



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

INVESTIGACIÓN DE LA DIVERSIDAD DEL PATÓGENO
Exserohilum turcicum, CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD
DEL TIZÓN NORTEÑO DE MAÍZ EN MÉXICO

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

CARLOS MUÑOZ ZAVALA



APROBADA



Bajo la supervisión de: **Dr. SANTOS GERARDO LEYVA MIR**



CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DEL 2020

**INVESTIGACIÓN DE LA DIVERSIDAD DEL PATÓGENO
Exserohilum turcicum, CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD
DEL TIZÓN NORTEÑO DE MAÍZ EN MÉXICO**

Tesis realizada por **CARLOS MUÑOZ ZAVALA** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

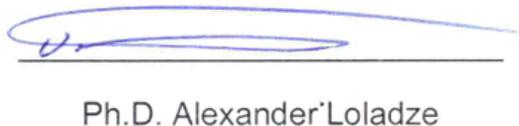
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Director:



Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

Asesor:



Ph.D. Alexander Loladze

Asesor:



Dr. Mateo Vargas Hernández

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, A DICIEMBRE DEL 2020.

RESUMEN GENERAL

INVESTIGACIÓN DE LA DIVERSIDAD DEL PATÓGENO *Exserohilum turcicum*, CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD DEL TIZÓN NORTEÑO DE MAÍZ EN MÉXICO. ¹

Exserohilum turcicum, es un ascomiceto hemibiotrófico, que causa una enfermedad foliar grave en maíz con distribución cosmopolita. Algunas cepas del hongo producen una fitotoxina no específica llamada monocerina que desarrolla una necrosis foliar, provocando la inhibición de la síntesis de clorofila y reducción del tamaño de las raíces en maíces susceptibles. Las razas fisiológicas de *E. turcicum* se denominan en base a los monogenes resistentes *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *HtN*). El principal inconveniente de la resistencia monogénica es la amenaza de nuevas razas del patógeno con virulencia diferente que rompan la resistencia en la planta. Por lo que, el objetivo de la presente investigación fue identificar la diversidad racial del hongo *E. turcicum* en México para posteriormente evaluar la toxina en maíces mejorados por CIMMYT con resistencia poligénica. Los resultados revelaron 6 razas presentes en México, siendo la raza 23 la dominante. También se confirmó la importancia de la toxina monocerina en la infección por el hongo *E. turcicum*, así como la identificación de 10 líneas endogámicas con resistencia monogénica y poligénica para uso en los programas de mejoramiento y estudios moleculares.

Palabras claves: *Exserohilum turcicum*, monocerina, razas fisiológicas, diferenciales, resistencia monogénica.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias, Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Carlos Muñoz Zavala
Director de Tesis: Santos Gerardo Leyva Mir

GENERAL ABSTRACT

RESEARCH OF THE DIVERSITY OF THE PATHOGEN *Exserohilum turcicum*, CAUSING THE NORTHERN CORN BLIGHT DISEASE IN MEXICO.²

Exserohilum turcicum, is a hemibiotrophic ascomycete, which causes severe foliar disease in corn with a cosmopolitan distribution. Some strains of the fungus produce a non-specific phytotoxin called monocerin that develops foliar necrosis, causing the inhibition of chlorophyll synthesis and reduction of the size of the roots in susceptible genotypes. The physiological races of *E. turcicum* are referred to base on the *Ht* resistant monogenes (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *HtN*). The main drawback of monogenic resistance is the threat of new strains of the pathogen with different virulence that break the resistance in the plant. Therefore, the objective of this research was to identify the racial diversity of *E. turcicum* fungus in Mexico and subsequently evaluate the toxin in CIMMYT maize lines with polygenic resistance. The results revealed 6 races present in Mexico, with the 23 race dominant. The importance of monocerin toxin in *E. turcicum* fungal infection was also confirmed, as well as the identification of 10 endogamous lines with monogenic and polygenic resistance for use in breeding programs and molecular studies

Key words: *Exserohilum turcicum*, monocerin, physiological races, differentials, monogenic resistance.

² Tehsis: Plant Protection, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Carlos Muñoz Zavala
Advisor: Santos Gerardo Leyva Mir

Índice de contenido

RESUMEN GENERAL	i
GENERAL ABSTRACT	ii
Índice de contenido	iii
Índice de cuadros.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Dedicatoria.....	ix
Agradecimientos	x
Datos biográficos	xi
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Fundamentos y Planteamiento de la tesis	1
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Objetivo general	3
1.4. Objetivos específicos.....	3
1.5. Estructura de la tesis	4
1.6. Literatura	5
Capítulo 2: REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1. Historia y origen del maíz	7
2.2. La importancia del maíz en el mundo	7
2.3. La producción de maíz en México	7
2.4. Factores limitantes para la producción potencial del cultivo de maíz	8
2.5. El tizón foliar causado por <i>Exserohilum turcicum</i> (Leonard & Suggs), antes <i>Helminthosporium turcicum</i> (Passerini), Teleomorfo: <i>Setosphaeria turcica</i> (Luttrell) .	8
2.5.1. Epidemiología y sintomatología	10
2.6. Formas especiales de <i>E. turcicum</i>	12
2.7. Razas fisiológicas.....	13
2.8. Resistencia específica a razas, cualitativa, vertical o monogénica.....	15
2.9. Resistencia no específica, cuantitativa, horizontal o poligénica	17
2.10. Toxinas	17
2.10.1. Monocerina.....	18
2.11. Literatura.....	20

Capítulo 3: DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE LAS RAZAS FISIOLÓGICAS DE *Exserohilum turcicum* PRESENTES EN MÉXICO 25

3.1. Resumen	25
3.2. Introducción.....	25
3.3. Materiales y métodos.....	3
3.3.1. Colección de cepas de <i>E. turcicum</i>	3
3.4.2. Aislamientos de lesiones con <i>E. turcicum</i>	4
3.4.3. Obtención de cultivos puros.....	5
3.4.4. Obtención de los diferenciales <i>Ht</i>	6
3.4.5. Determinación de razas fisiológicas de <i>E. turcicum</i>	7
3.4.6. Análisis de datos	9
Resultados	10
3.3.2. Postulación de genes	10
3.5.2. Distribución de las razas fisiológicas de <i>E. turcicum</i>	15
3.5.3. Frecuencia de las razas fisiológicas de <i>E. turcicum</i>	17
3.5.4. Frecuencia de virulencia de los aislamientos en los diferenciales <i>Ht</i>	17
3.4. Discusión.....	18
3.7. Conclusiones.....	19
3.8. Literatura	20

Capítulo 4: EVALUACIÓN DE LA TOXINA MONOCERINA PRODUCIDA POR *Exserohilum turcicum* EN MAÍZ 23

4.1. Resumen	23
4.2. Introducción.....	23
4.3. Materiales y métodos.....	25
4.3.1. Medios de cultivo líquido	25
4.3.2. Aislamiento de cepa de <i>E. turcicum</i>	26
4.3.3. Purificación de la toxina monocerina	28
4.3.4. Tratamientos para evaluar monocerina	29
4.3.5. Bioensayo.....	29
4.4. Resultados	29
4.4.1. Medio de cultivo Fries.....	29
4.4.2. Edad de las plántulas	30

4.4.3.	Bioensayos de monocerina en plántulas	30
4.5.	Discusión.....	32
4.6.	Conclusiones.....	32
4.7.	Literatura	33
Capítulo 5: LÍNEAS DE MAÍZ CON RESISTENCIA MONOGÉNICAS Y POLIGÉNICAS A <i>Exserohilum turcicum</i>		36
5.1.	Resumen.....	36
5.2.	Introducción.....	36
5.3.	Materiales y métodos.....	3
5.3.1.	Aislamientos de <i>E. turcicum</i>	3
5.3.2.	Toxina monocerina	4
5.3.3.	Material genético	5
5.3.4.	Bioensayos con el hongo <i>E. turcicum</i>	8
5.3.5.	Bioensayos con la toxina monocerina.....	8
5.4.	Resultados	9
5.4.1.	Reacción de virulencia.....	9
5.4.2.	Reacción de toxicidad.....	11
5.5.	Discusión.....	13
5.6.	Conclusiones.....	14
5.7.	Literatura	15

Índice de cuadros

CUADRO 1. NOMENCLATURA PARA DETERMINAR 16 RAZAS FISIOLÓGICAS DE <i>E. TURCICUM</i> UTILIZANDO CUATRO DIFERENCIALES <i>HT</i> (<i>HT1, HT2, HT3 Y HTN</i>) (LEONARD ET AL., 1989).....	14
CUADRO 2. LOCALIDADES POR REGIÓN Y AMBIENTE DE LOS 140 ASILAMIENTOS OBTENIDOS DE LESIONES NATURALES DE <i>E. TURCICUM</i> EN MÉXICO.	6
CUADRO 3. DIFERENCIALES UTILIZADOS PARA IDENTIFICAR LAS RAZAS FISIOLÓGICAS DE <i>E. TURCICUM</i> PRESENTES EN MÉXICO.....	6
CUADRO 4. ESCALA DE EVALUACIÓN VISUAL DE 0 A 5 EN LOS DIFERENCIALES <i>HT</i> (MUIRU ET AL., 2010).	8
CUADRO 5. POSTULACIÓN DE GENES DE LAS MUESTRAS EN LOS 8 PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE MAÍZ EN MÉXICO EN EL CICLO AGRÍCOLA 2019.....	11
CUADRO 6. POSTULACIÓN DE GENES DE LAS MUESTRAS PARA EL HISTORIAL 2010 A 2019 EN AMBIENTE TEMPLADO CIMMYT- EL BATAN, ESTADO DE MÉXICO.	12
CUADRO 7. POSTULACIÓN DE GENES DE LAS MUESTRAS PARA EL HISTORIAL 2010 A 2019 EN AMBIENTE TROPICAL CIMMYT- AGUA FRÍA, VERACRUZ.	13
CUADRO 8. RESUMEN DE LAS 6 RAZAS FISIOLÓGICAS DE <i>E. TURCICUM</i> PRESENTES EN LOS 8 PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE MAÍZ EN MÉXICO EN EL CICLO AGRÍCOLA 2019.	15
CUADRO 9. RESUMEN DE LAS RAZAS FISIOLÓGICAS DE <i>E. TURCICUM</i> PRESENTES EN EL HISTORIAL 2010 A 2019 EN AMBIENTE TEMPLADO CIMMYT- EL BATAN, ESTADO DE MÉXICO.	16
CUADRO 10. RESUMEN DE LAS RAZAS FISIOLÓGICAS DE <i>E. TURCICUM</i> PRESENTES EN EL HISTORIAL 2010 A 2019 EN AMBIENTE TROPICAL CIMMYT- AGUA FRÍA, VERACRUZ.....	16
CUADRO 11. RAZAS FISIOLÓGICAS DE <i>E. TURCICUM</i> UTILIZADAS EN LOS BIOENSAYOS CON EL HONGO <i>E. TURCICUM</i> Y LA TOXINA MONOCERINA.	4
CUADRO 12. LISTA DE 60 LÍNEAS ENDOGÁMICAS PREVIAMENTE CARACTERIZADAS A LA REACCIÓN DE LA ENFERMEDAD DEL TIZÓN FOLIAR EN VARIOS CAMPOS EXPERIMENTALES POR EL CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAÍZ Y TRIGO (CIMMYT).	6
CUADRO 13. REACCIÓN DE INFECCIÓN EN LAS 60 LÍNEAS ENDOGÁMICAS DE CIMMYT A LAS 6 RAZAS (2, 3, 23, 3N, 23N Y 123N) DE <i>E. TURCICUM</i> PRESENTES EN MÉXICO, 2019.....	10
CUADRO 14. MEDIAS DE LA VIRULENCIA CAUSADA POR EL HONGO <i>E. TURCICUM</i> Y TOXICIDAD POR MONOCERINA EN 10 LÍNEAS CON RESISTENCIA MONOGÉNICA Y POLIGÉNICA A LAS RAZAS (2, 3, 23, 3N, 23N Y 123N).	12

Índice de figuras

FIGURA 1. SÍNTOMAS EN HOJAS DE MAÍZ DEL TIZÓN FOLIAR DE COLOR CAFÉ EN FORMA DE CIGARRILLO CAUSADO POR EL HONGO <i>EXSEROHILUM TURCICUM</i> ... 11	11
FIGURA 2. CICLO DE LA ENFERMEDAD DEL TIZÓN FOLIAR CAUSADO POR EL HONGO <i>EXSEROHILUM TURCICUM</i> Y SU TELEOMORFO <i>SETOSPHAERIA TURCICA</i> 12	12
FIGURA 3. ENSAMBLAJE DE LA BIOSÍNTESIS POR LA TOXINA MONOCERINA (WEERASOORIYA Y CROSBY, 2007)..... 19	19
FIGURA 4. UBICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE HOJAS INFECTADAS CON LESIONES DE <i>E. TURCICUM</i> EN LOS 10 PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE MAÍZ EN MÉXICO, 2019. 4	4
FIGURA 5. INCREMENTO DE SEMILLA DE LOS DIFERENCIALES <i>HT</i> , EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE CIMMYT EN AGUA FRÍA, PUEBLA OI2019..... 7	7
FIGURA 6. ESCALA DE EVALUACIÓN VISUAL DE 0 A 5 EN LOS DIFERENCIALES <i>HT</i> (MUIRU <i>ET AL.</i> , 2010), DONDE 0 A 3 ES UNA REACCIÓN DE RESISTENTES (R) Y 4 A 5 ES SUSCEPTIBLES (S) EN LOS DIFERENCIALES <i>HT</i> 9	9
FIGURA 7. LAS SEIS RAZAS FISIOLÓGICAS DE <i>E. TURCICUM</i> IDENTIFICADAS EN MÉXICO 2019; A) RAZA 2 (<i>HT1 HT3 NTN / HT2</i>), B) RAZA 3 (<i>HT1 HT2 NTN / HT3</i>), C) RAZA 23 (<i>HT1 NTN / HT2 HT3</i>), D) RAZA 3N (<i>HT1 HT2 / HT3 NTN</i>), E) RAZA 23N (<i>HT1 / HT2 HT3 NTN</i>) Y F) RAZA 123N (0 / <i>HT1 HT2 HT3 NTN</i>). NOTA: EL DIFERENCIAL RECESIVO <i>HT4</i> AUSENTE DE LOS MONOGENES DE RESISTENCIA <i>HT</i> , MOSTRÓ SÍNTOMAS DE <i>E. TURCICUM</i> EN LOS 140 AISLAMIENTOS Y SIRVIÓ DE INDICADOR PARA CORROBORAR QUE LA CONCENTRACIÓN DE ESPORAS Y LAS CONDICIONES CLIMÁTICAS FUERON LAS ADECUADAS..... 14	14
FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN DE LAS RAZAS FISIOLÓGICAS PRESENTES EN MÉXICO. LA RAZA 23 FUE LA DOMINANTE CON UNA REPRESENTACIÓN TOTAL DE 68 PORCIENTO DE N = 140 AISLAMIENTOS INDIVIDUALES DE <i>E. TURCICUM</i> 17	17
FIGURA 9. DISTRIBUCIÓN DE VIRULENCIA DE LAS RAZAS EN LOS DIFERENCIALES <i>HT</i> (<i>HT1</i> , <i>HT2</i> , <i>HT3</i> Y <i>NTN</i>). LOS VALORES CORRESPONDEN A LOS AISLAMIENTOS INDIVIDUALES DE <i>E. TURCICUM</i> (N = 140)..... 18	18
FIGURA 10. ABSORCIÓN Y SEVERIDAD EN ESCALA DE 1 A 5 (1 = PLÁNTULA SANA, 2 = PLÁNTULA MARCHITA, 3 = HOJAS ENROLLADAS, 4 = HOJAS CON PUNTAS QUEMADAS Y 5 = PLÁNTULA COMPLETAMENTE QUEMADA) CON 11 MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO. LOS MEDIOS DE TEJIDO, FRIES Y SNA MOSTRARON MAYOR ABSORCIÓN Y MENOR MARCHITAMIENTO DE PLÁNTULAS. 27	27

FIGURA 11. ABSORCIÓN Y SEVERIDAD EN ESCALA DE 1 A 5 EN PLÁNTULAS CON SOLO AGUA. LOS PROCEDIMIENTOS CON TUBO NUEVO Y ESTERILIZANDO EL TALLO CON ALCOHOL MOSTRARON MAYOR ABSORCIÓN Y MENOR MARCHITAMIENTO DE PLÁNTULAS.....	27
FIGURA 12. LIOFILIZACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS: B) CON LA TOXINA, MEDIO FRIES Y SOLO AGUA. NÓTESE: LOS RESIDUOS DE LA SACAROSA (COLOR BLANCO AL FONDO DE LOS TUBOS) UTILIZADOS COMO NUTRIENTE EN EL MEDIO DE FRIES EN COMPARACIÓN CON SOLO AGUA QUE NO MUESTRA RESIDUOS AL FINALIZAR LA LIOFILIZACIÓN.....	28
FIGURA 13. BIOENSAYO DE LA TOXINA MONOCERINA EN GENOTIPO A619HT4 SUSCEPTIBLE A <i>E. TURCICUM</i> CON 4 TRATAMIENTOS A LAS 48 H DE INCUBACIÓN: A). TOXINA PURA, B). PURIFICACIÓN DE LA TOXINA UTILIZANDO METANOL COMO DISOLVENTE, C) SOLO MEDIO FRIES MODIFICADO, D) CONTROL CON SOLO AGUA. NÓTESE: EL TRATAMIENTO CON SOLO MEDIO FRIES (C) QUE NO MUESTRA MARCHITAMIENTO Y SE OBSERVA SIMILAR AL TRATAMIENTO CONTROL (D).	31
FIGURA 14. BIOENSAYO DE LA TOXINA MONOCERINA EN GENOTIPO CML495 RESISTENTE A <i>E. TURCICUM</i> CON 4 TRATAMIENTOS: A). TOXINA PURA, B). PURIFICACIÓN DE LA TOXINA UTILIZANDO METANOL COMO DISOLVENTE, C) SOLO MEDIO FRIES MODIFICADO, D) CONTROL CON SOLO AGUA. NÓTESE: EL TRATAMIENTO CON TOXINA PURA (A) MUESTRA HOJAS CON PUNTAS QUEMADAS AUN EN GENOTIPO RESISTENTE Y CUANDO LA TOXINA SE PURIFICÓ (B) NO SE OBSERVA MARCHITAMIENTO CON SIMILITUD A LOS CONTROLES (C Y D).	31
FIGURA 15. DESARROLLO DE LAS SEIS RAZAS FISIOLÓGICAS (2, 3, 23, 3N, 23N, 123N) EN EL MEDIO NUTRITIVO FRIES MODIFICADO PARA LA PRODUCCIÓN DE LA TOXINA MONOCERINA. NÓTESE, AL INICIO EL CONTROL CON SOLO MEDIO FRIES SIN DESARROLLO DEL HONGO.	5
FIGURA 16. REACCIÓN DE INFECCIÓN EN LAS LÍNEAS RESISTENTES (PARTE SUPERIOR) Y TESTIGOS A <i>E. TURCICUM</i> (PARTE INFERIOR). NÓTESE: LA INMUNIDAD EN LA CML474 Y CML483, ASÍ COMO LAS LÍNEAS RESISTENTES QUE SUPERARON AL TESTIGO 89LMBR.	9
FIGURA 17. BIOENSAYOS <i>IN VITRO</i> CON LA TOXINA MONOCERINA EN 60 GENOTIPOS PREVIAMENTE EVALUADOS EN CAMPO A LA REACCIÓN DE <i>E. TURCICUM</i>	12
FIGURA 18. CORRELACIÓN ENTRE LA VIRULENCIA CAUSADO POR <i>E. TURCICUM</i> Y LA TOXICIDAD POR MONOCERINA. LOS VALORES USADOS FUERON LAS MEDIAS DE 60 LÍNEAS DE CIMMYT CON RESISTENCIA POLIGÉNICA A TIZÓN FOLIAR EN CAMPO.	13

Dedicatoria

A mi hijo **Carlos Alexis** como regalo de sus 14 primaveras le brindo la presente.

También a mi princesa **Yesica Itzel** y **mi familia** por apoyarme y estar siempre cuando los necesito.

Al Dr. **Dan Jeffers** que me brindo su confianza y conocimientos en el área de fitopatología en CIMMYT. Así como: Ing. **Leocadio Martínez**, Dr. **George Mahuku**, Dr. **Santiago Mideros** y Dr. **Henry Ngugi** por apoyarme en mi crecimiento profesional y laboral.

Al exfitopatólogo de CIMMYT y profesor del COLPOS Dr. **Carlos de León** por darme el curso de Conceptos Fitopatológicos y revisar mi anteproyecto. Mi tocayo me enseñó que también los mexicanos como excelentes investigadores que podemos ser reconocidos internacionalmente.

Al M.C. **Javier Flores** por recomendarme esta extraordinaria Maestría en "Protección Vegetal". Javi, gracias por su amistad y por enseñarme que no existe edad para superarse en la vida.

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para llevar a cabo mis estudios durante el posgrado.

Al programa de la **Maestría en Ciencias en Protección Vegetal** perteneciente al departamento de **Parasitología Agrícola** de la **Universidad Autónoma Chapingo** (UACH) por apoyarme en mi desarrollo profesional.

Al **Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo** (CIMMYT), por darme la oportunidad de contribuir a la ciencia con mi trabajo de investigación.

Al Dr. **Santos Gerardo Leyva Mir**, por su confianza, consejos y apoyo brindado durante todo el periodo de mis estudios de posgrado y la investigación.

Al fitopatólogo Dr. **Aleksandre Loladze**, por darme ese empujón que necesitaba para crecer verticalmente. También por proponerme y orientarme en este gran trabajo de investigación. Dr. Sandro siempre le estaré muy agradecido.

Al Dr. **Mateo Vargas Hernández**, por sus consejos en el desarrollo e interpretación de la parte estadística y logística para darle un plus a mi trabajo de investigación.

También al Dr. **Paul H. Goodwin**, por apoyarme en toda la parte de investigación con la toxina monocerina.

Así como al coordinador del posgrado el M.C **Antonio Segura Miranda** por confiar en mí. Profesor nunca olvide que se le quiere y admira mucho.

A la Dra. **Carmen Velazquez** (CORTEVA) por su amistad y apoyo de las colectas en Sinaloa y Jalisco, así como a los técnicos del programa **MasAgro** en las colectas en las diferentes localidades de México.

Al Dr. **Pawan Singh** por brindarme parte de su invernadero para finalizar las actividades de evaluación en los tiempos de pandemia por COVID-19.

Por último, pero igual de importante a mis **14 compañeros** de posgrado. Muchas gracias a cada uno de ustedes por su tiempo, paciencia y apoyo brindado, saben que en mí siempre tendrán un amigo. ¡Les deseo mucho éxito, salud y amor en su vida personal y profesional!..... ¡Animo chavalones!!

Datos biográficos



Datos personales

Nombre: Carlos Muñoz Zavala

Fecha de nacimiento: 06 de septiembre de 1977

Lugar de nacimiento: Tepetlaoxtoc, Edo. de Méx.

Profesión: Licenciatura en Ciencias Agrícolas

Cédula profesional: 11049604-C1

Experiencia Laboral y Profesional

20 años de experiencia adquirida en el desarrollo de protocolos para el fenotipo de las principales enfermedades y plagas en el cultivo de maíz dentro de la unidad de fitopatología en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Fundamentos y Planteamiento de la tesis

Los estreses bióticos, como las enfermedades y los daños causados por insectos, siguen siendo un importante factor que limita la productividad del maíz en México. Se estima que, en promedio, las pérdidas en el rendimiento global de maíz causadas por enfermedades, es aproximadamente de 13% (Oerke, 2005). En México, esto equivale a 3.47 Mt, de acuerdo con los estimados de producción de 26.7 Mt en 2019 (SIAP, 2020). Sin embargo, las enfermedades a nivel individual suelen causar pérdidas más cuantiosas en determinadas localidades, debido a la influencia cambiante de las condiciones climáticas y las prácticas de manejo agronómico.

En México, cada año se presenta el tizón foliar causado por el hongo *Exserohilum turcicum* (antes *Helminthosporium turcicum*, teleomorfo: *Setosphaeria turcica*) con distintos grados de severidad e incidencia en los tres ambientes: Tropical, Subtropical y Templado. En 2014, se reportaron pérdidas a causa del tizón, en más de 15, 000 ha de 12 municipios de la región oriental del estado de Puebla, México (SAGARPA, 2014). En ciclos agrícola recientes se ha observado el aumento de la incidencia del tizón foliar del maíz en varios estados de México (Orduño-Cota et al., 2014; Félix-Gastélum et al., 2017).

E. turcicum, es un ascomiceto hemibiotrófico, que causa una enfermedad foliar grave de maíz con distribución cosmopolita (Hughes y Hooker, 1971). La infección del tizón foliar puede ocurrir en condiciones desde los 15 – 30 °C (Levy y Cohen, 1983). En híbridos susceptibles, el hongo destruye el follaje causando una disminución del rendimiento que varía del 28 al 91 % en la producción de este grano (Rajeshwar et al., 2013).

Las razas fisiológicas de *E. turcicum* se denominan en base a los monogenes resistentes *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *HtN*, *Htm*, *HtP*, *HtNB*) (Hooker, 1963, 1977, 1981; Gevers, 1975; Robbins y Warren, 1993; Ogliari et al., 2005; Wang et al., 2012). El principal inconveniente de la resistencia monogénica es su limitada durabilidad, por lo que exige un mejoramiento genético continuo (Niks y Lindhout, 2004). En 1998, Borchardt et al., examinaron la estructura de la población de *E. turcicum* entre continentes y regiones. El gráfico de escala ubicó las muestras mexicanas en el centro, lo que significa con probabilidad el origen.

E. turcicum secreta una toxina no específica llamada monocerina (Robeson y Strobel, 1982). 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 plantas susceptibles (Cuq et al., 1993; Bashan et al., 1995; Zhang et al., 2007). Dong et al. (1993); Li et al. (2016) compararon virulencia y toxicidad de *E. turcicum* y encontraron complicaciones en la planta por respuesta defensiva, por lo que recomiendan determinar la reacción a la toxicidad *in vitro*.

Con base a lo anterior, en esta investigación se estudiará la diversidad racial de *E. turcicum* en México y se confirmará la importancia de la toxina monocerina en la incidencia de la enfermedad, también se identificarán nuevas fuentes de resistencia monogénica y poligénica en líneas endogámicas de CIMMYT. Esta sería la primera investigación en documentar a más profundidad las razas de *E. turcicum* en los principales estados productores de maíz en México y ofrecerá información de nuevas fuentes de resistencia de utilidad para los programas de mejoramiento y estudios moleculares.

1.2. Hipótesis

- 1.2.1. Existe una gran diversidad racial de *E. turcicum* en las diferentes regiones agroecológicas de producción de maíz en México.
- 1.2.2. A mayor virulencia causada por el hongo *E. turcicum* se presenta mayor toxicidad de monocerina.
- 1.2.3. En CIMMYT se tienen maíces con resistencia monogénica y poligénica a *E. turcicum*.

1.3. Objetivo general

- 1.3.1. Estudiar la distribución poblacional de *E. turcicum* en México para evaluar la toxina monocerina de las razas fisiológicas en maíces de CIMMYT.

1.4. Objetivos específicos

- 1.4.1. Determinar la distribución poblacional de las razas fisiológicas de *E. turcicum* presentes en México.
- 1.4.2. Evaluar *in vitro* la toxina monocerina proveniente de las razas fisiológicas de *E. turcicum*.
- 1.4.3. Identificar nuevas fuentes de resistencia monogénica y poligénica a *E. turcicum* en maíces de CIMMYT previamente evaluados en campo.

1.5. Estructura de la tesis

Esta tesis se divide en cinco capítulos como se describen a continuación:

Capítulo 1: Describe brevemente la problemática del hongo *E. turcicum* y justifica su importancia para estudiarlo, con la finalidad de establecer las hipótesis y los objetivos de esta tesis.

Capítulo 2: Proporciona una revisión de literatura de la importancia del cultivo de maíz y el tizón foliar causado por *E. turcicum*, con énfasis a las razas fisiológicas y su toxina monocerina.

Capítulo 3: Se estudia la diversidad racial del hongo *E. turcicum* causante del tizón foliar y se determina la distribución poblacional de las razas fisiológicas en las diferentes regiones agroecológicas productoras de maíz en México en el ciclo agrícola 2019 y un historial de 2010-2019 con un total de 140 aislamientos de *E. turcicum*.

Capítulo 4: Se evalúa *in vitro* la toxina monocerina secretada por el hongo *E. turcicum*. Para desarrollar el protocolo, se evaluaron 11 medios de cultivo nutritivos, se purificó la toxina con metanol al 20% y se seleccionó la raza 123N proveniente de Sinaloa del ciclo agrícola 2019 para evaluar la fitotoxicidad en los genotipos A619ht4 (susceptible) y CML495 (resistente).

Capítulo 5: Se describe la evaluación de la virulencia y toxicidad de *E. turcicum* en 60 líneas endogámicas con resistencia poligénica proporcionadas por CIMMYT. Las 6 razas fisiológicas (2, 3, 23, 3N, 23N y 123N) identificadas en el capítulo 3, se utilizaron para las evaluaciones.

1.6. Literatura

- Bashan, B., Levy, R. S., Cojocar, M., & Levy, Y. (1995). Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exserohilum turcicum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47(4), 225-235.
- Borchardt, D. S., Welz, H. G., & Geiger, H. H. (1998). Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in tropical and temperate climates. *Phytopathology*, 88(4), 322-329.
- Cuq, F., Petitprez, M., Herrmann-Gorline, S., Kläbe, A., & Rossignol, M. (1993). Monocerin in *Exserohilum turcicum* isolates from maize and a study of its phytotoxicity. *Phytochemistry*, 34(5), 1265-1270.
- Dong J G, Shi Y Y, Kang S L, Huang W F. (1993). Extraction of HT-toxin produced by *Helminthosporium turcicum* and its pathogenic activity. *Microbiology China*, 20, 73-77. (in Chinese).
- Félix-Gastélum, R., Lizárraga-Sánchez, G. J., Maldonado-Mendoza, I. E., Leyva-Madrigal, K. Y., Herrera-Rodríguez, G., & Espinoza-Matías, S. (2017). Confirmación de la identidad de *Exserohilum turcicum*, agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(3).
- Gevers, H. O. (1975). A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight in maize. *Plant Dis. Rep.* 59, 296-299.
- Hooker, A. L. (1963). Monogenic resistance in *Zea mays* L. to *Helminthosporium turcicum*, *Crop Sci.*, 1963, 3: 381.
- Hooker, A. L. (1977). A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Sci.* 17, 132-135.
- Hooker, A. L. (1981). Resistance to *Helminthosporium turcicum* from *Tripsacum floridanum* incorporated into corn. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 55, 87-88.
- Hughes, G. R., Hooker, A. L. (1971). Gene action conditioning resistance to northern leaf blight in maize. *Crop science*, 11(2), 180-184.
- Levy, Y., & Cohen, Y. (1983). Biotic and environmental factors affecting infection of sweet corn with *Exserohilum turcicum*. *Phytopathology*, 73(5), 722-725.
- Li Po, Gong, X. D., Hui, J. I. A., Fan, Y. S., Zhang, Y. F., Cao, Z. Y., & Dong, J. G. (2016). MAP kinase gene *STK1* is required for hyphal, conidial, and appressorial development, toxin biosynthesis, pathogenicity, and hypertonic stress response in the plant pathogenic fungus *Setosphaeria turcica*. *Journal of integrative agriculture*, 15(12), 2786-2794.
- Niks, R. E., & Lindhout, W. H. (2004). Curso sobre mejoramiento para resistencia durable a patógenos especializados. Universidad de Wageningen, Wageningen, Holanda.

- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Ogliari, J. B., Guimarães, M. A., Geraldi, I. O., & Camargo, L. E. A. (2005). New resistance genes in the *Zea mays*: *Exserohilum turcicum* pathosystem. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 435-439.
- Orduño-Cota, F. J., Montiel-García, M. A., Herrera-Rodríguez, G., Ruíz-Guzmán, A. G., Espinoza-Castillo, D. F., & de Campo, P. T. (2014). Distribución, incidencia, severidad y control del tizón foliar del maíz en el norte de Sinaloa.
- Rajeshwar, T., Reddy, P., Narayan Reddy, R. R., & Reddy, S. (2013). Management of Turcicum leaf blight of maize caused by *Exserohilum turcicum* in maize. *International journal of scientific and Research Publications*, Vol. 3, ISSN 2250-3153.
- Robbins Jr, W. A., & Warren, H. L. (1993). Inheritance of resistance to *Exserohilum turcicum* in PI 209135, 'Mayorbela' variety of maize. *Maydica*, 38(3), 209-213
- Robeson, D. J., & Strobel, G. A. (1982). Monocerin, a Phytotoxin from *Exserohilum turcicum* (*Drechslera turcica*). *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(11), 2681-2683.
- SAGARPA, (2014). Infectadas 15 mil hectáreas de maíz con tizón norteño en Puebla. Consultado en junio del 2019. <http://www.milenio.com/estados/infectadas-15-mil-hectareas-maiz-tizon-norteno-puebla>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2020). Resumen nacional de producción (to) de grano blanco de maíz en el año agrícola 2019. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.
- Wang H., Xiao Z. X., Wang F. G., Xiao Y. N., Zhao J. R., Zheng Y. L., et al. (2012). Mapping of NtNB, a gene conferring non-lesion resistance before heading to *Exserohilum turcicum* (Pass.), in a maize inbred line derived from the Indonesian variety Bramadi. *Genet. Mol. Res. GMR* 11 2523–2533. 10.4238/2012.July.10.7.
- Zhang, L. H., Dong, J. G., Wang, C. H., & Li, Z. P. (2007). Purification and structural analysis of a selective toxin fraction produced by the plant pathogen *Setosphaeria turcica*. *Agricultural Sciences in China*, 6(4), 452-457.

Capítulo 2: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Historia y origen del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es una especie de gramínea anual que se le atribuye al *Teosintle* como su descendiente directo (Llanos, 1984). Su origen es un tema aun debatido en los países de Mesoamérica, como México, Perú, Bolivia y Guatemala, donde existen maíces criollos nativos que aún se cultivan. La planta de maíz ha tenido una larga historia en México, existen esculturas y cerámicas prehispánicas de varias religiones que lo sustenta (Wellhausen, 1951).

2.2. La importancia del maíz en el mundo

La hibridación en maíz a partir de los trabajos de Beal (1876) ha tenido como principal objetivo aumentar la variabilidad genética y el vigor (Arriaga, 1987). Los rendimientos de los maíces híbridos en los E.U.A. tuvieron un alza desde 1.9 to/ha en los 1930s a 8.8 to/ha en los 1990s (Smith y Cooper, 2004). Ahora, el mejorador cuenta con herramientas de ingeniería genética para introducir características más precisa y eficiente (Levitus, 2006).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) prevé para 2020 una producción histórica de 1,123 millones de toneladas (Mt) en grano de maíz. Los productores más grandes son los Estados Unidos de América y la República Popular China que producen 37 y 21 % de la totalidad mundial, respectivamente. México es el segundo importador de maíz y lo provee de E.U.A y Argentina (FAOSTAT, 2019).

2.3. La producción de maíz en México

En México, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) anunció una producción de 26.7 Mt de maíz para el año agrícola 2019, (SIAP, 2020). La región del noroeste representada por el estado de Sinaloa es el principal productor potencial de maíz con 6.4 Mt y en segundo lugar se encuentra la región occidente encabezada por el estado de Jalisco con 3.5 Mt. El maíz blanco representa el

86.94 % de la producción y se destina principalmente al consumo humano. El consumo per cápita de maíz es de más de 342 g al día, con una aportación del 30 % de la proteína y 40 % de la energía en la dieta de la mayoría de los mexicanos (Atlin et al., 2011). El maíz amarillo se destina a la industria o a la fabricación de alimentos balanceados para la producción pecuaria. Esta producción satisface solo el 20 % de los requerimientos nacionales (SIAP, 2017).

2.4. Factores limitantes para la producción potencial del cultivo de maíz

Las estimaciones sobre pérdidas potenciales de protección al maíz a nivel regional y global, por insectos son de 18 %, enfermedades de 16 % y malezas de 34 %. El control de malezas se puede manejar de forma mecánica o química, por lo tanto, la eficacia es considerablemente mayor que para insectos y enfermedades (Oerke, 2005). Las enfermedades foliares más importantes en México son causadas por patógenos fúngicos que causan pérdidas significativas en la fase vegetativa y reproductiva, tales como: *Tar spot complex*, *Exserohilum turcicum*, *Cercospora* spp, *Puccinia* spp, *Sporisorium reilianum* y *Corn stunt complex* (Ngugi, 2013). Las pudriciones comienzan en la fase reproductiva afectando raíces, tallos y mazorcas (Ortega et al., 1980). Los agentes asociados a la pudrición de mazorca son causados por hongos de las especies de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Stenocarpheella*, que provocan severas pérdidas de cosecha y afectan la comercialización del grano, además de producir sustancias tóxicas naturales peligrosas para animales y humanos (Betanzos et al., 2001).

2.5. El tizón foliar causado por *Exserohilum turcicum* (Leonard & Suggs), antes *Helminthosporium turcicum* (Passerini), Teleomorfo: *Setosphaeria turcica* (Luttrell).

El tizón norteño del maíz fue inicialmente descrito por Passerini en Italia (1876), como *Helminthosporium turcicum*. Posteriormente, con avances en conceptos genéricos, en 1974, lo colocaron en el género *Exserohilum* (del latín *Exsero*:

reducción y *hilum*: cicatriz en la célula basal del conidio donde se une al conidióforo). La posición taxonómica de *Exserohilum turcicum* es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Eumycota

Subclase: Deuteromycota

Orden: Moniliales

Familia: Dematiaceae

Género: *Exserohilum*

Especie: *turcicum*

Los conidióforos son individuales o en pequeños grupos, simples cilíndricos, de color verde oliva, pálidos hacia el ápice, geniculado, hasta 300 x 8-10 µm. Los conidios son elipsoides, rectos a levemente curvados, color pálido a verdoso-marrones, lisos, 4-9 septas, 50-144 x 18-33 µm, con un hilum de 2-3 x 2-3 µm. En la naturaleza, se pueden formar clamidosporas en algunas células de conidios (Luttrell, 1958; Sivanesan, 1987).

El teleomorfo fue descrito por Luttrell (1958) como *Trichometasphaeria turcica*. Este, fue posteriormente transferido al género *Keissleriella*, pero se vio que no pertenecía a este género ya que el anamorfo de *Keissleriella* es *Dendrophoma*. Finalmente, se colocó en *Setosphaeria*, con otros ascomicetos similares con anamorfos en *Exserohilum*. Al igual que muchos ascomicetos fitopatógenos, se cree que *S. turcica* pasa la mayor parte de su vida como un organismo haploide, que se convierte en diploide en una etapa muy corta durante la recombinación sexual, antes de pasar por la fase de meiosis. La posición taxonómica de *Setosphaeria turcica* es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Subclase: Pleosporomycetidae

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Setosphaeria*

Especie: *turcica*

S. turcica produce pseudotecios de color marrón oscuro a negro, globosos a elipsoidales de 40-56 x 12-15 µm con septas claramente visibles. Las ascas son cilíndricas con un pedicelo corto, y contienen de 1-8 ascosporas hialinas, rectas a ligeramente curvas. Comúnmente tienen 3 septas y miden 13-17 x 42-78 µm (Bunkoed et al., 2014).

2.5.1. Epidemiología y sintomatología

E. turcicum, es un ascomiceto hemibiotrófico, que causa una enfermedad foliar grave de maíz con distribución cosmopolita (Hughes y Hooker, 1971). *E. turcicum* utiliza una estrategia de infección biotrófica durante las primeras etapas de infección y posiblemente después de los 8 días de infección el hongo cambia a una estrategia de infección necrotrofica (Human et al., 2020). La infección de *E. turcicum* puede ocurrir en condiciones desde los 15 - 30 °C, pero la temperatura óptima para el desarrollo de apresorios es entre 20 - 25 °C (Levy y Cohen, 1983). Después de la penetración y formación de los haustorios el hongo continúa invadiendo nuevos tejidos causando necrosis y el colapso del tejido. El micelio crece a través del tejido foliar y hacia el sistema vascular, extendiéndose sistémicamente por toda la planta (Muiru et al., 2010).

Las lesiones en desarrollo tienen característica en forma de cigarro, color café canela de 5-20 cm de longitud, que se extienden a lo largo de la hoja (**Figura 1**). La infección, generalmente se limita al área foliar y no causa daño directamente a la semilla. Sin embargo, las lesiones grandes y numerosas en las hojas son

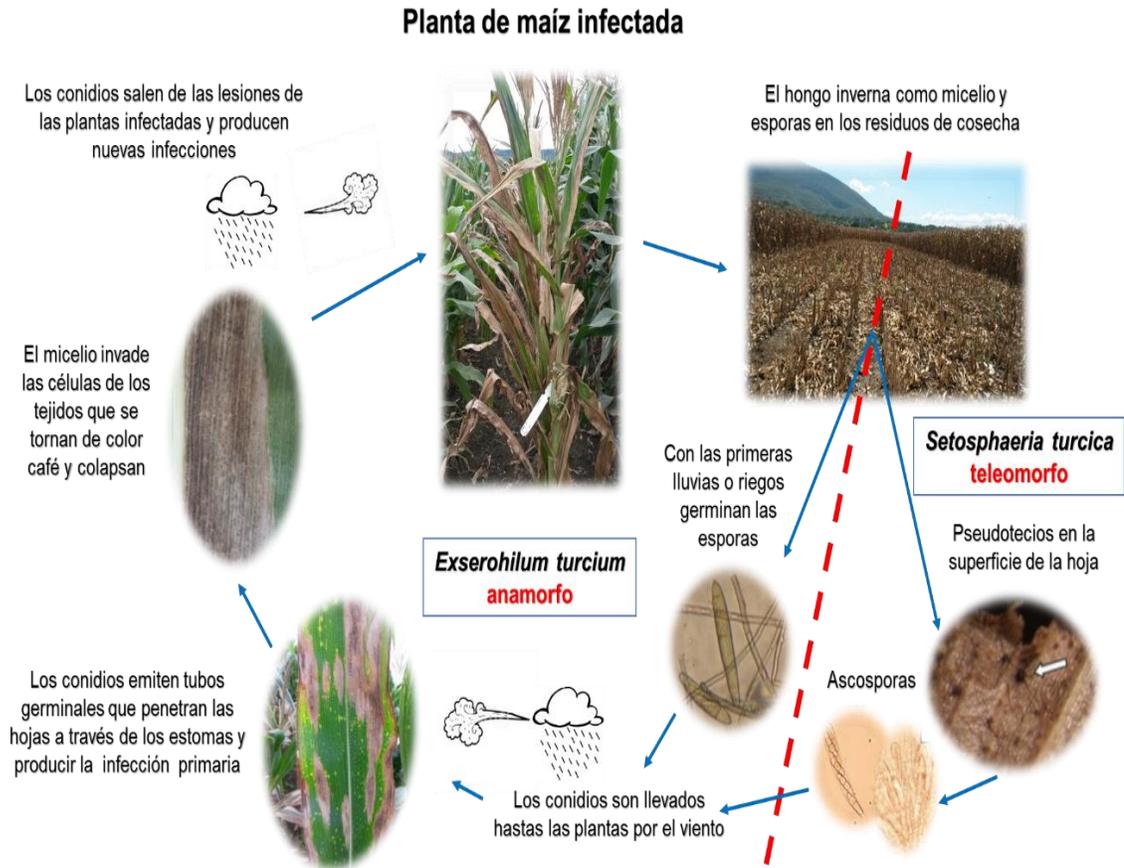
suficientes para causar marchitez y una reducción en el potencial fotosintético que reduce el rendimiento (Hughes y Hooker, 1971).



Foto: C. Muñoz

Figura 1. Síntomas en hojas de maíz del tizón foliar de color café en forma de cigarrillo causado por el hongo *Exserohilum turcicum*.

En condiciones naturales, *E. turcicum* vive y se reproduce en una fase asexual, con un ciclo de vida relativamente simple. En regiones templadas, el hongo sobrevive como micelio, conidios y clamidosporas en los restos de maíz infectados. En condiciones favorables, los conidios se producen a partir de los residuos del cultivo y se dispersan por la lluvia o el viento para infectar plantas de maíz en la siguiente temporada de siembra. Una vez sobre la hoja, los conidios germinan e infectan directamente a la planta. En condiciones con alta humedad y temperatura adecuada, el hongo inicia la formación de inóculo secundario produciendo nuevas esporas sobre la superficie de la hoja que se propagan por la lluvia y el viento creando un nuevo ciclo de infección (**Figura 2**). Al final de la temporada, *E. turcicum* entra en un estado de latencia en residuos del cultivo (Formento, 2010). La virulencia de *E. turcicum* se puede aumentar o pueden generarse nuevas razas fisiológicas a través de la hibridación sexual por *S. turcica* (Bunkoed et al., 2014)



Fuente: Hanekamp, (2018); Agrios, (2005); Bunkoed et al. (2014). **Foto:** C. Muñoz

Figura 2. Ciclo de la enfermedad del tizón foliar causado por el hongo *Exserohilum turcicum* y su teleomorfo *Setosphaeria turcica*.

2.6. Formas especiales de *E. turcicum*

E. turcicum puede atacar también al sorgo (*Sorghum* spp.), zacate Johnson (*Sorghum halepense*), zacate Sudán (*Sorghum × drummondii*) y teocintle (*Euchlaena mexicana*), pero los aislamientos de éstos hospedantes no atacan al maíz (Donald, 2004). En el Bajío (México) se determinaron tres formas especiales de *E. turcicum*: *S. turcica* f sp. *sorghii*, específica para sorgo; *S. turcica* f sp. *complexa*, para sorgo y zacate, y *S. turcica* f sp. *zea*, sólo para maíz (Ayala et al.,

1994). Algunos estudios han demostrado la utilidad de la reacción en cadena de polimerasa (UP-PCR) para caracterizar la diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre las formas especiales de *E. turcicum* (Félix-Gastélum *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2015).

2.7. Razas fisiológicas

Las razas de *E. turcicum* en maíz, se denominan en base a los monogenes *Ht* (por el nombre anterior de *Helminthosporium turcicum*). Leonard *et al.*, (1989), propusieron un sistema de nomenclatura de razas de *E. turcicum* designando la raza de acuerdo con los genes de resistencia que coinciden con su virulencia, así, la raza 0, indica que es avirulenta en maíz con cualquiera de los genes *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *HtN*); la raza 1, indica su virulencia a *Ht1*, la raza 23, indica su virulencia a *Ht2* y *Ht3* y la raza 123N indica su virulencia a *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *HtN*. El sistema es fácil de manejar y útil para la identificación de 16 s razas en los diferenciales de maíz con genes *Ht* (**Cuadro 1**).

Borchardt *et al.* (1998), examinaron la estructura de la población de *E. turcicum* entre continentes y regiones. En poblaciones tropicales (México, Kenia y Sur de China) tenían una diversidad genotípica extremadamente alta. Las poblaciones de regiones templadas (Europa y Norte de China) mostraron menor diversidad genotípica, fuerte desequilibrio de fase gamética y una distribución desigual de los tipos de apareamiento. El gráfico de escala multidimensional ubicó las muestras mexicanas en el centro y el mayor número de bandas polimórficas, lo que significa una alta diversidad genética y probablemente el origen.

Cuadro 1. Nomenclatura para determinar 16 razas fisiológicas de *E. turcicum* utilizando cuatro diferenciales *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *HtN*) (Leonard et al., 1989).

Designación de la raza <i>E. turcicum</i>	Diferenciales <i>Ht</i> en genotipos de maíz				
	Ausente de <i>Ht</i>	Monogenes de resistencia <i>Ht</i>			
	<i>ht4</i>	<i>Ht1</i>	<i>Ht2</i>	<i>Ht3</i>	<i>HtN</i>
0	S	R	R	R	R
1	S	S	R	R	R
2	S	R	S	R	R
3	S	R	R	S	R
n	S	R	R	R	S
12	S	S	S	R	R
13	S	S	R	S	R
1n	S	S	R	R	S
23	S	R	S	S	R
2n	S	R	S	R	S
3n	S	R	R	S	S
123	S	S	S	S	R
12n	S	S	S	R	S
13n	S	S	R	S	S
23n	S	R	S	S	S
123N	S	S	S	S	S

S = genotipo susceptible y patógeno virulento = reacción compatible

R = genotipo resistente y patógeno avirulento = reacción incompatible

Biológicamente, se denomina resistencia a la capacidad que tiene un organismo hospedante para limitar, detener, neutralizar o sobreponerse en cierto grado a la actividad nociva de un organismo patogénico (Bos y Parlevliet, 1995; Niks et al., 1993). Genéticamente, la resistencia está determinada por un gen, un par o múltiples genes en un complejo de sistema poligénico (Agrios, 2005; Paliwal, 2001). Se reconocen básicamente dos tipos de resistencia verdadera: la resistencia vertical (monogénica) y la resistencia horizontal (poligénica) (Niks y Lindhout, 2004; Paliwal, 2001).

2.8. Resistencia específica a razas, cualitativa, vertical o monogénica

La resistencia vertical, o de razas específicas, también conocida como hipótesis de la relación gen por gen, fue inicialmente formulada por Flor en 1956. Flor logró obtener relaciones de segregación en generación F₂'s para la resistencia a la susceptibilidad de 1:3, 1:15 y 1:63, que muestra que la resistencia era dominante y se rige por 1, 2 y 3 genes, respectivamente. En este sistema, la resistencia del fenotipo es consecuencia de la interacción entre los genotipos del cultivar y de las razas interactuantes de manera que por cada gen de resistencia en el hospedante existe un gen específico complementario que condiciona avirulencia en el patógeno (Díaz, 2000; Niks y Lindhout, 2004).

Para hacer más eficiente el desarrollo de cualquier programa de mejoramiento genético se debe tener información detallada de cómo es heredada la resistencia, es decir, definir la naturaleza de los genes que se heredan (Renfro, 1985; Elwinger et al., 1990). Paliwal, (2001), menciona que se han identificado fuentes de resistencia para muchas enfermedades de importancia económica, cuyos genes de resistencia están presentes dentro del genoma del maíz. Respecto a la base genética a *E. turcicum* se dispone de los genes *Ht* que inhiben el crecimiento y diseminación del hongo. La fitoalexina DIMBOA es disponible con este carácter (Ahmad et al., 2011; Mikić y Ahmad, 2018; Rostás, 2007).

El primer monogen de resistencia cualitativo es *Ht1* (Hooker, 1963). Una característica de *Ht1* es que la esporulación es limitada en las lesiones cloróticas (Hooker, 1963). Esto fue confirmado por el recuento de esporas en el aire encima de campos de producción de semillas híbridas en Illinois, E.U.A (Hooker, 1963). *Ht1* ha sido mapeado en el brazo largo del cromosoma 2 en el contenedor 2.08, cerca de los marcadores RFLP *sgcr506* y *umc150B* (Bentolila et al., 1991).

El gen *Ht2* se encontró en la línea *NN14B* de Australia. *Ht2* confiere un fenotipo de resistencia muy similar a *Ht1*, sólo que con más necrosis (Zaitlin et al., 1992). *Ht2* muestra dominancia parcial (Hooker, 1977) y, para su expresión, depende

del genotipo de la planta. Un gen dominante supresor de *Ht2*, llamado *Sht1* (Simcox y Bennetzen, 1993) se encontró en líneas endogámicas y ha complicado la transferencia de *Ht2* en los programas de retrocruzamiento. *Ht2* se ha mapeado en el brazo largo del cromosoma 8 en el intervalo *umc48-umc89* (Welz y Geiger, 2000; Zaitlin *et al.*, 1992) en el contenedor 8.06 (Ding *et al.*, 2015)

Plantas con el gen *Ht3* son difíciles de distinguir de aquellas con el gen *Ht2*. El gen *Ht3* se identificó en la cruce de *Zea mays* con *Tripsacum floridanum* y fue mapeado en el contenedor 7.04. Hooker (1981), demostró que segrega independientemente de los genes *Ht1* y *Ht2*. La virulencia a *Ht2* y *Ht3* se asocia en las poblaciones de *E. turcicum* y parece ser heredado por el mismo gen (Welz y Geiger, 2000).

El gen *HtN*, tiene origen en la raza mexicana Pepitilla (Gevers, 1975). Este gen actúa de forma diferente a *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* ya que retrasa el desarrollo de lesiones hasta aproximadamente 4 semanas después de la infección y reduce el número de lesiones (Simcox y Bennetzen, 1993; Raymundo *et al.*, 1981; Raymundo y Hooker 1981, 1982). *HtN* está ubicado en el contenedor 8.05, (Hurni *et al.*, 2015).

El gen recesivo *ht4*, se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 1, cerca del centrómero. En presencia de este gen, la planta presenta halos cloróticos circulares de aproximadamente 1 cm de diámetro y ausencia de los genes de resistencia *Ht* (Carson, 1995).

Robbins y Warren, (1993) reportan el gen *HtM* con reacción semejante a *HtN*. Más tarde, Ogliari *et al.* (2005) reportaron que un nuevo gen dominante *HtP* induce resistencia a *E. turcicum* y los genes recesivos *rt* inducen virulencia al patógeno. *HtP* fue mapeado en el brazo largo del cromosoma 2, en el contenedor 2.08. En 2012 Wang *et al.*, identificaron en una línea de Indonesia el gen de resistencia *NtNB* ubicado en el contenedor 8.07.

2.9. Resistencia no específica, cuantitativa, horizontal o poligénica

La resistencia cuantitativa a *E. turcicum* es bastante común y ha sido descrita en muchas líneas endogámicas y cultivares. Se detectó en los 1950's en programas de mejoramiento en los Estados Unidos después de una serie de fuertes epidemias de *E. turcicum*. En ese momento, los híbridos ganaban popularidad rápidamente y la mayoría de los híbridos eran altamente susceptible. La resistencia cuantitativa se caracteriza por un número menor de lesiones más pequeñas y un período prolongado de incubación, pero con una esporulación normal (Carson, 1995). El período de incubación prolongado es expresado en plantas jóvenes y correlacionado con la severidad de tizón de las plantas adultas en el campo. En contraste, con resistencia cualitativa conferida por los genes *Ht*, la resistencia cuantitativa para *E. turcicum* es en gran medida insensible a la variación de la luz y condiciones de temperatura (Carson y Van, 1994).

Varios estudios de herencia genética se han realizado en la línea CML202 de CIMMYT- Zimbabue (Asea *et al.*, 2009) y la línea Mo17 de E.U.A. (Freymark *et al.*, 1994) y han sido utilizadas como fuentes de resistencia a *E. turcicum* (Hooda *et al.*, 2017). Las líneas CIMBL225, CML305, CIMBL399, CML483 y CIMBL269, resultaron altamente resistentes a *E. turcicum* en un panel de 999 líneas evaluadas en múltiples ambientes de México, Colombia y Kenia (Ding *et al.*, 2015).

2.10. Toxinas

Aunque los patógenos utilizan la fuerza mecánica (apresorios) para penetrar en los tejidos de una planta, sus funciones como fitopatógenos son principalmente de naturaleza química. Por lo tanto, los efectos que ocasionan sobre las plantas son casi siempre el resultado de reacciones bioquímicas que se llevan a cabo entre las sustancias que secreta el patógeno y las que contiene o produce la planta como defensa. Estos compuestos se llaman con frecuencia fitotoxinas; sin

embargo, este término puede ser confundido, ya que se utiliza para designar a las toxinas originarias de plantas superiores (Agrios, 2005).

Las toxinas son metabolitos producidos (secretados) por patógenos, la mayoría de los cuales son compuestos de bajo peso molecular que causan cambios histológicos y fisiológicos en el hospedante. Las toxinas pueden ser la causa primaria de la enfermedad inducida por el patógeno o pueden constituir solamente una parte del proceso de la enfermedad. A menudo, las toxinas se clasifican como específicas y no específicas. Las toxinas específicas son tóxicas sólo para hospedantes del hongo que produce la toxina. En cambio, las toxinas no específicas pueden afectar a muchas plantas independientemente de si son o no hospedantes del patógeno. Yoder (1980), clasifica las toxinas de los fitopatógenos como un factor de patogenicidad o un factor de virulencia, considerando la posible implicación de las toxinas en la patogénesis: la patogenicidad es la capacidad de causar enfermedades, un término cualitativo, mientras que la virulencia se refiere a la magnitud o severidad de la enfermedad causada, un término cuantitativo. La mayoría de las toxinas específicas se consideran factores de patogenicidad que requieren los hongos que las producen para invadir el tejido e inducir la enfermedad. Por otra parte, el papel exacto de las toxinas no específicas en patogénesis es en gran parte desconocido, pero algunos autores que contribuyen en las características de virulencia, tales como desarrollo de síntomas y la propagación del patógeno en la planta (Tsuge et al., 2012).

2.10.1. Monocerina

La toxina monocerina es una dihidroisocoumarina, con fórmula química $C_{16}H_{20}O_6$. Dihidroisocoumarinas son compuestos fenólicos relacionados con isocoumarina. El péptido está compuesto por tres aminoácidos fitotóxicos (glicina-serina-glutamina) que aumentan el tamaño de la lesión, la germinación y formación de apresorios de *E. turcicum*. Estos compuestos fueron sintetizados en laboratorio (Bashan et al., 1995). Esto puede aumentar la agresividad de los aislados no

patógenos, lo que indica que monocerina es un importante factor de virulencia del hongo (Bashan et al., 1992).

Estudios de biosíntesis han confirmado que la monocerina tiene orígenes de heptaketida. La policétido sintasa (PKS) de la monocerina produce un intermedio con un alto grado de modificación reductiva inicial, pero termina con un resto de β -policétido clásico. Dihidroisocoumarina es el primer producto intermedio libre de PKS que se formaría a partir del heptaketida reducido, en la ruta de ensamblaje se muestra en la **Figura 3** (Weerasooriya y Crosby, 2007).

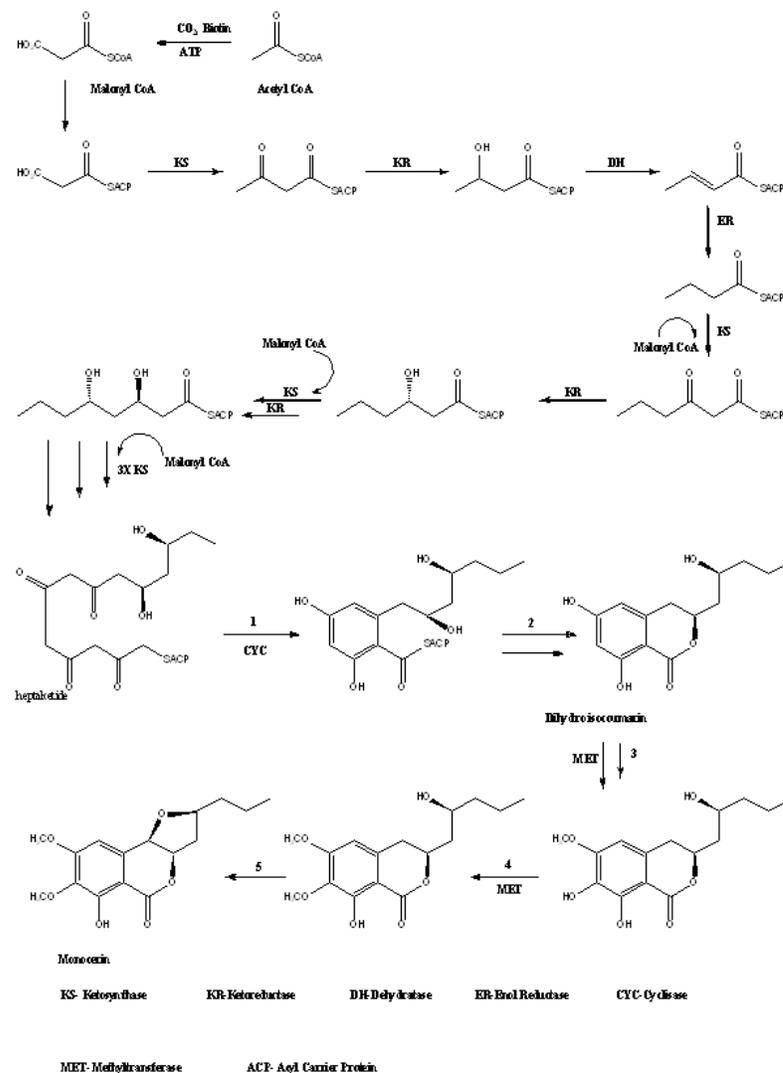


Figura 3. Ensamblaje de la biosíntesis por la toxina monocerina (Weerasooriya y Crosby, 2007).

2.11. Literatura

- Agrios, G. N. (2005). Plant diseases caused by fungi. *Plant pathology*, 4.
- Ahmad, S., Veyrat, N., Gordon-Weeks, R., Zhang, Y., Martin, J., Smart, L., & Ton, J. (2011). Benzoxazinoid metabolites regulate innate immunity against aphids and fungi in maize. *Plant physiology*, 157(1), 317-327.
- Arriaga, H. O. (1987). La evolución del mejoramiento del maíz. En III Jornada Científica organizada por la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria y la Universidad Nacional del Litoral (30 de noviembre al 1 de diciembre de 1987, Santa Fe, Argentina).
- Asea, G., Vivek, B. S., Bigirwa, G., Lipps, P. E., & Pratt, R. C. (2009). Validation of consensus quantitative trait loci associated with resistance to multiple foliar pathogens of maize. *Phytopathology*, 99(5), 540-547.
- Atlin, G., Palacios, N., Babu, R., Das, D., Twumasi-Afriyie, S., Friesen, D., DeGroote, H., Vivek, B. Pixley, K. (2011). Quality protein maize: Progress and prospects. *Plant Breed. Rev.* 34: 83-130.
- Ayala Escobar, V., Osada Kawasoe, S., Narro Sánchez, J., & Sandoval Islas, S. (1994). Variabilidad patogénica de *Helminthosporium turcicum* Pass. (*Exserohilum turcicum* Pass.) (*Setosphaeria turcica* LL & Suggs.) en sorgo (*Sorghum bicolor* M.) en el Bajío México (No. TESIS.). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Centro de Fitopatología.
- Bashan, B., & Levy, Y. (1992). Differential response of sweet corn cultivars to phytotoxic water-soluble compounds from culture filtrates of *Exserohilum turcicum*. *Plant disease* (USA).
- Bashan, B., Levy, R. S., Cojocar, M., & Levy, Y. (1995). Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exserohilum turcicum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47(4), 225-235.
- Bentolila, S., Guitton, C., Bouvet, N., Sailland, A., Nykaza, S., and Freyssinet, G. (1991). Identification of an RFLP marker tightly linked to the Ht1 gene in maize. *Theor. Appl. Genet.* 82, 393–398.
- Betanzos, E., Ramírez, A., Espinosa, P., y Coutiño, E. (2001). Formación de variedades mejoradas de maíz, productivas y tolerantes a los factores adversos de la zona cálido-subhúmeda de México. Reunión de programación y evaluación, Campo Experimental Centro de Chiapas, Ocozocoautla, Chiapas, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. *Agricultura Técnica en México*. Vol. 35, Núm. 4 -octubre-diciembre. Pág. 391-400.
- Borchardt, D. S., Welz, H. G., & Geiger, H. H. (1998). Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in tropical and temperate climates. *Phytopathology*, 88(4), 322-329.

- Bos, L., & Parlevliet, J. E. (1995). Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Annual Review of Phytopathology*, 33(1), 69-102.
- Bunkoed, W., Kasam, S., Chaijuckam, P., Yhamsoongnern, J., & Prathuangwong, S. (2014). Sexual reproduction of *Setosphaeria turcica* in natural corn fields in Thailand. *Kasetsart J. (Natl Sci.)*, 48, 175-182.
- Carson, M. L. (1995). A new gene in maize conferring the "Chlorotic Halo" reaction to infection by *Exserohilum turcicum*. *Plant Dis.* 79, 717–720.
- Carson, M. L., & Van Dyke, C. G. (1994). Main content area Effect of light and temperature on expression of partial resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. *Plant disease*, 78(5), 519-522.
- Díaz, R. M. J. (2000). Interacciones planta-hongo: mecanismos de infección, patogénesis y resistencia. In *Patología vegetal* (pp. 739-769). Phytoma.
- Ding, J., Ali, F., Chen, G., Li, H., Mahuku, G., Yang, N., & Yan, J. (2015). Genome-wide association mapping reveals novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. *BMC plant biology*, 15(1), 206.
- Donald, G. (2004). *Plagas y enfermedades del maíz*. (3ª edición). España: Mundi-Prensa.
- Elwinger, G. F., Johnson, M. W., Hill, R. R., & Ayers, J. E. (1990). Inheritance of resistance to gray leaf spot of corn. *Crop Science*, 30(2), 350-358.
- FAOSTAT, (2019). Base de datos estadísticos corporativos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). <http://www.fao.org/faostat/es/>
- Félix-Gastélum, R., Lizárraga-Sánchez, G. J., Maldonado-Mendoza, I. E., Leyva-Madrigal, K. Y., Herrera-Rodríguez, G., & Espinoza-Matías, S. (2017). Confirmación de la identidad de *Exserohilum turcicum*, agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(3).
- Flor, H. H. (1956). The complementary genic systems in flax and flax rust. In *Advances in genetics* (Vol. 8, pp. 29-54). Academic Press.
- Formento, A. N. (2010). Enfermedades foliares reemergentes del cultivo de maíz: royas (*Puccinia sorghi* y *Puccinia polysora*), tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) y mancha ocular (*Kabatiella zeae*). INTA.
- Freymark PJ, Lee M, Martinson CA and Woodman W (1994). Molecular-marker-facilitated investigation of host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.): components of resistance. *Theor. Appl. Genet.* 88: 305-313.
- Gevers, H. O. (1975). A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight in maize. *Plant Dis. Rep.* 59, 296–299.

- Hanekamp, H. (2018). Europäisches Rassen-Monitoring und Pathogenesestudien zur Turcicum-Blattdürre (*Exserohilum turcicum*) an Mais (*Zea mays* L.) (Doctoral dissertation, Georg-August-Universität Göttingen).
- Hooda, K. S., Khokhar, M. K., Shekhar, M., Karjagi, C. G., Kumar, B., Mallikarjuna, N., & Yadav, O. P. (2017). Turcicum leaf blight—sustainable management of a re-emerging maize disease. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(2), 101-113.
- Hooker, A. L. (1963). Monogenic resistance in *Zea mays* L. to *Helminthosporium turcicum*, *Crop Sci.*, 1963, 3: 381.
- Hooker, A. L. (1977). A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turicum*. *Crop Sci.* 17, 132–135.
- Hooker, A. L. (1981). Resistance to *Helminthosporium turcicum* from *Tripsacum floridanum* incorporated into corn. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 55, 87–88.
- Hughes, G. R., & Hooker, A. L. (1971). Gene action conditioning resistance to northern leaf blight in maize. *Crop science*, 11(2), 180-184.
- Human, M. P., Berger, D. K., & Crampton, B. G. (2020). Time-Course RNAseq Reveals *Exserohilum turcicum* Effectors and Pathogenicity Determinants. *Frontiers in microbiology*, 11, 360.
- Hurni, S., Scheuermann, D., Krattinger, S. G., Kessel, B., Wicker, T., Herren, G., et al. (2015). The maize disease resistance gene NtN1 against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 8780–8785. doi: 10.1073/pnas.1502522112
- Leonard, K. J., Levy, Y., & Smith, D. R. (1989). Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. *Plant disease*, 73(9), 776-777.
- Levitus, G. (2006). Biotecnología y maíz. Serie de Informes Especiales de ILSI Argentina, Volumen II: Maíz y Nutrición, 73.
- Llanos, M. (1984). El maíz; su cultivo y aprovechamiento (No. 633.153 LLA. CIMMYT.).
- Luttrell ES, (1958). The perfect stage of *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology*, 48:281-287.
- Mikić, S., & Ahmad, S. (2018). Benzoxazinoids-protective secondary metabolites in cereals: The role and application.
- Muiru, W. M., Koopmann, B., Tiedemann, A. V., Mutitu, E. W., & Kimenju, J. W. (2010). Race typing and evaluation of Aggressiveness of *Exserohilum turcicum* isolates of Kenyan, German and Austrian origin. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(3), 277-284.

- Ngugi, Henry (2013). CIMMYT-Reporte anual 2013. Estrategia Internacional para Aumentar el Rendimiento de Maíz. Modernización Sustentable de la Agricultura Tradicional (MasAgro).
- Niks, R. E., & Lindhout, W. H. (2004). Curso sobre mejoramiento para resistencia durable a patógenos especializados. Universidad de Wageningen, Wageningen, Holanda.
- Niks, R. E., Ellis, P. R., & Parlevliet, J. E. (1993). Resistance to parasites. In Plant Breeding (pp. 422-447). Springer, Dordrecht
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science, 144(1), 31-43.
- Ogliari, J. B., Guimarães, M. A., Geraldi, I. O., & Camargo, L. E. A. (2005). New resistance genes in the *Zea mays*: *Exserohilum turcicum* pathosystem. Genetics and Molecular Biology, 28(3), 435-439.
- Ortega, A., Vasal, S.K., Milhm, S.K., and Hershey, C. (1980). Breeding for insect resistance in maize. Breeding Plant Resistant Insects. 22: 371-419.
- Paliwal, R. L. (2001). El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción (No. 28). Food & Agriculture Org.
- Raymundo A.D. and Hooker A.L. (1981). Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses. Plant Dis. 65: 325-327.
- Raymundo A.D. and Hooker A.L. (1982). Single and combined effects of monogenic and polygenic resistance on certain components of northern corn leaf blight development. Phytopathology 72: 99-103.
- Renfro, B. L. (1985). Breeding for disease resistance in tropical maize and its genetic control. Relazioni e Monografie Agrarie Subtropicali e Tropicali. Nuova Serie (Italy).
- Robbins Jr, W. A., & Warren, H. L. (1993). Inheritance of resistance to *Exserohilum turcicum* in PI 209135, 'Mayorbela' variety of maize. Maydica, 38(3), 209-213
- Rostás, M. (2007). The effects of 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1, 4-benzoxazin-3-one on two species of *Spodoptera* and the growth of *Setosphaeria turcica* in vitro. Journal of pest science, 80(1), 35-41.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2017). Planeación agrícola 2017-2030. Producción de grano de maíz blanco y amarillo en México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B_sico-Ma_z_Grano_Blanco_y_Amarillo.pdf
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2020). Resumen nacional de producción (to) de grano blanco de maíz en el año agrícola 2019. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.

- Simcox, K. D., and Bennetzen, J. L. (1993). Mapping the *NtN* resistance gene to the long arm of chromosome 8. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 67, 118–119.
- Sivanesan A, (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Wallingford, UK: CAB International, vi + 261pp.
- Smith, D. N. D. J., & Cooper, M. (2004). Changes in performance, parentage, and genetic diversity of successful corn hybrids, 1930-2000. *Corn: Origin, history, technology, and production*, 4, 65.
- 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.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., & Otani, H. (2012). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 44-66.
- Wang H., Xiao Z. X., Wang F. G., Xiao Y. N., Zhao J. R., Zheng Y. L., et al. (2012). Mapping of *NtNB*, a gene conferring non-lesion resistance before heading to *Exserohilum turcicum* (Pass.), in a maize inbred line derived from the Indonesian variety Bramadi. *Genet. Mol. Res. GMR* 11 2523–2533. 10.4238/2012.July.10.7.
- Weerasooriya, M. K. B., & Crosby, J. (2007). Methyl Transferase, a Polyketide Biosynthetic Enzyme from *Drechslera monoceras*: Purification and Properties.
- Wellhausen, E. J. E. J. (1951). Razas de maíz en México; origen, características y distribución (No. 04; SB191. M2, W45.).
- Welz, H. G., & Geiger, H. H. (2000). Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. *Plant breeding*, 119(1), 1-14.
- Yoder OC (1980). Toxins in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 18: 103–129.
- Zaitlin, D., DeMars, S. J., and Gupta, M. (1992). Linkage of a second gene for NCLB resistance to molecular markers in maize. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 66, 69–70.

Capítulo 3: DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE LAS RAZAS FISIOLÓGICAS DE *Exserohilum turcicum* PRESENTES EN MÉXICO

3.1. Resumen

Las razas fisiológicas de *Exserohilum turcicum* o *Setosphaeria turcica* f sp. *zea*, se denominan en base a los monogenes de resistencia dentro de los diferenciales *Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *HtN* y *ht4*. Para estudiar la distribución poblacional de las razas presentes en México, se colectaron hojas de maíz con infección natural en los principales estados productores de maíz en el ciclo agrícola 2019, además un historial de diez años (2010-2019) en ambiente tropical, subtropical y templado. Utilizando los genotipos de maíz A619Ht1, A619Ht2, A619Ht3, B68HtN y A619ht4. Los resultados revelaron la presencia de seis razas (2, 3, 23, 3N, 23N y 123N), siendo la raza 23 la dominante con una representación de 68 %. La virulencia obtenida de los 140 aislamientos en los diferenciales *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *HtN* mostraron susceptibilidad de 3.5 %, 41.8 %, 44.1 % y 10.6 %, respectivamente.

3.2. Introducción

Exserohilum turcicum (telemorfo: *Setosphaeria turcica*) causante del tizón foliar por turcicum (en inglés Turcicum leaf blight, TLB), también conocido como el tizón norteño de la hoja de maíz (*Zea mays* L.) (en inglés Northern corn leaf blight, NCLB), es un ascomiceto hemibiotrófico, que utiliza una estrategia de infección biotrófica durante las primeras etapas de infección y posiblemente después de los 8 días de infección el hongo cambia a una estrategia de infección necrotrófica (Human et al., 2020). Después de la penetración y formación de los haustorios, el hongo continúa invadiendo nuevos tejidos causando necrosis y extendiéndose sistémicamente por toda la planta (Muiru et al., 2010). En la cosecha, *E. turcicum* entra en un estado de latencia en los residuos del cultivo (Formento, 2010). La virulencia de *E. turcicum* se puede aumentar o pueden generarse nuevas razas

fisiológicas a través de la hibridación sexual por *Setosphaeria turcica* (Bunkoed et al., 2014). En el Bajío (México) se determinaron tres formas especiales del hongo *E. turcicum*: *Setosphaeria turcica* f sp. *sorghii*, específica para sorgo; *S. turcica* f sp. *complexa*, para sorgo y zacate; y *S. turcica* f sp. *zea*, sólo para maíz (Ayala et al., 1994).

Las razas fisiológicas de *E. turcicum* o *S. turcica* f sp. *zea*, se denominan en base a los monogenes de resistencia *Ht* (por el nombre anterior de *Helminthosporium turcicum*) dentro de los diferenciales *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *HtN* (Hooker, 1963, 1977, 1981; Gevers, 1975) y el diferencial recesivo *ht4* (Carson, 1995). El sistema de nomenclatura propuesto por Leonard et al. (1989) designa la raza de acuerdo con los genes de resistencia del hospedante y de virulencia del patógeno. Así entonces, la raza 0, indica que es avirulenta con cualquiera de los genes *Ht*, mientras que la raza 123N indica su virulencia a los cuatro diferenciales (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *HtN*). Varios estudios han utilizado este sistema para conocer la distribución poblacional de las razas fisiológicas nativas de *E. turcicum*: En México ha identificado la presencia de las razas 23N, 23 y 2N, en Zambia las razas 0, 23 y 23N y en Uganda las razas 0, 2, n y 23n (Welz et al., 1993). En Brasil las razas 0, 1n, 12N y 123N (Gianasi et al., 1996). En China las razas 0, 1, 2, 12, 3, 13, 23, N, 1N, 2n, 3N, 12N, 13N, 23N, 123N (Dong et al., 2008; Ma et al., 2020). En Kenia, Alemania y Austria las razas 0, 1, 2, 3, N, 12, 13, 23, 3N, 123, 13N y 23N (Muiru et al., 2010). En Turquía las razas 0, 1, 2, 123, N, 1N, 3N y 12N (Turgay et al., 2020). Dos estudios recientes han agregado en su investigación el diferencial de maíz con el monogen *HtM* (Robbins y Warren, 1993) donde lograron identificar en los Estados Unidos las razas 0, 1, 2, M, N, 12, 13, 23, 1M, 1N, MN, 123, 1MN, 2MN, 23M, 23N, 12MN, 23MN, 123M y 123MN (Japheth y Carl, 2018) y en Canadá las razas 0, 1, 2, 3, M, N, 12, 1M, 1N, 3M, 13M, 12N, 13N, 1MN, 12MN, 13MN, 123MN (Jindal et al., 2019).

Borchardt et al. (1998) examinaron la estructura de la población de *E. turcicum* entre poblaciones tropicales (México, Kenia y Sur de China) y poblaciones de

regiones templadas (Europa y Norte de China). Los resultados revelaron que las muestras mexicanas podrían ser el posible centro de origen.

El objetivo principal de esta investigación fue estudiar la distribución poblacional de las razas fisiológicas de *E. turcicum* presentes en México. Se colectaron hojas de maíz con infección natural de *E. turcicum* en los principales estados productores de maíz en el ciclo agrícola 2019 y además un historial de los últimos diez años 2010 a 2019 en ambiente tropical y templado. Para la identificación de las razas fisiológicas de *E. turcicum*, se utilizaron los genotipos de maíz con genes de resistencia *Ht* (A619Ht1, A619Ht2, A619Ht3 y B68HtN) y A619ht4 (ausente de genes de resistencia *Ht*) como control positivo.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Colección de cepas de *E. turcicum*

Con el apoyo de la red de MASAGRO, INIFAP y CORTEVA en 2019, se colectaron muestras de hojas de maíz infectadas con *E. turcicum* en los principales estados productores de maíz, incluyendo; Tamaulipas, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guanajuato, Hidalgo, Puebla y Chiapas. Además, se incluyó las colectas proporcionadas por CIMMYT-Agua Fría, Veracruz (20.454758, -97.640882) y CIMMYT-EI Batán, Estado de México (19.529426, -98.846112) de 2010 a 2019, representando el ambiente tropical y templado, respectivamente (**Figura 4**). Los aislamientos de las colectas se realizaron con técnicas asépticas en base a los protocolos descritos por Gilchrist (1995). Las características morfológicas de los conidios del hongo se identificaron como lo describen Luttrell (1958) y Sivanesan (1987).

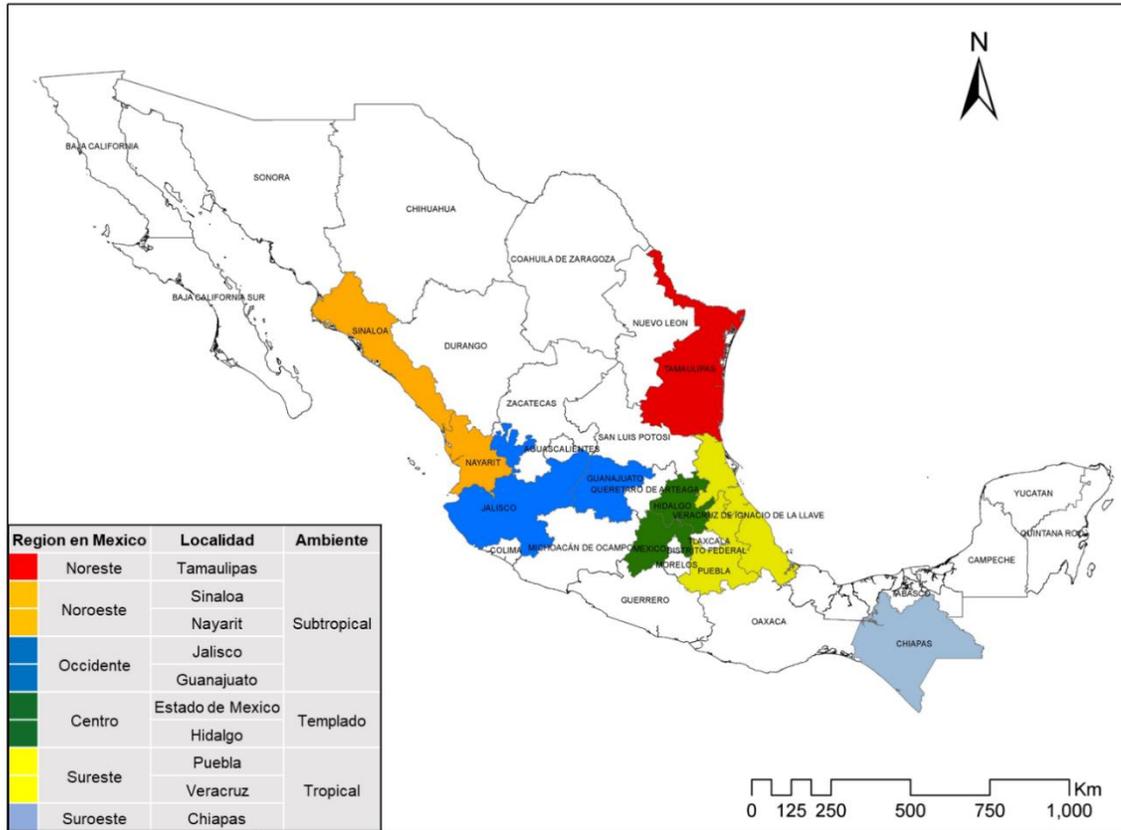


Figura 4. Ubicación de las muestras de hojas infectadas con lesiones de *E. turcicum* en los 10 principales estados productores de maíz en México, 2019.

3.4.2. Aislamientos de lesiones con *E. turcicum*

Las hojas con lesiones de *E. turcicum* se identificaron y almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Para poder aislar las lesiones colectadas y eliminar algún contaminante de campo, se cortaron solo tres pedazos de 1 cm³ de cada colecta entre la lesión necrótica por *E. turcicum* y la parte verde de la hoja. Los tres pedazos se esterilizaron en solución de cloro (Cloralex) al 2 % por 30 segundos, posteriormente se enjuagó con tres gotas de agua destilada-estéril para eliminar los residuos de cloro y después se colocaron en papel filtro para eliminar el exceso de humedad para poder sembrar (Gilchrist, 1995) sobre placas de Petri con jugo V8 al 5% que contiene en 1 L: 5 ml de jugo de verduras V8 (Herdez), 5 gr de carbonato de calcio (JT Baker), 15 gr de Agar bacteriológico (BD Bioxon) y 0.1 gr de Chloramphenicol (SIGMA) para inhibir el crecimiento

bacteriano. Las placas se incubaron en condiciones de 25 °C con 12 horas luz por tres días. Los aislamientos se purificaron pasando una punta de hifa a una nueva placa con medio V8 a 25 °C con 12 horas luz durante 7 días, antes de que llenara toda la placa. (Japheth y Carl, 2018).

3.4.3. Obtención de cultivos puros

En cada uno de los aislamientos se observaron los conidios bajo microscopio óptico. Después de confirmar que las esporas pertenecían morfológicamente a *E. turcicum*, se procedió a la obtención de una sola espora por cepa: Un asa para sembrar bacteria, se hidrató en tubos de 15 ml con 2 ml de agua destilada-estéril hasta formar una burbuja, la asa se pasó por encima del micelio hasta romper la burbuja y quedar las esporas adheridas al círculo del asa. El asa se introdujo nuevamente al tubo con agua para depositar las esporas capturadas y se repitió el procedimiento por tres veces. Posteriormente se agitó suavemente con los dedos y se vertió el agua a una placa Petri con Agua y Agar al 15 % (AA) homogenizando con movimientos circulares. Después de 10 minutos se eliminó el exceso del agua de las placas para colocarlas inclinadas en total oscuridad por 18 horas a temperatura ambiente. Con ayuda de un estereoscopio y aguja se tomó una sola espora germinando para sembrar al centro de una placa Petri con medio V8 para crecer a 25 °C con 12 horas luz. Después de 14 días de crecimiento con un sacabocado se transfirieron 10 discos de la placa a un tubo de 2 ml para congelar a -80 °C por 12 horas, posteriormente se liofilizaron y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Se lograron obtener un total de 140 cultivos puros de *E. turcicum* en México; Cinco cepas corresponden a cada localidad en 2019 y el historial 2010-2019 solo en CIMMYT-El Batán y Agua Fría (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Localidades por región y ambiente de los 140 asilamientos obtenidos de lesiones naturales de *E. turcicum* en México.

Número	Localidad	Region en Mexico	Ambiente
1	Tamaulipas	Noreste	Subtropical
2	Sinaloa	Noroeste	Subtropical
3	Nayarit	Noroeste	Subtropical
4	Jalisco	Occidente	Subtropical
5	Guanajuato	Occidente	Subtropical
6	Estado de Mexico (CIMMYT)	Centro	Templado
7	Hidalgo	Centro	Templado
8	Puebla	Sureste	Tropical
9	Veracruz (CIMMYT)	Sureste	Tropical
10	Chiapas	Suroeste	Tropical

3.4.4. Obtención de los diferenciales *Ht*

Los diferenciales con los monogenes de resistencia *Ht* se obtuvieron del Centro de Stock de Cooperación Genética de Maíz del USDA / ARS, en la Universidad de Illinois, Urbana / Champaign y el Sistema Nacional de Germoplasma de Planta (NPGS) (**Cuadro 3**). Posteriormente se sembraron en la estación experimental de CIMMYT en Agua Fría, OI2019 para multiplicar la semilla (**Figura 5**).

Cuadro 3. Diferenciales utilizados para identificar las razas fisiológicas de *E. turcicum* presentes en México.

Nº	ID accesión	Nombre	Mono gen <i>Ht</i>	Reacción de defensa	Referencia
1	Ames 25219	A619Ht1	<i>Ht1</i>	Lesiones cloróticas	Hooker, 1963
2	Ames 25220	A619Ht2	<i>Ht2</i>	Lesiones necróticas sin esporulación	Hooker, 1977
3	Ames 25221	A619Ht3	<i>Ht3</i>	Lesiones necróticas sin esporulación	Hooker, 1981
4	Ames 25371	B68NtN	<i>HtN</i>	Lesiones retardadas	Gevers, 1975
5	PI 587139	A619ht4	<i>ht4</i>	Halos cloróticos	Carson, 1995



Figura 5. Incremento de semilla de los diferenciales *Ht*, en la estación experimental de CIMMYT en Agua Fría, Puebla OI2019.

3.4.5. Determinación de razas fisiológicas de *E. turcicum*

Los cultivos puros liofilizados se crecieron en medio de cultivo lactosa que contiene en 1 L: 30 g de lactosa, 3 g de caseína, 1 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de MgSO_4 , 15 gr de Agar bacteriológico y 0.1 gr de Chloramphenicol (Tuite, 1969). Las placas se incubaron en condiciones de 25 °C con 12 horas luz por 14 días.

Los 5 diferenciales se sembraron en invernadero en tres macetas de 5 x 5 cm con 3 semillas (para al final solo dejar una semilla por maceta), dentro de charolas negras de plástico de 50 x 30 cm para inocular una cepa por charola. En los primeros 14 días, la temperatura se mantuvo a 27 °C día y 18 °C noches, con iluminación de 600 - 800 W/m^2 (Carson y Van, 1994). A las plantas se le agregó 1.5 L de agua por charola cada 7 días y se fertilizó con Ultrasol 18-18-18 (N-P-K) al momento de la siembra y a los 14 días para mantener el vigor de la planta (Japheth y Carl, 2018).

Los conidios se obtuvieron enjuagando las placas Petri con 15 ml de agua destilada estéril con 10 μl lt^{-1} con Tween 20 para dispersar y adherir los conidios

a las hojas de maíz. La concentración de la suspensión conidial se ajustó usando una cámara de Bauer a 2×10^4 conidios ml^{-1} (Muiru *et al.*, 2010).

Las plantas de 14 días (3 hojas), se inocularon en la copa de las plántulas con 200 μl de la dilución conidial utilizando una pipeta. Posteriormente, las plantas inoculadas se colocaron en una cámara de humedad durante 24 h (Japheth y Carl, 2018). La temperatura se modificó a 24 - 25 °C día y 18 - 16 °C noches, con sombra durante el día manteniendo una iluminación de 100 - 200 W/m^2 (Carson y Van, 1994).

Las evaluaciones de la reacción de *E. turcicum* se realizaron a los 14 días después de la inoculación (28 días después de la siembra) con una escala visual de 0 a 5, donde 0 a 3 es resistentes (R) y 4 a 5 son susceptibles (S) en los diferenciales *Ht* (**Cuadro 4 y Figura 6**) (Muiru *et al.*, 2010).

Cuadro 4. Escala de evaluación visual de 0 a 5 en los diferenciales *Ht* (Muiru *et al.*, 2010).

Escala	Reacción	Descripción
0	R	No síntomas
1	R	Lesiones cloróticas sin necrosis
2	R	Lesiones cloróticas con necrosis leve
3	R	Lesiones cloróticas con necrosis moderada
4	S	Lesiones marchitas y necróticas sin clorosis
5	S	Lesiones elípticas de color bronceado



Figura 6. Escala de evaluación visual de 0 a 5 en los diferenciales *Ht* (Muiru *et al.*, 2010), donde 0 a 3 es una reacción de resistentes (R) y 4 a 5 es susceptibles (S) en los diferenciales *Ht*.

3.4.6. Análisis de datos

Para los casos de las variables de crecimiento, tono de oscuridad y número de conidios producidos en placas Petri con medio V8 a los 10 días de crecimiento de cada uno de los 140 aislamientos, se realizaron análisis de varianza con un modelo lineal general. En ninguno de los tres casos el ANOVA resultó significativa, y se usó la prueba de LSD para comparar las medias.

Para determinar la diversidad racial se utilizó el análisis simple debido que los datos obtenidos fueron cualitativos.

Resultados

3.3.2. Postulación de genes

A las 24 horas después de la inoculación, todas las razas produjeron puntos cloróticos en la zona inoculada como reacción en respuesta de la planta. En el control positivo se iniciaron a observar lesiones plateadas de 2~4 cm desde los 7 días y las lesiones elípticas de color bronceado fueron claras a partir de los 12 días después de la inoculación. Las reacciones en los diferenciales a cada raza en particular fueron claras a los 14 días, presentando lesiones necróticas locales que se extendieron a lo largo de la hoja.

La reacción de infección para diferenciar la respuesta de resistencia y susceptibilidad siempre se comportó de forma homogénea, lo que indicó pureza en los monospóricos de *E. turcicum* y en los genotipos utilizados como diferenciales *Ht*. El genotipo *ht4* presentó síntomas dentro del rango de escala 4 a 5 en todos los aislamientos. El diferencial *Ht1* en su reacción de resistencia siempre mostró lesiones cloróticas alargadas. Mientras que el diferencial *NtN* solo mostró algunos puntos cloróticos muy pequeños casi difíciles de ver. Los diferenciales *Ht2* y *Ht3* se mostraron similares en su reacción de resistencia con lesiones cloróticas cortas y necrosis leve.

La información obtenida de las diferentes variables evaluadas en los 8 principales estados productores de maíz en México 2019 se muestran en el **Cuadro 5**, así como el historial 2010-2019 para el ambiente templado en el **Cuadro 6** y tropical en el **Cuadro 7**. La postulación de genes basada en los cuatro diferenciales con los monogenes de resistencia *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *HtN*) y *ht4* como control positivo permitió identificar 6 razas fisiológicas: 2, 3, 23, 3N, 23N y 123N (**Figura 7**) presentes en los 140 aislamientos de *E. turcicum* colectados en México, sin intervención molecular debido que los genotipos han sido secuenciados previamente (Carson, 1995; Hooker, 1963, 1977, 1981; Gevers, 1975).

Cuadro 5. Postulación de genes de las muestras en los 8 principales estados productores de maíz en México en el ciclo agrícola 2019.

Nombre de cepa* (localidad/año/ muestra)	Micelio**		numero de conidios (Log10+1)	Reacción en los diferenciales Ht					Razas fisiológicas identificadas
	Crecimiento	Obscuridad		Ht4	Ht1	Ht2	Ht3	HtN	
TAM19-01	5	3	5.43	S	R	S	S	S	23n
TAM19-02	6	2	5.48	S	R	S	S	R	23
TAM19-03	3	3	5.17	S	R	S	S	R	23
TAM19-04	6	2	5.45	S	R	S	S	R	23
TAM19-05	6	2	5.87	S	R	R	S	S	3n
SIN19-01	5	2	5.60	S	R	S	S	R	23
SIN19-02	6	2	5.40	S	R	S	S	R	23
SIN19-03	4	2	5.81	S	R	S	S	R	23
SIN19-04	7	2	6.07	S	S	S	S	S	123N
SIN19-05	3	2	5.81	S	S	S	S	S	123N
NAY19-01	3	2	5.06	S	R	R	S	R	3
NAY19-02	5	3	5.59	S	R	S	S	R	23
NAY19-03	6	1	5.83	S	R	S	S	R	23
NAY19-04	3	1	5.78	S	R	S	S	R	23
NAY19-05	8	2	5.87	S	R	R	S	R	3
JAL19-01	7	2	5.62	S	R	S	S	S	23n
JAL19-02	6	1	5.52	S	R	S	S	R	23
JAL19-03	5	2	5.75	S	R	R	S	R	3
JAL19-04	5	2	5.93	S	R	S	S	R	23
JAL19-05	4	2	5.71	S	R	S	R	R	2
GUA19-01	7	2	5.75	S	R	S	S	S	23n
GUA19-02	5	1	5.21	S	R	R	S	R	3
GUA19-03	3	2	5.32	S	R	S	S	R	23
GUA19-04	3	2	5.21	S	R	R	S	R	3
GUA19-05	3	1	4.78	S	R	R	S	R	3
HID19-01	7	2	5.17	S	R	S	S	S	23n
HID19-02	7	2	5.96	S	R	S	S	R	23
HID19-03	6	1	5.59	S	R	S	S	S	23n
HID19-04	6	1	5.99	S	R	S	S	R	23
HID19-05	6	2	5.88	S	R	S	S	S	23n
PUE19-01	5	3	5.48	S	R	R	S	R	3
PUE19-02	4	1	5.38	S	R	S	S	R	23
PUE19-03	4	3	6.15	S	R	S	S	R	23
PUE19-04	7	2	5.59	S	R	S	S	R	23
PUE19-05	6	1	5.80	S	R	S	S	S	23n
CHI19-01	5	2	5.76	S	R	S	S	S	23n
CHI19-02	7	1	6.08	S	R	S	S	S	23n
CHI19-03	3	3	5.27	S	R	S	S	R	23
CHI19-04	5	2	5.73	S	R	S	S	R	23
CHI19-05	7	1	5.72	S	R	S	S	R	23

*Tamaulipas (TAM), Sinaloa (SIN), Nayarit (NAY), Jalisco (JAL), Guadalajara (GUA), Hidalgo (HID), Puebla (PUE), Chiapas (CHI). ** Crecimiento = Diámetro en centímetros de crecimiento del micelio en placas Petri con medio V8 a los 10 días después del aislamiento. ***Obscuridad: 1 = micelio de color gris en placas V8, 2 = micelio de color negro en placas V8 y 3 = micelio de color negro intenso en placas V8. S = susceptible y R = resistente.

Cuadro 6. Postulación de genes de las muestras para el historial 2010 a 2019 en ambiente templado CIMMYT- El Batán, Estado de México.

Nombre de cepa (localidad/año/ muestra)	Micelio*		numero de conidios (Log10+1)	Reacción en los diferenciales Ht					Razas fisiológicas identificadas
	Crecimiento	Obscuridad		ht4	Ht1	Ht2	Ht3	HtN	
BA10-01	8	1	5.58	S	R	S	S	R	23
BA10-02	8	1	6.05	S	R	S	S	R	23
BA10-03	6	1	5.41	S	R	S	S	R	23
BA10-04	8	1	5.57	S	R	S	S	R	23
BA10-05	8	1	5.99	S	R	S	S	R	23
BA11-01	8	1	5.27	S	R	S	S	R	23
BA11-02	8	1	5.31	S	R	S	S	R	23
BA11-03	8	2	5.55	S	S	S	S	S	123N
BA11-04	6	1	5.48	S	R	S	S	R	23
BA11-05	5	3	5.60	S	R	S	S	S	23n
BA12-01	8	2	6.01	S	S	S	S	S	123N
BA12-02	5	3	5.54	S	R	S	S	S	23n
BA12-03	8	1	5.90	S	R	S	S	R	23
BA12-04	8	1	5.49	S	R	S	S	R	23
BA12-05	8	1	5.51	S	R	S	S	R	23
BA13-01	6	1	5.35	S	R	S	S	R	23
BA13-02	6	1	5.54	S	R	S	S	R	23
BA13-03	8	1	6.06	S	R	S	S	R	23
BA13-04	6	1	5.41	S	R	S	S	R	23
BA13-05	6	1	5.51	S	R	S	S	R	23
BA14-01	8	1	5.69	S	R	S	S	R	23
BA14-02	8	2	4.75	S	R	S	S	R	23
BA14-03	8	2	5.48	S	R	S	S	R	23
BA14-04	8	1	5.67	S	R	S	S	R	23
BA14-05	8	2	5.41	S	R	S	S	R	23
BA15-01	8	1	5.23	S	R	S	S	R	23
BA15-02	6	1	4.92	S	R	S	R	R	2
BA15-03	8	1	4.64	S	R	S	S	R	23
BA15-04	8	1	5.52	S	R	S	S	R	23
BA15-05	8	1	5.09	S	R	S	S	R	23
BA16-01	8	2	5.74	S	R	S	S	R	23
BA16-02	8	2	5.85	S	R	S	S	R	23
BA16-03	8	2	5.28	S	R	S	S	R	23
BA16-04	8	2	5.51	S	R	S	S	R	23
BA16-05	8	2	5.77	S	R	S	S	R	23
BA17-01	5	2	5.33	S	R	S	S	R	23
BA17-02	6	2	5.93	S	R	R	S	R	3
BA17-03	5	2	5.35	S	R	S	S	R	23
BA17-04	5	2	5.40	S	R	S	S	R	23
BA17-05	5	2	5.37	S	R	S	S	R	23
BA18-01	6	2	5.59	S	R	S	S	R	23
BA18-02	6	2	5.52	S	R	S	S	S	23n
BA18-03	5	2	5.12	S	R	S	S	R	23
BA18-04	6	2	5.57	S	R	S	S	R	23
BA18-05	5	2	5.40	S	R	S	S	R	23
BA19-01	6	2	5.39	S	R	S	S	R	23
BA19-02	8	2	5.98	S	R	S	S	S	23n
BA19-03	6	2	5.23	S	R	S	S	S	23n
BA19-04	6	2	5.39	S	R	S	S	R	23
BA19-05	6	2	5.29	S	R	S	S	R	23

*Crecimiento = Diámetro en centímetros de crecimiento del micelio en placas Petri con medio V8 a los 10 días después del aislamiento. Obscuridad: 1 = micelio de color gris en placas V8, 2 = micelio de color negro en placas V8 y 3 = micelio de color negro intenso en placas V8. S = susceptible y R = resistente.

Cuadro 7. Postulación de genes de las muestras para el historial 2010 a 2019 en ambiente tropical CIMMYT- Agua Fría, Veracruz.

Nombre de cepa (localidad/año/muestra)	Micelio		# de conidios (Log10+1)	Reacción en los diferenciales Ht					Razas fisiológicas identificadas
	Crecimiento	Obscuridad*		Ht4	Ht1	Ht2	Ht3	HtN	
AF10-01	8	2	5.24	S	R	S	R	R	2
AF10-02	8	2	5.47	S	R	S	S	R	23
AF10-03	8	2	5.08	S	R	S	S	R	23
AF10-04	8	2	5.51	S	R	S	S	R	23
AF10-05	8	2	5.26	S	R	S	S	R	23
AF11-01	8	2	5.21	S	R	S	S	R	23
AF11-02	8	2	5.35	S	R	S	S	R	23
AF11-03	8	2	5.19	S	R	S	S	R	23
AF11-04	8	2	5.79	S	R	S	S	S	23n
AF11-05	6	3	5.67	S	R	S	S	S	23n
AF12-01	8	2	4.51	S	R	S	S	R	23
AF12-02	5	3	6.05	S	S	S	S	S	123N
AF12-03	6	3	5.44	S	S	S	S	S	123N
AF12-04	8	2	5.59	S	R	S	S	R	23
AF12-05	8	2	5.57	S	R	S	S	R	23
AF13-01	8	2	5.64	S	R	S	S	R	23
AF13-02	8	1	5.00	S	R	S	S	R	23
AF13-03	6	3	5.31	S	R	S	S	R	23
AF13-04	5	3	5.85	S	S	S	S	S	123N
AF13-05	8	2	5.60	S	R	S	S	R	23
AF14-01	8	1	4.88	S	R	S	S	R	23
AF14-02	6	3	5.49	S	R	R	S	R	3
AF14-03	5	3	5.39	S	R	S	S	R	23
AF14-04	8	2	5.71	S	R	S	S	R	23
AF14-05	8	2	5.79	S	R	S	S	R	23
AF15-01	8	2	5.89	S	R	S	S	R	23
AF15-02	8	1	4.94	S	R	S	S	R	23
AF15-03	8	3	4.96	S	R	S	S	R	23
AF15-04	8	3	5.70	S	S	S	S	S	123N
AF15-05	6	3	5.39	S	R	S	S	R	23
AF16-01	8	2	5.51	S	R	S	S	R	23
AF16-02	8	3	5.66	S	S	S	S	S	123N
AF16-03	6	3	5.19	S	R	S	S	R	23
AF16-04	8	2	5.79	S	R	S	S	S	23n
AF16-05	6	3	5.68	S	R	S	S	S	23n
AF17-01	8	2	5.86	S	R	S	S	R	23
AF17-02	8	2	5.61	S	R	S	S	R	23
AF17-03	8	3	5.66	S	S	S	S	S	123N
AF17-04	6	3	5.52	S	R	S	S	R	23
AF17-05	8	2	5.56	S	R	S	S	R	23
AF18-01	6	3	5.59	S	R	S	S	S	23n
AF18-02	8	2	5.89	S	R	S	S	R	23
AF18-03	8	3	5.76	S	R	S	S	R	23
AF18-04	6	3	5.45	S	R	S	S	R	23
AF18-05	5	3	5.43	S	R	S	S	R	23
AF19-01	8	1	5.57	S	R	S	S	S	23n
AF19-02	8	3	5.66	S	S	S	S	S	123N
AF19-03	8	3	5.63	S	R	S	S	S	23n
AF19-04	6	3	5.45	S	R	S	S	R	23
AF19-05	5	3	5.44	S	R	S	S	R	23

*Crecimiento = Diámetro en centímetros de crecimiento del micelio en placas Petri con medio V8 a los 10 días después del aislamiento. **Obscuridad: 1 = micelio de color gris en placas V8, 2 = micelio de color negro en placas V8 y 3 = micelio de color negro intenso en placas V8. S = susceptible y R = resistente.

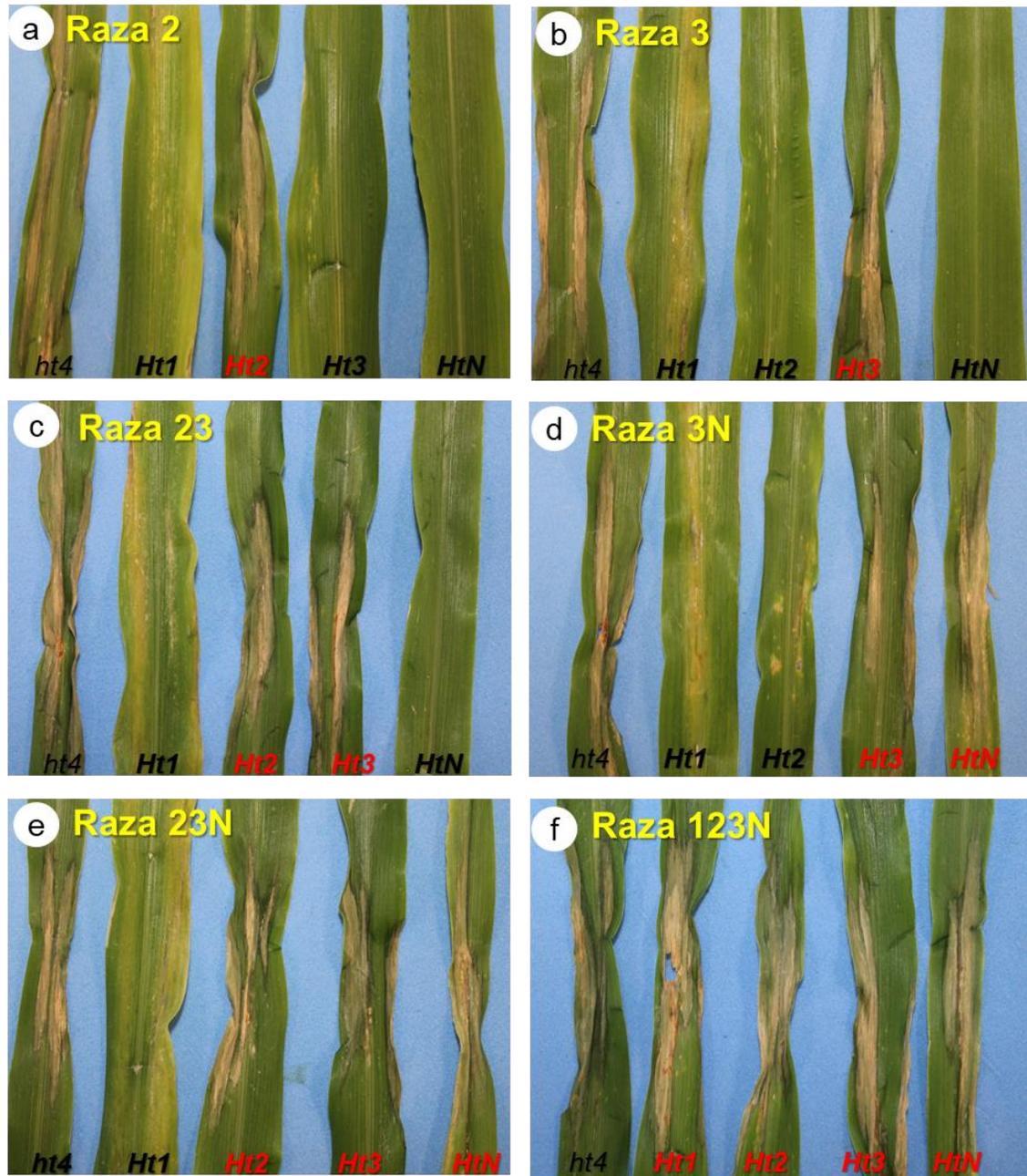


Figura 7. Las seis razas fisiológicas de *E. turcicum* identificadas en México 2019; a) Raza 2 ($Ht1 Ht3 NtN / Ht2$), b) Raza 3 ($Ht1 Ht2 NtN / Ht3$), c) Raza 23 ($Ht1 NtN / Ht2 Ht3$), d) Raza 3n ($Ht1 Ht2 / Ht3 NtN$), e) Raza 23n ($Ht1 / Ht2 Ht3 NtN$) y f) Raza 123N ($0 / Ht1 Ht2 Ht3 NtN$). Nota: El diferencial recesivo *ht4* ausente de los monogenes de resistencia *Ht*, mostró síntomas de *E. turcicum* en los 140 aislamientos y sirvió de indicador para corroborar que la concentración de esporas y las condiciones climáticas fueron las adecuadas.

3.5.2. Distribución de las razas fisiológicas de *E. turcicum*

La raza 23 fue la dominante en todos los estados productores de maíz en México (**Cuadro 8**), en los historiales de los ambientes templado (**Cuadro 9**) y tropical (**Cuadro 10**). La raza 23n fue la segunda más común. La raza más completa 123N solo se presentó en el estado de Sinaloa, en el ambiente tropical casi se presentó consecutivamente en cada año, mientras que, en el ambiente templado solo se encontró en el año 2011 y 2012. La raza 3 se observó concentrada en la parte occidente de México (Nayarit, Jalisco y Michoacán). La raza 2 solo se presentó en tres aislamientos: Jalisco 2019, ambiente templado 2015 y en el ambiente tropical en 2010. La raza 3n solo se encontró en un aislamiento del estado de Tamaulipas 2019.

Cuadro 8. Resumen de las 6 razas fisiológicas de *E. turcicum* presentes en los 8 principales estados productores de maíz en México en el ciclo agrícola 2019.

Localidades en el año 2019	Razas fisiológicas de <i>E. turcicum</i>					
	2	3	23	3n	23n	123N
Tamaulipas	0	0	3	1	1	0
Sinaloa	0	0	3	0	0	2
Nayarit	0	2	3	0	0	0
Jalisco	1	1	2	0	1	0
Guanajuato	0	3	1	0	1	0
Estado de México	0	0	3	0	2	0
Hidalgo	0	0	2	0	3	0
Puebla	0	1	3	0	1	0
Veracruz	0	0	2	0	2	1
Chiapas	0	0	3	0	2	0
Total	1	7	25	1	13	2

En cada localidad se obtuvieron 5 aislamientos para representar a los 8 principales estados productores de maíz en México con un total de 40 aislamientos.

Cuadro 9. Resumen de las razas fisiológicas de *E. turcicum* presentes en el historial 2010 a 2019 en ambiente templado CIMMYT- El Batan, Estado de México.

Historial en ambiente templado (año)	Razas fisiológicas de <i>E. turcicum</i>					
	2	3	23	3n	23n	123N
2010	0	0	5	0	0	0
2011	0	0	3	0	1	1
2012	0	0	3	0	1	1
2013	0	0	5	0	0	0
2014	0	0	5	0	0	0
2015	1	0	4	0	0	0
2016	0	0	5	0	0	0
2017	0	1	4	0	0	0
2018	0	0	4	0	1	0
2019	0	0	3	0	2	0
Total	1	1	41	0	5	2

En cada año se obtuvieron 5 aislamientos para representar el historial 2010-2019 en el ambiente templado dentro de la estación experimental de CIMMYT el Batan en el Estado de México con un total de 50 aislamientos.

Cuadro 10. Resumen de las razas fisiológicas de *E. turcicum* presentes en el historial 2010 a 2019 en ambiente tropical CIMMYT- Agua Fría, Veracruz.

Historial en ambiente tropical (año)	Razas fisiológicas de <i>E. turcicum</i>					
	2	3	23	3n	23n	123N
2010	1	0	4	0	0	0
2011	0	0	3	0	2	0
2012	0	0	3	0	0	2
2013	0	0	4	0	0	1
2014	0	1	4	0	0	0
2015	0	0	4	0	0	1
2016	0	0	2	0	2	1
2017	0	0	4	0	0	1
2018	0	0	4	0	1	0
2019	0	0	2	0	2	1
Total	1	1	34	0	7	7

En cada año se obtuvieron 5 aislamientos para representar el historial 2010-2019 en el ambiente tropical dentro de la estación experimental de CIMMYT Agua Fría en el Estado de Puebla con un total de 50 aislamientos.

3.5.3. Frecuencia de las razas fisiológicas de *E. turcicum*

En general, la raza 23 fue la dominante con una representación de 68 por ciento, seguida de las razas 23n (15%), 123N (8 %), 3 (6 %), 2 (2 %) y 3n (1 %) obtenidas de los 140 aislamientos (**Figura 8**).

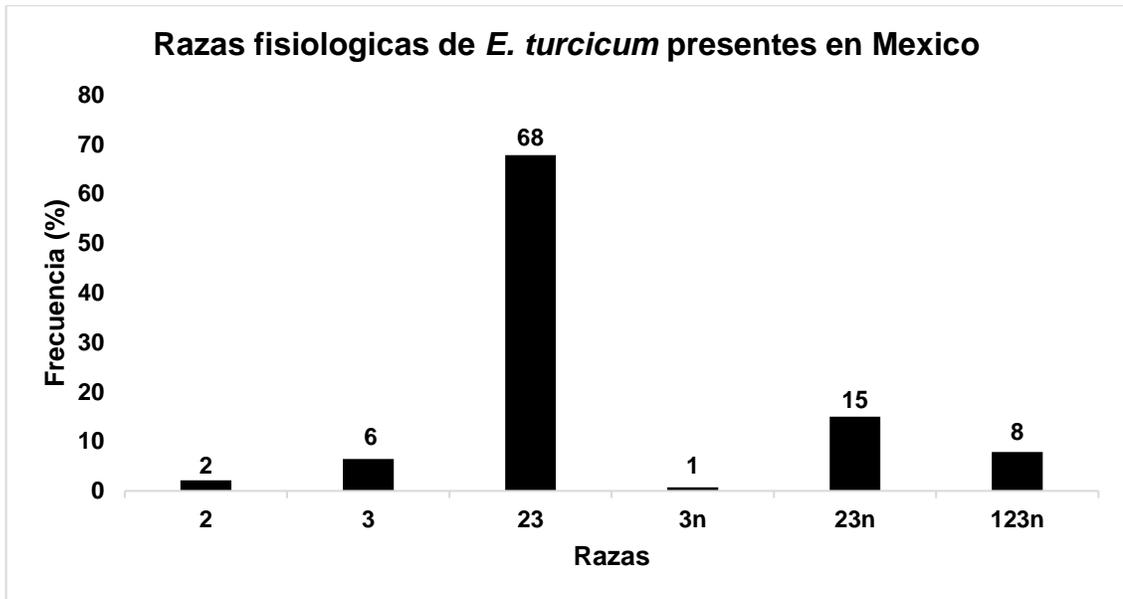


Figura 8. Distribución de las razas fisiológicas presentes en México. La raza 23 fue la dominante con una representación total de 68 por ciento de n = 140 aislamientos individuales de *E. turcicum*.

3.5.4. Frecuencia de virulencia de los aislamientos en los diferenciales *Ht*.

La virulencia obtenida de los 140 aislamientos en los diferenciales *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *NtN*) mostrada en los diferenciales como susceptibilidad, fue de: 3.5 %, 41.8 %, 44.1 % y 10.6 %, respectivamente (**Figura 9**). Para obtener la reacción de los diferenciales *Ht*, cambiamos resistente (R) por el valor de cero (0) y para la reacción de susceptibilidad (S) colocamos el valor de uno (1).

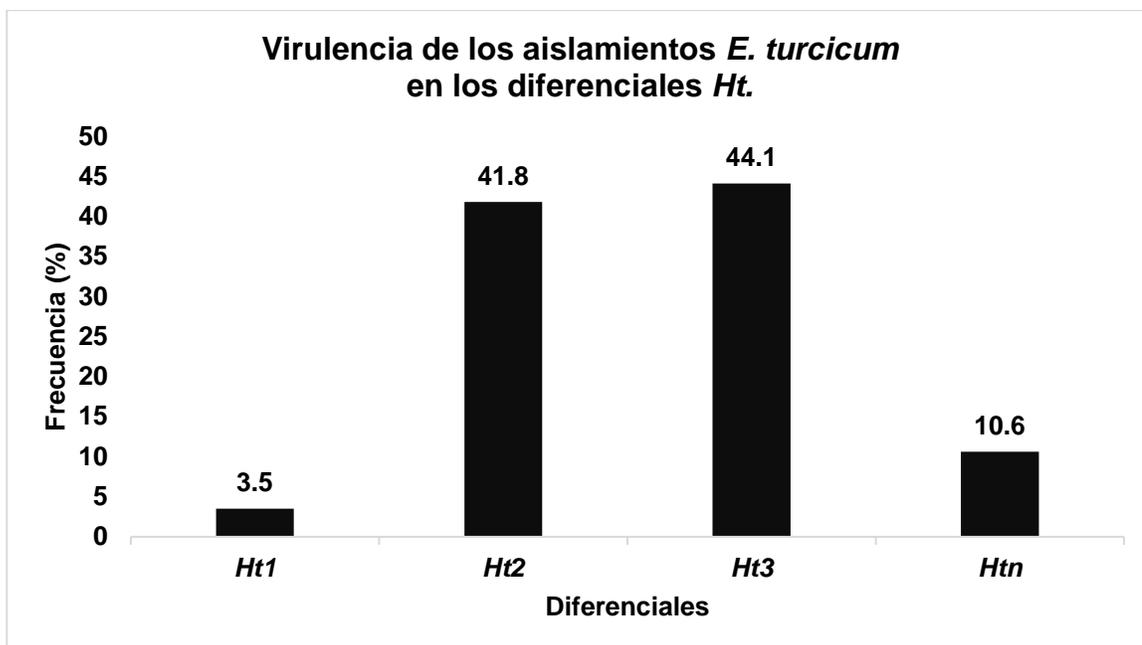


Figura 9. Distribución de virulencia de las razas en los diferenciales *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *NtN*). Los valores corresponden a los aislamientos individuales de *E. turcicum* (n = 140).

3.4. Discusión

En este estudio se identificaron 6 razas fisiológicas (2, 3, 23, 3n, 23n y 123N) obtenidas de 140 aislamientos de hojas de maíz con lesiones *E. turcicum* en México, en base a la reacción en cuatro diferenciales con los monogenes de resistencia *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3* y *NtN*) y *ht4* como control positivo, siendo la raza 23 la dominante en todos los ambientes (Tropical, Subtropical y Templado) y años muestreados (2010-2019). Resultados previos por Welz et al. (1993) identificaron solo tres razas (23n, 23 y 2n) presentes en México. Los resultados de esta investigación confirman la ausencia de las razas con virulencia en el diferencial *Ht1* (Hooker, 1963) o dicho de otra forma, se confirma la presencia del monogene *Ht1* en los híbridos de maíz en México y la dificultad de transferencia de los monogenes de resistencia *Ht2* y *Ht3* en los programas de mejoramiento (Welz et al., 2000), debido al gen superior *Sht1* (Simcox y Bennetzen, 1993).

México es un lugar clave para el estudio de la diversidad racial de *E. turcicum*, debido que en esta investigación el monogen *NtN* de origen mexicano (Pepitilla) mostró inmunidad en reacción de resistencia. Además, los estudios de Borchardt et al. (1998), revelaron que las muestras mexicanas de *E. turcicum* tenían una diversidad genética alta. Así como, Wellhausen, (1951) considera que posiblemente México es el lugar de origen del maíz.

Los monogenes de resistencia *Htm* (Robbins y Warren, 1993), *HtP* (Ogliari et al., 2005) y *NtNB* (Wang et al., 2012) también inducen resistencia a *E. turcicum* y deberían incluirse en las siguientes investigaciones de diversidad racial.

3.7. Conclusiones

Los resultados de identificación de las razas fisiológicas a través del concepto gen por gen, en base a los diferenciales *Ht*, da apertura al seguimiento de otros trabajos de investigación, tales como: 1) Evaluación de la toxina secretada por el hongo *E. turcicum*, 2) identificación de nuevas fuentes de resistencia monogénica y poligénica, 3) secuenciación de las razas identificadas y 4) estudios de herencia a la resistencia de la enfermedad del tizón norteño, así como 5) la asociación con otros tizones o royas que afectan a la producción potencial del cultivo de maíz en México.

3.8. Literatura

- Ayala Escobar, V., Osada Kawasoe, S., Narro Sánchez, J., & Sandoval Islas, S. (1994). Variabilidad patogénica de *Helminthosporium turcicum* Pass. (*Exserohilum turcicum* Pass.) (*Setosphaeria turcica* LL & Suggs.) en sorgo (*Sorghum bicolor* M.) en el Bajío México (No. TESIS.). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Centro de Fitopatología.
- Borchardt, D. S., Welz, H. G., & Geiger, H. H. (1998). Genetic structure of *Setosphaeria turcica* populations in tropical and temperate climates. *Phytopathology*, 88(4), 322-329.
- Bunkoed, W., Kasam, S., Chaijuckam, P., Yhamsoongnern, J., & Prathuangwong, S. (2014). Sexual reproduction of *Setosphaeria turcica* in natural corn fields in Thailand. *Kasetsart J. (Natl Sci.)*, 48, 175-182.
- Carson, M. L. (1995). A new gene in maize conferring the "Chlorotic Halo" reaction to infection by *Exserohilum turcicum*. *Plant Dis.* 79, 717–720.
- Carson, M. L., & Van Dyke, C. G. (1994). Main content area Effect of light and temperature on expression of partial resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. *Plant disease*, 78(5), 519-522.
- Dong, J., Fan, Y., Gui, X., An, X., Ma, J., and Dong, Z. (2008). Geographic distribution and genetic analysis of physiological races of *Setosphaeria turcica* in Northern China. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 3:389-398. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2008.389.398>
- Formento, A. N. (2010). Enfermedades foliares reemergentes del cultivo de maíz: royas (*Puccinia sorghi* y *Puccinia polysora*), tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) y mancha ocular (*Kabatiella zae*). INTA.
- Gevers, H. O. (1975). A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight in maize. *Plant Dis. Rep.* 59, 296–299.
- Gianasi, L., de Castro, H. A., and da Silva, H. P. 1996. Raças fisiológicas de *Exserohilum turcicum* identificadas em regiões produtoras de milho no Brasil, Safra 93/94. *Summa Phytopathol.* 22:214-217.
- Gilchrist, L. (1995). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. CIMMYT
- Hooker, A. L. (1963). Monogenic resistance in *Zea mays* L. to *Helminthosporium turcicum*, *Crop Sci.*, 1963, 3: 381.
- Hooker, A. L. (1977). A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Sci.* 17, 132–135.
- Hooker, A. L. (1981). Resistance to *Helminthosporium turcicum* from *Tripsacum floridanum* incorporated into corn. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 55, 87–88.

- Human, M. P., Berger, D. K., & Crampton, B. G. (2020). Time-Course RNAseq Reveals *Exserohilum turcicum* Effectors and Pathogenicity Determinants. *Frontiers in microbiology*, 11, 360.
- Japheth D. Weems and Carl A. Bradley. (2018). *Exserohilum turcicum* Race Population Distribution in the North Central United States. Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana, 61801. *Plant Disease*, February 2018, Volume 102, Number 2, Pages 292-299.
- Jindal, K. K., Tenuta, A. U., Woldemariam, T., Zhu, X., Hooker, D. C., & Reid, L. M. (2019). Occurrence and distribution of physiological races of *Exserohilum turcicum* in Ontario, Canada. *Plant disease*, 103(7), 1450-1457.
- Leonard, K. J., Levy, Y., & Smith, D. R. (1989). Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. *Plant disease*, 73(9), 776-777.
- Luttrell ES, (1958). The perfect stage of *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology*, 48:281-287.
- Ma, Z., Liu, B., He, S., & Gao, Z. (2020). Analysis of physiological races and genetic diversity of *Setosphaeria turcica* (Luttr.) KJ Leonard & Suggs from different regions of China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1-12.
- Muiru, W. M., Koopmann, B., Tiedemann, A. V., Mutitu, E. W., & Kimenju, J. W. (2010). Race typing and evaluation of Aggressiveness of *Exserohilum turcicum* isolates of Kenyan, German and Austrian origin. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(3), 277-284.
- Ogliari, J. B., Guimarães, M. A., Geraldi, I. O., & Camargo, L. E. A. (2005). New resistance genes in the *Zea mays*: *Exserohilum turcicum* pathosystem. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 435-439.
- Robbins Jr, W. A., & Warren, H. L. (1993). Inheritance of resistance to *Exserohilum turcicum* in PI 209135, 'Mayorbela' variety of maize. *Maydica*, 38(3), 209-213
- Simcox, K. D., and Bennetzen, J. L. (1993). Mapping the *NtN* resistance gene to the long arm of chromosome 8. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 67, 118–119.
- Sivanesan A, (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Wallingford, UK: CAB International, vi + 261pp.
- Turgay, E. B., Büyük, O., Tunalı, B., Helvacıoğlu, Ö., & Kurt, Ş. (2020). Detection of the race of *Exserohilum turcicum* [(Pass.) KJ Leonard & Suggs] causing northern leaf blight diseases of corn in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 102(2), 387-393.
- Wang H., Xiao Z. X., Wang F. G., Xiao Y. N., Zhao J. R., Zheng Y. L., et al. (2012). Mapping of *NtNB*, a gene conferring non-lesion resistance before heading to *Exserohilum turcicum* (Pass.), in a maize inbred line derived from the Indonesian variety Bramadi. *Genet. Mol. Res. GMR* 11 2523–2533. 10.4238/2012.July.10.7.

Wellhausen, E. J. E. J. (1951). Razas de maíz en México; origen, características y distribución (No. 04; SB191. M2, W45.).

Welz, H. G., & Geiger, H. H. (2000). Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. *Plant breeding*, 119(1), 1-14.

Welz, H. G., R. Wagner, and H. H. Geiger, (1993). Virulence variation in *Setosphaeria turcica* populations collected from maize in China, Mexico, Uganda, and Zambia. *Phytopathology*, 83: 1856.

Welz, H. G., R. Wagner, and H. H. Geiger, (1993). Virulence variation in *Setosphaeria turcica* populations collected from maize in China, Mexico, Uganda, and Zambia. *Phytopathology*, 83: 1856.

Capítulo 4: EVALUACIÓN DE LA TOXINA MONOCERINA PRODUCIDA POR *Exserohilum turcicum* EN MAÍZ

4.1. Resumen

Monocerina es una toxina no específica producida por el hongo *Exserohilum turcicum* causante del tizón norteño en maíz. Las cepas productoras de monocerina provocan la inhibición de la síntesis de clorofila y reducen el crecimiento de raíces. Debido a las complicaciones que surgen de la planta en respuesta defensiva, varios estudios sugieren determinar la reacción a la toxicidad *in vitro*. En este estudio se probaron 11 medios de cultivo donde el medio Fries modificado mostró mayor absorción y no fue tóxico para las plántulas. Los genotipos A619ht4 (susceptible) y CML495 (resistente) fueron utilizados para los bioensayos, cortando el tallo para la absorción de la toxina a través de los haces vasculares en tubos de ensayo de 15 ml. La toxina fue purificada utilizando metanol al 20 % y mostró diferencias entre los genotipos a diferencia de la toxina pura que fue muy potente hasta en el genotipo resistente.

4.2. Introducción

El tizón foliar por turcicum (en inglés Turcicum leaf blight, TLB), también conocido como el tizón norteño de la hoja de maíz (*Zea mays* L.) (en inglés Northern corn leaf blight, NCLB) causado por el hongo *Exserohilum turcicum* (Leonard y Suggs), antes *Helminthosporium turcicum* (Passerini), Teleomorfo: *Setosphaeria turcica* (Luttrell), produce una toxina llamada monocerina (Robeson y Strobel, 1982). Las cepas productoras de monocerina provocan la virulencia del hongo, inhibiendo la síntesis de clorofila en las hojas y reduciendo el crecimiento de raíces en maíces susceptibles (Bashan et al., 1995; Cuq et al., 1993; Zhang et al., 2007).

Monocerina es una toxina no específica obtenida por primera vez por Aldridge et al., en 1970, de asilamientos de *Exserohilum monoceras*. Posteriormente, fue obtenida de *Fusarium larvarum* (Claydon et al., 1979), *Drechslera ravenelii* (Scott

et al., 1984) y *Microdochium bolleyi* (Zhang et al., 2008). En 1982, Robeson y Strobel lograron obtener la toxina monocerina de lesiones de *E. turcicum* en hojas de pasto Johnson (*Sorghum halepense*). Finalmente, Bashan y Levy en 1992; Cuq et al. en 1993, obtuvieron monocerina de aislamientos del hongo *E. turcicum* en hojas de maíz. En 2011, Hailmi et al. encontraron el uso de un bioherbicida con la misma toxina producida por el hongo *E. monoceras*.

En 1997, Chauhan et al. realizaron bioensayos de extractos con metanol, cloroformo y éter con concentraciones de monocerina al 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 % y observaron una gran sensibilidad de la clorofila, lo que limita determinar el grado de precisión hasta en las concentraciones más bajas. En 2016, Li et al., revelaron en uno de sus estudios, que las lesiones causadas por monocerina en las hojas de maíz, eran similares a las causadas por el metanol solo, que usaron como solvente.

Wathaneeyawech et al. (2015), utilizaron acetato de etilo. Las lesiones producidas por la toxina fueron similares a las causadas por *E. turcicum*. Zhang et al. (2007, 2012); Gu et al. (2014), descubrieron que monocerina es estable al calor, sensibles a la luz y puede disolverse en varios solventes orgánicos. Dong et al. (1993); Li et al. (2016), compararon la toxina y la virulencia de *E. turcicum in vivo* y encontraron que la respuesta defensiva de la planta, complica la identificación por reacción de fitotoxicidad, por lo que recomiendan realizar bioensayos *in vitro*.

Debido a las dificultades y diferencias para evaluar la toxina monocerina, en este estudio se desarrolló un protocolo con el medio Fries modificado para la producción de la toxina y se usó metanol como disolvente para posteriormente utilizar la toxina purificada en los bioensayos con plántulas de maíz *in vitro*.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Medios de cultivo líquido

Se realizaron pruebas con 11 medios de cultivo líquido (Tejido, Espiga, V8, Frijol chino, PDB, Czapek, Czapek Dox, Fries, SNA, Zang, Richard) para seleccionar un medio de cultivo que tuviera buena absorción de líquido y que no fuera tóxico para las plántulas de maíz. El experimento se llevó a cabo en un cuarto de incubación a 25 °C con luz todo el tiempo en plántulas del genotipo de maíz A619ht4, ausente de los genes de resistencia *Ht* (Carson, 1995), en etapa V4. Se midió la absorción líquida y se evaluó la severidad de las plántulas en escala de 1 a 5 a los días 1, 2, 3 y 6. Los tres mejores medios fueron Tejido, SNA y Fries (**Figura 10**).

También se realizaron pruebas para mejorar el procedimiento estándar: El primer procedimiento fue como regularmente se realiza dentro del laboratorio, al cual se le llamó procedimiento estándar (PE), el segundo fue el PE donde se cambió utilizando tubos nuevos (PE+tubo nuevo), el tercero fue el PE y además se esterilizaron los tallos de las plántulas después de cortar en solución de alcohol al 70 % (PE+alcohol), en el cuarto procedimiento se utilizó el PE y los tallos se cortaron y se sumergieron en agua estéril, un segundo corte se realizó dentro del agua (PE+bajo el agua). Se midió la absorción líquida por las plántulas y se evaluó la severidad por plántula en escala de 1 a 5 a los días 1, 2, 3 y 6. Los dos mejores procedimientos con solo agua fueron el de tallo esterilizado con alcohol y el de tubo nuevo (**Figura 11**). Se observó que la toxina puede quedar adherida a los tubos y contaminar en las siguientes evaluaciones, principalmente si coincide con el tratamiento control de solo agua.

Finalmente, el medio sintético Fries demostró mayor absorción y menor variación, al ser más estable, que el medio natural con hoja de maíz, además Fries ha sido utilizado en otras investigaciones para la producción de la toxina monocerina. El procedimiento de la técnica de inoculación fue esterilizado con alcohol al 70 % el tallo de las plántulas y con tubo nuevo. Las evaluaciones visuales se realizaron

a las 24, 36, 48 y 72 h en escala de 1 a 5 (1 = plántula sana, 2 = plántula marchita, 3 = hojas enrolladas, 4 = hojas con puntas quemadas y 5 = plántula completamente quemada).

4.3.2. Aislamiento de cepa de *E. turcicum*

La raza fisiológica 123N, identificada en el estudio de la distribución poblacional de *E. turcicum* presentes en México, 2019 con origen en el estado de Sinaloa, se sembró en placas Petri con jugo V8 al 5% que contiene en 1 L: 5 ml de jugo de verduras V8 (Herdez), 5 gr de carbonato de calcio (JT Baker), 15 gr de Agar bacteriológico (BD Bioxon) y 0.1 gr de Chloramphenicol (SIGMA) para inhibir el crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron en condiciones de 25 °C con 12 horas luz por 7 días (Japheth y Carl, 2018). El aislamiento fue trasferido con un sacabocados, colocando 3 discos (0.5 cm de diámetro) a matraces de capacidad de 500 ml con 300 ml de la solución nutritiva líquida modificada (medio Fries), que contiene en 1L: 10 g de sacarosa, 1 g de tartrato de amonio dibásico, 1 g de nitrato de amonio (NH₄NO₃), 1 g de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), 0.5 g de sulfato de magnesio (MgSO₄ 7H₂O), 0.1 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.1 g de cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂ 2H₂O) y 0.5 g de extracto de levadura. Después de 21 días de crecimiento en la oscuridad a 25 °C se purificó y extrajo la toxina (Zhang et al., 2007, 2012; Gu et al., 2014; Li et al., 2016).

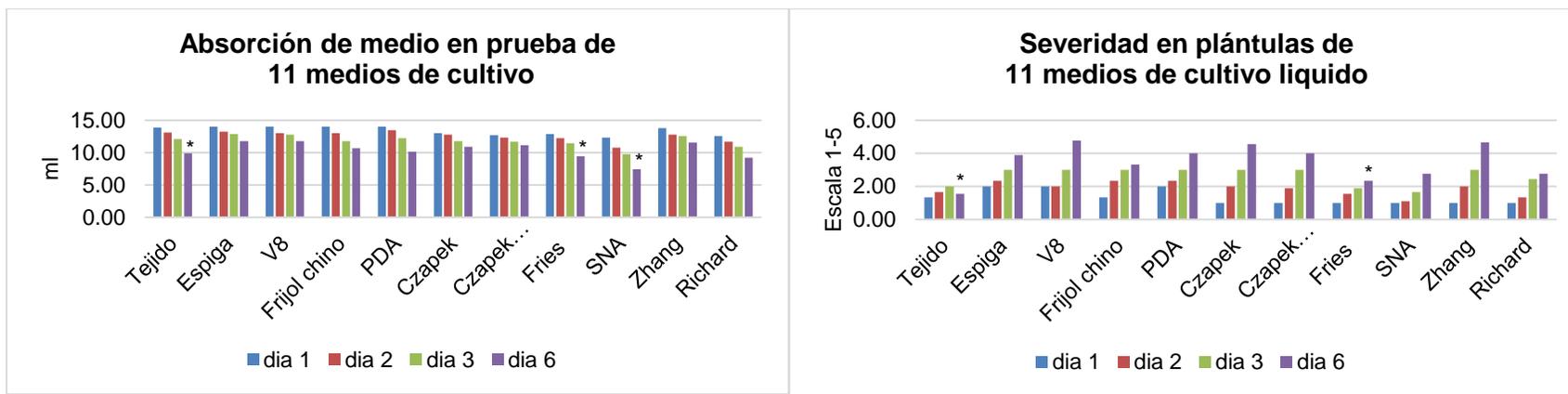


Figura 10. Absorción y severidad en escala de 1 a 5 (1 = plántula sana, 2 = plántula marchita, 3 = hojas enrolladas, 4 = hojas con puntas quemadas y 5 = plántula completamente quemada) con 11 medios de cultivo líquido. Los medios de tejido, Fries y SNA mostraron mayor absorción y menor marchitamiento de plántulas.

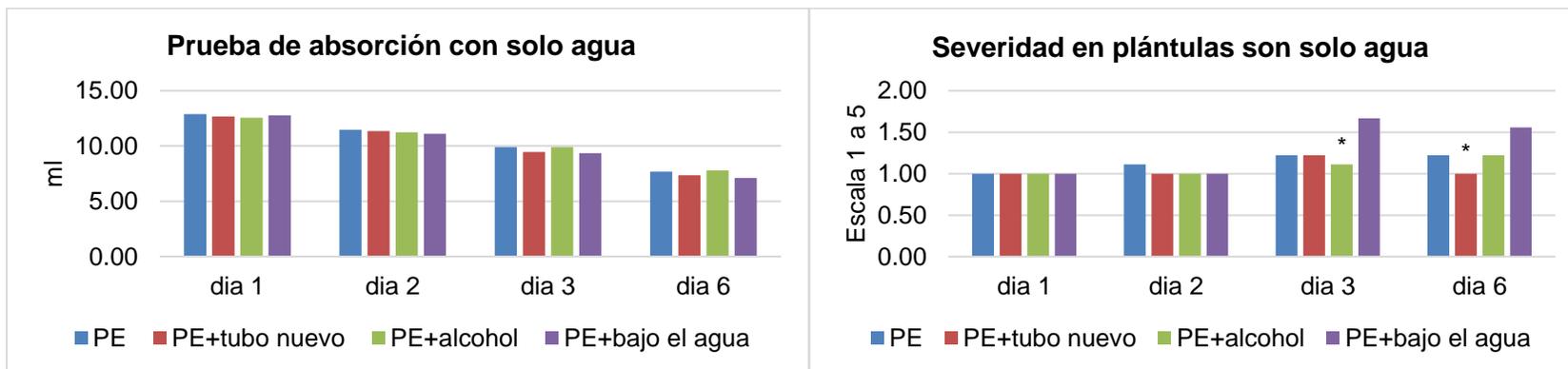


Figura 11. Absorción y severidad en escala de 1 a 5 en plántulas con solo agua. Los procedimientos con tubo nuevo y esterilizando el tallo con alcohol mostraron mayor absorción y menor marchitamiento de plántulas.

4.3.3. Purificación de la toxina monocerina

El cultivo se filtró con una gasa de 4 capas para eliminar el micelio. Los 300 ml del filtrado se dividieron en 6 tubos con 50 ml y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas para liofilizar hasta llegar al 10 % del volumen inicial. Se agregó 20 ml de metanol y se almacenaron los tubos cerrados durante una noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se centrifugaron dos veces a $2,000\text{ rpm} \times 10\text{ min}$ para asentar los residuos del medio Fries (**Figura 12**). El sobrenadante se extrajo y se colocó en un tubo nuevo dentro de campana de extracción para evaporar el disolvente a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se aforó a 50 ml con agua destilada estéril para resuspender la toxina y colocando en el agitador vórtex por 10 segundos antes de utilizar en los bioensayos (Bashan y Levy, 1992; Fan et al., 2008; Li et al., 2016; Wang et al., 2010).

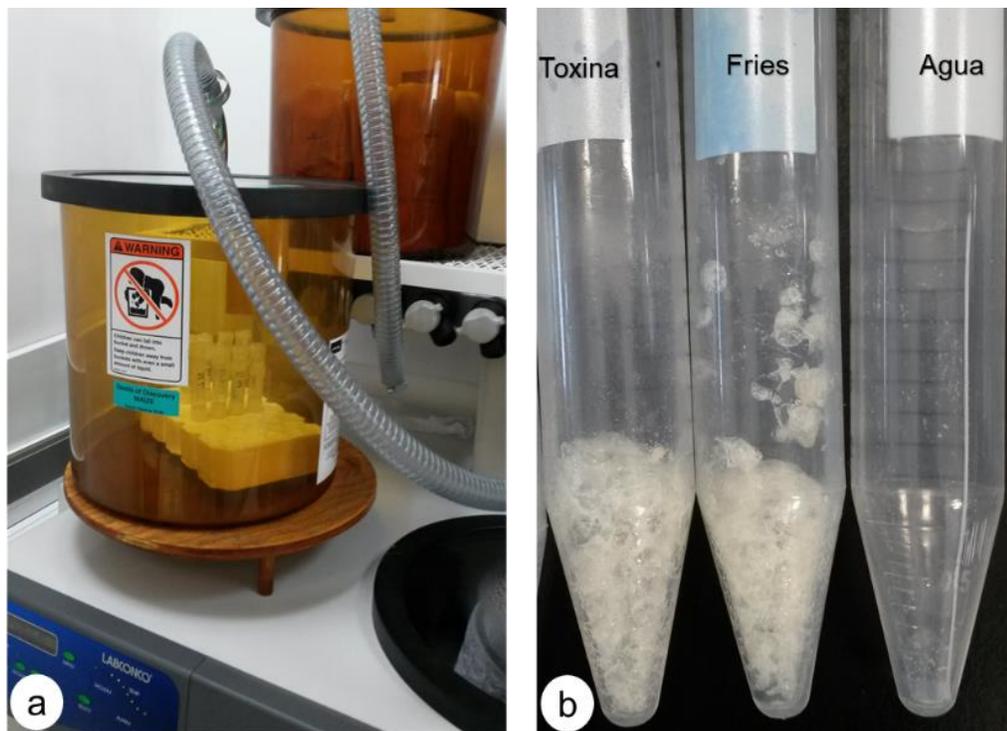


Figura 12. Liofilización de los tratamientos: b) con la toxina, medio Fries y solo agua. Nótese: Los residuos de la sacarosa (color blanco al fondo de los tubos) utilizados como nutriente en el medio de Fries en comparación con solo agua que no muestra residuos al finalizar la liofilización.

4.3.4. Tratamientos para evaluar monocerina

El experimento finalmente se formó de 4 tratamientos como se describen a continuación:

1. Toxina pura al 100 %.
2. Purificación de la toxina con metanol al 20 %.
3. Control 1 = Solo medio Fries.
4. Control 2 = Solo agua destilada-estéril.

4.3.5. Bioensayo

Se colocaron doce plántulas en etapa de desarrollo V4 del diferencial A619ht4 (susceptible) y CML495 (resistente), cortando el tallo para la absorción a través de los haces vasculares en tubos de ensayo de 15 ml. a una temperatura de 25 °C y 24 h luz para acelerar la transpiración de la plántula y la absorción de los 4 tratamientos.

Posteriormente a las 24, 36, 48, 60 y 72 horas, se evaluó en la escala de 1 a 5 (1 =plántula sana, 2 = plántula marchita, 3 = plántula con hoja enrollada, 4 = plántula con punta quemada en las hojas y 5 = plántula completamente quemada).

4.4. Resultados

4.4.1. Medio de cultivo Fries

Se modificó el medio de cultivo líquido "Fries" a 10 g/L de sacarosa, porque se observó que los polisacáridos formados por los azúcares son tóxicos para las plántulas en los bioensayos de absorción después de las 48 h de incubación. Los tallos de las plántulas V4 sumergidos en el medio Fries al 10 % de sacarosa, se mostraron sin marchitamiento al igual que el control (solo agua) hasta las 72 h. Después de tres días de incubación a 25 °C y 24 h luz las plántulas empiezan a marchitarse en los controles, por lo que se recomienda dar por terminado el experimento antes de las 96 h de incubación.

4.4.2. Edad de las plántulas

También, se observó la importancia de la edad de las plántulas. Cuando se utilizó plántulas de 5-7 hojas de desarrollo, la toxicidad en las plántulas era después de las 96 h y las plántulas en los controles también iniciaban a marchitarse. Los experimentos con plántulas de 4 hojas fueron más uniformes y se observó mejor las diferencias entre los tratamientos. Es importante garantizar una germinación uniforme de los genotipos a utilizar en los bioensayos para evitar tener plántulas de diferentes edades, debido que plántulas de 2 hojas de edad son sensibles a estos bioensayos.

Los genotipos se sembraron dentro de invernadero manteniendo una temperatura de 27 °C día y 18 °C noches, con iluminación de 600 - 800 W/m². Además, se fertilizó con Ultrasol 18-18-18 (N-P-K) al momento de la siembra para garantizar buen vigor de las plántulas, evitando riegos excesivos que favorecen el desarrollo de hongos de raíz y tallo aun en suelo esterilizado.

4.4.3. Bioensayos de monocerina en plántulas

Las plántulas en etapa de desarrollo V4 (se eliminaron las dos hojas inferiores para que el tallo quedara bien sumergido) del diferencial A619ht4 y CML495, para la absorción de la toxina a través de los haces vasculares en tubos de ensayo, mostraron: En el tratamiento 1, la toxina pura fue muy potente y no se apreciaban diferencias entre los genotipos resistente y susceptible, mientras que, el tratamiento 2, con la toxina purificada mostró las diferencias esperadas, en el genotipo susceptible A619ht4 se observó plantas marchitas afectadas por monocerina (**Figura 13**) y en el genotipo resistente CML495 no se mostró marchitamiento (**Figura 14**), similar a los controles de solo medio Fries y Agua. También el tratamiento 3 con solo medio Fries modificado al 10 % de sacarosa fue liofilizado y llevó el mismo procedimiento de purificación que la toxina, así como el control 4 con solo agua para observar si el metanol utilizado como disolvente tenía algún efecto en las plántulas.

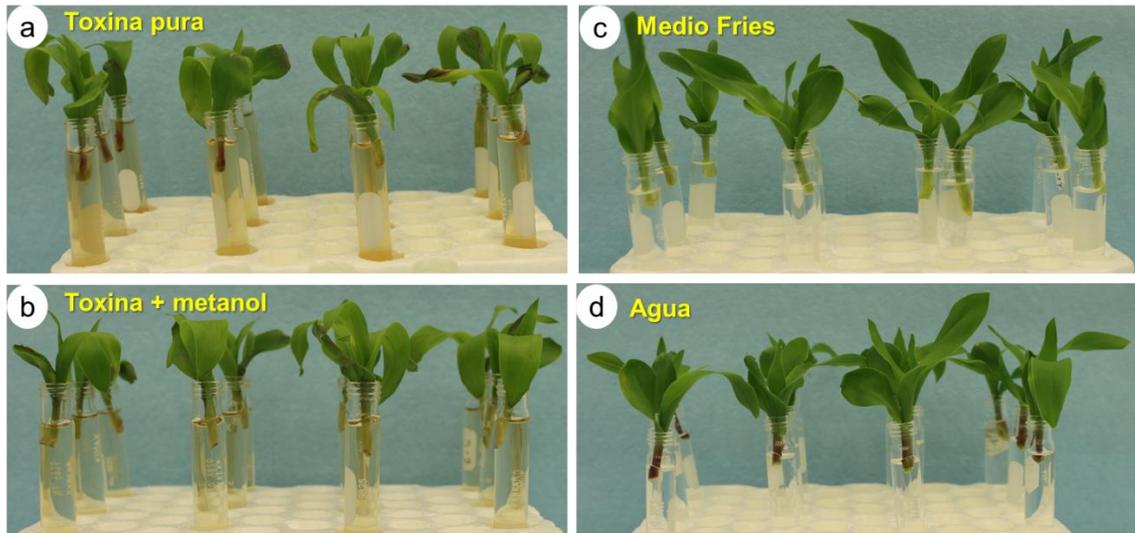


Figura 13. Bioensayo de la toxina monocerina en genotipo A619ht4 susceptible a *E. turcicum* con 4 tratamientos a las 48 h de incubación: a). Toxina pura, b). Purificación de la toxina utilizando metanol como disolvente, c) Solo medio Fries modificado, d) Control con solo agua. Nótese: El tratamiento con solo medio Fries (c) que no muestra marchitamiento y se observa similar al tratamiento control (d).

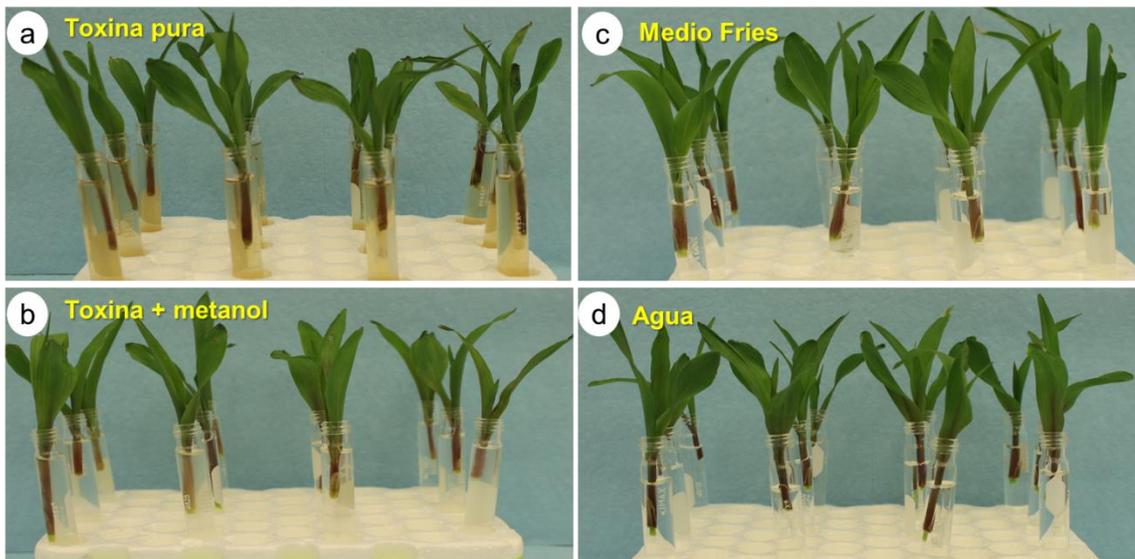


Figura 14. Bioensayo de la toxina monocerina en genotipo CML495 resistente a *E. turcicum* con 4 tratamientos: a). Toxina pura, b). Purificación de la toxina utilizando metanol como disolvente, c) Solo medio Fries modificado, d) Control con solo agua. Nótese: El tratamiento con toxina pura (a) muestra hojas con puntas quemadas aun en genotipo resistente y cuando la toxina se purificó (b) no se observa marchitamiento con similitud a los controles (c y d).

4.5. Discusión

El protocolo para la evaluación de la toxina monocerina producida con asilamientos de lesiones con *E. turcicum* en hojas de maíz desarrollado en este estudio, ayudará a realizar bioensayos con otras toxinas causantes de tizones foliares, tal es el caso del complejo de la mancha de asfalto (CMA, en inglés Tar Spot Complex, TSC) que es la enfermedad más perjudicial para la producción actual del maíz en México y otros países de Centro América y el norte de Sudamérica, causando pérdidas de hasta 90 % (Mahuku et al., 2013). El CMA es una enfermedad producida por la interacción sinérgica de tres hongos: *Phyllachora maydis* (Maublanc, 1904), *Monographella maydis* (Müller y Samuels, 1984) y el hiperparásito *Coniothyrium phyllachorae* (Maublanc, 1904), cuyo papel en la etiología de la enfermedad aún se desconoce. De acuerdo con reportes recientes *P. maydis* está presente en los Estados Unidos (Ruhl et al., 2016) y en la región de los Valles Altos de Toluca, estado de México, donde no se había divulgado anteriormente (Ríos-Herrera et al., 2016). Los genotipos susceptibles pueden marchitarse por completo de 8 a 14 días después de ser infectados, lo que hace pensar que el complejo en condiciones favorables produce sustancias tóxicas para las plantas principalmente por *M. maydis*. También podría ser útil para evaluación del tizón sureño causado por *Bipolaris maydis* (antes *Helminthosporium maydis*) que produce la toxina T, atacando al maíz con citoplasma androestéril del tipo Texas (Gengenbach y Green, 1975). Así como, la mancha gris causada por *Cercospora* spp. que producen la toxina cercosporina (Williamson y Scandalios, 1992) y *Cochliobolus carbonum* (anamorfo: *Bipolaris zeicola*) que produce la toxina HC (Brosch et al., 1995), entre otras toxinas que afectan la producción potencial del maíz.

4.6. Conclusiones

Se necesitan hacer más pruebas y secuenciar la toxina para confirmar la presencia de monocerina en los bioensayos con plántulas, que garanticen la reacción correcta por fitotoxicidad para identificar maíces tolerantes.

4.7. Literatura

- Bashan, B., & Levy, Y. (1992). Differential response of sweet corn cultivars to phytotoxic water-soluble compounds from culture filtrates of *Exserohilum turcicum*. Plant disease (USA).
- Bashan, B., Levy, R. S., Cojocar, M., & Levy, Y. (1995). Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exserohilum turcicum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 47(4), 225-235.
- Brosch, G., Ransom, R., Lechner, T., Walton, J. D., & Loidl, P. (1995). Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. The Plant Cell, 7(11), 1941-1950.
- Gengenbach, B. G., & Green, C. E. (1975). Selection of T-Cytoplasm Maize Callus Cultures Resistant to *Helminthosporium maydis* Race T Pathotoxin 1. Crop Science, 15(5), 645-649.
- Chauhan, R. S., Singh, B. M., & Develash, R. K. (1997). Effect of toxic compounds of *Exserohilum turcicum* on chlorophyll content, callus growth and cell viability of susceptible and resistant inbred lines of maize. Journal of Phytopathology, 145(10), 435-440.
- Claydon, N., Grove, J. F., & Pople, M. (1979). Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Fusarium larvarum*. Journal of Invertebrate Pathology, 33(3), 364-367.
- Cuq, F., Petitprez, M., Herrmann-Gorline, S., Kläbe, A., & Rossignol, M. (1993). Monocerin in *Exserohilum turcicum* isolates from maize and a study of its phytotoxicity. Phytochemistry, 34(5), 1265-1270.
- Dong J G, Shi Y Y, Kang S L, Huang W F. (1993). Extraction of HT-toxin produced by *Helminthosporium turcicum* and its pathogenic activity. Microbiology China, 20, 73-77. (in Chinese).
- Gengenbach, B. G., & Green, C. E. (1975). Selection of T-Cytoplasm Maize Callus Cultures Resistant to *Helminthosporium maydis* Race T Pathotoxin 1. Crop Science, 15(5), 645-649.
- Gu, S. Q., Li, P., Wu, M., Hao, Z. M., Gong, X. D., Zhang, X. Y., ... & Fan, Y. S. (2014). StSTE12 is required for the pathogenicity of *Setosphaeria turcica* by regulating appressorium development and penetration. Microbiological research, 169(11), 817-823.
- Hailmi, M. S., Kadir, J., Abdullah, T. A., Suhaili, Z., Mohamad, N. M., Nazri, M., & Salmah, M. (2011). Potential of *Exserohilum monoceras* as a Bioherbicide for Controlling *Echinochloa crus-galli* (Rumpu Sambau). Journal of Agrobiotechnology, 2, 1-15.
- Japheth D. Weems and Carl A. Bradley. (2018). *Exserohilum turcicum* Race Population Distribution in the North Central United States. Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana, 61801. Plant Disease, February 2018, Volume 102, Number 2, Pages 292-299.

- Li Po, Gong, X. D., Hui, J. I. A., Fan, Y. S., Zhang, Y. F., Cao, Z. Y., & Dong, J. G. (2016). MAP kinase gene *STK1* is required for hyphal, conidial, and appressorial development, toxin biosynthesis, pathogenicity, and hypertonic stress response in the plant pathogenic fungus *Setosphaeria turcica*. *Journal of integrative agriculture*, 15(12), 2786-2794.
- Luttrell ES, (1958). The perfect stage of *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology*, 48:281-287.
- Mahuku GS, Shrestha R, & San Vicente F, (2013). Complejo mancha de asfalto del maíz: hechos y acciones. Consultado en julio del 2019. <http://conservacion.cimmyt.org/index.php/es/folletos-tecnicos>.
- Maublanc, A. (1903). Sur quelques espèces nouvelles de champignons inférieurs. *Bull Soc Mycol Fr*, 19, 291-296.
- Müller, E., and J. G. Samuels. (1984). *Monographella maydis*: sp.nov. and its connection to the tar-spot disease of *Zea mays*. *Nova Hedwigia* 40: 113–121.
- Ríos-Herrera, E. N., Partida-Martínez, L. P., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cerna-Chávez, E., Hernández-Castillo, F. D., Flores-Olivas, A., ... & 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(05), 733.
- Robeson, D. J., & Strobel, G. A. (1982). Monocerin, a Phytotoxin from *Exserohilum turcicum* (*Drechslera turcica*). *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(11), 2681-2683.
- Ruhl, G., Romberg, M. K., Bissonnette, S., Plewa, D., Creswell, T., & Wise, K. A. (2016). First report of tar spot on corn caused by *Phyllachora maydis* in the United States. *Plant Disease*, 100(7), 1496.
- Scott, F. E., Simpson, T. J., Trimble, L. A., & Vederas, J. C. (1984). Biosynthesis of monocerin. Incorporation of 2 H-, 13 C-, and 18 O-labelled acetates by *Drechslera ravenelii*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (12), 756-758.
- Wathaneeyawech, S., Sirithunya, P., & Smitamana, P. (2015). Study of the host range of northern corn leaf blight disease and effect of *Exserohilum turcicum* toxin on sweet corn. *J. Agric. Technol*, 11, 953-963.
- Williamson, J. D., & Scandalios, J. G. (1992). Differential response of maize catalases and superoxide dismutases to the photoactivated fungal toxin cercosporin. *The Plant Journal*, 2(3), 351-358.
- Zhang, L. H., Dong, J. G., Wang, C. H., & Li, Z. P. (2007). Purification and structural analysis of a selective toxin fraction produced by the plant pathogen *Setosphaeria turcica*. *Agricultural Sciences in China*, 6(4), 452-457.

- Zhang, S. R., Hao, Z. M., Wang, L. H., Shen, S., Cao, Z. Y., Xin, Y. Y., & Dong, J. G. (2012). StRas2 regulates morphogenesis, conidiation and appressorium development in *Setosphaeria turcica*. *Microbiological research*, 167(8), 478-486.
- Zhang, W., Krohn, K., Draeger, S., & Schulz, B. (2008). Bioactive isocoumarins isolated from the endophytic fungus *Microdochium bolleyi*. *Journal of natural products*, 71(6), 1078-1081.

Capítulo 5: LÍNEAS DE MAÍZ CON RESISTENCIA MONOGÉNICAS Y POLIGÉNICAS A *Exserohilum turcicum*

5.1. Resumen

La resistencia monogénica a *E. turcicum*, se obtiene de los genes *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *NtN*, *Htm*, *HtP*, *NtNB*) La principal desventaja es que puede romperse fácilmente con la aparición de nuevas razas. La resistencia poligénica opera contra varias razas del patógeno. Varios autores recomiendan la combinación de ambas resistencias en la misma planta. El objetivo de este estudio fue identificar líneas con resistencia monogénica a las razas 2, 3, 23, 3n, 23n y 123N en maíces de CIMMYT con resistencia poligénica al tizón foliar. Los resultados identificaron 10 líneas con resistencia monogénica y poligénica al patógeno. Los análisis de correlación entre la virulencia y la toxina secretada por el hongo muestran por debajo de la curva a las líneas CML543, CML583, CML547, CML540, y CML549 que pueden ser útiles en los programas de mejoramiento genético y molecular para su revalidación e incorporación.

5.2. Introducción

El tizón foliar por turcicum (en inglés Turcicum leaf blight, TLB), también conocido como el tizón norteño de la hoja de maíz (*Zea mays* L.) (en inglés Northern corn leaf blight, NCLB) causado por el hongo *Exserohilum turcicum* (Leonard & Suggs), Teleomorfo: *Setosphaeria turcica* (Luttrell), es un ascomiceto hemibiotrófico con distribución cosmopolita (Hughes y Hooker, 1971). En ciclos agrícola recientes con temperatura entre 20 y 25 °C (Levy y Cohen, 1983) se ha reportado el aumento de la incidencia y virulencia de *E. turcicum* en México (Orduño-Cota *et al.*, 2014; Félix-Gastélum *et al.*, 2017), así como la asociación con otros patógenos, tales como: *Puccinia sorghi* (Sartori *et al.*, 2017),

Cercospora zeae-maydis, *Curvularia lunata* (Li et al., 2013), *Physoderma maydis* (Adipala et al., 1994) y *Phyllachora maydis* (Loladze et al., 2019).

Las razas fisiológicas de *E. turcicum* se denominan en base a los monogenes resistentes *Ht* (por su nombre anterior *Helminthosporium turcicum*, Passerini). Algunas cepas de *E. turcicum* secretan la toxina no específica llamada monocerina (Robeson y Strobel, 1982), causando fitotoxicidad por la inhibición de la síntesis de clorofila y reducción del tamaño de las raíces en plantas de maíz susceptibles, a través de los haces vasculares que promueven la pudrición del tallo y mazorca (Bashan et al., 1995; Cuq et al., 1993; Zhang et al., 2007).

La resistencia cualitativa, vertical, monogénica o específica a razas de *E. turcicum*, se dispone de los genes *Ht* (*Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *NtN*, *Htm*, *HtP*, *NtNB*) (Hooker, 1963, 1977, 1981; Gevers, 1975; Robbins y Warren, 1993; Ogliari et al., 2005; Wang et al., 2012) que inhiben el desarrollo del tizón foliar, evitando la esporulación del hongo o retardando las lesiones de la enfermedad. También la fitoalexina DIMBOA es disponible con este carácter (Ahmad et al., 2011; Mikić y Ahmad, 2018; Rostás, 2007). La principal desventaja de la resistencia monogénica es que puede romperse fácilmente con la aparición de nuevas razas con virulencia diferente (Niks y Lindhout, 2004).

Respecto, a la resistencia cuantitativa, horizontal, poligénica o no específica a razas, es aquella que confiere una protección incompleta, pero permanente (Agrios, 2005). La resistencia poligénica es más difícil de manejar que la monogénica, ya que, en la misma planta, participan múltiples genes con variación continua (Paliwal, 2001). Las ventajas de la resistencia cuantitativa es que opera contra varias razas del patógeno, tiene mayor estabilidad y durabilidad, debido al efecto amortiguador del sistema poligénico por la presencia de los genes menores de efecto aditivo (Paliwal, 2001).

Finalmente, para el cultivo de maíz, Vanderplank (2012) señala que las resistencias cualitativa y cuantitativa pueden coexistir en la misma planta. Renfro (1985), recomienda la combinación de las dos resistencias operando de forma

conjunta. Ambas resistencias pueden ser heredadas por programas de mejoramiento dependiendo de la estructura de la población y la capacidad evolutiva del patógeno (Galiano-Carneiro y Miedaner, 2017). El objetivo de este estudio fue identificar maíces con resistencia monogénica a las razas 2, 3, 23, 3n, 23n y 123N identificadas en los estudios de diversidad racial de *E. turcicum* en los ciclos agrícolas 2010-2019 de los principales estados productores de maíz en México. En 60 líneas endogámicas con resistencia poligénica previamente caracterizadas a la reacción de la enfermedad del tizón en varios campos experimentales por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). También se evaluaron las líneas contra la toxina monocerina para observar la correlación entre la virulencia causada por el hongo y la toxicidad por monocerina.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Aislamientos de *E. turcicum*

Seis razas fisiológicas (2, 3, 23, 3n, 23n, 123N), identificadas en el estudio de la distribución poblacional de *E. turcicum* presente en México, 2019 (**Cuadro 11**), se sembraron en placas Petri con jugo V8 al 5% que contiene en 1 L: 5 ml de jugo de verduras V8 (Herdez), 5 gr de carbonato de calcio (JT Baker), 15 gr de Agar bacteriológico (BD Bioxon) y 0.1 gr de Chloramphenicol (SIGMA) para inhibir el crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron en condiciones de 25 °C con 12 horas luz por 7 días (Japheth y Carl, 2018).

Cuadro 11. Razas fisiológicas de *E. turcicum* utilizadas en los bioensayos con el hongo *E. turcicum* y la toxina monocerina.

Raza de <i>E. turcicum</i>	Nombre de cepa*	Localidad	Región en México	Ambiente
2	JAL19-05	Jalisco	Occidente	Subtropical
3	GUA19-05	Guanajuato	Occidente	Subtropical
23	BA19-01	Estado de México	Centro	Templado
3n	TAM19-05	Tamaulipas	Noreste	Subtropical
23n	AF19-03	Veracruz	Sureste	Tropical
123N	SIN19-04	Sinaloa	Noroeste	Subtropical

*Las cepas fueron de aislamientos puros obtenidos en el ciclo agrícola 2019.

5.3.2. Toxina monocerina

Los aislamientos fueron trasferidos con un sacabocados, colocando 3 discos (0.5 cm de diámetro) a matraces de capacidad de 500 ml con 300 ml de la solución nutritiva líquida modificada (medio Fries), que contiene en 1L: 10 g de sacarosa, 1 g de tartrato de amonio dibásico, 1 g de nitrato de amonio (NH₄NO₃), 1 g de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), 0.5 g de sulfato de magnesio (MgSO₄ 7H₂O), 0.1 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.1 g de cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂ 2H₂O) y 0.5 g de extracto de levadura (**Figura 15**).

Después de 21 días de crecimiento en la oscuridad a 25 °C se purificó y extrajo la toxina (Zhang et al., 2007, 2012; Gu et al., 2014; Li et al., 2016). Filtrando los cultivos con una gasa de 4 capas para eliminar el micelio. Los 300 ml del filtrado se dividieron en 6 tubos con 50 ml y se congelaron a -80 °C por 12 horas para liofilizar hasta llegar al 10 % del volumen inicial. Se agregó 20 ml de metanol y se almacenaron los tubos cerrados durante una noche a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron dos veces a 2, 000 rpm × 10 min para asentar los residuos del medio Fries. El sobrenadante se extrajo y se colocó en un tubo nuevo dentro de campana de extracción para evaporar el disolvente a 45 °C. Se aforó a 50 ml con agua destilada estéril para resuspender la toxina y colocando en el agitador

vórtex por 10 segundos antes de utilizar en los bioensayos (Bashan y Levy, 1992; Fan et al., 2008; Li et al., 2016; Wang et al., 2010).

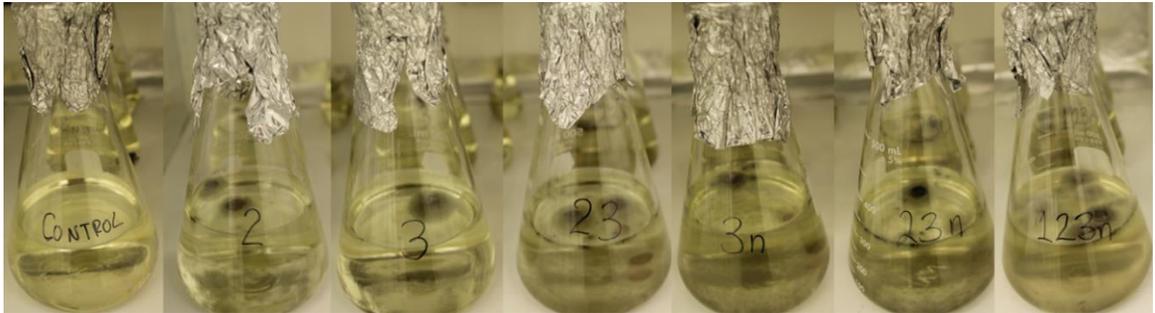


Figura 15. Desarrollo de las seis razas fisiológicas (2, 3, 23, 3N, 23N, 123N) en el medio nutritivo Fries modificado para la producción de la toxina monocerina. Nótese, al inicio el control con solo medio Fries sin desarrollo del hongo.

5.3.3. Material genético

Se seleccionaron un total de 60 líneas endogámicas (20 líneas con adaptación tropical, 15 subtropical, 16 templada, 1 testigos resistente y 8 susceptibles) previamente caracterizadas a la reacción de la enfermedad del tizón foliar en varios campos con alta incidencia de la enfermedad en forma natural por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT (**Cuadro 12**). Las líneas se sembraron en invernadero en tres macetas de 5 x 5 cm con 3 semillas (para al final solo dejar una semilla por maceta), dentro de charolas negras de plástico de 50 x 30 cm para inocular una cepa por charola a temperatura de 27 °C día y 18 °C noches (Carson y Van, 1994). A las plantas se les fertilizó con Ultrasol 18-18-18 (N-P-K) al momento de la siembra y a los 14 días (Japheth y Carl, 2018).

Cuadro 12. Lista de 60 líneas endogámicas previamente caracterizadas a la reacción de la enfermedad del tizón foliar en varios campos experimentales por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

Numero	Nombre	Germoplasma	Color de grano	Madurez	Ambiente	Reacción a <i>E. turcicum</i> en campo
1	CML451	NPH-28-1/G25	Amarillo	Tardía	Tropical	Resistente
2	CML474	SW92145-2EV	Amarillo	Intermedia	Tropical	Resistente
3	CML491	6207QB/6207QA	Blanco	Tardía	Tropical	Resistente
4	CML495	PNVABCOSD/NPH	Blanco	Tardía	Tropical	Resistente
5	CML497	CL00331	Amarillo	Intermedia	Tropical	Resistente
6	CML498	CML265/CL00303/CML264	Blanco	Intermedia	Tropical	Resistente
7	CML501	CL02709	Amarillo	Intermedia	Tropical	Resistente
8	CML503	CML176/CML264	Blanco	Intermedia	Tropical	Resistente
9	CML549	CML498/CLRCW36	Blanco	Tardía	Tropical	Resistente
10	CML554	CML491/CLQRCWQ13	Blanco	Tardía	Tropical	Resistente
11	CML573	CML495/CML401	Blanco	Tardía	Tropical	Resistente
12	CML576	CLFAWW11/CML494	Blanco	Intermedia	Tropical	Resistente
13	CML577	CML454/CML451	Amarillo	Intermedia	Tropical	Resistente
14	CML596	CL04325/CML401	Blanco	Intermedia	Tropical	Resistente
15	CML597	CML285/CL00356	Amarillo	Intermedia	Tropical	Resistente
16	CML598	CML413/CML287	Amarillo	Intermedia	Tropical	Resistente
17	CML599	P390AM	Amarillo	Intermedia	Tropical	Resistente
18	CML600	CLRCW88/CLRCW96	Blanco	Intermedia	Tropical	Resistente
19	CML601	CLRCW79/CLRCW98	Blanco	Tardía	Tropical	Resistente
20	CML602	CLRCY040/CML451	Amarillo	Tardía	Tropical	Resistente
21	CML202	ZSR923	Blanco	Tardía	Subtropical	Resistente
22	CML370	MBRETW	Blanco	Intermedia	Subtropical	Resistente
23	CML384	P502-C1	Blanco	Tardía	Subtropical	Resistente
24	CML483	P502-C2	Blanco	Tardía	Subtropical	Resistente
25	CML484	MBRETW-C1	Blanco	Tardía	Subtropical	Resistente
26	CML513	ZSR923	Blanco	Tardía	Subtropical	Resistente
27	CML514	7794-4	Blanco	Tardía	Subtropical	Resistente

28	CML517	S89500-F2	Blanco	Intermedia	Subtropical	Resistente
29	CML519	P502-C1	Blanco	Tardía	Subtropical	Resistente
30	CML540	INTA-F2	Blanco	Precoz	Subtropical	Resistente
31	CML543	CML202/CML395	Blanco	Tardía	Subtropical	Resistente
32	CML544	CML395/CML444/Tuxp	Blanco	Intermedia	Subtropical	Resistente
33	CML545	CML312/CML445/Tuxp	Blanco	Precoz	Subtropical	Resistente
34	CML547	DRB-F2	Blanco	Intermedia	Subtropical	Resistente
35	CML585	KILIMAST94/M37W/ZM607	Blanco	Intermedia	Subtropical	Resistente
36	CML457	P87-C5	Blanco	Intermedia	Templado	Resistente
37	CML459	P940/P87-C4	Blanco	Intermedia	Templado	Resistente
38	CML463	G9A-C6-RL6	Blanco	Tardía	Templado	Resistente
39	CML464	G9A-C6-HS3	Blanco	Tardía	Templado	Resistente
40	CML524	CML242/CML176QPM	Blanco	Precoz	Templado	Resistente
41	CML525	CML244/CML176QPM	Blanco	Precoz	Templado	Resistente
42	CML526	CML246/CML176QPM	Blanco	Precoz	Templado	Resistente
43	CML528	CML352/CML176QPM	Blanco	Precoz	Templado	Resistente
44	CML529	CML354/CML176QPM	Blanco	Precoz	Templado	Resistente
45	CML558	G9A-C7/SR-FS89	Blanco	Tardía	Templado	Resistente
46	CML561	G9A-C7/SR-FS59	Blanco	Intermedia	Templado	Resistente
47	CML583	POOL9Ac7	Blanco	Intermedia	Templado	Resistente
48	CML594	P86-C5	Amarillo	Precoz	Templado	Resistente
49	CML595	P88-C3	Amarillo	Tardía	Templado	Resistente
50	CHWTI23	B.I.Z.T.R.L.PR93	Blanco	Intermedia	Templado	Resistente
51	CHWTI59	G31*G32/CML-349	Blanco	Intermedia	Templado	Resistente
52	89LMBR	89(L/LMBR)11-F2	Blanco	Intermedia	Subtropical	Testigo resistente
53	LPSF96	La Posta Seq C7-F96	Blanco	Intermedia	Tropical	Testigo susceptible
54	CML154	EV8762SR-17-1-B	Blanco	Tardía	Tropical	Testigo susceptible
55	CML423	G18-C19-HS100-4-1-1-B	Amarillo	Precoz	Tropical	Testigo susceptible
56	DTMA85	200-6 x GUAT189xP84c1	Amarillo	Intermedia	Subtropical	Testigo susceptible
57	CML326	P45-C6-F6	Amarillo	Intermedia	Subtropical	Testigo susceptible
58	CML240	P85-C3-FS50	Blanco	Precoz	Templado	Testigo susceptible
59	CML245	P86-C0-FS77	Amarillo	Precoz	Templado	Testigo susceptible
60	CML349	HTBA89-136-	Blanco	Precoz	Templado	Testigo susceptible

5.3.4. Bioensayos con el hongo *E. turcicum*

Los conidios se obtuvieron enjuagando las placas Petri con 15 ml de agua destilada estéril con 10 μl lt^{-1} con Tween 20 para dispersar y adherir los conidios a las hojas de maíz. La concentración de la suspensión conidial se ajustó usando una cámara de Bauer a 2×10^4 conidios ml^{-1} (Muiru *et al.*, 2010).

Las plantas de 14 días (3 hojas), se inocularon en la copa de las plántulas con 200 μl de la dilución conidial utilizando una pipeta. Posteriormente, las plantas inoculadas se colocaron en una cámara de humedad durante 24 h (Japheth y Carl, 2018). La temperatura se modificó a 24 - 25 °C día y 18 - 16 °C noches, con sombra durante el día manteniendo una iluminación de 100 - 200 W/m^2 (Carson y Van, 1994).

Las evaluaciones de la reacción de *E. turcicum* se realizaron a los 14 días después de la inoculación (28 días después de la siembra) con una escala visual de 0 a 5, donde 0 a 3 es resistentes (R) y 4 a 5 son susceptibles (S) en los diferenciales *Ht* (Muiru *et al.*, 2010).

5.3.5. Bioensayos con la toxina monocerina

Se colocaron tres plántulas en etapa de desarrollo V4 de las 60 líneas endogámicas, cortando el tallo para la absorción a través de los haces vasculares en tubos de ensayo de 15 ml. a una temperatura de 25 °C y 24 h luz para acelerar la transpiración de la plántula y la absorción de la toxina purificada obtenida de las 6 razas de *E. turcicum*.

Posteriormente a las 24, 48 y 72 horas, se evaluó en la escala de 1 a 5 (1 =plántula sana, 2 = plántula marchita, 3 = plántula con hoja enrollada, 4 = plántula con punta quemada en las hojas y 5 = plántula completamente quemada).

5.4. Resultados

5.4.1. Reacción de virulencia

En las evaluaciones de reacción de infección por el hongo *E. turcicum*, la línea tropical CML474 y subtropical CML483, mostraron inmunidad a la virulencia de las 6 razas fisiológicas (2, 3, 23, 3N, 23N y 123N), así como las líneas con adaptación tropical CML491, CML495 y CML549; subtropical CML517, CML540, CML543 y CML547; templado CML583 mostraron resistencia con lesiones cloróticas y sin esporulación. El testigo resistente (89LMBR) utilizado en los ensayos de evaluación del tizón foliar en campos de CIMMYT, mostró lesiones necróticas limitadas sin esporulación. Los testigos susceptibles (LPSF96, CML154, CML423, CML326) mostraron lesiones típicas de *E. turcicum* desde los 10 días después de la inoculación, mientras las líneas DTMA85, CML240, CML245 y CML349 mostraron tolerancia a las razas 2 (**Figura 16 y Cuadro 13**).



Figura 16. Reacción de infección en las líneas resistentes (parte superior) y testigos a *E. turcicum* (parte inferior). Nótese: La inmunidad en la CML474 y CML483, así como las líneas resistentes que superaron al testigo 89LMBR.

Cuadro 13. Reacción de infección en las 60 líneas endogámicas de CIMMYT a las 6 razas (2, 3, 23, 3N, 23N y 123N) de *E. turcicum* presentes en México, 2019.

Numero	Nombre	Reacción a las razas fisiológicas de <i>E. turcicum</i> en escala 1 a 5 (1= resistente y 5= susceptible)					
		Raza 2	Raza 3	Raza 23	Raza 3N	Raza 23N	Raza 123N
1	CML451	2	4	3	4	4	4
2	CML474	1	1	2	2	2	2
3	CML491	2	2	3	3	3	3
4	CML495	2	2	2	2	3	3
5	CML497	3	2	4	4	4	4
6	CML498	4	4	5	4	5	4
7	CML501	3	4	4	4	5	4
8	CML503	4	4	4	4	4	4
9	CML549	2	3	2	3	3	3
10	CML554	5	4	5	3	5	4
11	CML573	3	3	4	4	4	3
12	CML576	3	3	4	5	4	5
13	CML577	3	3	4	4	4	3
14	CML596	4	4	4	4	4	3
15	CML597	5	4	5	4	5	4
16	CML598	4	3	4	3	4	3
17	CML599	5	4	5	4	5	4
18	CML600	3	4	5	4	5	4
19	CML601	4	4	4	4	4	4
20	CML602	4	3	5	4	5	3
21	CML202	5	4	5	4	5	2
22	CML370	5	3	5	3	5	4
23	CML384	3	4	4	4	4	4
24	CML483	2	2	2	2	2	2
25	CML484	3	4	4	4	4	4
26	CML513	5	4	5	4	5	5
27	CML514	4	5	4	4	4	4
28	CML517	3	3	3	3	3	3
29	CML519	2	4	4	4	5	4
30	CML540	2	3	3	3	2	3
31	CML543	3	2	3	2	3	2
32	CML544	3	3	3	4	3	4
33	CML545	4	4	2	4	5	4
34	CML547	3	3	3	2	3	2
35	CML585	4	3	4	4	4	4
36	CML457	4	4	5	4	4	4

37	CML459	4	4	4	5	4	5
38	CML463	4	4	4	4	4	5
39	CML464	4	2	4	3	4	4
40	CML524	2	4	2	4	4	4
41	CML525	3	4	3	4	4	5
42	CML526	4	5	5	5	5	5
43	CML528	4	4	4	4	4	4
44	CML529	2	4	2	4	1	4
45	CML558	4	3	4	4	4	4
46	CML561	4	3	4	3	4	4
47	CML583	3	2	3	2	3	2
48	CML594	4	4	4	2	4	4
49	CML595	4	2	4	4	4	4
50	CHWTI23	5	4	5	4	5	4
51	CHWTI59	4	4	4	4	4	4
52	89LMBR	3	3	3	3	3	3
53	LPSF96	5	5	5	5	5	5
54	CML154	5	5	5	5	5	5
55	CML423	5	5	5	5	5	5
56	DTMA85	3	4	5	5	4	5
57	CML326	5	5	5	5	5	5
58	CML240	3	4	5	5	4	5
59	CML245	3	4	5	5	5	5
60	CML349	3	4	5	5	5	5

5.4.2. Reacción de toxicidad

Las reacciones de la fitotoxicidad por monocerina en las 60 líneas endogámicas de CIMMYT se mostraron desde las 24 horas después de la incubación (**Figura 17**). Posteriormente con el objetivo de correlacionar la toxicidad por monocerina y la virulencia por el hongo *E. turcicum*, así como seleccionar las líneas con resistencia monogénica y poligénica se compararon las 10 líneas con resistencia a las razas (2, 3, 23, 3n, 23n, 123N) de *E. turcicum* (**Cuadro 14**). El gráfico estadístico de correlación entre la virulencia y la toxicidad mostró un ajuste del 46 % (**Figura 18**).



Figura 17. Bioensayos *in vitro* con la toxina monocerina en 60 genotipos previamente evaluados en campo a la reacción de *E. turcicum*.

Cuadro 14. Medias de la virulencia causada por el hongo *E. turcicum* y toxicidad por monocerina en 10 líneas con resistencia monogénica y poligénica a las razas (2, 3, 23, 3N, 23N y 123N).

Numero	Nombre	Germoplasma	Virulencia (1 a 5)	Toxicidad (%)
1	CML543	CML202/CML395	2.4	20
2	CML583	POOL9Ac7	2.4	30
3	CML547	DRB-F2	2.6	30
4	CML540	INTA-F2	2.8	30
5	CML549	CML498/CLRCW36	3.0	30
6	CML474	SW92145-2EV	1.8	40
7	CML483	P502-C2	2.0	50
8	CML495	PNVABCOSD/NPH	2.5	50
9	CML491	6207QB/6207QA	2.8	60
10	CML517	S89500-F2	3.0	60
Testigo	CML326	P45-C6-F6	5.0	90

*Las medias se obtuvieron de las evaluaciones de 60 líneas con resistencia poligénica de CIMMYT y seis razas fisiológicas de *E. turcicum* presentes en los principales estados productores de maíz en México, 2019.

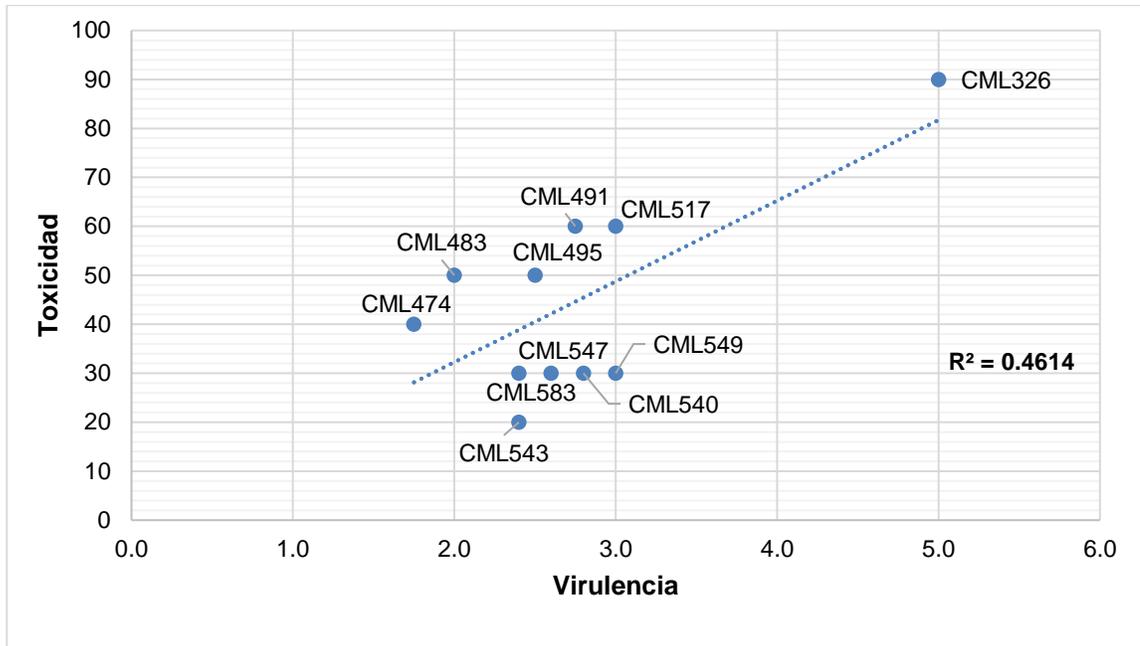


Figura 18. Correlación entre la virulencia causado por *E. turcicum* y la toxicidad por monocerina. Los valores usados fueron las medias de 60 líneas de CIMMYT con resistencia poligénica a tizón foliar en campo.

5.5. Discusión

En este estudio se evaluaron 60 líneas endogámicas de CIMMYT, de las cuales se identificaron 10 líneas (CML543, CML583, CML547, CML540, CML549, CML474, CML483, CML495, CML491, CML517) con resistencia monogénica y poligénica al hongo *E. turcicum* causante del tizón foliar en maíz. Las líneas CML474 y CML438 mostraron inmunidad al patógeno, mientras que la línea CML503 no mostró fitotoxicidad a monocerina.

Respecto a la correlación entre la virulencia causada por el hongo y toxicidad por monocerina, las líneas CML543, CML583, CML547, CML540, y CML549 se mostraron por debajo de la curva. Estas líneas pueden ser utilizadas para incorporar en los programas de mejoramiento y estudios moleculares. Así como la CML326 que resultó altamente susceptible, puede ser útil de control positivo.

5.6. Conclusiones

El uso de híbridos con resistencia genética a los patógenos suele ser la forma más económica y ecológica para la producción potencial del cultivo de maíz en México. Las líneas endogámicas (CML543, CML583, CML547, CML540, CML549, CML474, CML483, CML495, CML491, CML517) con resistencia monogénica y poligénica, además de amplia aptitud combinatoria, ya están disponibles gratuitamente en <https://www.cimmyt.org/resources/seed-request/> para su uso en los programas de mejoramiento genético y molecular. Para más información relacionada a las líneas puede consultar en la página web <https://data.cimmyt.org/dataset.xhtml?persistentId=hdl:11529/10246>.

5.7. Literatura

- Adipala, E., Okoboi, C. A., Takan, J. P., & Mukalere, Z. (1994). The effect of intercropping maize with finger millet on *Physoderma maydis* and *Exserohilum turcicum* infections. *East African Agricultural and Forestry Journal*, 59(4), 311-315.
- Agrios, G. N. (2005). Plant diseases caused by fungi. *Plant pathology*, 4.
- Ahmad, S., Veyrat, N., Gordon-Weeks, R., Zhang, Y., Martin, J., Smart, L., & Ton, J. (2011). Benzoxazinoid metabolites regulate innate immunity against aphids and fungi in maize. *Plant physiology*, 157(1), 317-327.
- Bashan, B., & Levy, Y. (1992). Differential response of sweet corn cultivars to phytotoxic water-soluble compounds from culture filtrates of *Exserohilum turcicum*. *Plant disease (USA)*.
- Bashan, B., Levy, R. S., Cojocar, M., & Levy, Y. (1995). Purification and structural determination of a phytotoxic substance from *Exserohilum turcicum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47(4), 225-235.
- Carson, M. L., & Van Dyke, C. G. (1994). Main content area Effect of light and temperature on expression of partial resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. *Plant disease*, 78(5), 519-522.
- Cuq, F., Petitprez, M., Herrmann-Gorline, S., Kläbe, A., & Rossignol, M. (1993). Monocerin in *Exserohilum turcicum* isolates from maize and a study of its phytotoxicity. *Phytochemistry*, 34(5), 1265-1270.
- Fan Y S, Gu S Q, Dong J G, Dong N. (2008). Regulation of MAPK signal pathway on the production and biological activity of HT-toxin in *Setosphaeria turcica*. *Scientia Agricultura Sinica*, 41, 86–92. (in Chinese)
- Félix-Gastélum, R., Lizárraga-Sánchez, G. J., Maldonado-Mendoza, I. E., Leyva-Madrigal, K. Y., Herrera-Rodríguez, G., & Espinoza-Matías, S. (2017). Confirmación de la identidad de *Exserohilum turcicum*, agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(3).
- Galiano-Carneiro, A. L., & Miedaner, T. (2017). Genetics of resistance and pathogenicity in the maize/ *Setosphaeria turcica* pathosystem and implications for breeding. *Frontiers in plant science*, 8, 1490.
- Gevers, H. O. (1975). A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight in maize. *Plant Dis. Rep.* 59, 296–299.
- Gu, S. Q., Li, P., Wu, M., Hao, Z. M., Gong, X. D., Zhang, X. Y., ... & Fan, Y. S. (2014). StSTE12 is required for the pathogenicity of *Setosphaeria turcica* by regulating appressorium development and penetration. *Microbiological research*, 169(11), 817-823.

- Hooker, A. L. (1963). Monogenic resistance in *Zea mays* L. to *Helminthosporium turcicum*, *Crop Sci.*, 1963, 3: 381.
- Hooker, A. L. (1977). A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Sci.* 17, 132–135.
- Hooker, A. L. (1981). Resistance to *Helminthosporium turcicum* from *Tripsacum floridanum* incorporated into corn. *Maize Genet. Coop. Newsl.* 55, 87–88.
- Hughes, G. R., & Hooker, A. L. (1971). Gene action conditioning resistance to northern leaf blight in maize. *Crop science*, 11(2), 180-184.
- Japheth D. Weems and Carl A. Bradley. (2018). *Exserohilum turcicum* Race Population Distribution in the North Central United States. Department of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana, 61801. *Plant Disease*, February 2018, Volume 102, Number 2, Pages 292-299.
- Levy, Y., & Cohen, Y. (1983). Biotic and environmental factors affecting infection of sweet corn with *Exserohilum turcicum*. *Phytopathology*, 73(5), 722-725.
- Li Po, Gong, X. D., Hui, J. I. A., Fan, Y. S., Znanang, Y. F., Cao, Z. Y., & Dong, J. G. (2016). MAP kinase gene *STK1* is required for hyphal, conidial, and appressorial development, toxin biosynthesis, pathogenicity, and hypertonic stress response in the plant pathogenic fungus *Setosphaeria turcica*. *Journal of integrative agriculture*, 15(12), 2786-2794.
- Li, J. T., Fu, J. F., & Li, H. C. (2013). Epidemic processes and yield loss of northern leaf blight (*Exserohilum turcicum*), Curvularia leaf spot (*Curvularia lunata*) and gray leaf spot (*Cercospora zea-maydis*) of maize when they occurred together in the field. *Acta Phytopathologica Sinica*, (3), 13.
- Loladze, A., Rodrigues Jr, F. A., Toledo, F., San Vicente, F., Gérard, B., & Boddupalli, M. P. (2019). Application of remote sensing for phenotyping tar spot complex resistance in maize. *Frontiers in Plant Science*, 10, 552.
- Luttrell ES, (1958). The perfect stage of *Helminthosporium turcicum*. *Phytopathology*, 48:281-287.
- Mikić, S., & Ahmad, S. (2018). Benzoxazinoids-protective secondary metabolites in cereals: The role and application.
- Muiru, W. M., Koopmann, B., Tiedemann, A. V., Mutitu, E. W., & Kimenju, J. W. (2010). Race typing and evaluation of Aggressiveness of *Exserohilum turcicum* isolates of Kenyan, German and Austrian origin. *World Journal of Agricultural Sciences*, 6(3), 277-284.
- Niks, R. E., & Lindhout, W. H. (2004). Curso sobre mejoramiento para resistencia durable a patógenos especializados. Universidad de Wageningen, Wageningen, Holanda.

- Ogliari, J. B., Guimarães, M. A., Geraldi, I. O., & Camargo, L. E. A. (2005). New resistance genes in the *Zea mays*: *Exserohilum turcicum* pathosystem. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 435-439.
- Orduño-Cota, F. J., Montiel-García, M. A., Herrera-Rodríguez, G., Ruíz-Guzmán, A. G., Espinoza-Castillo, D. F., & de Campo, P. T. (2014). Distribución, incidencia, severidad y control del tizón foliar del maíz en el norte de Sinaloa.
- Paliwal, R. L. (2001). El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción (No. 28). Food & Agriculture Org.
- Renfro, B. L. (1985). Breeding for disease resistance in tropical maize and its genetic control. *Relazioni e Monografie Agrarie Subtropicali e Tropicali. Nuova Serie (Italy)*.
- Robbins Jr, W. A., & Warren, H. L. (1993). Inheritance of resistance to *Exserohilum turcicum* in PI 209135, 'Mayorbela' variety of maize. *Maydica*, 38(3), 209-213.
- Robeson, D. J., & Strobel, G. A. (1982). Monocerin, a Phytotoxin from *Exserohilum turcicum* (*Drechslera turcica*). *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(11), 2681-2683.
- Rostás, M. (2007). The effects of 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1, 4-benzoxazin-3-one on two species of *Spodoptera* and the growth of *Setosphaeria turcica* in vitro. *Journal of pest science*, 80(1), 35-41.
- Sartori, M. V., Nesci, A. V., Montemarani, A. M., Barros, G. G., García, J., & Etcheverry, M. G. (2017). Preliminary evaluation of biocontrol agents against maize pathogens *Exserohilum turcicum* and *Puccinia sorghi* in field assays.
- Vanderplank, J. E. (2012). Disease resistance in plants. Academic Press. 2nda Edition. Orlando, Florida. USA.
- Wang H., Xiao Z. X., Wang F. G., Xiao Y. N., Zhao J. R., Zheng Y. L., et al. (2012). Mapping of NtNB, a gene conferring non-lesion resistance before heading to *Exserohilum turcicum* (Pass.), in a maize inbred line derived from the Indonesian variety Bramadi. *Genet. Mol. Res. GMR 11 2523–2533*. 10.4238/2012.July.10.7.
- Wang, H., Li, H., Zhu, Z., & Wang, X. (2010). Expression of Ht2-related genes in response to the HT-Toxin of *Exserohilum turcicum* in Maize. *Annals of applied biology*, 156(1), 111-120.
- Zhang, L. H., Dong, J. G., Wang, C. H., & Li, Z. P. (2007). Purification and structural analysis of a selective toxin fraction produced by the plant pathogen *Setosphaeria turcica*. *Agricultural Sciences in China*, 6(4), 452-457.