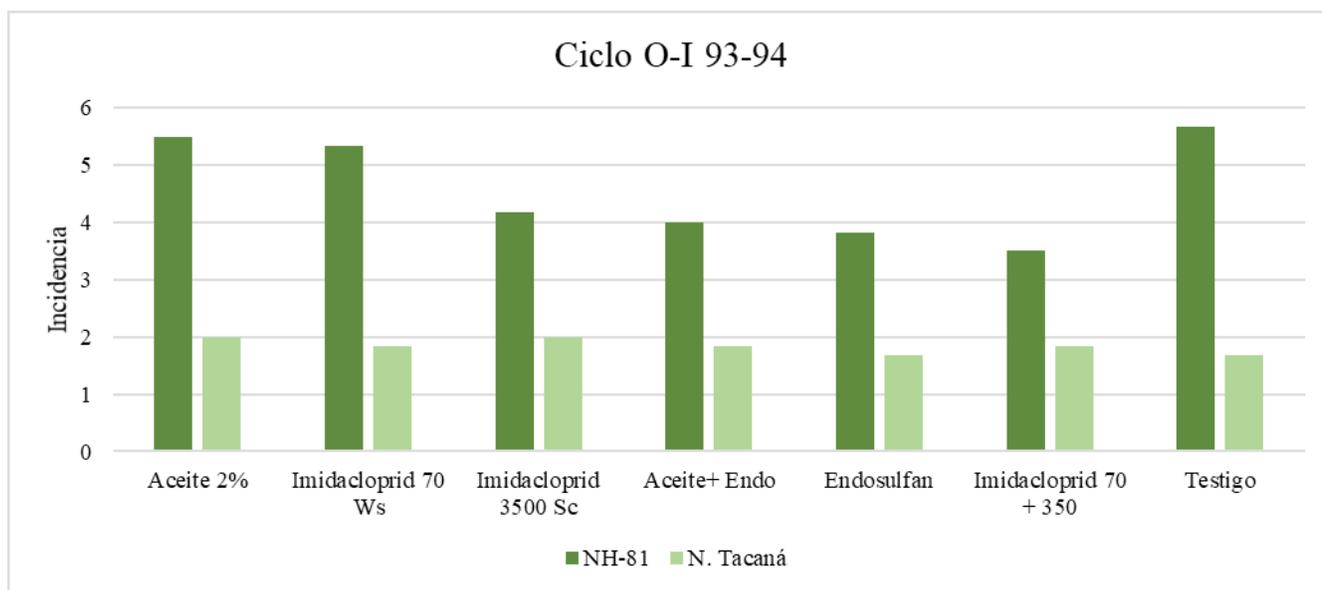


Figura 25.

Serogrupo B: *Bean common mosaic virus*. Ambos pertenecen al género Potyvirus. Son los virus más agresivos en el cultivo de Frijol, causando pérdidas de hasta el 100% por el efecto de subdesarrollo vegetativo. Se caracterizan por presentar inclusiones celulares fibrosas.

Síntomas. Los síntomas típicos de ambos virus son: Epinastia, clorosis de tipo mosaico con áreas verdes oscuras aparentes a lo largo de las nervaduras, embolsamiento arrugamiento reducción de lámina foliar. Solo en las zonas del trópico húmedo se presenta el serotipo A el cual induce necrosis en los puntos de crecimiento con secamiento descendente y en algunas hojas las nervaduras son de café oscuro, así como necrosis venal en la raíz (Figura 26 A).

Inclusiones. Inclusiones citoplasmáticas fibrosas típicas de Potyvirus (Figura 26 B).

Transmisión. Pueden transmitirse a través de semillas, polen, áfidos y fricción mecánica. La alta tasa de transmisión de semillas es una de las principales razones de la dispersión mundial de BCMV y es el principal recurso viral en el campo. BCMV se limita a la cubierta de la semilla de variedades de frijol con una tasa de transmisión baja; sin embargo, puede invadir las semillas (embriones) de variedades de frijol con altas tasas de transmisión.



Figura 26. A) síntoma de necrosis causado por *Bean common necrotic mosaic virus* B) Inclusiones citoplasmáticas fibrosas de tamaño pequeño.

Interacción virus vector. Es transmitida por distintas especies de pulgones como: *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora*, *Aphis fabae* y *Myzus persicae* de forma no persistente. Al alimentarse de las células infectadas, el estilete del áfido se impregna de citoplasma y es este citoplasma con partículas virales el que funge como inóculo primario se da la transmisión por el estilete a plantas sanas (Figura 27).

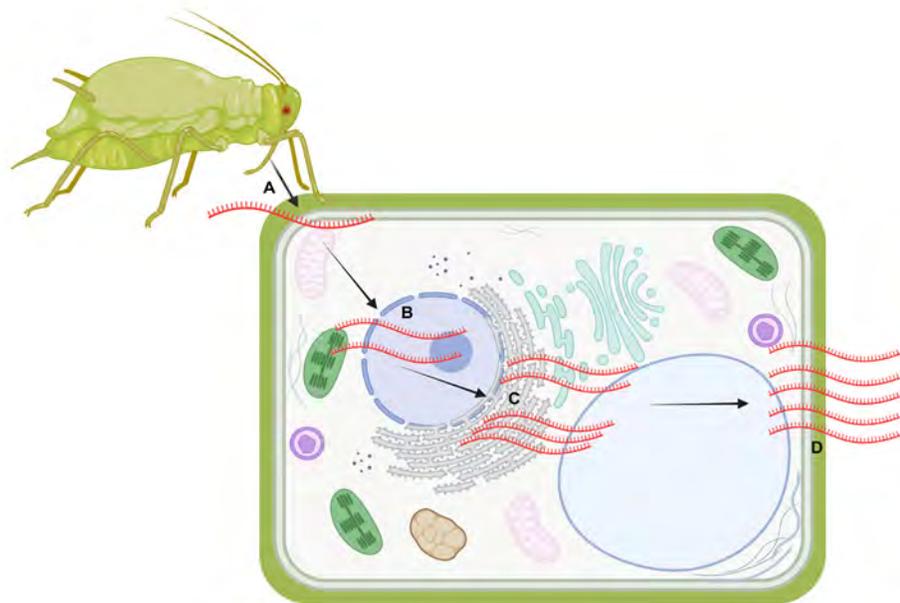


Figura 27. Ciclo de replicación en la célula del hospedante y su interacción con el vector.

Manejo

Resistencia genética. El control de BCMV y BCMNV puede lograrse mediante programas de certificación de semilla libre de enfermedades y el uso de variedades resistentes. La forma más económica de prevenir daños es sembrar variedades con resistencia durable obtenida mediante la piramidación de genes, en la que se combina una resistencia de amplio espectro contra patogrupos de BCMV y BCMNV. Este proceso de mejoramiento puede facilitarse mediante el uso de selección asistida por marcadores moleculares en combinación con la confrontación directa de los virus. (Anaya-López *et al*, 2015). Durante 2015 y 2016, Rubí, se evaluó junto con dos testigos regionales en un vivero de adaptación en seis ambientes de Veracruz y Chiapas, para determinar su respuesta productiva, bajo condiciones de temporal, humedad residual, riego y sequía terminal. Rubí demostró tener mayor estabilidad del rendimiento y adaptación más amplia que estos tres genotipos. Esta variedad es resistente al BCMV por tener incorporado el gen dominante I y muestra una baja incidencia de BGYMV en condiciones de campo. La variedad Rubí es de ciclo precoz y su grano negro opaco, de tamaño pequeño, reúne el tipo y las características del frijol que demandan los productores y consumidores de los estados de Veracruz y Chiapas, México (Ibarra *et al*, 2022).

Enfermedades de raíz y pudrición del tallo

Las enfermedades de raíz y pudrición del tallo son menos frecuentes que las enfermedades foliares, pero pueden causar pérdidas significativas. Las más importantes son las siguientes:

Pudrición de raíz

Agente causal. *Fusarium spp.*

Fusarium es un género de hongos filamentosos muy diverso y complejo. Este grupo de patógenos son cosmopolita y sobreviven como saprofito facultativo en ausencia de su hospedante

Condiciones climáticas favorables. La temperatura que favorece la infección va de 25 a 30°C y niveles altos de humedad en suelo.

Síntomas. Una vez iniciada la infección *Fusarium spp.* genera hifas de alimentación las cuales generan toxinas que ayudan a la lisis celular y facilitar la ex-



Figura 28. Sintoma de taponamiento de haces vasculares causante de marchitez.

tracción de polisacáridos esenciales para el hongo. Por la naturaleza sistémica de la infección el inoculo es movilizado a toda la planta, incluyendo vainas y semillas. El taponamiento de haces vasculares obstruye en libre tránsito de la sabia vegetal y por ende el marchitamiento de la planta. El marchitamiento se divide en fases inicial donde el follaje comienza a amarillarse, etapa media donde la planta se ve decaída pero no seca y etapa final, donde la planta está completamente marchita. La raíz presenta pudrición necrótica por la obstrucción de haces vasculares.

Ciclo de la enfermedad El ciclo de la enfermedad depende del hospedante, patógeno y la combinación multivariable del ambiente.

En presencia de exudados radicales las clamidosporas, conidios o micelio germinan para iniciar la enfermedad, primero con el reconocimiento del tejido, posteriormente con el desarrollo del apresorio para anclaje y haustorio para absorción. Una vez establecido el patógeno en la raíz y tejido vascular, comienza su etapa de dispersión la cual consiste en el desarrollo de acervulos de los cuales se generan conidióforos y estos conidios para la multiplicación y dispersión por el agua de riego. Al ser un patógeno sistémico se dispersa por semilla, ya que coloniza en movimiento acropetal por la planta

El inóculo primario está presente en los residuos de cosecha y en el suelo, iniciándose la infección en etapas tempranas del cultivo. La pudrición radical

comienza en etapas vegetativas, pero pasa desapercibida hasta que comienza el amarillamiento o marchitez. Esta enfermedad se considera monocíclica, ya que, aunque puede haber infecciones secundarias, la expresión de la enfermedad depende de la carga de inoculo en el suelo (Figura 29) (Koike *et al.*, 2019).



Figura 29. Ciclo de la enfermedad de *Fusarium* spp.

Pudrición de tallo y raíz.

Agente causal. *Rhizoctonia solani* (*Thanatephorus cucumeris*)

Condiciones climáticas favorables. Los esclerocios de *R. solani*, se activan cuando entran contacto con el exudado de la raíz del frijol. La temperatura óptima es de 19 a 30 °C y alta humedad relativa en el suelo.

Síntomas. Este hongo produce anillamiento del hipocótilo parcial o completo durante la germinación. Además, pudrición de aspecto rojizo oscuro en la raíz y muerte inminente de la planta. Derivando en nula producción.

Ciclo de la enfermedad. El ciclo de la enfermedad depende del hospedante, patógeno y la combinación multivariable del ambiente. *R. solani* sobrevive

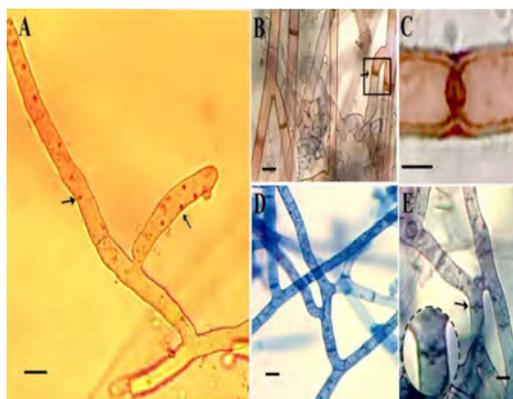


Figura 30. Síntomas de pudrición de tallo típico de *Rhizoctonia solani*.

como micelio o esclerocios (estructura de resistencia con paredes gruesas de melanina). Al tener un estímulo por parte de los exudados de la raíz del frijol los esclerocios germinan, desarrollando hifas de penetración, los cuales ingresan por las heridas naturales del crecimiento radical.

El crecimiento de *R. solani* es vegetativo, colonizando el tejido de raíz y tejido de transición de raíz-tallo, el proceso de infección se ve favorecido por la presencia de enzimas para la lisis celular, hasta causar pudrición radical. En el área foliar se nota un amarillamiento generalizado y marchitez (Figura 31).

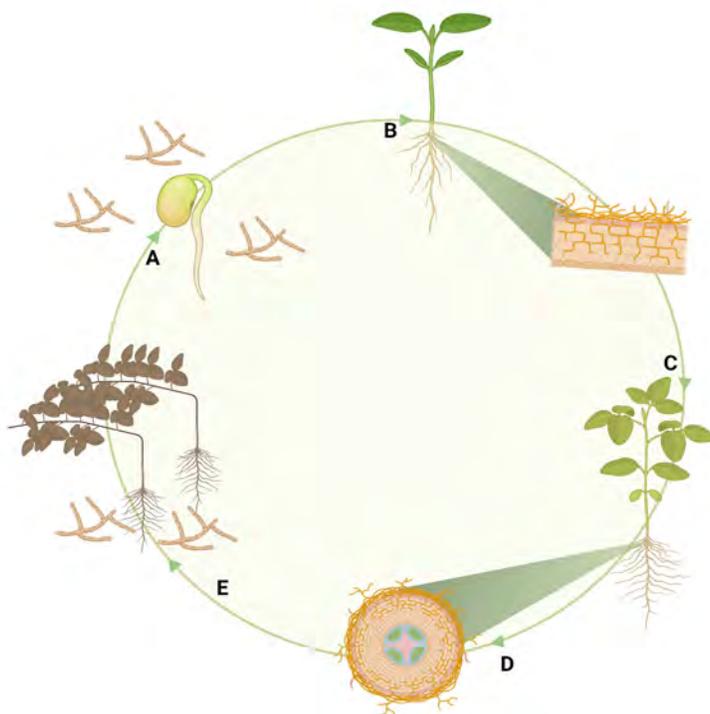


Figura 31. Ciclo de la enfermedad de *Rhizoctonia solani*

Podredumbre de raíz y tallo

Agente causal. *Sclerotium rolfsii*

Condiciones climáticas favorables. Este hongo necrotrófico es favorecido por suelos arcillo-limosos con poca capacidad de drenaje y temperaturas entre 25 y 30°C.

Síntomas. Los síntomas que produce son manchas y pudrición de parte basal del tallo en plántulas. En plantas adultas comienzan con clorosis y marchitez acompañados de pudriciones húmedas en el tallo y base que a veces llegan a cubrirse de micelio blanco. El hongo produce micelio blanco algodonoso de crecimiento rápido en el se generan esclerocios de color blanco que van tomando un color café a medida que pasa el tiempo.



Figura 32. Síntomas de pudrición de raíz y cuello. Se observa el crecimiento de esclerocios en el tejido radical.

Ciclo de la enfermedad. El ciclo de la enfermedad depende del hospedante, patógeno y la combinación multivariable del ambiente.

Este hongo sobrevive por medio de esclerocios y micelio. Los esclerocios germinan al tener contacto con los exudados radicales del hospedante. El micelio penetra a través de aberturas naturales o heridas y comienza a colonizar intra e intercelular alimentándose del tejido necrosado por las toxinas generadas para este fin. La planta comienza a mostrar decaimiento por el efecto de necrosamiento de hace vasculares. La infección ocurre en cualquier etapa vegetativa de la planta, la cual se ve favorecida por el calor y la alta humedad

relativa. El necrosamiento gradual del tejido de la raíz y parte basal de la planta deriva en una muerte inminente de esta (Figura 33).



Figura 33. Ciclo de vida de *Sclerotium rolfsii*.

Podredumbre carbonosa

Agente causal. *Macrophomina phaseolina*.

Condiciones climáticas favorables. Es un hongo habitante natural del suelo que se favorece de alta temperatura y humedades relativas elevadas.

Síntomas. Los síntomas típicos son el amarillamiento y la senescencia de las hojas, desprendimiento del tejido cortical de la raíz y la apariencia gris de estos tejidos debido a la abundancia de microesclerocios que pueden provocar la muerte prematura del hospedante.



Figura 34. Síntoma de necrosis basal

Ciclo de la enfermedad. El ciclo de la enfermedad depende del hospedante, patógeno y la combinación multivariable del ambiente.

El hongo sobrevive por microsclerocios, los cuales al tener contacto con los exudados radicales germinan en hifas infectivas, penetrando por heridas naturales de la raíz. Formando el tubo germinativo, después el apresorio de anclaje y posteriormente el haustorio de alimentación. Una vez dentro de la planta, el hongo afecta el tejido vascular obstruyendo el transporte de agua y nutrientes, provocando el marchitamiento de la planta. Del micelio se forman microsclerocios infectivos en la parte basal del tallo. Con estas estructuras de resistencia puede permanecer en el suelo por tiempo indefinido.

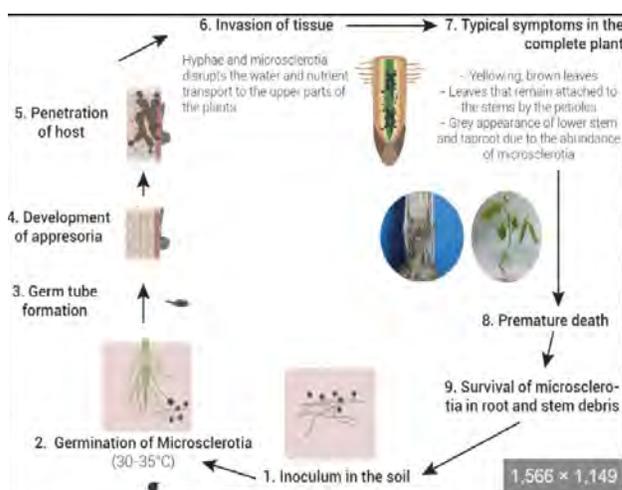


Figura 35. Ciclo de la enfermedad de *Macrophomina phaseolina*.

Enfermedades causadas por pseudohongos

Dentro del grupo de los oomicetos se encuentran varios géneros. De patógenos vegetales de importancia económica. Los géneros *Phytophthora* y *Pythium* son los patógenos vegetales más importantes de este grupo. En su historial evolutivo evolucionaron de algas, por ello es por lo que sus características estructurales y reproductivas son diferentes a los hongos verdaderos antes mencionados. Están especializados en su dispersión por el agua e infección a tejido de raíz.

Damping off

Agente causal. *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp.

Condiciones favorables. *Phytophthora* prospera en condiciones cálidas y húmedas. La temperatura óptima para el crecimiento del pseudohongo es de 25-30 °C. El patógeno requiere saturación de agua en el suelo para iniciar la infección.

Síntomas. Los pseudohongos causan pudrición de raíz y cuello de la planta denominado ahogamiento el cual deriva en marchitez generalizada. En algunas especies vegetales causa tizones en hojas.

Ciclo de la enfermedad. El ciclo de la enfermedad depende del hospedante, patógeno y la combinación multivariable del ambiente.

Este pseudohongo sobrevive en forma de clamidosporas (asexuales) u oosporas (resultado de recombinación sexual) que tienen paredes gruesas que al entrar en contacto con los exudados radicales del hospedante germinan y generan esporangios e hifas cenocíticas. De los esporangios se originan las zoosporas, las cuales son el inóculo primario. El ciclo de infección comienza cuando las zoosporas de *Phytophthora* entran en contacto con las raíces del frijol. Las zoosporas pueden penetrar en las raíces del hospedante a través de heridas o aberturas naturales. Una vez que las zoosporas de *Phytophthora* entran en contacto con las raíces germinan dando lugar a los Cystos, las cuales son estructuras de penetración y generación de hifas infectivas. Una vez que el pseudohongo penetra produce toxinas para lisis celular y alimentarse de polisacáridos, ocasionando necrosis celular radical y obstruyendo el flujo de agua y nutrientes, por ello es por lo que la planta presenta un decaimiento y marchitez inminente.

Zoosporas son esporas de infección producidas por los esporangios, estas zoosporas son frágiles y susceptibles al desecamiento por el calor.

Factores bióticos

En el mismo año se evaluó la adaptación y reacción a enfermedades de 16 genotipos en nueve localidades/año seis en Veracruz y tres en Chiapas, durante el periodo de 1999 al 2001. Los genotipos Negro 8025, ICTA JU-95-112 y DOR 454, resultaron sobresalientes por su rendimiento y adaptabilidad. Negro 8025, UCR 55 y TLP 22, fueron resistentes a roya, antracnosis y mancha angular. En Isla Veracruz en suelo ácido los genotipos, Negro 8025, ICTA JU-95-112 y DOR 454 mostraron los mejores rendimientos con o sin



Figura 36. Ciclo de infección de *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp.

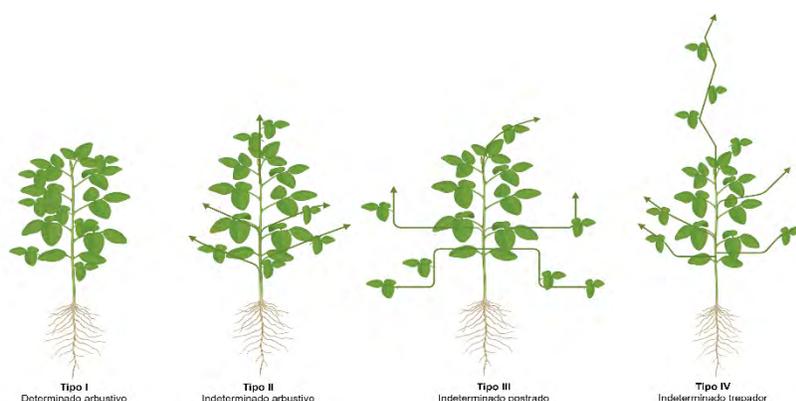
cal dolomítica, lo que indica que el potencial de frijol en el trópico húmedo está relacionado a la resistencia a enfermedades y adaptación a suelos de baja fertilidad (López *et al*, 2002).

En el periodo de 1999 a 2005 se evaluó la adaptación, el rendimiento, reacción a enfermedades y adaptación a suelo ácido bajo diferentes condiciones de humedad: temporal, humedad residual y riego de la variedad de frijol Negro Papaloapan en áreas tropicales de los estados de Veracruz y Chiapas, se incluyeron en un ensayo uniforme a las variedades Negro Jamapa, Negro Medellín y Negro Tropical como testigos. Se realizó un análisis combinado de rendimiento y estabilidad y se compararon los parámetros de estabilidad de la variedad con genotipos comerciales. Negro Papaloapan se validó en 20 parcelas semi comerciales en Veracruz y Chiapas. El rendimiento promedio de Negro Papaloapan fue de 1,228 kg ha⁻¹; similar a Negro Medellín y superior a Negro Tropical y Negro Jamapa. Su rendimiento a través de localidades y años se clasificó como estable. Negro Papaloapan mostró tolerancia a roya, mancha angular y antracnosis y resistencia al BGYMV así como adaptación en suelos ácidos. En las parcelas de validación el rendimiento promedio de la nueva variedad fue 1364 kg ha⁻¹; significativamente superior a los testigos utilizados. Negro Papaloapan mostró alto potencial de rendimiento y adaptación a las áreas productoras de frijol en Veracruz y Chiapas.

Cuadro 1. Variedades de frijol negro liberadas por el INIFAP y su tolerancia o resistencia hacia enfermedades.

Variedad	Agente causal									
	BYGMV	BCMV	<i>U. appendiculatus</i>	<i>P. griseola</i>	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Pythium</i> spp.	<i>Phytophthora</i> spp.	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>phaseoli</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
México										
Frailescano	R	R	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Negro Grijalva	T	T	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Negro Tropical	T	R	R	T	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Negro Tacana	T	T	T	T	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Verdín	R	R	SR	SR	R	SR	SR	SR	SR	SR
Negro Comapa	T	T	SR	T	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Negro Huasteco 81	T	SR	T	R	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Negro Cotaxtla 91	T	SR	R	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Negro INIFAP	T	SR	R	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Negro Medellín	T	SR	T	T	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Negro Papaloapan	T	SR	T	T	T	SR	SR	SR	SR	SR
Negro Jamapa	SR	SR	SR	T	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Primavera 28	SR	SR	T	SR	R	SR	SR	SR	T	SR
Rubi	T	R	R	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
DOR-454	SR	SR	T	T	T	SR	SR	SR	SR	SR
Rincon Grande	T	R	SR	R	SR	SR	SR	SR	SR	SR
Negro 8025	SR	SR	R	T	T	SR	SR	SR	SR	SR
San Blas	SR	R	R	SR	SR	SR	SR	SR	T	SR
Negro Vizcaya	SR	T	R	SR	T	T	SR	SR	SR	SR
NOD 1	SR	SR	R	SR	R	SR	SR	SR	T	SR
Negro Sahuatoba	SR	SR	R	SR	R	T	SR	SR	T	SR
Guatemala										
ICTA Ligero	SR	SR	T	SR	T	SR	SR	SR	SR	SR
ICTA JU-93-15	SR	SR	SR	T	T	SR	SR	SR	SR	SR
ICTA JU-95-112	SR	SR	SR	T	T	SR	SR	SR	SR	SR
Costa Rica										
TLP-18	SR	SR	T	T	T	SR	SR	SR	SR	SR
TLP-20	SR	SR	T	SR	T	SR	SR	SR	SR	SR
TLP-22	SR	SR	T	R	R	SR	SR	SR	SR	SR
NEPA-68	SR	SR	T	T	T	SR	SR	SR	SR	SR
Tropical DOR-500	SR	SR	T	T	T	SR	SR	SR	SR	SR

Tipo I
Tipo II
Tipo III
Tipo IV



LITERATURA CITADA

- Anaya-López JL, Silva-Rosales L, Montero-Tavera V, Espejel F y Acosta-Gallegos JA. 2015. Retos y oportunidades en la selección asistida de frijol resistente a BCMV y BCMNV en México. Dimensión del problema. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 6(3): 453-465.
- Becerra LEN, Ibarra PFJ, Tosquy VHO, López SE. 2021. Enfermedades que afectan el cultivo de frijol en Veracruz. Folleto Técnico No. 98. INIFAP. Formato electrónico. 38 p.
- Becerra LEN, López SE y Acosta J. 1995. Resistencia genética y control químico de la roya del frijol en el trópico húmedo de México. *Revista Agronomía Mesoamericana* 6: 61-67.
- Becerra N, Fraire G y López E. 1996. Evaluación de aceite e insecticidas para el control del Virus del Mosaico Dorado (VMDF) del frijol en Chiapas, México. *Agronomía Mesoamericana* 7(1): 67-73.
- Cardenas-Soriano E. 1999. Diagnóstico de virus mediante inclusiones virales. Colegio de postgraduados. Instituto de fitosaidad. 147 ISBN 868-839-280-4.
- Ibarra PFJ, Tosquy VHO, López SE, Rodríguez RJR y Anaya L JL. 2022. Rubí, variedad de frijol negro para las áreas tropicales de Veracruz y Chiapas. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 13 (3): 577-587.
- López S E, Becerra LEN, Acosta GJA y Villar SB. 1993. Variedades de frijol tolerantes al Virus del Mosaico Dorado para el trópico de México. *Agricultura Técnica en México*. 19 (2): 99-109.
- López SE, Acosta GJA, Cumpían, GJ Cano RO, Villar SB y Becerra LEN. 2002. Adaptación de genotipos de frijol común en la región tropical húmeda de México. *Agricultura Técnica en México* 28 (1): 35-42.
- López SE, Tosquy VHO, Villar SB, Cumpían GJ, Ugalde AFJ, y Becerra LEN. 2002. Negro Papaloapan, nueva cultivar de frijol, para las áreas tropicales de Veracruz y Chiapas. *Agricultura Técnica en México*. 33 (3): 259-269.
- Martínez JL. 1986. Memoria del XII Congreso Nacional de Fitopatología. 22-25 julio Tuxtla Gutierrez, Chiapas. p. 51.
- Nakayinga R, Makumi A, Tumuhaise V, Tinzaara W. 2021. *Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture. *BMC Microbiology*. 25;21(1):291. doi: 10.1186/s12866-021-02351-7.
- Roca MG, Davide LC, Mendes-Costa MC, Wheals A. 2003. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. *Fungal Genetics and Biology*. 40(2):138-45. doi: 10.1016/s1087-1845(03)00088-4.
- Simons NJ, Mclean LD, Kinsey GM. 1977. Effects of mineral oil on probing behavior and transmission of stylet-borne viruses by *Myzus persicae*. *Journal of Economic Entomology*. 70: 309-315.
- Tosquy VHO, Ernesto-López SE, Bernardo Villar SB, Jorge GJA. y Rodríguez-Rodríguez JR. 2016. Verdín: variedad de frijol negro tolerante a sequía terminal para Veracruz y Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7 (7): 1775-1780.
- Tosquy-Valle OH, López-Salinas E, Becerra-Leor EN, Esqueda- Esquivel VA y Rodríguez-Rodríguez JR. 2013. Reacción a mancha angular y productividad de genotipos de frijol con y sin aplicación de fungicida. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4 (1): 167-174.
- Tosquy-Valle OH, López-Salinas EB Leor-Enrique N, Esqueda-Esquivel VA., y Rodríguez-Rodríguez, JR. 2013. Reacción a mancha angular y productividad de genotipos de frijol con y sin aplicación de fungicida. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(1), 167-174. Recuperado en 21 de noviembre de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342013000100014&lng=es&tlng=es.
- Walkley ADG, Dance CM. 1979. The effect of oil sprays on aphid transmission of Turnip Mosaic, Beet Yellows, Bean Common and Bean Yellow Mosaic Viruses. *Plant Disease Reporter*. 63: 877-881.
- Zitter AI, Ozaky HY. 1978. Aphid-borne vegetable viruses controlled with oil sprays. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 91: 287-289.
- Zitter AI, Simons NJ. 1980. Management of viruses by alteration of vector efficiency and by cultural practices. *Annual Review Phytopathology*. 18: 289-310.