

# RENDIMIENTO DE GRANO Y RESISTENCIA A TIZÓN FOLIAR (*Exserohilum turcicum*) DE HÍBRIDOS FÉRTILES Y ANDROESTÉRILES DE MAÍZ

## GRAIN YIELD AND RESISTANCE TO LEAF BLIGHT (*Exserohilum turcicum*) OF FERTILE AND ANDROSTERILE MAIZE HYBRIDS

Benjamín Martínez-Nuñez<sup>1</sup>, Margarita Tadeo-Robledo<sup>2\*</sup>, Alejandro Espinosa-Calderón<sup>3</sup>, J. Jesús García-Zavala<sup>1</sup>, Hilda V. Silva-Rojas<sup>1</sup>, Víctor H. Aguilar-Rincón<sup>1</sup>, Salvador Miranda-Colín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genética. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (martinez.benjamin@colpos.mx, jzavala@colpos.mx, hsilva@colpos.mx, aheber@colpos.mx, smiranda@colpos.mx). <sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucán, Km 2.5. C. P. 54714. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. (tadeorobledo@yahoo.com). <sup>3</sup>Campo Experimental Valle de México. INIFAP. Carretera Los Reyes-Texcoco km 13.5. C. P. 56250. Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. (espinole@yahoo.com.mx)

### RESUMEN

Los productores de maíz (*Zea mays* L.) en México enfrentan la problemática de comprar semilla cara de los híbridos que cultivan. Una alternativa que abarata la semilla es la androesterilidad en la formación de los híbridos, pero esta característica está asociada a problemas fitosanitarios, como el tizón foliar o norteño (*Exserohilum turcicum*), un patógeno presente en México. Por ello, es necesario controlar su distribución con materiales resistentes a la enfermedad y con mayor rendimiento de grano. La hipótesis de este estudio fue que los híbridos androfértiles y androestériles tienen el mismo nivel de resistencia a tizón, y que los híbridos androestériles presentan mayor rendimiento de grano que los androfértiles. En este estudio el rendimiento y la resistencia a tizón norteño se evaluó en cinco híbridos experimentales de maíz, en su versión fértil y androestéril, y se comparó con las de cinco híbridos de fertilidad normal, con uso amplio en la región de estudio. El diseño experimental fue bloques completos al azar, con dos tratamientos de inoculación, tres repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue un surco de 5 m de largo por 0.80 m de ancho. La investigación se desarrolló en el ciclo agrícola primavera-verano 2016, en los Valles Altos del Centro de México en Cuautitlán y Texcoco, Estado de México. El rendimiento medio de grano (8.0 Mg ha<sup>-1</sup>) mostró que la expresión fenotípica de los híbridos fue sobresaliente. Los genotipos comerciales Cimarrón, Aspros 823, P3368W y Tsiri Puma y el material experimental H3 en su versión fértil destacaron por su productividad de grano, y este

\* Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: January, 2018. Aprobado: October, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: xxx-xxx. 2019.

### ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) growers in Mexico face the problem of buying expensive seed of the hybrids they cultivate. An option to reduce seed price is androsterility in the formation of the hybrids. This characteristic, however, is associated with phytosanitary problems, such as leaf, or northern, blight (*Exserohilum turcicum*), a pathogen present in Mexico. Therefore, it is necessary to control its distribution with materials that are resistant to the disease and produce higher grain yield. The hypothesis of this study was that androfertile and androsterile hybrids have the same level of resistance to blight and that the androsterile are higher-yielding than androfertile. In this study yield and resistance to northern blight was evaluated in five experimental maize hybrids in their fertile and androsterile versions and compared with five hybrids of normal fertility that are widely used in the study region. The experimental design was complete randomized blocks with two inoculation treatments, three replications per treatment, and the experimental unit was one row 5 m long by 0.80 m wide. The research was conducted during the spring-summer 2016 growing cycle in the High Valleys of Central Mexico in Cuautitlán and Texcoco, Estado de Mexico. Mean grain yield (8.0 Mg ha<sup>-1</sup>) showed that phenotypical expression of the hybrids was outstanding. The commercial genotypes Cimarrón, Aspros 823, P3368W and Tsiri Puma, and the experimental material H3 in its fertile version were outstanding for their grain yield. The last hybrid exhibited contrasts in resistance to northern blight. The hybrids with normal fertility produced higher grain yield. Resistance to leaf blight did not depend on androsterility since both genotypes, androsterile and fertile, had similar resistance.

**último presentó contrastes en la resistencia a tizón norteño. Los híbridos con fertilidad normal mostraron rendimiento mayor de grano. La resistencia a tizón foliar no dependió de la androesterilidad, debido a que ambos genotipos, androestériles y fértiles, presentaron resistencia similar.**

**Palabras clave:** *Zea mays* L., *Exserohilum turcicum*, androesterilidad, resistencia, severidad.

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) en México es el cultivo más importante. Cerca de ocho millones de ha se establecen cada año, con rendimiento promedio de 3.7 Mg ha<sup>-1</sup>, pero cada año se importan 10 millones Mg de grano entero (SIAP, 2016). En los Valles Altos del Centro de México (2200 a 2600 m de altitud), se cultivan cerca de 1.5 millones ha, alrededor del 50 % en zonas de riego y buen temporal, y son aptas para siembras con semillas mejoradas principalmente híbridos (Turrent, 2009).

La producción de semilla tiene dos esquemas. El primero usa progenitores fértiles, por lo regular se alternan seis surcos de líneas hembra por dos de líneas macho (Tadeo *et al.*, 2010), y la inflorescencia masculina de la hembra debe eliminarse a mano antes de la liberación de polen, lo que encarece la semilla híbrida. El segundo esquema emplea la androesterilidad y usa progenitores hembra que no producen polen; esto evita el desespigue de las plantas y favorece al productor y consumidor, porque genera semilla híbrida más barata y garantiza su calidad genética (Tadeo *et al.*, 2015).

La androesterilidad en maíz comenzó a utilizarse en EUA, pero dejó de usarse en 1970 porque los híbridos con la fuente de esterilidad citoplasmática (*cms-T*) mostraron susceptibilidad al tizón foliar (*Helminthosporium maydis*) raza T, que ocasionó pérdidas del 90 % de las siembras de maíz (Grogan *et al.*, 1971; Airy *et al.*, 1978). Este daño generalizado provocó el desuso de la androesterilidad, porque esta condición se asoció con la susceptibilidad del maíz a cualquier tizón foliar.

En maíz, *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard y Suggs, teleomorfo *Setosphaeria turcica* (Luttr.) Leonard y Suggs., es causante del tizón norteño de la hoja, importante en el mundo por su amplia presencia en este cultivo (Smith y White, 1988; Leonard *et al.*, 1989; Carson, 2006; Weems y Bradley, 2017).

**Key words:** *Zea mays* L., *Exserohilum turcicum*, androsterility, resistance, severity.

## INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is Mexico's most important crop. Nearly eight million hectares are planted yearly, yielding on average 3.7 Mg ha<sup>-1</sup>, but every year 10 million Mg of whole grains is imported every year (SIAP, 2016). In the High Valleys of Central Mexico (2200 to 2600 m altitude) 1.5 million ha are cultivated, around 50 % irrigated, precipitation is favorable, and they are apt for growing improved varieties, mainly hybrids (Turrent, 2009).

Seed is produced under two schemes. The first uses fertile progenitors, usually alternating six rows of female lines by two male lines (Tadeo *et al.*, 2010), and the male inflorescence of the female inflorescence should be removed manually before pollen is released, which makes hybrid seed expensive. The second scheme utilizes androsterility, using female progenitors that do not produce pollen; this prevents detasseling of the plants and favors grower and consumer by producing cheaper hybrid seed and guaranteeing genetic quality (Tadeo *et al.*, 2015).

Use of androsterility in maize began in the United States, but by 1970 it was no longer used because hybrids with a source of cytoplasmic sterility (*cms-T*) are susceptible to T race leaf blight (*Helminthosporium maydis*), which has caused losses of 90 % in maize crops (Grogan *et al.*, 1971; Airy *et al.*, 1978). Because of this generalized damage, androsterility was no longer used since it was associated with maize susceptibility to any leaf blight.

In maize, *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard and Suggs, teleomorph *Setosphaeria turcica* (Luttr.) Leonard and Suggs., is the cause of northern leaf blight, which is important worldwide because of its widespread presence in the crop (Smith and White, 1988; Leonard *et al.*, 1989; Carson, 2006; Weems and Bradley, 2017). *Exserohilum turcicum* occurs mainly in locations with temperatures of 18 to 27 °C and moderate to high relative humidity during crop development (Hooker, 1977; Balint *et al.*, 2010; Sartori *et al.*, 2017). If it is present before emergence of stigmas, it can cause losses to grain production of up to 50 % (Raymundo and Hooker, 1981). The most serious incidences were reported in East Africa,

*Exserohilum turcicum* se presenta principalmente en lugares con temperaturas de 18 a 27 °C y con humedad relativa de moderada a alta durante el desarrollo del cultivo (Hooker, 1977; Balint *et al.*, 2010; Sartori *et al.*, 2017), y si se presenta antes de la emergencia de estigmas puede causar pérdidas de hasta 50 % en la producción de grano (Raymundo y Hooker, 1981). Las incidencias más graves se han reportado en el Este de África, India, EUA (Harlapur *et al.*, 2007; Rajeshwar *et al.*, 2013; Weems y Bradley, 2017) y Argentina (Sartori *et al.*, 2015). En México en el estado de Sinaloa, en el ciclo agrícola 2013-2014, dicho tizón provocó pérdidas de 50 % en la producción de grano (Orduño *et al.*, 2015).

Para reducir pérdidas en el rendimiento a causa del tizón norteño, la principal estrategia es utilizar genotipos con resistencia genética estable (Ding *et al.*, 2015). En Valles Altos hay híbridos de maíz debido al trabajo colaborativo de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), los cuales son de alto rendimiento y buenas características agronómicas, y se ofertan mediante microempresas que requieren de esquemas que faciliten su producción (Espinosa *et al.*, 2003a; Ortiz *et al.*, 2007). Una oportunidad para lograr lo anterior es emplear la androesterilidad, por lo que es necesario conocer el rendimiento de grano de los materiales en sus versiones androestériles y fértiles, así como su nivel de resistencia al tizón norteño. El objetivo del presente estudio fue evaluar el rendimiento de grano y la resistencia a tizón norteño de genotipos experimentales de maíz androestériles y de fertilidad normal y compararlos con cultivares comerciales androfértiles. La hipótesis fue que los híbridos androfértiles y androestériles tienen el mismo nivel de resistencia a tizón, y que los híbridos androestériles exhiben mayor rendimiento de grano que los androfértiles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se evaluaron cinco híbridos experimentales de maíz en sus versiones androestériles (AE) y fértiles (F), junto con los híbridos testigo de fertilidad normal Cimarrón (Monsanto), Aspros 823 (Aspros), P3368W (Pioneer), Tsiri Puma (UNAM) y H-50 (INIFAP), todos de uso común en los Valles Altos. Los genotipos fueron sometidos a los tratamientos de inoculación artificial del patógeno (*E. turcicum*) y sin inoculación (incidencia natural).

India, USA (Harlapur *et al.*, 2007; Rajeshwar *et al.*, 2013; Weems and Bradley, 2017) and Argentina (Sartori *et al.*, 2015). In Mexico, in the state of Sinaloa, during the 2013-2014 crop cycle, this blight caused losses of 50 % in grain production (Orduño *et al.*, 2015).

To reduce losses in yield caused by northern blight, the main strategy is to use genotypes with stable genetic resistance (Ding *et al.*, 2015). In the High Valleys maize hybrids are available because of the collaboration between Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). These hybrids are high-yielding and have good agronomic characteristics. They are supplied by micro-enterprises that require schemes that facilitate their production (Espinosa *et al.*, 2003a; Ortiz *et al.*, 2007). One option to achieve the above is to use androsterility, but it is necessary to determine grain yield of materials in their androsterile and fertile versions, as well as their resistance to northern blight. The objective of this study was to evaluate grain yield and resistance to northern blight of maize genotypes that are androsterile and the same genotypes with normal fertility, and to compare them with commercial androfertile cultivars. The hypothesis was that androfertile and androsterile hybrids have the same level of resistance to blight and that the androsterile hybrids are higher-yielding than androfertile hybrids.

## MATERIALS AND METHODS

We evaluated five experimental maize hybrids in their androsterile (AE) and fertile (F) versions, together with the control hybrids with normal fertility Cimarrón (Monsanto), Aspros 823 (Aspros, P3368W (Pioneer), Tsiri Puma (UNAM) and H-50 (INIFAP), all commonly used in the High Valleys. The genotypes were subjected to treatments of artificial inoculation of the pathogen (*E. turcicum*) and no inoculation (natural incidence).

The genotypes were evaluated in three experiments set up in the 2016 spring-summer cycle. Two of them in the Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX) of INIFAP in Texcoco, Estado de Mexico, and one in the experimental station of the Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) of UNAM, in Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

The experimental design was complete random blocks, with two inoculation treatments, three replications per treatment and

Los genotipos se evaluaron en tres experimentos establecidos en el ciclo primavera-verano de 2016. Dos de ellos en el Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX) del INIFAP en Texcoco, Estado de México; y uno más en el campo experimental de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) de la UNAM, en Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

El diseño experimental fue bloques completos al azar, con dos tratamientos de inoculación, tres repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue un surco de 5 m de largo por 0.8 m de ancho. El manejo agronómico del cultivo fue el recomendado por el CEVAMEX-INIFAP para siembras de maíz en Valles Altos (Virgen *et al.*, 2014).

#### Obtención de aislamientos de *Exserohilum turcicum*

Para obtener aislamientos del patógeno se realizó un muestreo en los bordos y zona centro de parcelas sembradas de manera anticipada al ciclo primavera-verano 2016 con el híbrido de maíz Tširi Puma, en Cuautitlán y Texcoco. Las hojas de plantas de dos meses de edad que presentaban síntomas de tizón norteño se recolectaron; es decir, las plantas mostraban lesiones necróticas de color verde-grisáceo o café de tamaño pequeño y abusadas, principalmente en las hojas inferiores de la planta (Hooker, 1977; De León, 1984), las cuales se desinfectaron por 1 min en una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril.

En la zona de avance de la enfermedad se seleccionaron porciones de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup> de tejido vegetal, que se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo V8 (300 mL de jugo V8 Herdez®, 19 g de agar, 4 g de CaCO<sub>3</sub> y 700 mL de H<sub>2</sub>O) y se colocaron 5 d con ciclo de 12 h luz y 12 h oscuridad, a temperatura de laboratorio (25 °C). Los cultivos monospóricos se obtuvieron mediante una dilución 10<sup>-4</sup>, la cual se sembró en medio agar-agua (17 g de agar y 1000 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril). La germinación y crecimiento de conidios se observó 5 d después de la siembra, se transfirieron individualmente a cajas Petri con medio V8 y se mantuvieron 10 a 15 d en laboratorio bajo 12 h de luz y 12 h de oscuridad, hasta observar la esporulación del hongo.

#### Identificación molecular de *Exserohilum turcicum*

El ADN se extrajo con el protocolo de CTAB al 2 % (Doyle y Doyle, 1990) con ligeras modificaciones (procedimiento desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo). La cuantificación del DNA se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific, EUA). Mediante PCR se efectuó la amplificación de *loci* ribosomal de la región correspondiente al Espacio

the experimental unit was one 5 m long by 0.8 m wide row. Agronomic management of the crop was that recommended by CEVAMEX-INIFAP for maize crops in the High Valleys (Virgen *et al.*, 2014).

#### *Exserohilum turcicum* isolation

To obtain isolates of the pathogen, samples were collected from the edges and the central area of plots planted early, before the 2016 spring-summer cycle, with the maize hybrid Tširi Puma in Cuautitlán and Texcoco. Leaves of two-month-old plants that exhibited symptoms of northern blight, that is, plants that showed small tapered necrotic grayish-green or brown lesions, mainly on the lower leaves of the plant (Hooker, 1977; De León, 1984). The leaves were disinfected with a 1 % solution of sodium hypochlorite for 1 min and rinsed twice with sterile distilled water.

In the disease progression area, portions of approximately 0.5 cm<sup>2</sup> of plant tissue were selected. These portions were seeded in Petri dishes with V8 culture medium (300 mL Herdez® V8 juice, 19 g agar, 4 g CaCO<sub>3</sub> and 700 mL of H<sub>2</sub>O) and kept for 5 d with 12 h light and 12 h dark at laboratory temperature (25 °C). Monosporic cultures were obtained with a 10<sup>-4</sup> dilution, which was seeded in agar-water medium (17 g agar and 1000 mL sterile distilled H<sub>2</sub>O). Germination and growth of conidia was observed 5 d after seeding. These were transferred individually to Petri dishes containing V8 medium and kept 10 to 15 d in the laboratory with 12 h light and 12 h dark until fungal sporulation was observed.

#### Molecular identification of *Exserohilum turcicum*

DNA was extracted following the CTAB protocol at 2 % (Doyle and Doyle, 1990) with slight modifications (procedure developed in the Laboratorio de Biotecnología de Semillas, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo). DNA was quantified in a spectrophotometer NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific, USA). PCR amplification of ribosomal *loci* of the regions corresponding to the rDNA Internal Transcript Space (ITS). The universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used and a fragment of approximately 550 base pairs (bp).

For the PCR, at a concentration of 20 ng μL<sup>-1</sup>, and the reagent mixture was prepared in a volume of 15 μL, with 7.86 μL sterile H<sub>2</sub>O, 3 μL buffer 5X, 0.6 μL dNTP, 0.18 μL of each primer, 0.18 GoTaq polymerase DNA and 3 μL genomic DNA. The PCR reaction was conducted in a thermocycler C100 Touch (Biorad, USA). Amplification conditions were an initial denaturalization cycle of 4 min at 95 °C, then 35 cycles of

Transcrito Interno (ITS) del rDNA. Los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') se usaron y amplifican un fragmento de 550 pares de bases (bp) aproximadamente.

Para la PCR se usó una concentración de 20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , y la mezcla de reacción se preparó en un volumen de 15  $\mu\text{L}$ , con 7.86  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril, 3  $\mu\text{L}$  de Buffer 5X, 0.6  $\mu\text{L}$  de dNTP's, 0.18  $\mu\text{L}$  de cada *primer*, 0.18 de GoTaq DNA Polimerasa y 3  $\mu\text{L}$  de DNA genómico. La reacción de PCR se realizó en un termociclador C100 Touch (Biorad, EUA). Las condiciones de amplificación fueron un ciclo inicial de desnaturalización de 4 min a 95 °C, luego 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 58 °C y 2 min a 72 °C; y un ciclo final de desnaturalización de 10 min a 72 °C.

La calidad y el tamaño del fragmento amplificado se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %, y se visualizó la presencia de bandas utilizando un transiluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX (Vilber Lourmat, Alemania). Los productos de PCR se purificaron con ExoSAP-IT® (Affymetrix, EUA). Después se incubaron en un termociclador (Biorad, México) a 37 °C por 15 min y se inactivaron las enzimas de ExoSAP a 80 °C por 15 min.

El producto obtenido se cuantificó en un NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific, EUA) y se utilizó para la secuenciación, la cual se realizó con 18  $\mu\text{L}$  del amortiguador BigDye® Terminator v3.1 (1X) (Applied Biosystems, EUA) y 2  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras, en un termociclador (Biorad, México) con este programa: un ciclo inicial de 1 min a 96 °C, luego 25 ciclos de 10 s a 96 °C, 50 s a 50 °C y 4 min a 60 °C; y un ciclo final de tiempo indeterminado a 4 °C. Los productos de secuenciación se precipitaron con etanol/EDTA, y se colocaron en el Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, EUA); así, las dos hebras de ADN se secuenciaron.

Las secuencias de las dos hebras de ADN obtenidas para cada aislamiento se ensamblaron y se editaron usando el programa BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso, y se compiló cada una en un archivo FASTA y se alinearon con el *profile mode* del Clustal W 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Estas secuencias se compararon en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLAST (Zhang *et al.*, 2000).

### Preparación del inóculo e inoculación

Una vez identificado el patógeno, la producción de inóculo se realizó en cajas Petri con medio de cultivo V8, se incubaron 15 d con periodos de 12 h luz y 12 h oscuridad, y con temperatura aproximada de 25 °C, hasta observar la esporulación del patógeno. El inóculo se preparó mediante la frotación de la superficie del

1 min at 95 °C, 1 min at 58 °C and 2 min at 72 °C, and a final denaturalization cycle of 10 min at 72 °C.

The quality and size of the amplified fragment was verified by electrophoresis in a 1.5 % agarose gel, and the presence of bands was visualized using a transilluminator Infinity-3026 WL/LC/26MX (Vilber Lourmat, Germany). PCR products were purified with ExoSAP-IT® (Affymetrix, USA). They were then incubated in a thermocycler (Biorad, Mexico) at 37 °C for 15 min, and the ExoSAP enzymes were inactivated at 80 °C for 15 min.

The product obtained was quantified in a NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific, USA) and used for sequencing, which was carried out with 18  $\mu\text{L}$  of the buffer BigDye® Terminator v3.1 (1X) (Applied Biosystems, USA) AND 2  $\mu\text{L}$  of each of the samples in a thermocycler (Biorad, Mexico) with the following schedule: an initial cycle of 1 min at 96 °C, then 25 cycles of 10 s at 96 °C, 50 s at 50 °C and 4 min at 60 °C, and one final cycle of undetermined time at 4 °C. The products of sequencing were precipitated with ethanol/EDTA and placed in the Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA), and in this way, the two DNA threads were sequenced.

The sequences of the two DNA threads obtained for each isolate were assembled and edited using the software BioEdit version 7.0.5 (Hall, 1999), with which a consensus sequence was created, and each was compiled in a FASTA file and aligned with the profile mode of Clustal W 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994), included in the software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). These sequences were compared in the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the option BLAST (Zhang *et al.*, 2000).

### Preparation of the inoculum and inoculation

Once the pathogen was identified, the inoculum was produced in Petri dishes with V8 culture medium. The culture was incubated 15 d with periods of 12 h light and 12 h dark at a temperature of approximately 25 °C until sporulation of the pathogen was observed. The inoculum was prepared by rubbing the surface of mycelia with sterile distilled water using cheese cloth as a sieve to remove impurities, and the conidia were collected in a sterile recipient. Concentration of conidia in the suspension was adjusted to  $4 \times 10^5$  conidia per mL (Rajeshwar *et al.*, 2013).

Plants were inoculated artificially with the pathogen when 50 % in each plot exhibited feminine flowering, that is, in the R1 phenological stage of maize (emergence of stigmas) (Perkins and Pedersen, 1987); 7 d later plants were inoculated a second time. The rows planted with each hybrid were sprayed with the suspension of conidia with one pass with the motorized pump sprayer at dusk, while the rows of the treatment

micelio con agua destilada estéril, usando manta de cielo como colador para evitar impurezas y recogiendo los conidios en un recipiente estéril. La concentración de conidios de la suspensión se ajustó a  $4 \times 10^5$  conidios por mL (Rajeshwar *et al.*, 2013).

La inoculación artificial del patógeno se realizó cuando el 50 % de las plantas en cada parcela presentó floración femenina, esto es en el estado fenológico R1 del maíz (emergencia de estigmas) (Perkins y Pedersen, 1987), y 7 d después se hizo otra inoculación. Los surcos sembrados con cada híbrido se asperjaron con la suspensión de conidios mediante un paso con bomba de aspersión motorizada durante el atardecer, mientras que los surcos del tratamiento sin inoculación solo quedaron expuestos a la presencia natural (ambiental) del patógeno en cada localidad.

#### Evaluación de la resistencia a tizón norteño

Las evaluaciones de la resistencia de las plantas al tizón se iniciaron después de la segunda inoculación, porque fue cuando aparecieron los primeros síntomas de tizón foliar. La severidad de la enfermedad y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE) se determinó con la siguiente ecuación:

$$ADCPE = \sum_{i=1}^n \left( \frac{x_{i+1} + x_i}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

donde  $x_i$  es a la severidad de la enfermedad en la medición  $i$  u medición inicial,  $t_i$  es el tiempo en días en la  $i$  medición, y  $n$  es el número total de observaciones.

Para la primera variable se calculó el porcentaje de área foliar afectada utilizando la escala de Elliot y Jenkis (1946) modificada por Muiru *et al.* (2007), mediante observaciones visuales cada semana. Para la segunda variable el valor se calculó con la fórmula de Toley y Grau (1984) y las evaluaciones se extendieron hasta el inicio de la senectud de la hoja de la mazorca principal.

#### Evaluación del rendimiento y otras variables

En campo se registraron los datos de floración masculina (cuando 50 % de las plantas liberaron polen), floración femenina (cuando 50 % de las plantas habían expuesto los estigmas, en por lo menos 3 cm), altura de planta (en cm de la base del tallo al nudo de inserción de la espiga) y altura de mazorca (en cm de la base del tallo al nudo de inserción de la mazorca superior). Además, se midió el porcentaje de grano por parcela (cociente del peso de una muestra de 5 mazorcas sin olote y el peso de la muestra de las 5 mazorcas con olote, multiplicado por 100), longitud de mazorca en cm, número de hileras por mazorca y de

without inoculation were left exposed only to natural presence (environmental) of the pathogen in each location.

#### Evaluation of resistance to northern blight

Evaluations of plant resistance to the blight began after the second inoculation because it was when the first symptoms of leaf blight appeared. Severity of the disease and the area under the disease progression curve (ADCPE) was determined with the following equation:

$$ADCPE = \sum_{i=1}^n \left( \frac{x_{i+1} + x_i}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

where  $x_i$  is disease severity in measurement  $i$  or initial measurement,  $t_i$  is the time in days at measurement  $i$ , and  $n$  is the total number of observations

For the first variable, the percentage of affected leaf area was calculated using the Elliot and Jenkins scale (1946), modified by Muiru *et al.* (2007), with weekly visual observations. For the second variable, the value was calculated with the formula of Toley and Grau (1984) and the evaluations extended up to the beginning of senescence of the leaf of the main ear.

#### Evaluation of yield and other variables

Data on masculine flowering was recorded in the field when 50 % of the plants had released pollen. Data on feminine flowering was taken when 50 % of the plants had exposed the stigma at least 3 cm. Plant height was recorded in cm from the stem base to the node of spike insertion and at ear height in cm from stem base to the node of insertion of upper insertion. In addition, the percentage of grain per plot was calculated, the quotient of the weight of a sample of 5 ears without cob and the weight of a sample of 5 ears with cob, multiplied by 100. Other variables recorded were ear length in cm, number of rows per ear and grains per row. Grain yield (RG) per plot was calculated with the formula:

$$\text{Yield} = (\text{P.C.} * \% \text{ M.S.} * \% \text{ G} * \text{F.C.}) / 8600$$

where PC is the field weight of all the ears harvested from each plot expressed in kg; % MS is the percentage of dry matter of the grain sample from five ears; %G is the percentage of grain; FC is the factor of conversion to obtain yield per hectare, obtained by dividing 10 000 m<sup>2</sup> by useful plot size in m<sup>2</sup> (4 m<sup>2</sup>); 8600 is a constant for estimating yield with commercial moisture of 14%.

granos por hilera. El rendimiento de grano (RG) por parcela se calculó con la fórmula:

$$\text{Rendimiento} = (\text{P.C.} * \% \text{ M.S.} * \% \text{ G} * \text{F.C.}) / 8600$$

donde PC es el peso de campo del total de las mazorcas cosechadas de cada parcela expresado en kg; % MS es el porcentaje de materia seca de la muestra de grano de 5 mazorcas; % G es el porcentaje de grano; FC es el factor de conversión para obtener rendimiento por hectárea que se obtiene al dividir 10 000 m<sup>2</sup> entre el tamaño de la parcela útil en m<sup>2</sup> (4 m<sup>2</sup>); 8600 es una constante para estimar el rendimiento con una humedad comercial del 14 %.

El análisis estadístico de los datos se efectuó en forma combinada calculando las interacciones. Para identificar el efecto del ambiente, los efectos de la interacción repeticiones x ambiente se combinaron con el efecto de repeticiones para integrar el error usado para cotejar la hipótesis. El análisis estadístico se hizo con SAS/STAT® versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el rendimiento de grano (REND), el análisis de varianza combinado detectó significancia ( $p \leq 0.01$ ) entre ambientes, entre tratamientos de inoculación y entre genotipos. La interacción tratamientos\*ambiente fue no significativa, pero hubo alta significancia ( $p \leq 0.01$ ) en las interacciones genotipos\*ambiente y genotipos\*tratamientos. Estos resultados indican que en cada ambiente y en cada tratamiento de inoculación el valor promedio del rendimiento fue diferente. Además, cada material genético tuvo *per se* una diferente expresión genética promedio del rendimiento al considerar los ambientes y tratamientos de evaluación en conjunto, lo cual indica diferencias genéticas intrínsecas entre los genotipos y, por tanto, la posibilidad de identificar los mejores, pues el rendimiento de grano se usó para evaluar la capacidad productiva de los híbridos evaluados. La no significancia de la interacción tratamientos\*ambiente indica que el valor del rendimiento en cada tratamiento de inoculación fue consistente a través de los ambientes de prueba, mientras que lo contrario ocurrió para esta variable en las interacciones significativas genotipos\*ambiente y genotipos\*tratamientos.

Entre genotipos hubo alta significancia para el área bajo la curva del progreso de la enfermedad

Statistical analysis of the data was performed in combined form calculating interactions. To identify effect of the environment, the effects of interaction replications x environment was combined with the effect of replications to integrate the error used to compare with the hypothesis. The statistical analyses were carried out with SAS/STAT® version 9.0 (SAS Institute, 2002).

## RESULTS AND DISCUSSION

For grain yield (REND), the combined analysis of variance detected significance ( $p \leq 0.01$ ) among environments, between inoculation treatments and among genotypes. The interaction treatments\*environment was not significant, but significance ( $p \leq 0.01$ ) was high in the interactions genotypes\*environment and genotype\*treatments. These results indicate that in each environment and each inoculation treatment the average value of yield was different. Moreover, each genetic material had *per se* a different average genetic expression of yield when considering environments and evaluation treatments in conjunction, indicating intrinsic genetic differences among the genotypes and, therefore, the possibility of identifying the best genotypes since grain yield is used to evaluate productive capacity of evaluated hybrids. Non-significance of the interaction treatments\*environment indicates that the value of yield in each inoculation treatment was consistent across test environments, while the opposite occurred for this variable in the significant interactions genotype\*environment and genotype\*treatments.

Among genotypes there was high significance for area under the curve of advance of the disease (ABCPE), final severity (SF), masculine flowering (FM) feminine flowering (FF), plant height (AP), and ear height (AM). Among environments there were differences only for FM, FF, AP and AM, but between inoculation treatments there was significance for only ABCPE and SF. The interaction treatments\*environment was not significant, but genotypes\*environment and genotype\*treatments were significant for all the variables except FM and FF in the second. This indicates that, like yield, the genotypes also had different genetic expression for other agronomic variables across environments and treatments of the evaluation (Table 1).

The coefficients of variation were of acceptable magnitude (less than 20 %), with values of 3.3 % to 15 %. This means that there was adequate control of

(ABCPE), severidad final (SF), floración masculina (FM), floración femenina (FF), altura de planta (AP) y altura de mazorca (AM). Entre ambientes solo hubo diferencias para FM, FF, AP, y AM, pero entre tratamientos de inoculación solo para ABCPE y SF. La interacción tratamientos\*ambiente no fue significativa, pero genotipos\*ambiente y genotipos\*tratamiento sí lo fueron para todas las variables, excepto para FM y FF en la segunda. Esto indica que al igual que para rendimiento, los genotipos también tuvieron diferente expresión genética para otras variables agronómicas a través de los ambientes y tratamientos de evaluación (Cuadro 1).

Los coeficientes de variación fueron de magnitud aceptable (menos de 20 %), con valores de 3.3 % a 15 %. Esto significa que hubo un control adecuado de la variación experimental y que los datos obtenidos para las variables de esta investigación son confiables (Cuadro 1).

### Obtención de aislamientos e identificación molecular de *Exserohilum turcicum*

A partir de hojas con síntomas de tizón norteño del maíz, recolectadas en parcelas de maíz de las localidades de Texcoco y Cuautitlán, se obtuvieron 20 aislamientos de *E. turcicum*. El análisis de las secuencias de ADN obtenidas indicó que los aislamientos coincidieron con

experimental variation and that the data obtained for the variables of this investigation are reliable (Table 1).

### Isolation and molecular identification of *Exserohilum turcicum*

Twenty isolates of *E. turcicum* were obtained from maize leaves with northern blight symptoms collected in plots in Texcoco and Cuautitlán. The analysis of DNA sequences obtained indicated that the isolates coincided with three accessions from the NCBI GenBank, 11 coinciding with accession HF934950 and two with accession KU729034, both reported in the USA, while seven coincided with accession KT223346 from Canada. Comparison of the sequences of the isolates with those of the GenBank resulted in 100 % identity of all the isolates, assuring that the isolated pathogen was *E. turcicum*.

Use of molecular tools, such as rDNA sequencing of the leaf isolates in our study, allowed greater precision in the identification of the pathogen. Before the existence of these tools, identification and characterization of fungal agents were based only on morphological features (Martin and Rygeiwicz, 2005). Isolation and sequencing assured that the causal agent inoculated was *E. turcicum* (northern maize blight); this would have been doubtful if

**Cuadro 1. Cuadros medios del análisis de varianza combinado para siete variables de 15 híbridos de maíz androestéiles y fértiles evaluados con y sin inoculación de tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) en Valles Altos. Ciclo primavera-verano 2016.**

**Table 1. Mean squares of the combined analysis of variance for seven variables of 15 androsterile and fertile maize hybrids evaluated with and without inoculation of leaf blight (*Exserohilum turcicum*) in the High Valleys. Spring-summer 2016 crop cycle.**

FV	GL	REND (kg ha <sup>-1</sup> )	ABCPE (u)	SF (%)	FM (d)	FF (d)	AP (cm)	AM (cm)
A	2	307 242 581.0**	20 398.8	25.3	196.00**	236.70**	69 553.0**	3616.0**
R/A	6	996 514.0	20 542.2	20.1	14.28	14.00	186.6	18.6
TRA	1	7 563 399.0**	3 365 450.2**	2586.7**	12.10	11.40	245.1	41.3
GEN	19	107 174 892.0**	260 778.5**	163.7**	128.50**	140.20**	3533.0**	930.8**
TRA*A	2	1 359 532.0	1085.8	3.6	12.80	16.00	273.4	12.7
GEN*A	38	5 495 553.0**	41 519.1**	23.7**	25.50**	27.40**	516.6**	160.4*
GEN*TRA	19	3 371 383.0**	70 893.5**	35.4**	7.91	8.75	209.5*	188.7*
CV		12.4	10.8	15.0	3.30	3.40	4.6	9.1

\*p≤0.05, \*\*p≤0.01. A: ambientes; R: repeticiones; TRA: tratamientos de inoculación; GEN: genotipos; CV: coeficiente de variación; GL: grados de libertad; REND: rendimiento; ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad; SF: severidad final; FM: floración masculina; FF: floración femenina, AP: altura de planta, AM: altura de mazorca; u: unidades; d: días; m: metros. ♦ \*p≤0.05, \*\*p≤0.01. A: environments; R: replications; TRA: inoculation; GEN: genotypes; CV: coefficient of variation; GL: degrees of freedom; REND: yield; ABCPE: area under the disease progression curve; SF: final severity; FM: masculine flowering; FF: feminine flowering, AP: plant height, AM: ear height; u: units; d: days; m: meters.

tres accesiones del GenBank del NCBI, 11 con la accesión HF934950 y dos con la accesión KU729034, ambas reportadas en EUA, mientras que siete coincidieron con la accesión KT223346 de Canadá. El porcentaje de identidad obtenido al hacer las comparaciones de las secuencias de los aislamientos con las secuencias de GenBank fue 100 % en todas, por lo que se aseguró que el patógeno aislado e identificado fue *E. turcicum*.

El uso de las herramientas moleculares como la secuenciación del rDNA de aislamientos foliares en esta investigación, permitió una mayor precisión en la identificación del patógeno. Antes, la identificación y caracterización de agentes fúngicos solamente se basaba en rasgos morfológicos (Martin y Rygielwicz, 2005). El aislamiento y la secuenciación permitieron tener la seguridad de que al momento de inocular el agente causal éste era *E. turcicum* (tizón norteño del maíz), situación que hubiese sido dudosa si se hubiera usado solo métodos morfológicos para la identificación.

**Evaluación de la resistencia a tizón foliar**

La comparación de medias entre ambientes no detectó diferencias para las variables ABCPE y SF, por lo que sus promedios se ubicaron en un mismo grupo (Cuadro 2). El valor numérico mayor de ABCPE se presentó en la localidad CEVAMEX 1 (1242 u), seguido por FESC (1229 u) y CEVAMEX 2 (1216 u). Para la severidad final, el mayor valor promedio de daño se presentó en el ambiente de la FESC (23 %). Al respecto, es importante mencionar que el clima en

we had used only morphological methods for its identification.

**Evaluation of resistance to leaf blight**

Comparison of environment means did not detect differences for the variables ABCPE or SF, and so their averages were placed in the same group (Table 2). The highest numerical value of ABCPE was found in CEVAMEX 1 (1242 u), followed by FESC (1229 u) and CEVAMEX 2 (1216 u). For final severity, the highest average value of damage occurred in the FESC environment (23 %). In this respect, it is important to mention that the climate in these locations of the High Valleys is similar in precipitation, temperature and relative humidity, so that the accumulated value of the area under the curve was not determinant for evaluation and comparison of the resistance of the genotypes to northern blight; rather it served as a reference to detect with certainty the natural presence and incidence of the disease in the genotypes. Moreover, the magnitude of the variables ABCPE and SF depend on the presence of the pathogen and its pathogenicity, tolerance or susceptibility of the host genotype, and the environmental conditions present at the moment of pathogen-genotype coincidence. In this regard, artificial inoculation was carried out in the same way in all environments; thus, environmental conditions and the amount of inoculum present on each planting date were very similar. This may explain why there were no differences among the environments evaluated for ABCPE and SF.

**Cuadro 2. Comparación de medias de ambientes para siete variables de 15 híbridos de maíz evaluados con inoculación y sin inoculación de tizón foliar (*Exserohilum turcicum*). Ciclo primavera-verano 2016.**

**Table 2. Comparison of means of environments for seven variables of 15 maize hybrids evaluated, with inoculation and without inoculation of leaf blight (*Exserohilum turcicum*). 2016 spring-summer crop cycle.**

Ambiente	REND (kg ha <sup>-1</sup> )	ABCPE (u)	SF (%)	FM (d)	FF (d)	AP (cm)	AM (cm)
FESC	9573 a	1229 a	23.00 a	78.00 b	80.00 a	219.00 c	106.00 c
CEVAMEX 1	7923 b	1242 a	22.00 a	79.00 a	80.00 a	267.00 a	117.00 a
CEVAMEX 2	6374 c	1216 a	22.00 a	77.00 c	78.00 b	243.00 b	113.00 b
DSH (0.05)	301	40	1.01	0.78	0.81	3.40	3.10

Medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). DSH: diferencia honesta significativa; REND: rendimiento; ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad; SF: severidad final; FM: floración masculina; FF: floración femenina; AP: altura de planta; AM: altura de mazorca. ♦ Means with different letters in a column are statistically different (Tukey, p≤0.05). DSH: honest significant difference; REND: yield; ABCPE: area under the disease progression curve; SF: final severity; FM: masculine flowering; FF: feminine flowering; AP: plant height; AM: ear height.

estas localidades de Valles Altos es similar en precipitación, temperatura y humedad relativa, por lo que el valor acumulado del área bajo la curva no fue una determinante para evaluar y comparar la resistencia de los genotipos al tizón norteño; más bien sirvió como referente para detectar con seguridad la presencia e incidencia natural de la enfermedad en los genotipos. Además, la magnitud de las variables ABCPE y SF depende de la presencia del patógeno y su patogenicidad, la tolerancia o susceptibilidad del genotipo hospedante, y las condiciones ambientales presentes al momento de la coincidencia patógeno-genotipo. En relación con esto último, la inoculación artificial realizada en cada ambiente fue de igual manera, por lo que las condiciones ambientales y la cantidad de inóculo presentes en cada fecha de siembra fueron muy similares, lo cual también podría explicar por qué no hubo diferencias entre ambientes evaluados para ABCPE y SF.

En cuanto a la incidencia de tizón foliar entre genotipos (Cuadro 3), los valores más elevados de severidad final y ABCPE los mostró el genotipo experimental H3 F, pues el daño de lámina foliar presentó en promedio 27 % de severidad final y un ABCPE de 1439 u, y fue estadísticamente diferente a los demás genotipos, seguido por H-50 con 25 % y 1324 u, respectivamente. Los materiales que presentaron menor ABCPE fueron Cimarrón (F), Aspros 823 (F), y P3368W F, aunque en este grupo también se ubicaron los híbridos experimentales H1 (F) y Tsiri Puma (F).

Para severidad final de la enfermedad (Cuadro 3), los materiales con mayor daño fueron H3 (F), H3 (AE), H2 (F) y H-50 (F), mientras que los de menor daño fueron H1 (F), Tsiri Puma (F), Cimarrón (F), Aspros 823 (F) y P3368W (F). Al respecto, es necesaria otra evaluación de los materiales a través del tiempo para confirmar los niveles de resistencia e incidencia de la enfermedad, lo que aportaría más elementos para recomendar estos híbridos en cuanto a resistencia al tizón norteño para tener mayor certidumbre de elegirlos para siembra en los Valles Altos.

### Evaluación del rendimiento de grano

Los híbridos comerciales (fértiles) de empresas privadas tuvieron el rendimiento de grano (REND) más alto (Cuadro 3). Cimarrón fue el mejor híbrido (12835 kg ha<sup>-1</sup>), seguido por Aspros 823 (12156 kg ha<sup>-1</sup>) y P3368W (12090 kg ha<sup>-1</sup>). Es importante se-

Regarding leaf blight incidence among the genotypes (Table 3), the highest values of final severity and ABCPE were exhibited by the experimental genotype H3 F; final severity of damage to the leaf was on average 27 % and ABCPE was 1439 u. These values were statistically different from the other genotypes and were followed by those of H-50 with 25 % and 1324 u. The materials that had smaller ABCPE were Cimarrón (F), Aspros, 823 (F) and P3368W F, although the experimental hybrids H1 (F) and Tsiri Puma (F) were also placed in this group.

For final severity of the disease (Table 3), the materials exhibiting greatest damage were H3 (F), H3 (AE), H2 (F) and H-50 (F), while those with the least damage were H1 (F), Tsiri Puma (F), Cimarrón (F), Aspros 823 (F) and P3368W (F). In this respect, another evaluation of the materials is needed after some time to confirm the levels of resistance and incidence of the disease. This would contribute more elements to support recommendation of these hybrids in terms of resistance to northern blight by providing more certainty in their selection for planting in the High Valleys.

### Grain yield evaluation

Commercial hybrids (fertile) from private enterprise had the highest grain yield (REND) (Table 3). Cimarrón was the best hybrid (12835 kg ha<sup>-1</sup>), followed by Aspros 823 (12156 kg ha<sup>-1</sup>) and P3368W (12090 kg ha<sup>-1</sup>). It is important to mention that these materials are used by most of the growers in technified areas that have the capital to invest; a sack of hybrid seed in commercial establishments costs at least 3000 Mexican pesos, a very high price for growers with few resources, who are faced with the problem of having to buy the expensive hybrid seed they use or find available in the study region.

Of the experimental materials (Table 3), the genotypes in their fertile version had the highest yields, H3 F and H1 F with 10681 kg ha<sup>-1</sup> and 8238 kg ha<sup>-1</sup>, respectively, and both surpassed the general average of the experiment (7957 kg ha<sup>-1</sup>). In another group were placed both fertile (F) and androsterile (AE) hybrids, H1 AE (7611 kg ha<sup>-1</sup>), H2 AE (7230 kg ha<sup>-1</sup>) and H4 F (7177 kg ha<sup>-1</sup>), with yields that were higher than the regional average. This is beneficial since the maize materials generated by the UNAM and INIFAP are of good grain yield and are produced

**Cuadro 3. Comparación de medias entre híbridos de maíz para tres variables evaluadas, a través de tres ambientes distintos. Ciclo primavera-verano 2016.**
**Table 3. Comparison of means of hybrid maize for three variables evaluated, across three different environments. 2016 spring-summer crop cycle.**

Genotipo	AE/F	REND (kg ha <sup>-1</sup> )	ABCP (u)	SF (%)
Cimarrón	F	12835.0 a <sup>†</sup>	1037 g	18 g
Aspros 823	F	12156.0 a	1037 g	18 g
P3368W	F	12091.0 a	1035 g	18 g
H3 F	F	10681.0 b	1439 a	27 a
Tsiri Puma	F	8248.0 cd	1061 fg	18 fg
H1	F	8238.0 cd	1179 eg	21 eg
H1	AE	7611.0 ce	1234 ce	22 ce
H2	AE	7230.0 de	1223 de	22 ce
H4	F	7177.0 de	1236 ce	23 be
H4	AE	6951.0 ef	1219 df	23 be
H2	F	6638.0 eg	1401 ab	25 ad
H5	F	6624.0 eg	1279 be	24 ae
H-50	F	6556.0 eg	1324 ae	25 ad
H5	AE	5758.0 gh	1236 ce	23 be
H3	AE	4830.0 h	1385 ac	26 ab
DSH		1180.7	158.15	3.98

<sup>†</sup>Medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: diferencia significativa honesta; F: fértil; AE: androestéril; REND: rendimiento; ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad; SF: severidad final. ♦

<sup>\*</sup>Means with different letters in a column are statistically different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). DSH: honest significant difference; F: fertile; AE: androsterile; REND: yield; ABCPE: area under the disease progression curve; SF: final severity.

ñalar que estos materiales son utilizados en su mayoría por productores de áreas tecnificadas que tienen capital para invertir, puesto que un saco de semilla híbrida de casas comerciales cuesta por lo menos 3000 pesos mexicanos, la cual es una cantidad muy elevada para productores de menos recursos, es decir, para quienes enfrentan la problemática de tener que comprar cara la semilla de los híbridos que utilizan o se encuentran disponibles en la región de estudio.

Con respecto a los materiales experimentales (Cuadro 3), los genotipos en su versión fértil tuvieron los mejores rendimientos, H3 F y H1 F fueron los más rendidores con 10681 kg ha<sup>-1</sup> y 8238 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente, y ambos superaron el promedio general del experimento (7957 kg ha<sup>-1</sup>). En otro grupo se ubicaron tanto híbridos de fertilidad normal (F) y androestériles (AE), como H1 AE (7611 kg ha<sup>-1</sup>), H2 AE (7230 kg ha<sup>-1</sup>) y H4 F (7177 kg ha<sup>-1</sup>), con rendimientos superiores al promedio de la región, lo que es benéfico, pues los materiales de maíz generados por la UNAM e INIFAP son de buenos rendimientos de grano y se producen por pequeñas empresas semilleras que ofertan semillas a precios más económicos que las empresas transnacionales, lo

by small seed enterprises that offer seed at lower prices than transnational companies. Thus, growers can acquire improved seed with desirable genetic, physiological and phytosanitary characteristics at a good price that permits supplying maize-derived products, such as grain, masa and tortillas, locally and contribute to the region's food self-sufficiency.

The hybrid H-50 is recommended for the High Valleys (Espinosa *et al.*, 2003b) and has been cultivated for more than 19 years in the region. For this reason, the results of our study can contribute to generating alternative materials that growers can use to substitute this genotype. The best experimental hybrids included in our study may be options for producers of grain and seed.

The results in grain yield, at least in these genotypes, indicate that this yield did not depend so much on whether the genotype version was fertile or androsterile, nor that resistance to the disease is regulated. Rather, both characteristics result from genotypic, environmental, and pathogenicity factors, and the interactions among them. It should be underlined that these experimental materials are also isogenic, and the only difference between their

cual beneficia a los agricultores quienes adquieren semilla mejorada a buen precio y con características genéticas, fisiológicas y fitosanitarias deseables, que permiten ofertar derivados del maíz como grano, masa y tortilla a nivel local y contribuir a la soberanía alimentaria de la región.

El híbrido H-50 es recomendado para los Valles Altos (Espinosa *et al.*, 2003b) y se cultiva por más de 19 años en la región, por lo que los resultados obtenidos en nuestro estudio orientan acerca de generar materiales alternativos para sustituir este genotipo por los productores de maíz, así como por los productores de semilla. Los mejores híbridos experimentales de nuestro estudio podrían ser una alternativa de oferta para los productores de grano y semilla.

Los resultados del rendimiento de grano, al menos en estos genotipos, indican que este rendimiento no dependió tanto de la versión fértil o androestéril del genotipo, y que tampoco la resistencia a la enfermedad está regulada; más bien, ambas características resultan de los factores genotipo, ambiente, patogenicidad y las interacciones entre ellos. Cabe destacar que estos materiales experimentales también son isogénicos, y la única diferencia entre sus versiones es la presencia o no de la androesterilidad (Espinosa *et al.*, 2009; Tadeo *et al.*, 2010), lo que puede contribuir también a que los rendimientos sean estadísticamente similares entre ellos.

Entre tratamientos de inoculación se observó que el T1 (con inoculación) tuvo el valor mayor para ABCPE y SF con respecto al tratamiento T2 (sin inoculación) (Cuadro 4). El T1 permitió asegurar la presencia del patógeno en los genotipos evaluados; sin embargo, los valores de SF observados fueron bajos (de 20 % a 40 %) comparados con los observados en estudios de Carson (2006) con rangos de 54 a 85 % y Nwanosike *et al.* (2015) de 33 a 62 %. En las parcelas no inoculadas (T2), el porcentaje de infección fue de 15 a 25 %, lo cual dificultó la selección de materiales con diferente grado de resistencia. Puede decirse que la severidad del tizón foliar fue significativamente mayor en aquellas parcelas inoculadas artificialmente, al causar 40 % de daño y con menor rendimiento de grano promedio, mientras que las parcelas no inoculadas tuvieron daño de hasta 25 %, pero rindieron más en promedio (Cuadro 4). El bajo porcentaje de severidad final observado en los genotipos de maíz, puede deberse a la cantidad de inóculo aplicada (Rajeshwar *et al.*, 2013) y a los diferentes grados de resistencia de los genotipos.

versions is the presence or absence of androsterility (Espinosa *et al.*, 2009; Tadeo *et al.*, 2010), which can also contribute to their statistically similar yields.

Of the inoculation treatments, T1 (with inoculation) had the higher value for ABCPE and SF, relative to treatment T2 (without inoculation) (Table 4). T1 assured that the pathogen was present in all the evaluated genotypes; however, the SF values observed were low (20 % to 40 %) compared with those observed in the studies of Carson (2006) with a range of 54 to 85 % and of Nwanosike *et al.* (2015) of 33 to 62 %. In uninoculated plots (T2), the percentage of infection was 15 to 25 %, making selection of materials with different degrees of resistance difficult. Severity of leaf blight was significantly greater in the plots inoculated artificially, in which damage was 40 %, and average grain yield was lower, while in uninoculated plots there was damage of up to 25 %, but average yield was higher (Table 4). The low percentage of final severity observed in the maize genotypes may be due to the amount of inoculum applied (Rajeshwar *et al.*, 2013) and to the different degrees of resistance of the genotypes.

The environmental conditions existing at the moment of pathogen-genotype coincidence were not ideal (18 - 27 °C and moderate to high relative humidity) and values were similar in the different environments, temperature 11 - 25 °C and relative humidity (36 - 97 %) (Figure 1). These conditions probably did not permit adequate development of the pathogen since low temperatures and relative humidity reduce *E. turcicum* infection.

The low incidence of blight on both inoculated and uninoculated plants may also be explained because the pathogen still does not have an important presence in the High Valleys of Mexico, especially in Texcoco and Cuautitlán, although in recent crop cycles some local plots have seen notable presence, and in future cycles it could represent a phytosanitary problem in the region. In the state of Puebla since 2014, leaf blight has been the third most serious phytosanitary problem for which the state committee of plant health has been concerned, particularly in the rural development districts of the municipalities of Teziutlán and Libres where incidence of northern blight begins to be a problem in maize crops (CESAVEP, 2016).

**Cuadro 4. Comparación de medias entre tratamientos de inoculación para siete variables de 15 híbridos de maíz evaluados en tres ambientes de Valles Altos. Ciclo primavera-verano 2016.**
**Table 4. Comparison of means of inoculation treatments for seven variables of 15 maize hybrids evaluated in three environments of the High Valleys. 2016 spring-summer crop cycle.**

	REND (kg ha <sup>-1</sup> )	ABCPE (u)	SF (%)	FM (d)	FF (d)	AP (cm)	AM (cm)
T1	7812 b	1326 a	25 a	78 a	79 a	244 a	112 a
T2	8102 a	1132 b	20 b	78 a	79 a	243 a	111 a
DSH	205.36	27.50	0.69	0.53	0.55	2.30	2.10

Medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). T1: tratamiento con inoculación, T2: tratamiento sin inoculación, DSH: diferencia significativa honesta, REND: rendimiento, ABCPE: área bajo la curva del progreso de la enfermedad, SF: severidad final, FM: floración masculina, FF: floración femenina, AP: altura de planta, AM: altura de mazorca. ♦ Means with different letters in a column are statistically different (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). T1: treatment with inoculation, T2: treatment without inoculation, DSH: honest significant difference, REND: yield, ABCPE: area under the disease progression, SF: final severity, FM: masculine flowering, FF: feminine flowering, AP: plant height, AM: ear height.

Las condiciones ambientales presentes al momento de la coincidencia patógeno-genotipo no fueron las idóneas: 18 - 27 °C y humedad relativa de moderada a alta, con valores similares de temperatura (11 - 25 °C) y humedad relativa (36 - 97 %) (Figura 1), lo cual probablemente no permitió el desarrollo adecuado del patógeno, porque la presencia de temperaturas mínimas y humedad relativa baja reducen la infección de *E. turcicum*.

La baja incidencia de tizón, tanto en plantas inoculadas y no inoculadas, también puede explicarse porque no se presentaron las condiciones ambientales más idóneas para el patógeno, como temperaturas y humedad relativa, para que hubiese mayor presencia de la enfermedad, y también a que el patógeno aún no se presenta de manera importante en los Valles Altos de México, especialmente en las localidades de Texcoco y Cuautitlán, aunque en los ciclos agrícolas recientes en algunas parcelas locales su presencia ha sido más notoria, y en ciclos posteriores podría representar un problema fitosanitario en la zona, como en el estado de Puebla, en el cual desde el 2014 el tizón foliar es el tercer problema fitosanitario que preocupa al Comité Estatal de Sanidad Vegetal, en especial en los distritos de desarrollo rural de los municipios de Teziutlán y Libres, donde la incidencia del tizón norteño comienza a ser un problema en el cultivo de maíz (CESAVEP, 2016).

La incidencia de tizón norteño no está limitada a Valles Altos o altitudes similares. Orduño *et al.* (2015) reportaron que durante el ciclo agrícola 2013-2014 en el norte de Sinaloa, aumentó el número de predios de maíz afectados por el tizón; además,

Northern blight is not restricted to the High Valleys or similar altitudes. Orduño *et al.* (2015) reported that during the 2013-2014 crop cycle in northern Sinaloa the number of maize fields affected by the blight increased. Moreover, the disease increased in areas near the Sinaloa coast. In Córdoba, Argentina, *E. turcicum* increases and each year it has different degrees of severity because the conditions are favorable for the pathogen, such as temperatures between 18 and 25 °C and relative humidity above 50 % occur during the stage of vegetative growth (Sartori *et al.*, 2017).

Nwanosike *et al.* (2015) showed that an increase in maximum temperatures and a decrease in minimum temperatures and relative humidity reduce infection in maize by *E. turcicum*. However, a decrease in maximum temperatures and an increase in minimum temperatures and relative humidity favor infection by northern leaf blight. The blight on maize is favored by maximum temperatures of 24.1 to 24.9 °C, minimum temperatures of 13.7 to 15.9 °C, relative humidity of 67 to 85.6 % and precipitation of 325.3 to 679.2 mm during the growth stages.

Incidence and severity of northern blight are reported in areas of high altitude and humid climates, that is, cool climates, high relative humidity, intermediate altitudes and cloudy climate (Harlapur *et al.*, 2000; Ogliari *et al.*, 2005; Levic *et al.*, 2008). In the High Valleys, maize (seed or grain) is produced with irrigation or favorable rainfed conditions where there are periods of high relative humidity and cool temperatures (15 to 25 °C). These conditions are important for the development of northern blight

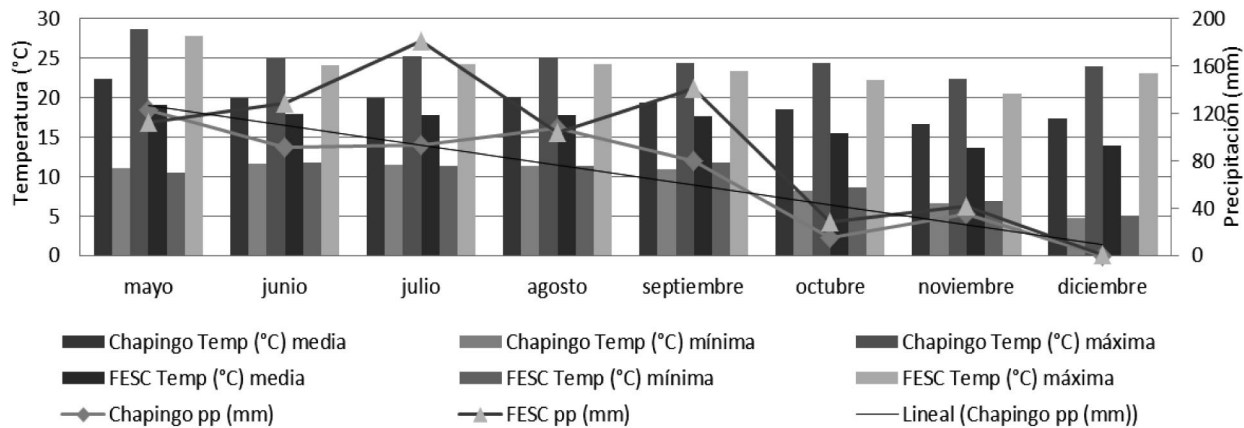


Figura 1. Temperatura mínima y máxima (°C) y precipitación (mm) mensuales en los ambientes donde se evaluó la incidencia de tizón foliar (*E. Turcicum*.) en el ciclo primavera-verano 2016.

Figure 1. Monthly minimum and maximum temperatures (°C) and precipitation (mm) in environments where leaf blight (*E. Turcicum*.) incidence was evaluated in the 2016 spring-summer crop cycle.

la enfermedad aumentó en zonas cercanas a las costas de dicha zona. En Córdoba, Argentina, *E. turcicum* aumenta y cada año tiene diferentes grados de severidad porque las condiciones favorables para el patógeno, como temperaturas entre 18 y 25 °C y humedad relativa mayor a 50 %, se presentan durante las etapas de crecimiento vegetativo del maíz (Sartori *et al.*, 2017).

Nwanosike *et al.* (2015) mostraron que el aumento de las temperaturas máximas y la disminución de temperaturas mínimas y humedad relativa, reducen la infección del maíz por *E. turcicum*. Sin embargo, la disminución de temperaturas máximas y el incremento de temperaturas mínimas y la humedad relativa favorecen la infección del tizón norteño de la hoja, pero el tizón es favorecido por temperaturas máximas de 24.1 a 24.9 °C, temperaturas mínimas de 13.7 a 15.9 °C, humedad relativa de 67 a 85.6 % y precipitación de 325.3 a 679.2 mm durante la etapa de crecimiento del maíz.

La incidencia y severidad de tizón norteño están reportadas en tierras altas y áreas con climas húmedos, esto es, climas frescos, alta humedad relativa, altitudes medias y condiciones de clima nublado (Harlapur *et al.*, 2000; Ogliari *et al.*, 2005; Levic *et al.*, 2008). En los Valles Altos, la producción de maíz (semilla o grano) se hace en tierras con riego o temporal favorable, donde hay periodos de alta humedad relativa y temperaturas frescas (15 a 25 °C); dichas

(Levy and Pataky, 1992; White, 2004), and so special attention should be given to this disease (Weems and Bradley, 2017).

### CONCLUSIONS

Androsterility in the maize genotypes evaluated was not associated with the disease northern leaf blight; the androfertile and androsterile versions were equally resistant or susceptible to *Exserohilum turcicum*. Grain yield of the fertile version of the hybrids, relative to that of their androsterile version, indicates that more research is required to sustain the hypothesis that because they are isogenic materials, they would produce similar yield.

—End of the English version—

-----\*

condiciones son importantes para el desarrollo del tizón norteño (Levy y Pataky, 1992; White, 2004), por lo que debe prestarse especial atención a esta enfermedad (Weems y Bradley, 2017).

## CONCLUSIONES

La androesterilidad en los genotipos de maíz evaluados no estuvo asociada con la enfermedad del tizón norteño de la hoja, debido a que en sus versiones androfértiles o androestériles resultaron igualmente resistentes o susceptibles a *Exserohilum turcicum*. El rendimiento de grano en los híbridos en su versión fértil respecto al producido por su versión androestéril, señala que se requieren más investigaciones que sustenten esta hipótesis, porque al ser materiales isogénicos se esperaría un rendimiento similar.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio es parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT: IT201618, UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, km 2.5. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. CP. 54714. AP. 25. Tel. 01 55 56231971.

## LITERATURA CITADA

- Airy J. M., L. A. Tatum, y J. W. Sorenson. 1978. La Producción de Semillas, Producción de Semilla Híbrida de Maíz y Sorgo para Grano. Anuario Estadístico de Semillas. Antonio Marino y Pánfilo Rodríguez (trad). Cuarta edición. Editorial CECSA. México. pp: 274-285.
- Balint, K. P. J., J. Yang, E. G. Van, J. Jung, and E. M. Smith. 2010. Use of a maize advanced intercross line for mapping of QTL for Northern Leaf Blight Resistance and multiple disease resistance. *Crop Sci.* 50: 458-466.
- Carson, M. 2006. Response of a maize synthetic to selection for component resistance to *Exserohilum turcicum*. *Plant Dis.* 7: 910-914.
- CESAVEP (Comité de Sanidad Vegetal del Estado de Puebla). 2016. Sanidad Vegetal. Campañas y Programas. Manejo Fitosanitario del maíz. Disponible en: [http://www.cesavep.org/campanias/MFM/mfm\\_int.html](http://www.cesavep.org/campanias/MFM/mfm_int.html) (Consulta: junio 2017).
- De León C. 1984. Enfermedades del Maíz: Una Guía para su Identificación en el Campo. CIMMYT. México, D. F. 114 p.
- Ding, J., F. Ali, G. Chen, H. Li, G. Mahuku, N. Yang, L. Narro, C. Magorokosho, D. Makumbi, and J. Yan. 2015. Genome-wide association mapping reveals novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. *BMC Plant Biol.* 15:1-11.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Elliot, C., and M. Jenkins. 1946. *Helminthosporium turcicum* leaf blight of corn. *Phytopathology* 36: 661-666.
- Espinosa C. A., M. Sierra, y N. Gómez. 2003a. Producción y tecnología de semillas mejoradas de maíz por el INIFAP en el escenario sin la PRONASE. *Agron. Mesoam.* 14: 117-121.
- Espinosa C. A., M. Tadeo R., J. Lothrop, S. Azpíroz R., C. Tut C., y Y. Salinas M. 2003b. H-50, híbrido de maíz de temporal para los Valles Altos de México (2200 a 2600 msnm). *Agric. Téc. Méx.* 29: 89-92.
- Espinosa C. A., M. Tadeo R., M. Sierra M., A. Turrent F., R. Valdivia B., y B. Zamudio G. 2009. Rendimiento de híbridos de maíz bajo diferentes combinaciones de semilla androestéril y fértil en México. *Agron. Mesoam.* 20: 211-216.
- Grogan, C. O., C. A. Francis, and A. P. Sarvella. 1971. Influence of cytoplasmic male sterility on dry matter accumulation in maize. *Crop Sci.* 5: 365-367.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc. Ac. Symp. Series* 41: 95-98.
- Harlapur, S. I., M. C. Wali, K. H. Anahosur, and S. Muralikrishna. 2000. A report on survey and surveillance of maize diseases in northern Karnataka. *Karnataka J. Agric. Sci.* 13: 750-751.
- Harlapur, S. I., M. S. Kulkarni, H. Yeshoda, and S. Kulkarni. 2007. Variability in *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard and Suggs, causal agent of leaf blight of maize. *Karnataka J. Agric. Sci.* 20: 665-666.
- Hooker, A. 1977. A second major gene locus in corn clorticle-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Sci.* 17: 132-135.
- Leonard, K. J., Y. Levy, and D. R. Smith. 1989. Proposed nomenclature for pathogenic races of *Exserohilum turcicum* on corn. *Plant Dis.* 73: 776-777.
- Levy, Y., and J. Pataky. 1992. Epidemiology of northern leaf blight on sweet corn. *Phytoparasitica* 20: 53-66.
- Levic, J., S. Stankovic, and T. Petrovic. 2008. The determination of *Exserohilum turcicum* virulence factors in Serbia. *Genetics.* 40: 271-281.
- Martin, K. J., and T. Rygielwicz. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 5: 28.
- Muiru, W. M., E. W. Mutitu, and J. W. Kimenju. 2007. Reaction of some Kenyan maize genotypes to *Exserohilum turcicum* leaf blight under greenhouse and field conditions. *Plant Sci.* 8: 1190-1196.
- Nwanosike, M. R., R. B. Mabagala, and P. M. Kusolwa. 2015. Disease intensity and distribution of *Exserohilum turcicum* incitant of northern leaf blight of maize in Tanzania. *Int. J. Pure Appl. Biosci.* 5:1-13.
- Ogliari, J. B., M. A. Guimaraes, and I. O. Geraldi. 2005. New resistance genes in the *Zea mays-Exserohilum turcicum* pathosystem. *Genet. Mol. Biol.* 28: 435-439.
- Orduño C. F. J., M. A. Montiel G, G. Herrera R, A. G. Ruíz G, D. F. Espinoza C., y T. De Campo P. 2015. Distribución, incidencia, severidad y control del tizón foliar del maíz en el norte de Sinaloa. *Rev. Mex. Fitopatol.* 33: 64-65.
- Ortiz C. J., R. Ortega P, J. D. Molina G, M. Mendoza R, C. Mendoza C, F. Castillo G, A. Muñoz O., A. Turrent F, y T. A. Kato Y. 2007. Análisis de la Problemática de la Producción Nacional de Maíz y Propuesta de Acción. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas (COLPOS). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Chapingo, Estado de México. 29 p.

- Perkins, J. M., and W. L. Pedersen. 1987. Disease development and yield losses associated with northern leaf blight on corn. *Plant Dis.* 71: 940-943.
- Rajeshwar, T., P. Narayan, R. Ranga, and S. Sokka. 2013. Management of turcicum leaf blight of maize caused by *Exserohilum turcicum* in maize. *Int. J. Sci. Res. Pub.* 10 p.
- Raymundo, A. D., and A. L. Hooker. 1981. Measuring the relationship between northern corn leaf blight and yield losses. *Plant Dis.* 65: 325-327.
- Sartori M., A. Nesci, A. Formento, and M. Etcheverry. 2015. Selection of potential biological control of *Exserohilum turcicum* with epiphytic microorganisms from maize. *Rev. Arg. Microbiol.* 1: 62-71.
- Sartori M., A. Nesci, J. García, M. A. Passone, A. Montemarani, and M. Etcheverry. 2017. Efficacy of epiphytic bacteria to prevent northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* in maize. *Rev. Arg. Microbiol.* 1: 75-82.
- SAS, Institute. 2002. *Statistical Analysis System User's Guide*. SAS Institute. Cary. USA. 956 p.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Producción anual de cultivos año agrícola 2016 en México. <http://www.siap.gob.mx>. (Consulta: mayo 2017).
- Smith D.R., and D. G. White. 1988. Diseases of corn. *In: Corn and Corn Improvement*. Agronomy Series 18. 3rd Ed. (Sprague, C. F., and J. W. Dudley) ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI. USA. pp: 701-766.
- Tadeo R. M., A. Espinosa C., J. Serrano R., M. Sierra M., F. Caballero H, R. Valdivia B., N. Gómez M., A. Palafox C., F. A. Rodríguez M., y B. Zamudio G. 2010. Productividad de diferentes combinaciones de semilla androestéril y fértil en dos híbridos de maíz. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3: 273-287.
- Tadeo R. M., A. Espinosa C., J. J. García Z., R. Lobato O., N. Gómez M., M. Sierra M., y R. Valdivia B. 2015. Productividad de híbridos androestériles y fértiles de maíz en cuatro ambientes de evaluación. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6: 1857-1866.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Toley, P. W., and C. R. Grau. 1984. Field characterization of rate-reducing resistance to *Phytophthora magasperma* f. sp. Glycinea in soybean. *Phytopathology* 74: 1201-1208.
- Turrent, F. A. 2009. El potencial productivo del maíz. *Rev. Difus. Fac. Cienc. UNAM.* 92-93: 126-129.
- Virgen, V. J., R. Zepeda B, A. Ávila M, A. Espinosa C., J. L. Arellano, y J. Gámez A. 2014. Producción de semilla de líneas progenitoras de maíz: densidad de población e interacción. *Agron. Mesoam.* 25: 323-335.
- Weems, J., and C. Bradley. 2017. *Exserohilum turcicum* race population distribution in the North Central United States. [doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0128-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0128-RE)
- White G. D. 2004. *Plagas y Enfermedades del Maíz*. 3° Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid-Barcelona-México. 78 p.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comp. Biol.* 7: 203-214.