

Evaluación de Métodos de Inoculación de Semillas de Maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton

Evaluation of Inoculation Methods on Maize Seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton

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

(Recibido: Septiembre 20, 2013 Aceptado: Febrero 26, 2014)

Quezada Salinas A, De León García De Alba C, Hernández Anguiano AM y Nava Díaz C. 2013. Evaluación de métodos de inoculación de semillas de maíz con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (Kühn) Langdon & Fullerton. Revista Mexicana de Fitopatología 31 (2): 80-90.

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

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

El carbón de la espiga del maíz (*Zea mays* L.), por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (sin. *Sphacelotheca*

Abstract. The objective of this work was to develop an inoculation method with teliospores of the fungus *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in maize seeds resulting in a consistently high rate of infection of seedlings, and implement its use in maize germplasm selection programs for resistant to this pathogen. Susceptible maize seeds to the disease were inoculated with different methods that allowed the contact between pathogen and host (teliospores-seed). Inoculated seeds were planted in pots with sterile soil under conditions of 25 °C and photoperiod of 12 h light. At 25 d after sown, the number of infected seedlings was measured by the observation of mycelium into the mesocotyl. Results determined that inoculated seeds with a suspension of 1.7×10^7 teliospores mL⁻¹ and 1% of sodium carboxymethylcellulose, produced 93.3 and 96.6% of infected seedlings in susceptible criollo Blanco de Toluca and hybrid AS-910 maize cultivars, respectively. Intracellular mycelium in infected seedlings was observed in the mesocotyl's parenchyma without cause visible symptoms, in adult plants was detected the formation of sori in the tassel and cob. The identity of mycelium present in the mesocotyl was confirmed by PCR test with the use of the specific primers SR1 and SR2.

Additional keywords: *Zea mays*, head smut, carboxymethylcellulose, teliospores.

The head smut of maize (*Zea mays* L.) disease, caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* (sin. *Sphacelotheca reiliana*), is found in several countries in Europe, North and South America, China, Australia, New Zealand, Western India, Palestine, and other countries. In Mexico, it is of major importance in the Bajío area where it caused losses of up to 30 % from 1956- 1961. This disease is present in the states of Jalisco, Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas and

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

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

Debido a que la infección ocurre durante la germinación y las primeras etapas de desarrollo de la plántula de maíz, la principal estrategia de control se basa en la aplicación de fungicidas a la semilla para evitar el contacto entre el patógeno y el hospedante durante estas etapas (Stienstra *et al.*, 1985; Martínez y Ledesma, 1990; Wright *et al.*, 2006). Por otra parte, mediante la evaluación de la expresión de la enfermedad se han identificado variedades e híbridos de maíz tolerantes (Stromberg *et al.*, 1984; Aquino *et al.*, 2011). Por lo tanto, la obtención de materiales resistentes es el método más efectivo de control del carbón de la espiga, por ello se requieren técnicas de inoculación efectivas para promover la infección del hospedante por el patógeno. Para lograr la infección de plántulas de maíz, se han usado mezclas de suelo con teliosporas y su deposición junto con semillas (Stromberg *et al.*, 1984; Matyac and Kommedahl, 1985b; Whyte and Gevers, 1988; Pradhanang and Ghimire, 1996), suspensiones de teliosporas aplicadas al momento de la siembra (Baggett y Koepsell, 1983; Martínez y Ledesma, 1990), inoculación hipodérmica de plántulas con basidiosporas (Craig y Frederiksen, 1992), e infiltración de teliosporas a la semilla mediante la generación de vacío (Metha, 1967). Sin embargo, estos métodos producen porcentajes de infección que varían de 5 a 95.8 %, lo cual limita su utilidad en un programa de selección de resistencia a la enfermedad.

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y almacenaje de teliosporas. En el verano de 2006 se recolectaron panojas y mazorcas de plantas de maíz infectadas con *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, en lotes con siembras comerciales de maíz en el

Aguascalientes (Aquino *et al.*, 2011).

The reduction in production by *S. reilianum* f. sp. *zeae* is mainly due to systemic infection and sori production that partially or completely replace the tassel and ear during the flowering stage, thus affecting the grain production. Sori are structures containing teliospores, which in the following crop cycle they germinate in the soil, produce a four-celled basidium and each cell originate a haploid basidiospore (Ingold, 1994). The union of two compatible haploid basidiospores give rise to a dikaryon (parasitic hyphae) that penetrates the roots of maize seedlings (Martínez *et al.*, 2000) and invades tissues systemically until reaching the apical meristem (Martínez *et al.*, 1999).

Because infection occurs during germination and early seedling development of maize, the main control strategy is based on the application of fungicides directly to the seeds to prevent contact between the pathogen and the host during these stages (Stienstra *et al.*, 1985; Martínez and Ledesma, 1990; Wright *et al.*, 2006). Moreover, by evaluating the expression of the disease, tolerant varieties and hybrids of maize have been identified (Stromberg *et al.*, 1984; Aquino *et al.*, 2011). Therefore, obtaining resistant materials is the most effective control method for head smut disease, thus, effective inoculation techniques are required to promote the infection of the host by the pathogen. In order to achieve the infection of maize seedlings, mixtures of soil with teliospores have been used as well as their deposition with seeds (Stromberg *et al.*, 1984; Matyac and Kommedahl, 1985b; Whyte and Gevers, 1988; Pradhanang and Ghimire, 1996), teliospore suspensions applied at time of planting (Baggett and Koepsell, 1983; Martínez and Ledesma, 1990), hypodermic inoculation of seedlings with basidiospores (Craig and Frederiksen, 1992) and infiltration of teliospores to the seed by generating vacuum (Mehta, 1967). However, these methods produce a percentage of infection ranging from 5 to 95.8 %, which limits its utility in a resistance selection program to the disease.

Therefore, the aim of this study was to develop an effective inoculation method which helps to obtain a consistently high rate of plants infection, in order to be able to implement it in maize germplasm selection programs that are resistant to the disease.

MATERIALS AND METHODS

Collection and storage of teliospores. During summer 2006, tassels and maize ears of infected plants with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* were collected in maize commercial plots located in Mixquihuala Municipality, Hidalgo State, Mexico. The infected plant material was placed in plastic trays and allowed to dry for 7 d in a greenhouse, after that time, teliospores were collected and stored in paper bags at 20 ± 2 °C until use.

Viability of teliospores. Teliospores of *S. reilianum* f. sp. *zeae* were used. They were previously disinfested in a 1% (w/v) CuSO₄ aqueous solution for 24 h, washed with three changes of sterile distilled water and recovered on filter paper.

The viability of the inoculum was verified prior to

Municipio de Mixquiahuala, estado de Hidalgo, México. El material vegetal infectado se colocó en charolas de plástico y se dejó secar por 7d en un invernadero, para posteriormente recuperar las teliosporas en bolsas de papel, donde se conservaron a 20 ± 2 °C hasta su utilización.

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

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

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

1. Carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC; marca libre: Droguería Metropolitana, México, D.F.). Se preparó una suspensión a 1 % de NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En esta suspensión se incorporaron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.

2. Cápsulas. Cápsulas farmacéuticas de gelatina rígida del número 1, se llenaron con 500 mg de teliosporas y se depositaron junto a semillas de maíz al momento de la siembra en macetas. Se colocó una cápsula por semilla.

3. Adyuvante de pesticidas (Agrocer® 010). Se preparó una suspensión a 0.2% (v/v) y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En ésta suspensión se sumergieron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.

4. Dispersante (KEM-KOL^{MR}). Se preparó una suspensión a 0.2 % (v/v) y 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} . En ésta suspensión se sumergieron 50 semillas de maíz por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.

5. Semilla impregnada con teliosporas. En una bolsa de polietileno de 20 x 14.5 cm, se depositaron 3 g de teliosporas, se agregaron 50 semillas de maíz y se mezclaron por 1 min, se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno.

inoculation treatments in seeds. A 50 000 teliosporas mL^{-1} suspension was prepared in sterile distilled water and 1 mL per Petri dish was deposited with Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium prepared from potatoes (Gilchrist *et al.*, 2005). The dishes were incubated in darkness at 25 °C during 48, 72 and 96 h. Then, five dishes were directly observed under microscope, the number of germinated teliosporas per field were counted at 40X magnification. Four fields were observed per case, and the germination average was recorded as a percentage.

Inoculation of seeds with *S. reilianum* f. sp. *zeae* teliosporas. Maize seeds of cultivars Criollo Blanco de Toluca (CBT) and Aspros-910 (AS-910) hybrid, both of white endosperm and susceptible to head smut disease, were disinfected with a 1.5 % NaOCl solution during 3 min, washed with three changes of sterile distilled water and dried at 22 °C on sterile absorbent paper. Then, the seeds of both materials were inoculated with teliosporas using the following methods:

1. Sodium carboxymethylcellulose (NaCMC; own brand: Droguería Metropolitana, Mexico, DF). A 1 % NaCMC and 1.7×10^7 teliosporas mL^{-1} suspension was prepared. In this suspension, 50 maize seeds were immersed for 1 min, individually recovered and placed on polystyrene plates to dry at room temperature (22 °C) for 48 h.

2. Capsules. Pharmaceutical hard gelatin capsules Number 1, were filled with 500 mg of teliosporas and deposited with maize seeds at planting in pots. One capsule per seed was placed.

3. Pesticide Adjuvant (Agrocer® 010). A 1.7×10^7 mL^{-1} teliosporas plus 0.2 % (v/v) suspension was prepared. In this suspension, 50 maize seeds were immersed for 1 min, individually recovered and placed on polystyrene plates to dry at room temperature (22 °C) for 48 h.

4. Dispersant (KEM-KOL^{MR}). A 1.7×10^7 mL^{-1} teliosporas plus 0.2% (v/v) suspension was prepared. In this suspension, 50 maize seeds were immersed for 1 min, individually recovered and placed on polystyrene plates to dry at room temperature (22 °C) for 48 h.

5. Seed impregnated with teliosporas. In a 20 x 14.5 cm polyethylene bag, 3 g of teliosporas were deposited, 50 maize seeds were added and mixed for 1 min, then recovered and placed individually on polystyrene plates.

6. Seeds with mechanical damage and impregnated with teliosporas. In order to cause damage to the surface of the seed, 50 maize seeds were rubbed for 1 min between two abrasive papers No. 4, then they were placed in a polyethylene bag of 20 x 14.5 cm with 3 g of teliosporas and mixed for 1 min, then recovered and placed individually on polystyrene plates.

7. Acrylic enamel (Aero Comex^{MR}). In a 20 x 14.5 cm polyethylene bag, 3 g of teliosporas were mixed with 50 maize seeds and stirred for 1 min. The seeds were collected and, after spray them with spray enamel for 1 min, they were dried at 22 °C on polystyrene plates at room temperature (22 °C) for 48 h.

8. Blank. Disinfested seed.

Maize seeds inoculated in previous treatments were sown in pots with sterile soil (pH 8.0), 5.08 dSm⁻¹ electrical

6. Semillas con daño mecánico e impregnadas con teliosporas. Para ocasionar daños sobre la superficie de la semilla, entre dos papeles lija No. 4 se frotaron 50 semillas de maíz por 1 min, posteriormente se depositaron en una bolsa de polietileno de 20 x 14.5 cm con 3 g de teliosporas y se mezclaron por 1 min, luego se recuperaron individualmente y se colocaron sobre platos de poliestireno.

7. Esmalte acrílico (Aero Comex^{MR}). En una bolsa de polietileno de 20 x 14.5 cm, se depositaron 3 g de teliosporas, se agregaron 50 semillas de maíz y se agitaron por 1 min. Las semillas se extrajeron y, después de rociarlas con esmalte en aerosol por 1 min, se secaron a 22 °C sobre platos de poliestireno para su secado a temperatura ambiente (22 °C) durante 48 h.

8. Testigo. Semilla desinfectada.

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

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

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

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

conductivity, 3.23 % organic matter content and sandy-loam texture (75.6 % sand, 14.5 % lime and 9.9 % clay). The pots were placed in a bioclimatic chamber (Model CEL 38-15), distributed in a completely randomized blocks design with seven experimental units (replicates) at 25 °C with a photoperiod of 12 h light generated with 16 lamps of white fluorescent light of 160 watts. Each unit consisted in one pot with five inoculated seeds. The variable evaluated was: number of infected seedlings with *S. reilianum* f. sp. *zeae* expressed as a percentage.

Evaluation of the infection. The percentage of infected seedlings in the different treatments, was determined by detecting the mycelium of *S. reilianum* f. sp. *zeae* 25 d after sowing. For this purpose, cross-sections cuts of mesocotyl with a razor in the stereomicroscope were done. Sections were stained with 0.5 % cotton blue in lactophenol for 3 min, placed into a 1% safranin solution in 70 % ethanol for 1 min, and washed in 70 % glycerol for 1 min. The sections were mounted in 70 % glycerol and examined under a compound microscope (40X). The data obtained were analyzed with ANOVA and Tukey's mean separation ($\alpha = 0.05$), with the statistical software SAS (1999). Tissue images were taken with a digital camera (Moticam 2300).

Inoculated seedlings of each treatment were kept in containers under the same conditions in the bioclimatic chamber to register the development of characteristic symptoms of the disease.

Molecular identity of the infective mycelium. The identity of the mycelium observed in the tissues of the mesocotyl was verified by the polymerase chain reaction (PCR) with primers SR1 and SR2, 5' CAGGTTATGTATGGGCCG-3', 5' TTGAGCGATGACCATTCC-3', respectively, specific for *S. reilianum* f. sp. *zeae* that amplifies genomic DNA (Xu *et al.*, 1999). For DNA extraction, from both plant tissue and basidiospore, the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 2009) was used according to the specified protocol.

DNA from plant tissue was obtained from the seedlings mesocotyl 25 d after sowing, coming from both, seeds inoculated with the fungus (1% NaCMC and 1.7 x 10⁷ teliospores mL⁻¹) and from non-inoculated (control) seeds. While fungus DNA was obtained from monosporidial cultures (basidiospore) of 72 h of growth at 25 °C in darkness according to Xu *et al.* (1999). Thus, 0.5 mL of suspension in sterile distilled water with 50 000 teliospores ml⁻¹ were distributed in PDA, and from the isolated colonies that were developed, samples were collected with a sterile loop for pure cultures of basidiospores in PDA.

PCR tests included a positive control (DNA of basidiospores), a negative control (DNA from plant tissue of non-inoculated control plants) and samples of inoculated plants (DNA from plant tissue of grown plants from inoculated seeds).

The reaction was carried out in a total volume of 50 L and for each reaction a PCR tube was used to mix the following reagents: 10 L of amplification buffer (GoTaq[®] Flexi Buffer, Promega), 5 L of MgCl₂, 25 M, 1 L of nucleotide mixture of 10 M each, 1 L of each primer at

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

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

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Viabilidad de teliosporas. En medio de cultivo PDA a 25 °C, se registró 19, 29.8 y 35.4 % de germinación de teliosporas después de 48, 72 y 96 h, respectivamente. Las teliosporas formaron un basidio septado con cuatro células (Figura 1), cada una de las cuales originó una basidiospora que desarrolló colonias tipo levadura de color crema.

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

1 M, 0.25 L of the enzyme GoTaq® DNA polymerase (5u/µL), 4 L of corresponding DNA and 27.75 L of nuclease-free water. The reagents were mixed in a vortex and centrifuged for 5 s. The PCR reactions were performed in a thermocycler (TC- 300, Techne®) with the following parameters: 1 cycle of 4 min at 94 °C, 1 min at 56 °C and 2 min at 72 °C followed by 36 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 56 °C and 2 min at 72 °C. The program ended with 10 min at 72 °C. Amplified products were separated by 1% agarose gel electrophoresis at 85V for 40 min, stained with ethidium bromide at 1 mg L⁻¹ and displayed on a gel photodocumentation system (Gel Doc 2000, Bio-Rad®). The detection of a 0.96 kb fragment was evidence of the presence of *S. reilianum* f. sp. *zeae* in plant tissue according to Xu *et al.* (1999).

RESULTS AND DISCUSSION

Viability of teliosporas. In PDA medium at 25°C, the 19, 29.8 and 35.4 % of teliospores germination was observed after 48, 72 and 96 h, respectively. Teliospores formed a septate basidium with four cells (Figure 1), and each of them gave rise to a basidiospore that developed colonies type yeast of cream color.

The germination percentages of teliospore observed in this study after 48 h of incubation were higher by 7 percentage points than those reported by Osorio and Frederiksen (1998), who obtained maximum germination of 12 % on PDA after 48 h of incubation in darkness at 28 °C. The differences could be due to storage conditions, incubation and growth media used. Pai and Pan (1964) reported that teliospores of *S. reilianum* stored for 30 d on wet paper at 30-35 °C germinated at a rate of 60-90 % in a 1 % sucrose solution; however, when kept during the same time in a cool, dry environment, germination was only 10%. In the present study, the teliospores stored in paper bags at 20 ± 2 °C registered maximum germination percentage of 35.4 %.

Evaluation of inoculation treatments. After each treatment with the fungus in control plants and in those without infections, there was no mycelium and no morphological alterations in the cells of the tissues of the mesocotyl (Fig. 2A -2C). In contrast, in the mesocotyl of the infected seedlings, specifically in the parenchyma and the area close to the endodermis, a thin intracellular mycelium (0.9-1.3 µm) was observed, smooth and septate (Figure 2D -2F) corresponding to *S. reilianum* f. sp. *zeae*, this was developed without causing alterations in colonized cells or visible symptoms; however, xylem and phloem didn't proliferate. This coincides with Martinez *et al.* (1999) reports, who observed that the infected cells of the vegetative meristem have normal activity, so that the fungus acts as a biotrophic endophyte until sporogenesis, which occurs in the floral meristem. Meanwhile, Matyac (1985) reported the presence of mycelium of *Sphacelotheca reiliana* in the phloem and xylem of maize plants, but this contrasts with the findings in this study, as no infective mycelium was found in these tissues.

In the present study, it was observed that the differential staining method with cotton blue in 0.5 %

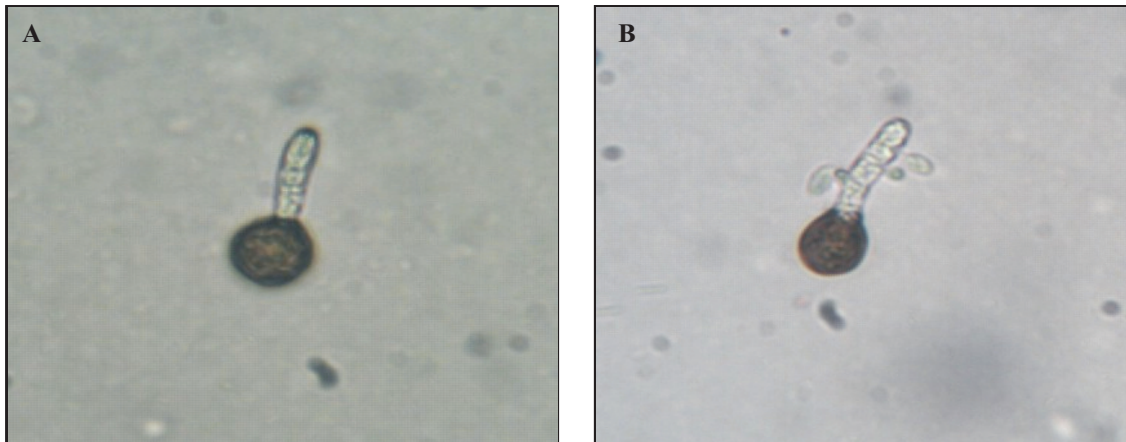


Figura 1. Teliosporas de *Sporisorium reilianum* f. sp. *zae* en medio de cultivo PDA. A) Germinación de teliospora y desarrollo de basidio. B) Basidio con producción de basidiosporas. Colegio de Postgraduados, 2010.

Figure 1. Teliospores of *Sporisorium reilianum* f. sp. in PDA culture medium. A) Teliospore germination and development of basidium. B) Basidium with basidiospores production. Colegio de Postgraduados, 2010.

en bolsas de papel a 20 ± 2 °C registraron un porcentaje máximo de germinación de 35.4%.

Evaluación de los tratamientos de inoculación. En las plantas testigo y en las que resultaron libres de infección, después de cada tratamiento con el hongo, no se registró micelio ni alteraciones morfológicas en las células de los tejidos del mesocotilo (Figura 2A-2C). En contraste, en el mesocotilo de las plántulas infectadas, específicamente en el parénquima y la zona cercana a la endodermis, se observó micelio intracelular delgado ($0.9\text{-}1.3\ \mu\text{m}$), liso y septado (Figura 2D-2F) correspondiente a *S. reilianum* f. sp. *zae*, este se desarrolló sin causar alteraciones en las células colonizadas ni síntomas visibles; sin embargo, no proliferó en el xilema y floema. Lo anterior coincide con lo reportado por Martínez *et al.* (1999), quienes observaron que las células infectadas del meristemo vegetativo tienen una actividad normal, por lo que el hongo actúa como un endófito biotrófico hasta el momento de la esporogénesis, la cual ocurre en el meristemo floral. Por su parte, Matyac (1985) reportó la presencia de micelio de *Sphacelotheca reiliana* en el floema y el xilema de plantas de maíz, esto contrasta con lo observado en este trabajo, ya que no se encontró micelio infectivo en esos tejidos.

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

lactophenol and 1 % safranin in 70 % ethanol, developed during this study, allows to differentiate plant tissues of maize seedling and mycelium of *S. reilianum* f. sp. *zae* resulting in a rapid identification of infected seedlings when cross sections are made to the mesocotyl after 25 d of sowing inoculated seeds, indicating that at this time the pathogen has penetrated the host, coinciding with Martínez *et al.* (2002) reports, who found that after three weeks of inoculation, the cultured *in vitro* seedlings show no symptoms; however, the surface of the root was extensively colonized with mycelium of *S. reilianum* f. sp. *zae* that penetrated through the cells of the epidermis, and in some cases the cells of the root were completely invaded by the fungus.

On the other hand, the infected plants developed symptoms characteristic of the disease (Matyac and Kommedahl, 1985b; Pataky, 1999). After 45 d of the emergence and from the fourth leaf, chlorotic spots (1-2 mm diameter) were observed in both, the leaf blade and midrib (Figure 3A). In cross sections of these chlorotic areas, the presence of intracellular mycelium was more abundant in the chlorosis area (Figure 3B). Similar observations were made by Foster and Frederiksen (1977) and Martínez *et al.* (2002), who documented the development of chlorotic spots on leaves as the first symptom in the disease development in seedlings. In this paper, both the seedlings of the CBT cultivar as well as the AS-910 hybrid, showed chlorotic spots in early stages and subsequently developed sori during the flowering stage. Therefore, the appearance of these small chlorotic spots could be used as an indicator of infection by *S. reilianum* f. sp. *zae* in maize. Previously, Matyac and Kommedahl (1985b) used this symptom as an indirect indicator of infection in artificially inoculated plants grown on greenhouse. After 102 d of plating, sori formed in the tassel and maize ear of the plants. The tassels were partially invaded by smut, affecting the development of spikelets and thus pollen production (Figure 3D). Also, on the maize ear grain formation was not presented because

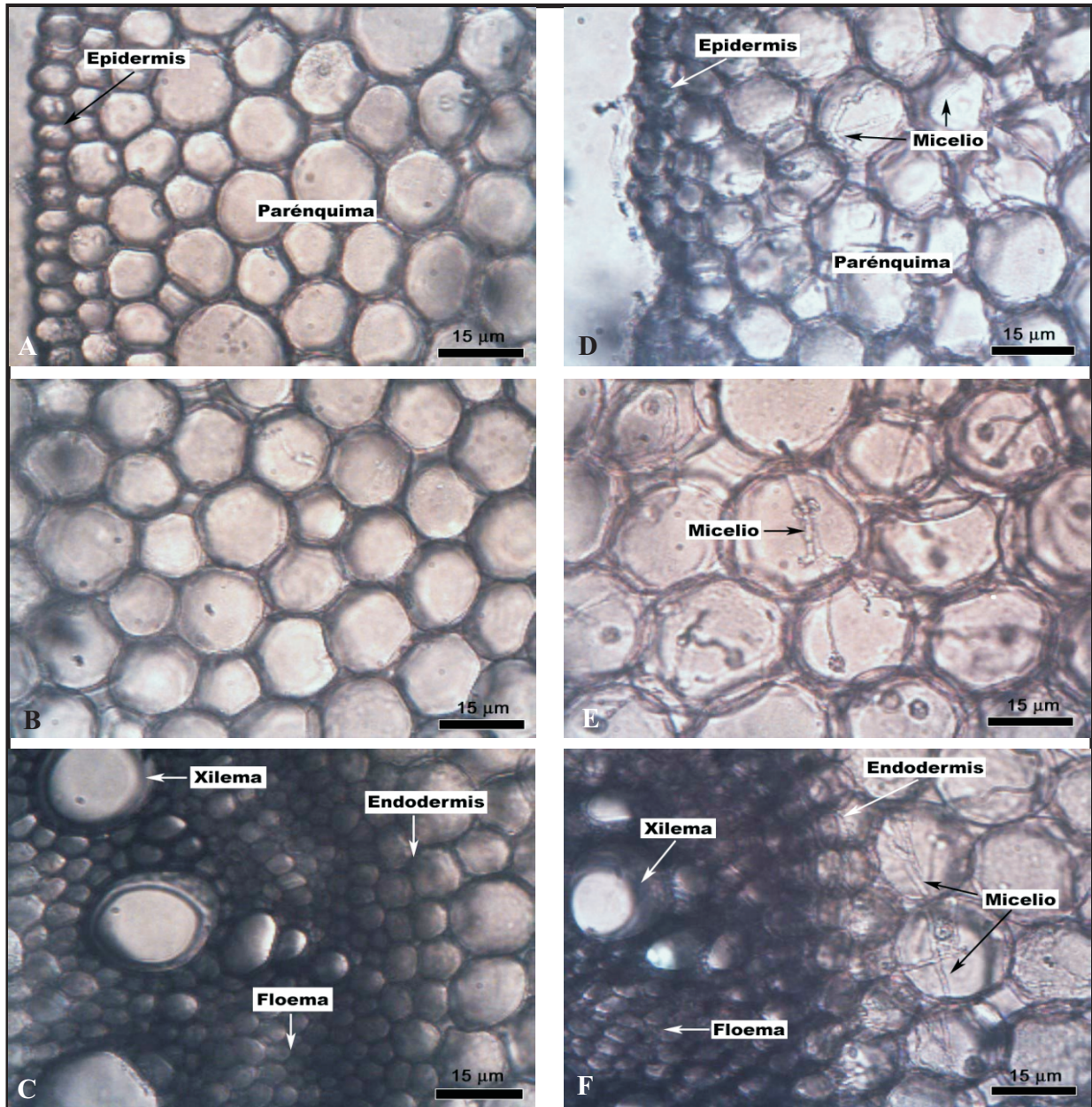


Figura 2. Cortes transversales de tejido del mesocotilo de plántulas de maíz 25 d después de la siembra. A-C) Tejido de plántula no infectada. D-F) Tejido de plántula infectada. A) Células de la epidermis y parénquima. B) Células del parénquima. C) Células de la endodermis y cilindro vascular. D y E)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

Figure 2. Cross sections of mesocotyl tissue from maize seedlings 25 d after sowing. A-C) non-infected seedling tissue. D-F) infected seedling Tissue. A) Cells of the epidermis and parenchyma. B) Cells of the parenchyma. C) Cells of the endodermis and vascular cylinder. D and E) Cells of the parenchyma infected with mycelium of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear*. F) Intracellular mycelium of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zear* infecting parenchymal cells near the endodermis. Colegio de Postgraduados, 2010.

zear el cual penetró a través de las células de la epidermis, y en algunos casos las células de la raíz fueron invadidas totalmente por el hongo.

Por otra parte, las plantas infectadas desarrollaron síntomas característicos de la enfermedad (Matyac y

these were replaced by sori development containing the teliospores (Figure 3C). Teliospores formation is the sporogenesis byproduct, which starts at the time of floral induction in maize (Martinez *et al.*, 2002). The total or partial replacement of the tassel and maize ear structures by

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

sori, is one of the major features of the infection and the development of the disease in maize by *S. reilianum* (Pataky, 1999; Matyac and Kommedahl, 1985a).

In this research, besides the evidence of the mycelium in the host tissue and the sori presence at the end of the experiment, the identity of the mycelium in the collected seedlings after 25 d of planting was molecularly confirmed. When DNA from plant tissue of seedlings grown from seeds inoculated with *S. reilianum* f. sp. *zetae* was used, a 0.96 kb segment was amplified with SR1 and SR2 primers. This fragment was also amplified from DNA of a pure culture of the fungus developed on PDA medium. The size of the 0.96 kb bands obtained coincides with Xu *et al.*, (1999) reports for *S. reilianum* f. sp. *zetae*. In contrast, no band was registered with DNA samples of plant tissue of

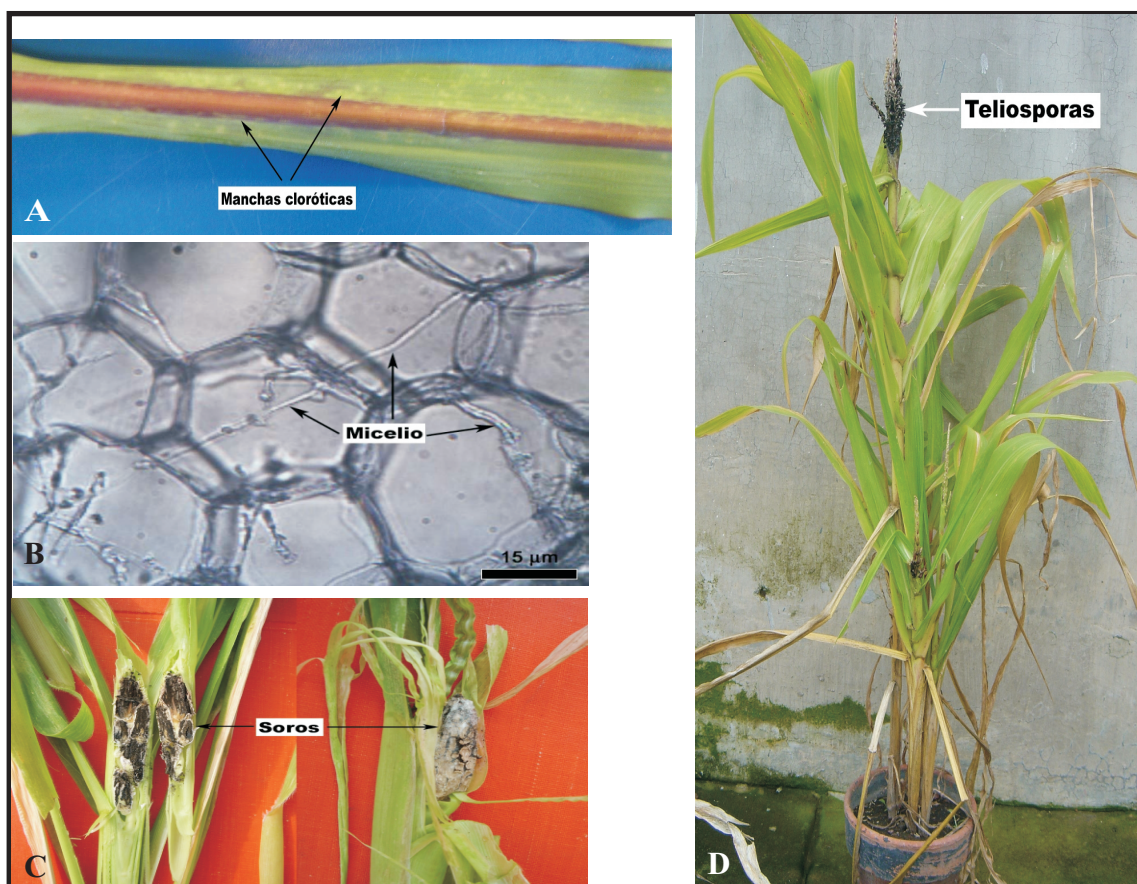


Figura 3. Material vegetal con síntomas y signos del carbón de la espiga del maíz por *Sporisorium reilianum* f. sp. *zetae*. Material colectado de plantas del híbrido AS-910 desarrolladas a partir de semillas inoculadas con una suspensión de 1 % de carboximetilcelulosa de sodio y 1.7×10^7 teliosporas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

Figure 3. Plant material with symptoms and signs of maize head smut caused by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zetae*. Material collected from plants of the AS-910 hybrid grown from inoculated seeds with a 1 % carboxymethylcellulose sodium and 1.7×10^7 mL^{-1} teliospores suspension, incubated under controlled conditions at 25 °C with 12 h of light. A) Leaf with chlorotic spots on midrib and leaf blade 45 d after emergence. B) Tissue with intracellular mycelium growth from the chlorotic leaf area. C) Sori formed on the ear, 102 d after sowing. D) Adult plant with teliospores on the tassel. Colegio de Postgraduados, 2010

pequeñas manchas cloróticas podría usarse como un indicador de la infección por *S. reilianum* f. sp. *zeae* en maíz. Previamente, Matyac y Kommedahl (1985b) usaron este síntoma como un indicador indirecto de la infección en plantas inoculadas artificialmente y desarrolladas en invernadero. A los 102 d después de la siembra, se encontró formación de soros tanto en la panoja como en la mazorca de las plantas. Las panojas fueron parcialmente invadidas por el carbón, lo que afectó el desarrollo de las espiguillas y con ello la producción de polen (Figura 3D). Asimismo, en la mazorca no se presentó la formación de granos debido a que estos fueron reemplazados por el desarrollo de soros que contenían a las teliosporas (Figura 3C). La formación de teliosporas es el producto derivado de la esporogénesis, la cual inicia al momento de la inducción floral en maíz (Martínez *et al.*, 2002). El reemplazo total o parcial de las estructuras de la panoja y la mazorca por soros, es una de las principales características de la infección y del desarrollo de la enfermedad por *S. reilianum* en maíz (Pataky, 1999; Matyac y Kommedahl, 1985a).

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

El ANOVA detectó diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación, evaluados mediante el porcentaje de plántulas infectadas con micelio de *S. reilianum* f. sp. *zeae* a 25 d después de la siembra (Cuadro 1). Tanto el cultivar CBT como el AS-910 presentaron infección cuando las semillas se inocularon con NaCMC y 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹. Este tratamiento registró medias de 93.3 y 96.6 % de infección en CBT y AS-910, respectivamente, superando a los demás. Estos porcentajes de plántulas infectadas fueron superiores a los reportados por Baggett y Koepsell (1983), quienes al inocular semillas de maíz dulce de un cultivar susceptible, con metilcelulosa y teliosporas de *Sphacelotheca reiliana* obtuvieron como máximo 54.5 % de infección en campo. Por otra parte, la inoculación con cápsulas, semilla impregnada y esmalte produjo infección de plántulas en ambos materiales de maíz, pero sin ser significativamente diferentes del testigo.

CONCLUSIONES

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

seedlings grown from seed not inoculated with the fungus (Figure 4).

ANOVA detected significant differences between inoculation treatments, which were evaluated by the percentage of infected seedlings with mycelium of *S. reilianum* f. sp. *zeae* after 25 d of planting (Table 1). Both, CBT cultivar and AS-910, were infected when seeds were inoculated with NaCMC and 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹. This treatment recorded averages of 93.3 and 96.6 % infection in CBT and AS-910, respectively, outperforming the rest. These percentages of infected seedlings were higher than those reported by Baggett and Koepsell (1983), who inoculated sweet maize seeds of a susceptible cultivar with methylcellulose and *Sphacelotheca reiliana* teliosporas, and they obtained a maximum of 54.5 % of infection in the field. On the other hand, inoculation with capsules, impregnated seed and enamel produced seedlings infection in both maize materials, but without being significantly different from the control.

CONCLUSIONS

The maize seed inoculation with a suspension of 1 % sodium carboxymethylcellulose and 1.7×10^7 teliosporas mL⁻¹ of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, induces a 96.6 % of infected seedlings.

The differential staining method of cotton blue with 0.5 % lactophenol and 1 % safranin in 70 % ethanol, applied in the mesocotyl crosscuts of maize seedlings 25 d after planting, is effective to differentiate *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* mycelium of plant tissues.

Acknowledgments. Thanks to the PM 0541 and PM 0542 projects: "Development of maize (*Zea mays*) cultivars for Mexico Highlands with high yield and resistance to head smut disease (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), funded by the Dirección General de Sanidad Vegetal del Servicio

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

Table 1. Average percentage of maize seedlings infected with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*, generated from inoculated seeds with teliosporas using different seed treatments.

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

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

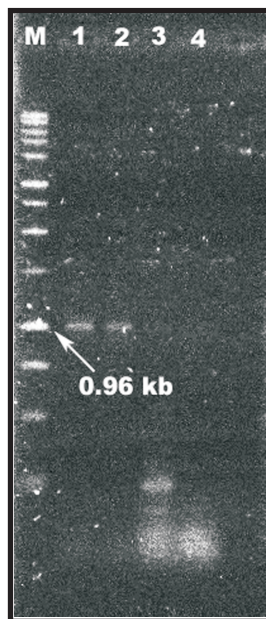


Figura 4. Productos de amplificación mediante PCR empleando el par de iniciadores SR1 y SR2; M. marcador molecular 1 kb; 1. ADN de colonias desarrolladas en medio de cultivo; 2. ADN de tejido vegetal de plántulas de maíz desarrolladas a partir de semillas inoculadas con *Sporisorium reilianum* f. sp.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

Figure 4. PCR amplification products using the primers SR1 and SR2; M. 1kb molecular marker; 1. DNA of colonies developed in a culture medium; 2. DNA plant tissue of maize seedlings grown from inoculated seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*; 3. DNA plant tissue of maize seedlings grown from non- inoculated seeds; 4. Water. Colegio de Postgraduados, 2010.

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

Agradecimientos. Al proyecto PM 0541 y PM 0542 “Desarrollo de cultivares de maíz (*Zea mays*) para el Altiplano de México con alto rendimiento y resistencia al carbón de la espiga (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), financiado por la Dirección General de Sanidad Vegetal del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 176171 para el primer autor.

LITERATURA CITADA.

Aquino MJG, Sánchez FA, González HA y Sánchez PJR. 2011. Resistencia de variedades e híbridos de maíz (*Zea mays*) a *Sporisorium reilianum* y su rendimiento de grano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:39-49.

Baggett JR and Koepsell PA. 1983. Field inoculation of sweet maize with the head smut pathogen (*Sphacelotheca reiliana*). *Hortscience* 18:67-68.

Craig J and Frederiksen RA. 1992. Comparison of sorghum seedling reactions to *Sporisorium reilianum* in relation to sorghum head smut resistance classes. *Plant Disease* 76:314-318.

Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, Mexico). To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), for the scholarship number 176171 awarded to the first author.

Foster JH and Frederiksen RA. 1977. Symptoms of head smut in maize seedlings and evaluation of hybrids and inbreds. *In: Progress Report, Texas Agricultural Experimental Station.* 3423: January, 1-4.

Gilchrist SL, Fuentes DG, Martínez CC, López ARM, Duveiller E, Singh RP, Henry M y García AI. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT. 8-9 pp.

Ingold CT. 1994. Products of teliospore germination in *Sporisorium* spp. *Mycological Research* 98:467-473.

Martinez CA, Roux C, Jauneau A and Dargent R. 2002. The biological cycle of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*: an overview using microscopy. *Mycologia* 94:505-514.

Martinez CA, Jauneau C, Roux C, Savy C and Dargent R. 2000. Early infection of maize roots by *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Protoplasma* 213:83-92.

Martinez C, Roux C and Dargent R. 1999. Biotrophic development of *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae* in vegetative shoot apex of maize. *Phytopathology* 89:247-253.

Martinez RJL y Ledesma MJ. 1990. Control químico del

- carbón de la espiga *Sphacelotheca reiliana* (Kühn) Clint. del maíz, en el Valle de Zapopan, Jalisco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8:68-70.
- Matyac CA. 1985. Histological development of *Sphacelotheca reiliana* on *Zea mays*. *Phytopathology* 75:924-929.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985a. Factors affecting the development of head smut caused by *Sphacelotheca reiliana* on maize. *Phytopathology* 75:577-581.
- Matyac CA and Kommedahl T. 1985b. Occurrence of chlorotic spots on maize seedlings infected with *Sphacelotheca reiliana* and their use in evaluation of head smut resistance. *Plant Disease* 69:251-254.
- Metha BK. 1967. Evaluation of physiological specialization in *Sphacelotheca reiliana*. *Phytopathology* 57:925-928.
- Osorio JA and Frederiksen RA. 1998. Development of an infection assay for *Sporisorium reilianum*, the head smut pathogen on sorghum. *Plant Disease* 82:1232-1236.
- Pai CK and Pan SF. 1964. Studies on factors influencing the germination of the chlamydospores of *Sphacelotheca reiliana*. *Acta Phytopathologica Sinica* 7:53-60.
- Pataky JK. 1999. Smuts. *In: Compendium of maize diseases* (White D.G., ed). 3rd. Edition. APS Press. Saint Paul, Minnesota, USA. 33-35 pp.
- Pradhanang PM and Ghimire SR. 1996. Fungicide management of maize head smut (*Sphacelotheca reiliana*) by seed treatment. *Tropical Agriculture* 73:325-328.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC USA. 1028 p.
- Stienstra WC, Kommedahl T, Stromberg EL, Matyac CA, Windels CE and Morgan F. 1985. Suppression of maize head smut with seed and soil treatments. *Plant Disease* 69:301-302.
- Stromberg EL, Stienstra WC, Kommedahl T, Matyac CA and Windels CE. 1984. Smut expression and resistance of maize to *Sphacllothea reiliana* in Minnesota. *Plant Disease* 68:880-884.
- Whythe IV and Gevers HO. 1988. Diallel analysis of resistance of eight maize inbred lines to *Sphacelotheca reiliana*. *Phytopathology* 78:65-68.
- Wright PJ, Fullerton RA and Koolaard JP. 2006. Fungicide control of head smut (*Sporisorium reilianum*) of sweetmaize (*Zea mays*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34:23-26.
- Xu ML, Melchinger AE and Lübberstedt T. 1999. Species-specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR-based assays. *Plant Disease* 83:390-395.