

# Genetic resistance to *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in selected maize (*Zea mays* L.) lines with white and yellow endosperm

## 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.

Recibido: 15 de Mayo, 2017.

Aceptado: 28 de Julio, 2017.

Quezada-Salinas A, Moreno-Velázquez M, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C, 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.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1705-2

Primera publicación DOI: 01 de Septiembre, 2017.

First DOI publication: September 01, 2017.

**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 C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> 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

**Abstract.** Head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) of maize (*Zea mays* L.) is an important disease present in Mexico, including the Mezquital and Toluca Valleys. The objective of this research was to identify C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> and C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> maize lines adapted to Mexican highlands to be used in a breeding program for disease resistance and good agronomic characters. Seed of lines were inoculated with a suspension of 7x10<sup>7</sup> teliospores mL<sup>-1</sup> of *S. reilianum* f. sp. *zeae* with 1% sodium carboxymethyl cellulose and planted in a greenhouse. Plants were monitored until tassel stage, when disease incidence was recorded. In 258 C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with white endosperm showed an incidence of 92.3% and 41.7% in 71 lines with yellow endosperm. Based on disease incidence and agronomic characters, 38 and 24 C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with white and yellow endosperm, respectively, were selected and self-pollinated in the field. A total of 123 and 114 C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> lines with white and yellow endosperm, respectively, inoculated with teliospores of the pathogen showed incidence of the disease up

suspensión de  $1.7 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> 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 C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> 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 C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> de endospermo blanco y 24 de endospermo amarillo. Un total de 123 y 114 líneas C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> 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

to 42.8% and 28.5%, respectively. Inoculation with teliospores and planting in the greenhouse resulted in the identification of maize lines with different percentages of infection allowing the selection of resistant lines, proving the efficiency of the technique.

**Key words:** *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, *Zea mays*, head smut, seed inoculation, resistant lines.

## INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is susceptible to diseases in different stages of its development. Head smut, caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon and Fullerton, synonym *Sphacelotheca reiliana* (Khün) Clint. (Matyac and Kommedahl, 1985a; Matyac and Kommedahl, 1985b) has been a serious problem since the 1970s in the U.S.A., Mexico, Australia, China, South Africa, and France (Stromberg, 1981; Bernardo *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 2000).

The symptoms of head smut are visible in flowering stage, even when the pathogen infects the root during germination and in the first stages of seedling development (Martínez *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2015). The infective mycelium invades the tissues systematically until it reaches the apical meristem (Frederiksen and Reyes, 1980; Martínez *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2015). The main damages are caused during flowering, when the mycelium established in the meristem produces sori that replace grains in the ear (female inflorescence) and anthers. When maturing, the sori release teliospores that fall to the ground and are carried short distances by the wind (Montes and Díaz, 2006; Ghareeb *et al.*, 2011).

Because the inoculum is found in the soil, efforts to fight this disease are focussed on avoiding infection

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 (Lübberstedt *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).

during seedling development. In order to do this, several strategies are used, such as treating seeds with fungicides (Stienstra *et al.*, 1985; Martínez and Ledesma, 1990; Pradhanang and Ghimire, 1996; Wright *et al.*, 2006), cultural practices (Mack *et al.*, 1984; Matyac and Kommedahl, 1985a), and host resistance (Baggett and Koepsell, 1983; Stromberg *et al.*, 1984; Song *et al.*, 2000; Aquino *et al.*, 2011). The latter is the most convenient technology, since it avoids environmental damages and reduces costs of production.

Among the studies carried out to identify genotypes resistant to head smut, some of the most important are those performed in South Africa (Krüger, 1962), the United States (Baggett and Koepsell, 1983), Kenya (Njuguna and Odhiambo, 1989), France (Lübberstedt *et al.*, 1999), and China (Duan *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2008). In Mexico, despite the importance of this disease in Valles Altos (States of Hidalgo and Mexico), breeding programs do not contemplate the selection for resistance and have only focused on determining percentages of incidence in hybrids and maize varieties (Pérez and Bobadilla, 2002 and 2003; Aquino *et al.*, 2011), under natural infection conditions (Quezada *et al.*, 2013).

In 2006 and 2007, the “National Food Health, Safety and Quality Service” (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad - SENASICA), and the “General Board for Plant Health – DGSV” (Dirección General de Sanidad Vegetal), and the Colegio de Postgraduados (CP), created the genetic improvement programs PM0531 and PM0542, which included the selection of maize populations and lines with head smut resistance for Valles Altos. In the states of Mexico and Hidalgo, maize populations were formed with a wide genetic base of white or yellow endosperm, with the aim of selecting material resistant to *S. reilianum* f. sp. *zaea* implementing a S<sub>1</sub> recurrent selection program.

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. *zeari* 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

The recurrent selection method involving  $S_1$  or  $S_2$  lines are the most widely used to improve resistance to pests and diseases; they also increase their efficiency by increasing the frequency of favorable genes of one or more agronomic characteristics under selection while maintaining genetic variability to continue the selection (Hallauer and Miranda, 1988; Hallauer, 1992). The genetic variation present in open-pollinated crops helps select different levels of susceptibility to the pathogen. Therefore, the aim of this study was to evaluate the level of resistance or susceptibility of maize  $C_2-S_1$  lines artificially inoculated with teliospores of the pathogen.

## MATERIALS AND METHODS

### Host

The formation of base maize populations with white or yellow endosperms began ( $C_0$ ) in the Spring-Summer cycle 2007, by recombining several sources of desirable germplasm in a nursery established in the *ejido* of Cinta Larga, Hgo. ( $20^{\circ} 13' 47''$  N,  $99^{\circ} 12' 52''$  O), selected due to its high incidence of head smut under natural conditions. In the Autumn-Winter cycle 2007/08, in a nursery established in a farmer's plot in Valle de Bravo, Mex. ( $19^{\circ} 11' 42''$  N,  $100^{\circ} 07' 52''$  O), the  $C_0$  seeds were planted, and best plants were self-pollinated obtaining the  $C_0-S_1$  seed. The nursery in Valle de Bravo, Mex. was established due to the presence of head smut and to advance a planting season under subtropical conditions without frost.

From this cycle onwards, a  $S_1$  population improvement program was followed, recombining  $S_1$  families selected for agronomic characters and resistance to head smut in the Spring-Summer cycle in Hidalgo and generating new  $S_1$  lines in the Autumn-Winter cycle in Valle de Bravo, Mex.

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° 11' 42" N, 100° 07' 52" O), se sembraron las mazorcas de medios hermanos, se autofecundaron las mejores plantas y se obtuvo la semilla C<sub>0</sub>-S<sub>1</sub>. 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<sub>1</sub> recurrente recombinando las familias S<sub>1</sub> en el ciclo primavera-verano en Hidalgo y generando nuevas líneas S<sub>1</sub> en el ciclo otoño-invierno en Valle de Bravo, Méx.

En 2009 se completaron dos ciclos de mejoramiento obteniéndose semilla C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>, 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<sub>2</sub>-S<sub>1</sub>, las cuales se recombinaron y autofecundaron y se obtuvo semilla C<sub>3</sub> y C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>. Para obtener la semilla C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>, se seleccionaron las mejores líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> 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<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>. Después de cosecha, semillas de 123 y 114 mazorcas C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> de endospermo blanco y amarillo, respectivamente, se inocularon, se sembraron en invernadero y se evaluaron por su resistencia al patógeno.

In 2009, two breeding cycles were completed, resulting in C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> seed with a total of 258 lines of white endosperm, and 71 lines of yellow endosperm. In these lines, the response to infection by *S. reilianum* f. sp. *zeae* was evaluated by artificial inoculation of seeds and crops in greenhouse conditions.

In 2010, in the state of Hidalgo, C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines were planted and were simultaneously recombined and self-pollinated, resulting in C<sub>3</sub> and C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> seeds. To obtain the C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> seed, six or seven plants of the best artificially inoculated C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines were selected based on agronomic traits with a pressure of selection to head smut with 0 to 7.7% of incidence in the lines of white endosperm and 0 to 12.5% in the lines of yellow endosperm. After harvest, seeds from 123 and 114 C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> ears with white or yellow endosperm, respectively, were inoculated, planted in the greenhouse, and evaluated for resistance to the pathogen.

### Pathogen

The study used *S. reilianum* f. sp. *zeae* teliospores obtained from tassels and ears of maize plants infected in natural conditions in the state of Hidalgo. The teliospores were disinfested in a 1% CuSO<sub>4</sub> solution for 24 h, washed with three changes of sterile distilled water and recovered in filter paper for drying.

To determine the viability of the inoculum, a suspension of teliospores was prepared with a concentration of 50 000 teliospores mL<sup>-1</sup> in sterile distilled water and 0.5 mL of this suspension was spread in Petri dishes with a PDA medium. The dishes were incubated at 25 °C in darkness. The percentage of germination was determined after 96 h counting 4 compound microscope fields (40X), and the percentage of germinated teliospores was recorded.

## 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 desinfectaron en una solución de 1% de  $\text{CuSO}_4$  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  $\text{mL}^{-1}$  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  $1.7 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  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 °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  $5.08 \text{ dSm}^{-1}$ , 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

## Inoculation of the host

A suspension of teliospores at a concentration of  $1.7 \times 10^7$  spores  $\text{mL}^{-1}$  was prepared in sterile distilled water with sodium carboxymethylcellulose as a sticker (NaCMC; Droguería Metropolitana, Mexico, D. F.). Twenty two seeds of each maize line, were submerged for 1 min in this suspension of teliospores and dried at 22 °C during 48 h. As a control and source of comparison, seed of the susceptible hybrid AS-910 was used.

The inoculated seeds were planted in pots with sterilized soils at a depth of 2 cm. The soil had a pH of 8.0, electric conductivity of  $5.08 \text{ dSm}^{-1}$ , 3.23% of organic matter and a sandy-loam texture (sand 75.6%, lime 14.5%, and clay 9.9%). The pots (40 cm wide x 40 cm high) were placed in a greenhouse and distributed in a completely randomized. The treatments were 123 lines of white endosperm and 114 of yellow endosperm. The experimental unit was a pot with 22 plants and 2 repetitions per treatment. After planting, the pots were watered at field capacity. Temperature and moisture in the greenhouse and soil were taken with a data recorder (WatchDog Micro Station, Spectrum Technologies Inc.).

## Evaluation of the incidence of the disease

In  $C_2-S_1$  and  $C_2-S_2$  lines, resistance and susceptibility were recorded during flowering by visual observation of the symptoms of smut, both in the ear and tassel of the plants of each line. A plant was considered as susceptible when presented sori in the ear, tassel, or both.

The percentage of incidence was determined as the quotient between plants with symptoms and the total of plants in the experimental unit, multiplied by 100; later, these values were transformed by arcsine to homogenize the variances. According to

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  $C_2-S_1$  y  $C_2-S_2$ , 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. *zeae* 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. *zeae* 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

the incidence, the lines were classified according to the following scale: 0%=highly resistant, 11-25%= moderately resistant, 26-50%= moderately susceptible, 51-75%= susceptible, and 76-100%= highly susceptible. The data were analyzed using the SAS analysis system and a mean comparison.

## RESULTS AND DISCUSSION

The *S. reilianum* f. sp. *zeae* teliospores used as an inoculum presented a germination of 31% after 96 h of incubation in darkness at 25 °C. The infection by *S. reilianum* f. sp. *zeae* was identified by the presence of sori in the ears, where kernels were replaced by masses of teliospores. In infected plants, ears were small (Figure 1A), with the proliferation of bracts and presence of the black masses of teliospores. To observe the infection in the ear, it was necessary to cut them in half lengthwise; in infected ears, teliospores developed inside these sori, grouped in a black mass (Figure 1B). The symptoms and signs observed in the tassel and ear coincide with those reported by White (1999) and Baggett and Kean (1989).

The plants developing symptoms and signs determined the percentage of incidence of the disease in the  $C_2-S_1$  and  $C_2-S_2$  lines evaluated.

### Evaluation of incidence in lines $C_2-S_1$

In the lines with white endosperm, only one was highly susceptible to the disease, with an incidence of 92.3%. In the yellow endosperm lines, the highest incidence values were moderately susceptible with 28.6, 30, 33.3, and 40%. The frequency of the disease in the 258  $C_2-S_1$  lines with white endosperm and 71  $C_2-S_1$  lines with yellow endosperm is shown in Figures 1 and 2, and the analysis of variance included in Table 1, showing



**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. *zear* de  $1.7 \times 10^7$  teliosporas  $\text{mL}^{-1}$  a 1% de carboximetilcelulosa de sodio y sembradas en invernadero. A) Formación de soros en la espiga. B) Formación de soros en la mazorca.

**Figure 1.** Symptoms and signs of head smut present in maize plants after seeds were inoculated with a suspension of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* with  $1.7 \times 10^7$  teliospores  $\text{mL}^{-1}$  in a 1% sodium carboxymethylcellulose and planted in the greenhouse. A) Formation of sori in the tassel. B) Formation of sori in the ear.

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).

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 $C_2-S_1$

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  $C_2-S_1$  de endospermo blanco y 71 líneas  $C_2-S_1$  de endospermo amarillo se presenta en las Figuras 2 y 3 y

that only one line with white endosperm presented an average incidence value of 92.3%, higher than the control, with incidence of 77.8% of the disease.

In the greenhouse, average temperatures for soil and environment were 19.4 and 22.1°C, respectively, and a relative humidity of 70%, adequate conditions for the development of the disease.

Lines with the greatest susceptibility to the disease had up to 92.3 and 40% of incidence in white or yellow endosperm maize, respectively. These results suggest that maize with white endosperm is more susceptible than those with yellow endosperm.

The frequency of the disease in the 258 inoculated lines with white endosperm was: 106 lines (41.1%) did not show the disease, 47 (18.2%) had an incidence of 1-10%, 58 (22.5%) with an incidence of 11-20%, 46 (17.8%) with an incidence of 21-70%, only one line had an average incidence value of 92.3%, greater than in the control which had a value of 77.8% of disease incidence.

In the case of the 71  $S_1$  yellow endosperm lines, the distribution of the incidence was: 35 lines



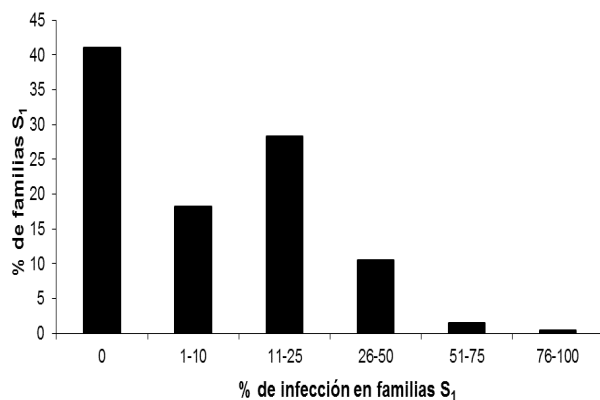


Figura 2. Frecuencia de la incidencia de carbón de la espiga en líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> de endospermo blanco.  
Figure 2. Frequency distribution of incidence of head smut in C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with white endosperm.

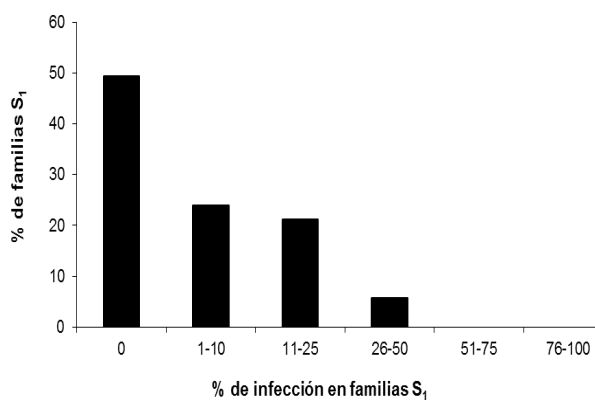


Figura 3. Frecuencia de la incidencia de carbón de la espiga en líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> de endospermo amarillo.  
Figure 3. Frequency distribution of incidence of head smut in C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with yellow endosperm.

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.

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.

(49.3%) did not show the disease, 17 (23.9%) had an incidence of 1-10%, 13 (18.3%) had an incidence of 11-20%, and 6 (8.4%) had an incidence of 21-40%. In the greenhouse, the average temperature values

Cuadro 1. Respuesta de líneas S<sub>1</sub> de endospermo blanco y amarillo a la infección por carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) con inoculación artificial de la semilla.

Table 1. Response of S<sub>1</sub> lines with white or yellow endosperm to the infection of head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) with artificial seed inoculation.

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 <sup>2</sup>	0.89	0.84

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 $C_2$ - $S_2$

La mayor incidencia del carbón de la espiga en líneas  $C_2$ - $S_2$  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  $S_2$  de endospermo blanco y amarillo se presenta en las Figuras 4 y 5. El análisis de varianza se muestra en el Cuadro 2.

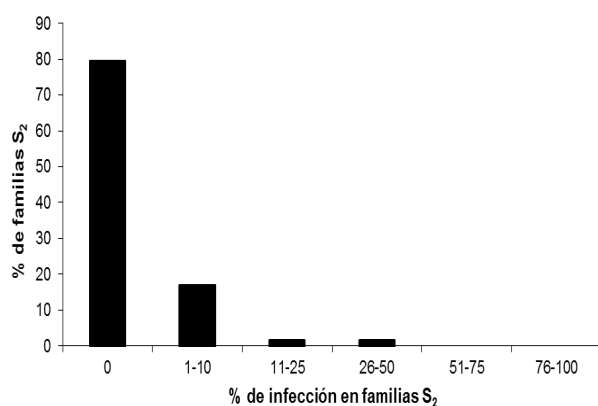


Figura 4. Distribución de la incidencia de carbón de la espiga en líneas  $C_2$ - $S_2$  de endospermo blanco.

Figure 4. Frequency distribution of incidence of head smut in  $C_2$ - $S_1$  lines with white endosperm.

were 19.4 and 22.1 °C for soil and environment, respectively, and a relative humidity of 70%. These values were favourable for disease development.

### Evaluation of incidence in $C_2$ - $S_2$ lines

The highest head smut incidence in the tassel in  $C_2$ - $S_2$  lines with white endosperm was 42.8% and up to 28.5% in yellow endosperm lines, whereas in the control the incidence was 86.1%.

Out of the 123 lines with white endosperm, 98 (79.7%) did not show the disease and in the 114 yellow endosperm lines, 84 (73.7%) did not show the disease (Table 2). The frequency of the disease in  $C_2$ - $S_2$  lines with white and yellow endosperm is shown in Figures 3 and 4. The analysis of variance is shown in Table 2.

In the greenhouse, during the development of this study, average temperatures of 18.47 °C and 21.61 °C were recorded in the soil and in the environment, respectively, and an average relative humidity of 69.76%.

The response of maize plants to infection by *S. reilianum* f. sp. *zea* has been evaluated with

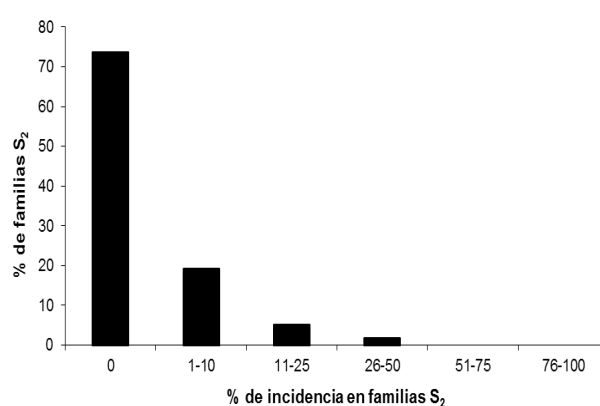


Figura 5. Distribución de la incidencia de carbón de la espiga en líneas  $C_2$ - $S_2$  de endospermo amarillo.

Figure 5. Frequency distribution of incidence of head smut in  $C_2$ - $S_1$  lines with yellow endosperm.

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%.

La respuesta de plantas de maíz a la infección de *S. reilianum* f. sp. *zeae* ha sido evaluada con el objetivo de identificar germoplasma resistente. Para esto se 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  $1.7 \times 10^7$  teliosporas mL<sup>-1</sup> (Quezada *et al.*, 2013), y se obtuvieron incidencias en líneas C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> 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<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> a C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>, 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),

**Cuadro 2. Respuesta de líneas C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> de endospermo blanco y amarillo a la infección por carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) bajo inoculación artificial de la semilla.**

**Table 2. Response of C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> lines with white or yellow endosperm to the infection of head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*) with artificial seed inoculation.**

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 <sup>2</sup>	0.92	0.97

the aim of identifying resistant germplasm. To do this, different seed inoculation methods have been used. Njuguna and Odhianbo (1989) reported incidences of up to 62.8% when placing teliospores on the seeds at planting time. Stromberg *et al.* (1984), after inoculating the seeds with substrates contaminated with teliospores, obtained maximum incidences of 56% and 35.5% in maize lines and hybrids, respectively. In this study, seed inoculation was done with a 1% NaCMC solution and  $1.7 \times 10^7$  teliospores mL<sup>-1</sup> (Quezada *et al.*, 2013), producing up to 92.3% incidences in C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines with white endosperm and up to 40% in those with yellow endosperm. Using seed inoculation, it is possible to simulate the natural conditions of the infection, ensuring that the pathogen is in direct contact with the host during the seed germination process (Prom *et al.*, 2011).

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

When advancing the C<sub>2</sub>-S<sub>1</sub> lines to C<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>, the proportion of lines with some degree of incidence decreased, and the proportion of lines with an incidence of 0% increased from 41.1 to 79.7% and from 49.3 to 73.7%, in maize with white or yellow endosperm, respectively. These results show that this method of inoculation leads to higher levels of infection and reliable selection in a program for the selection of germplasm resistant to head smut and helps in identifying lines with different response to infection. In this study, the presence or absence of sori in the ear or tassel was used as an indicator of the resistance or susceptibility. According to Zhao *et al.* (2015), resistance is determined by the suppression of the invasion of tissues inside the plant and not with the suppression of pathogen penetration.

Not only is important to rely in an efficient inoculation method, but temperature and soil humidity are also important factors in the epidemic. In this study, an excellent germination of teliospores was determined resulting in an infection at 18.47 and 19.4 °C, which differs with Matyac and Kommedahl (1985a), and Baier and Krüger (1962), who report that temperatures ranging between 23 and 30 °C are ideal for the germination of teliospores and seedling infection. In this study, the results obtained can be explained by the lower temperatures in the Central Mexican Highlands, where the disease is present at seed germination and first stages of development of the seedlings, the crucial stages for the infection, or by the presence of different genetic backgrounds with different behavior depending on the weather conditions and the genotype of the host (Pecina *et al.*, 2004). The average soil humidity remained at 26.18 kPa, equivalent to 0.2618 bar, resulting in an incidence of up to 92.3% in the first cycle of evaluation. This level of humidity is different to reports by Matyac and Kommedahl (1985a), who stated that a soil

agronómico y resistencia genética al carbón, además de ser incorporadas en programas de mejoramiento genético para resistencia al carbón de la espiga en el Estados 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 germoplasma 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. *zeae* 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. *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-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

humidity of 1.5 bar leads to a greater number of infected plants, with incidences of 32%.

In most maize genetic improvement programs, evaluations and selection against diseases are done under field conditions. This study showed that it is possible to combine the use of a greenhouse (greater selection pressure in controlled conditions) while perform breeding work in the field only with germplasm that has previously been evaluated and selected in the greenhouse.

Finally, the lines selected in this study have been used in the formation of synthetic varieties with a good agronomic behavior and resistance to head smut, as well as being incorporated into breeding programs for resistance to head smut in the states of Mexico and Hidalgo.

## CONCLUSIONS

The S1 recurrent selection program proves to be efficient in generating and selecting lines with different degrees of susceptibility to head smut.

The technique of inoculation used was efficient in the discrimination of resistant and susceptible germplasm.

The selection of maize lines in the field with desirable agronomic characters and evaluation of infection with *S. reilianum* f. sp. *zeae* in the greenhouse are complementary methodologies for the generation of resistant lines in a genetic improvement program.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the projects PM 0531 and PM 0542 “Development of maize (*Zea mays*) cultivars for the Mexican Highlands with high yield and resistance to head smut (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*)”, financed by the General Board for Plant Health of the National Food Health, Safety and Quality

- Fitopatología. 29:39-49. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092011000100004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000100004)
- 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](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](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. 2<sup>nd</sup> 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](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](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%2Fsf001220051273>
- 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>
- Service (SENASICA). To the National Science and Technology Council (CONACYT), for scholarship number 176171 for the main author.

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

- 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](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-%20202%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 A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> cytoplasm. *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\\_Cytoplasm](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_Cytoplasm)

- 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](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](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](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>