

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



Identificación y Variabilidad Genética de los Fitopatógenos Asociados a la Mancha de
Asfalto en el Cultivo de Maíz

Tesis

Que presenta ERIKA NATALIA RIOS HERRERA

como requisito parcial para obtener el Grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

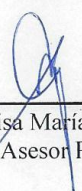
Saltillo, Coahuila

Junio 2016

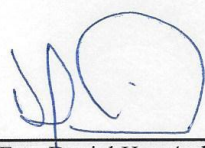
IDENTIFICACIÓN Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS FITOPATÓGENOS
ASOCIADOS A LA MANCHA DE ASFALTO EN EL CULTIVO DE MAÍZ

Tesis


Elaborada por ERIKA NATALIA RIOS HERRERA como requisito parcial para obtener
el grado de Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola con la supervisión y
aprobación del Comité de Asesoría



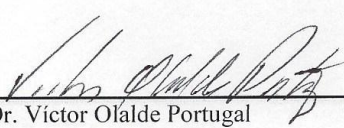
Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor Principal



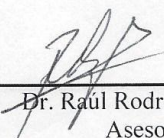
Dr. Fco. Daniel Hernández Castillo
Asesor



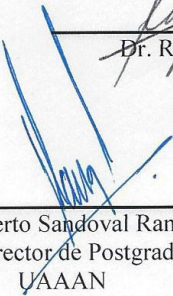
Dr. Alberto Flores Olivas
Asesor



Dr. Víctor Olalde Portugal
Asesor



Dr. Raúl Rodríguez Guerra
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado
UAAAN

Saltillo, Coahuila

Junio 2016

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo con la beca otorgada durante mis estudios en el programa de Doctor en Ciencias en Parasitología Agrícola.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y en particular al Departamento de Parasitología Agrícola por la formación académica, la experiencia y todos los apoyos otorgados en mi formación de Posgrado.

Agradezco en particular a todos los maestros del Departamento de Parasitología por los valiosos consejos en cada área y por los conocimientos brindados durante mi estancia en la universidad.

Principalmente un agradecimiento y reconocimiento a mi directora de Tesis, **Dra. Yisa María Ochoa Fuentes**, quien confió y apoyo desde el planteamiento inicial de proyecto. Por cada consejo, llamada de atención y por su amable amistad, por mostrar una gran calidad humana no solo en el aspecto académico, sino brindándome su amistad y apoyo incondicional en los momentos difíciles, tanto personales como académico.

Un agradecimiento especial a mi comité de asesorías. Quienes contribuyeron en todo momento y con la mejor disposición siempre, para llegar a la culminación de este proyecto. Al **Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo**, por su orientación, apoyo y consejos en cada etapa de la investigación. Al **Dr. Alberto Flores Olivas**, quien con la mejor disposición mostro siempre sabios consejos y apoyo en todo momento hasta la terminación del proyecto, así como en el aspecto académico durante la impartición de cursos, que fortalecieron el conocimiento personal en el área de diagnóstico, y por su amistad sincera. Al **Dr. Víctor Olalde Portugal**, quien amablemente contribuyó a la realización de dos estancias nacionales en el CINVESTAV unidad Irapuato, donde se llevo a cabo gran parte del proyecto de investigación, también por su asesoramiento académico y su disposición cordial, para la realización y culminación de este proyecto. Al **Dr. Raúl Rodríguez Guerra** quien no solo contribuyo en el panorama académico con sus sabios consejos, también por su amable disponibilidad y amistad.

Mi especial agradecimiento también a la **Dra. Laila P. Partida Martínez** por el enorme apoyo a este proyecto, por su pronta respuesta, por su disposición y consejos acertados en cada momento. Además por su valiosa amistad y convivencia durante mi estancia en el laboratorio de interacciones microbianas (LIM) del CINVESTAV unidad Irapuato. Muchas gracias.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio LIM en CINVESTAV, por su amable apoyo y sobre todo por la amistad sincera brindada. Me llevo grandes compañeros y amigos.

Gracia a Nely, Jorge, Susy, Citlali, Cristabel, Damaris, Chio, Paco, Gustavo, Luis, Carmen, Mariana, Ismael, Octavio, Don Tomas, Alicia. Y a todos quienes de alguna forma me brindaron su amistad, apoyo y conocimientos.

Mi agradecimiento de todo corazón a mi familia, mis abuelos Camila Estrada Sanchez y Ramón Herrera Monsibais, quienes han formado parte de mi vida y mi corazón y de quienes siempre recibí palabras de aliento a pesar de la enfermedad o la distancia, y a quienes llevo siempre en mi corazón. A mis padres Natalia Herrera Estrada y Alfredo Rios Rios por apoyarme y estar conmigo en los momentos felices y difíciles de mi vida y quienes gracias a ellos formaron la persona que ahora soy. A mi hermano Lenin Alfredo Rios Herrera por ser una luz de alegría en mi vida y contar con su apoyo cuando se requirió. A todos mis Tíos y primos por hacerme parte de una familia tan unida y comprometida, y por darme palabras de aliento en todo momento.

Al M.C. Epifanio Castro un especial agradecimiento por todo el apoyo durante mi doctorado, por compartir tantas experiencias y por su comprensión en los momentos difíciles. Gracias por el tiempo brindado, que es lo más valioso que se puede dar a una persona, así como todo el cariño y paciencia en el trabajo como en la vida diaria. Gracias por los momentos buenos y malos, que formaron cada experiencia y en muchas ocasiones me sacaron a flote de diferentes situaciones.

Desde mi corazón, un profundo agradecimiento a mis hermanos de vida, Juan Antonio Cedillo, Berenice Schaper, Alan Garcia, Sandy Barraza, Any Cante, Angelica Arredondo, Tomas Medina, Aby Amaro, Eduardo Salas, Cristela Carrera, Rodrigo, Saulito, Bety Treviño. Y a mi maestro y amigo Juan Manuel Molina. Quienes en diferentes momentos de mi vida o a todo lo largo de mi carrera formaron parte importante y me escucharon o me dieron un buen consejo a tiempo. Ellos quienes han sabido complementar mi vida y llenar los momentos felices y tristes a lo largo de lo que hemos caminado juntos, quienes en muchos momentos en los últimos siete años han llenado mi vida en todos los aspectos, les agradezco cada momento, cada lágrima y cada sonrisa a su lado y los llevo en mi corazón.

A todos mis compañeros y amigos del posgrado, con quienes compartí los cursos, y por el apoyo durante los trabajos de investigación realizados, jornadas de evaluación científica, en las bienvenidas de posgrado que compartimos, congresos, y principalmente por su amistad.

Agradezco al personal de posgrado y académico del Departamento de Parasitología Agrícola por el apoyo brindado, a **Ceci, Teresita, Juanita Almanza, Juanita Alvizo, Erika, Zulema, Cony, Lupita, Dr. Sandoval y Dr. Luis Lauro**; gracias por la atención y por su valioso apoyo.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a

Primeramente a la memoria de mi gran amigo y hermano de vida Juan Antonio Cedillo Martinez, quien me permitió compartirtantos momentos felices en sus últimos años de vida. Por ser esa fuerza que me levantó en tanto momentos difíciles. Por compartirme sonrisas, y crearla cuando no la había. Por llenar nuestra casa de tantos recuerdos y momento inolvidables. Dedico este trabajo porque fue mi comparo en las buenas y en las malas, supo ser el amigo leal, el hermamo protector, el consejo, el regaño, el pilar en las dificultades, la compañía diaria. Mereceria mucho mas que unas simples palabras escritas, porque su valor como persona fue inmenso. Dicen que hay persona que pasa por el tren de tu vida, otras se queda y otras se van, pero el es de las que marcan y dejan profunda huella, en particular en mi. Dedico esta Tesis a el en particular por ser nuestro plan de vida juntos el terminar nuestros posgrados y graduarnos juntos. Dedico este trabajo, porque como te dije “ahora va por ti”, y hemos cumplido esta meta juntos. Gracias por ser de esas personas que marcan la vida, por ser un hermano y por ser de esos amigos que se cuentan con los dedos de una sola mano, “TE AMO HERMANO” y espero que desde el cielo me acompañes siempre, porque yo a cada momento te extraño y no te olvido.

Tambien dedico esta tesis a toda mi familia y en particular a mi Abuelito Ramon, por ser tan valiente y vecer el cáncer, por ser tan fuerte y no rendirse cuando todos desfallecemos, por ser las manos fuerte de campo que nos alimenta y que ahora con los años y llena de arrugas nos da un cariño suave y lleno de aliento. Y a mi abuelita Camila por seguir en su lucha contra el Alzheimer's, que aunque olvide muchas cosas cotidiana, cada visita a su casa sigue recordándome como su hija consentida y que salio a buscar nuevas oportunidades, preguntando tantas veces lo mismo, y sobre que he he visto en tros lugares, queriendo conocer a través de mis ojos lo que ella no puede ver. Gracias a toda mi familia por su enorme apoyo los amo y los llevo conmigo a donde voy siempre.

“Insistir, Persistir, Resistir y nunca
Desistir para seguir adelante”
(María Luz, 2014)

Índice de contenido

	Pag
Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria.....	v
Índice de cuadros.....	ix
Índice de figuras.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiv
Introducción.....	1
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis.....	4
 REVISION DE LITERATURA	
1. El maíz y su importancia.	5
1.1. Principales Enfermedades del maíz en trópicos.	5
1.2. Las Enfermedades más Difundidas	7
1.2.1. Pudrición de la semilla y enfermedades de las plántulas	8
1.2.2. Pudrición de las raíces.....	8
1.2.3. Pudrición del tallo.....	9
1.2.4. Pudriciones del tallo después de la floración.....	10
1.2.5. Enfermedades foliares.....	11
1.2.6. Enfermedades de la inflorescencia.....	14
1.2.7. Pudrición de la mazorca.....	22
1.2.8. Mohos del almacenamiento.....	23
1.2.9. Enfermedades Regionales.....	27
1.2.10. Otras Enfermedades Causadas por Virus.....	28
1.2.11. Striga.....	32
2. Mancha de Asfalto en maíz (Tar spot).....	32
2.1. Manchas de asfalto – patosistema.....	33
2.2. Biología y ecología de Complejo Mancha de Asfalto.....	33
2.3. Fisiología y fenología.....	36
2.4. Asociaciones.....	36
2.5. Distribución del Complejo Mancha de Asfalto.....	36
2.6. Control del Complejo Mancha de Asfalto (CMA).....	38
2.6.1 Control cultural y medidas sanitarias.....	38
2.6.2 Control biológico.....	38
2.6.3. El control químico.....	39
3. Mecanismos de variabilidad en Hongos.....	39
4. DGGE.....	39
4.1 Definición y origen de la técnica.....	41
4.2 Fundamentos teóricos.....	42
4.3 Aspectos técnicos.....	43
4.4. Introducción de la grapa GC.....	44
4.5. Optimización de condiciones durante la electroforesis.....	44
LITERATURA CITADA	46

CARTA DE ACEPTACIÓN ARTÍCULO 1	59
First Report on the Presence of <i>Phyllachora</i> sp. in Corn Crops at Toluca, Estado de Mexico	60
Abstract.....	60
Key words.....	60
Introduction.....	61
Materials and Methods.....	63
Results and Discussions	68
Conclusion.....	71
Acknowledgements.....	72
References.....	72
 CARTA DE ACEPTACIÓN ARTÍCULO 2	 75
Hongos Asociados a la Mancha de Asfalto en el Cultivo de Maíz en México	76
Resumen.....	76
Introducción.....	77
Materiales y Métodos.....	79
Resultados y Discusiones.....	83
Conclusiones.....	91
Agradecimientos.....	91
Literatura citada.....	92

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Cuadro 1. Clasificación taxonómica del Maíz	5
Cuadro 2.	Cuadro 2. Clasificación taxonómica del <i>Phyllachora maydis</i>	34
Cuadro 3.	Cuadro 3. Clasificación taxonómica del <i>Monographella maydis</i> ...	35
Cuadro 4.	Clasificación taxonómica del <i>Coniothyrium phyllachorae</i>	35

Índice de figuras

Figura 1.	Distribución Geográfica CMA (Datos proporcionados SIAP, INIFAP y SAGARPA).....	38
Figura 2.	Desnaturalización de la molécula de ADN con urea y formamida. La urea y la formamida interactúan directamente con las bases nitrogenadas, compitiendo con la formación de puentes de hidrogeno entre bases complementarias, con lo que impiden un apareamiento correcto entre ellas a temperaturas a las que normalmente estarían apareadas.....	43
Figura 3.	Patrones de bandas generados por la DGGE de 40% al 60% gel del 6%, 50V 58°C 18Hrs. Huella molecular obtenida por DGGE a partir del análisis cepas de hongos conocidas e identificadas molecularmente para la creación de un marcador de referencia, para el estudio de la estructura de comunidades microbianas del CMA. Fotografía tomada de BioRad 1999.	44
Figura 4.	Electroforesis perpendicular en gel de gradientes desnaturalizantes (DGGE) de 0 al 100%. Perpendicular a la dirección de la electroforesis.....	45

Resumen

IDENTIFICACIÓN Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE LOS FITOPATÓGENOS
ASOCIADOS A LA MANCHA DE ASFALTO EN EL CULTIVO DE MAÍZ

POR

ERIKA NATALIA RIOS HERRERA

DOCTOR EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. YISA MARIA OCHOA FUENTES - ASESOR –

Saltillo, Coahuila

Junio 2016

El maíz uno de los cultivos más importantes en México, en el ámbito social y económico, siendo la región subtropical uno de los ambiente con mayor afectación de enfermedades, tanto de hongos como de bacterias, virus y plagas. Los estados de Chiapas, Guerrero, Veracruz y Jalisco, representan un poco mas del 30% de la producción de grano a nivel Nacional. Los primeros tres estados antes mencionados se encuentran comprendidos en la región subtropical, en donde se ha reportado en los últimos cinco años al complejo mancha de asfalto (CMA), el cual se convertido en un problema importante en la producción del maíz y su rendimiento. Durante los ciclos agrícolas otoño-invierno 2013, se presentaron síntomas severos de tizones foliares en lotes experimentales de maíz, sembrados el estados de Chiapas en el municipio de Villa Flores. El estado de Veracruz en dos localidades, Chalma Chapopote e Ixhuatlan de Madero, presentaron en cultivos locales las sintomatología CMA durante el ciclo otoño-invierno 2015 y 2014 respectivamente. De igual forma en el ciclo de siembra otoño-invierno 2014, fueron localizados y muestrados cultivos de maíz presentando manchas negras brillantes características de CMA en el Estado de México, Toluca. Así mismo Guerrero, en los municipios de Buenavista, Chilpancingo y Chichihualco, Chichihualco en el ciclo de otoño del 2014. Los objetivos de este estudio fueron identificar los hongos fitopatógenos asociados de los tizones foliares denominada mancha de asfalto en maíz. Se realizó un muestreo dirigido de los cuatro estados mencionados. La determinación de los asociados de las enfermedades se realizó mediante un análisis morfológico por medio de claves y se corroboró la identidad de los mismo por medios de la región intergenica ITS. El producto de la amplificación fue analizado por medio de electroforesis en geles de gradientes desnaturalizantes (DGGE) para la identificación de microbiotas de distintos nichos ecológico. La bandas separadas fueron clonadas y secuenciadas corroborando en la base de datos del NCBI su identidad. En el estado de Chiapas se encontró a *Phyllachora maydis*, y *Fusarium* sp. Así como primer reporte de la asociación a esta sintomatología, de *Curvularia* sp. en México. En el estado de Guerrero sumado a los fitopatógenos anteriores se identificó *Trichothecium*. En Veracruz y el Estado de México se identifico plenamente por técnicas convencionales y moleculares y presencia de *Phyllachora maydis*, el principal hongo causante de la lesiones estromaticas negras brillantes características del CMA. Generandose el primer reporte de esta enfermedad en el Estado

de México, a pesar de las condiciones ambientales de la región, las cuales difieren de lo reportado al momento en las zonas donde se presentó la enfermedad, que afectó la producción de cultivos de maíz en zonas subtropicales. La importancia de la enfermedad mancha de asfalto en zonas semitropicales del país es alta, donde las condiciones climáticas favorecen su aparición; en condiciones de severidad alta los cultivos pueden atizarse por completo en un periodo de ocho días y provocar pérdidas económicas.

Palabras clave: Manchas de asfalto, *Phyllachora maydis*, ITS, DGGE-PCR.

Abstract

IDENTIFICATION AND GENETIC VARIABILITY OF ASSOCIATE
PHYTOPATHOGENIC TO ASPHALT MANCHA CORN CROP

BY

ERIKA NATALIA RIOS HERRERA

DOCTOR IN SCIENCES
AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. YISA MARIA OCHOA FUENTES - ADVISER –

Saltillo, Coahuila

June 2016

Maize one of the most important crops in Mexico, in the social and economic sphere, with the subtropical region one of the most affected environment of diseases, both fungi and bacteria, viruses and pests. The states of Chiapas, Guerrero, Veracruz and Jalisco, represent a little more than 30% of grain production at a national level. The first three aforementioned states are included in the subtropical region, which has been reported in the last five years the complex tar spot (CMA), which has become a major problem in maize production and performance. Agricultural cycles during autumn-winter 2013, severe symptoms of leaf blights occurred in experimental plots of corn planted the state of Chiapas in the municipality of Villa Flores. The state of Veracruz in two locations, Chalma Chapopote and Ixhuatlan Madero, local crops presented in the CMA symptoms during the fall-winter 2015 and 2014 respectively cycle. Similarly in the planting cycle autumn-winter 2014, they were located and corn crops muestrados shiny black spots presenting characteristics of CMA in the State of Mexico, Toluca. Likewise Guerrero, in the municipalities of Buenavista, Chilpancingo and Chichihualco, Chichihualco cycle autumn 2014. The objectives of this study fue—ron identify fungal pathogens associated leaf blights called tar spot in corn. directed sampling of these four states was performed. The determination of associated diseases was performed using a morphological analysis by key and the identity of the same was confirmed by means of the intergenic region STI. The amplification product was analizadado by denaturing gel electrophoresis gradients (DGGE) for identifying different ecological niches microbiota of. The separated bands were cloned and sequenced corroborating in the NCBI database identity. In the state of Chiapas she was found *Phyllachora maydis*, and *Fusarium* sp. And first report of the association of these symptoms, *Curvularia* sp. in Mexico. In the state of Guerrero added to the above phytopathogenic *Trichothecium* identified. In Veracruz and the State of Mexico is fully identified by conventional and molecular techniques and presence of *Phyllachora maydis*, the main fungus causing the shiny black stromal lesions characteristic of the CMA. Generating the first report of this disease in the State of Mexico, despite the environmental conditions of the region, which differ from those reported at the time in the areas where they presented the disease, which affected the production of maize crops in areas subtropical. The importance of tar spot disease in semitropical areas of the country

is high, where climatic conditions favor its appearance; under high severity crops can atizonarse completely over a period of eight days and cause economic losses.

Keywords: asphalt stains, Phyllachora maydis, ITS, DGGE-PCR.

Google Translate for Business:Translator Toolkit

INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cultivos más importantes en el mundo, al igual que el arroz y el trigo, proporciona al menos 30 % de las calorías de los alimentos a más de 4,5 mil millones de personas en 94 países (Shiferaw *et al.*, 2011). Hasta el 2012 en el mundo se cosecharon 913 millones de toneladas. Estados Unidos ocupa el primer lugar entre los productores de maíz, seguidos por China y Brasil, mientras que México ocupó el cuarto lugar mundial en producción (FAO, 2013). El maíz es también un ingrediente clave en la alimentación animal y se utiliza ampliamente en productos industriales, incluyendo la producción de biocombustibles. El maíz (*Zea mays* L.) es la base en la alimentación de más de cien millones de mexicanos, sembrándose anualmente más de 2 000 000 ha.

La variabilidad climática y el cambio, aumenta el estrés abiótico y biótico, generando problemas en los cultivos (Shiferaw *et al.*, 2011) como plagas y enfermedades, principalmente causadas por hongos, virus y bacterias. La humedad y temperatura favorecen el desarrollo de tizones foliares, como sucede con la mancha de asfalto, que ocurre con mayor severidad en áreas con alta humedad relativa, localizadas entre 1300 y 2300 m (Hock *et al.*, 1989). La mancha de asfalto del maíz es importante en el trópico de México por su impacto en el rendimiento; el follaje puede ser atizonado en menos de ocho días, debido a coalescencia de lesiones inducidas por los distintos hongos y atribuido a la producción de una toxina. Factores adicionales que favorecen la enfermedad son: alta humedad en el ambiente (10 a 20 días nublados en el mes), niveles altos de fertilización nitrogenada, dos ciclos de maíz por año, genotipos susceptibles, baja luminosidad, edad de alta vulnerabilidad del hospedante, virulencia de los patógenos involucrados (Hock *et al.*, 1989).

La mancha de asfalto (Tar spot) es causada por la interacción de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*. Así mismo *Coniothyrium phyllachorae*, un micoparásito que se encuentra asociado a *P. maydis*, que siempre aparece por primera vez causando la mancha de asfalto. *M. maydis* es responsable del daño "ojo de pez", este se asocia con la mancha necrótica en el centro de la lesión. Este complejo fue descrito por primera vez en 1904 en el maíz mexicano. Este se ha encontrado en Bolivia, Colombia, Costa Rica, República Dominicana, Guatemala, Panamá, Perú, Puerto Rico y Venezuela. También se sabe que

se ha presentado en el Ecuador, El Salvador y Haití (Hock J. *et al.*, 1992). Entre 1985 y 1988 muestreos realizados en México, revelaron alta incidencia y severos daños al maíz en Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca y Chiapas, que afectaron aproximadamente 500 000 ha del cultivo y provocaron pérdidas hasta de 50 % en infecciones previas a la floración (Hock *et al.*, 1989). De 2001 a 2005, aproximadamente 40 % de 3100 ha de maíz establecidas en el valle de Mochitlán, Guerrero, fueron afectadas por la enfermedad con pérdidas severas en el rendimiento de grano; en 2005, se reportó pérdida total en 600 ha en el municipio de Tixtla, Guerrero, y para 2007, la enfermedad se presentó en más de 10 municipios de Guerrero (González *et al.*, 2008). Se han detectado los agentes causales de la mancha de asfalto en el Valle de Mochitlán y otros municipios del Estado de Guerrero, México, los cuales fueron: *Phyllachora maydis* Maubl., *Monographella maydis* Müller & Samuels y *Coniothyrium phyllachorae* Maubl, en donde la enfermedad causó pérdidas del 55.1 % de la producción en 81 híbridos y 25 variedades de polinización libre de maíz evaluadas (Pereyda-Hernández, 2009).

Para evaluar la biodiversidad de los hongos es necesario hacer primero su identificación de especie. En los últimos años el desarrollo de las herramientas moleculares ha permitido conocer la estructura, dinámica y variabilidad genética de la población fúngica en su hábitat. La más útil para el estudio de las comunidades ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) que permite identificar los microorganismos (Gardes *et al.*, 1991; Bruns y Gardes, 1993; Henrion *et al.*, 1992). Los procedimientos basados en PCR, ya sean reacciones simples o complejas (anidadas), abarcan un vasto número de protocolos; entre los más empleados están: a) Las regiones hipervariables del rDNA (IGS o espacio intergénico, e ITS o espacio transcrito interno); b) Los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) de los productos de la PCR; c) La amplificación de las secuencias cortas repetidas (microsatélites); y d) La obtención al azar del DNA polimórfico (Rodríguez, 2004). Sin embargo y aun con todas estas herramientas los patógenos asociados a la mancha de asfalto, no han sido debidamente descrito a nivel molecular, siendo así, que aún no se cuenta con la secuencia del genoma, publicado en el Gen Banck del principal patógeno de este complejo *Phyllachora maydis*, así como otros hongos asociados.

El uso de técnicas como los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP's), polimorfismos del DNA amplificados al azar (RAPD's), polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP's), o polimorfismos en la longitud de cromosomas (CLP), se han usado para establecer la variabilidad genética de muchos patógenos (Flores *et al.*, 1997). Un aspecto fundamental de la biodiversidad es la variación genética de las poblaciones y las especies (Piñero, D., et al. 2008). Los hongos pueden utilizar varios mecanismos para generar variabilidad genética. Estos se convierten en una ventaja para ellos, por lo que garantiza la sobrevivencia de su progenie, ante cualquier eventual cambio. Por lo tanto, la diversidad se convierte en un seguro que le va a permitir adaptarse a las nuevas condiciones. En los hongos fitopatógenos, la generación de nuevas variantes se convierte en un factor esencial de sobrevivencia, especialmente en los hongos parásitos obligados, los cuales ante un cambio genético en su hospedero, necesitan adaptarse con rapidez, para evitar su extinción. Entre la información codificada en el ADN, está la patogenicidad de estos organismos y alrededor de ella, gira el trabajo de los fitopatólogos y los fitomejoradores, tratando de reducir el impacto de las enfermedades en la producción.

Los mecanismos por medio de los cuales se genera variabilidad genética en los hongos son: recombinación, mutación, herencia citoplasmática, heterocariosi, parasexualismo y heteroploidia (Rivera. 2007). Por lo que los hongos asociados al complejo de asfalto presentan: recombinación, y herencia citoplasmática

Por todo lo anterior y debido a que el complejo mancha de asfalto, se encuentra ampliamente distribuido, afectando no solo México, sino centro América y parte de Sudamérica. Incluyendo países con altas producciones de maíz como es el caso de Brasil que ocupa el tercer lugar a nivel mundial con un 6 por ciento, por encima de México según datos de la FAO 2008. De igual manera sintomatologías semejantes se presentan en países como Guatemala, Venezuela, y Nicaragua, donde estudios realizados por el INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria) han encontrado hasta cinco patógenos asociados a la enfermedad. Por lo cual, se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivo general

- Identificar los patógenos involucrados en el complejo mancha de asfalto. Así mismo la severidad y su variabilidad.

Objetivos específicos

1. Determinar la severidad del CMA en cada uno de los sitios.
2. Identificación Morfológica de los patógenos involucrados en la enfermedad Mancha de asfalto.
3. Identificación Molecular por medio de ITS's y secuenciación de las clonas generadas.
4. Determinar el número de organismos involucrados en la sintomatología de CMA, así como su proporción en el hospedero, y su variabilidad a nivel secuencia genética ITS entre los sitios de muestreo.

Hipótesis

- Se encontrará a *Phyllachora maydis*, *Monographella*, asociados al CMA.
- Existirán diferentes grados de severidad del CMA dependiendo de los seis sitios de muestreo.
- Presentará variabilidad por lo menos el patógeno asociado al CMA, *Phyllachora maydis*.
- Se encontrarán más de dos organismos involucrados en la sintomatología CMA, existiendo variabilidad de los mismos entre los sitios.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. El maíz y su importancia.

El maíz, *Zea mays* L., es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen. Pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género. Otras especies del género *Zea*, comúnmente llamadas teosinte y las especies del género *Tripsacum* conocidas como arrocillo o maicillo son formas salvajes parientes de *Zea mays*. Son clasificadas como del *Nuevo Mundo* porque su centro de origen está en América (FAO 2016). En un primer momento, los taxónomos clasificaron los géneros *Zea* y *Euchlaena* al cual pertenecía el teosinte como dos géneros separados. Actualmente, en base a la compatibilidad para la hibridación entre esos grupos de plantas y a estudios citogenéticos, es generalmente aceptado que ambas pertenecen al género *Zea* (Reeves y Mangelsdorf, 1942). El teosinte y el *Tripsacum* son ambos importantes como posibles fuentes de características deseables para el mejoramiento del maíz. El *Tripsacum* no tiene un valor económico directo mientras que el teosinte tiene algún valor como fuente de forraje.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del Maíz

Maíz	
Reino:	Plantae
Clase:	Liliopsida
Sub-clase:	Commelinidae
Orden:	Cyperales
Familia:	Poaceae/Gramineae
Tribu:	Maydeae
Género:	<i>Zea</i>
Especie:	<i>mays</i> L.

Zea mays es la única especie cultivada de las Maydeas de gran importancia económica. Es conocida con varios nombres comunes; el más usado dentro de los países anglófonos

es *maize*, excepto en los Estados Unidos de América y Canadá, donde se le denomina *corn*. En español es llamado *maíz*, en francés *maïs*, en portugués *milho* y en el subcontinente hindú es conocido como *makka* o *makki* (FAO 2016).

Hoy día el maíz es el segundo cultivo del mundo por su producción, después del trigo, mientras que el arroz ocupa el tercer lugar. Es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total. El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. La diversidad de los ambientes bajo los cuales es cultivado el maíz es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo. Habiéndose originado y evolucionado en la zona tropical como una planta de excelentes rendimientos. La mayor parte del maíz es cultivado a altitudes medias, pero se cultiva también por debajo del nivel del mar en las planicies del Caspio y hasta los 3 800 msnm en la cordillera de los Andes. Más aún, el cultivo continúa a expandirse a nuevas áreas y a nuevos ambientes (FAO 2016).

El maíz es clasificado en dos tipos distintos dependiendo de la latitud y del ambiente en el que se cultiva. El maíz cultivado en los ambientes más cálidos, entre la línea ecuatorial y los 30° de latitud sur y los 30° de latitud norte es conocido como maíz tropical, mientras que aquel que se cultiva en climas más fríos, más allá de los 34° de latitud sur y norte es llamado maíz de zona templada; los maíces subtropicales crecen entre las latitudes de 30° y 34° de ambos hemisferios. Esta es una descripción muy general ya que los maíces tropicales y templados no obedecen a límites regionales o latitudinales rígidos (FAO 2016). Globalmente, el maíz se cultiva en más de 140 millones de hectáreas (FAO, 1999) con una producción anual de más de 580 millones de toneladas métricas. El maíz tropical se cultiva en 66 países y es de importancia económica en 61 de ellos, cada uno de los cuales siembra más de 50 000 hectáreas con un total de cerca de 61,5 millones de hectáreas y una producción anual de 111 millones de toneladas métricas. El rendimiento medio del maíz en los trópicos es de 1 800 kg/ha comparado con una media mundial de más de 4 000 kg/ha. El rendimiento medio del maíz en las zonas templadas es de 7 000 kg/ha (CIMMYT, 1994). El cultivo del maíz en zona templada tiene, sin embargo, un ciclo mayor que la mayoría de los maíces tropicales. Por lo tanto, el rendimiento del maíz tropical, cuando se lo compara con el del maíz de zona templada, no es tan bajo; aun así,

la productividad del maíz en las zonas tropicales es menor que en las zonas templadas. Hay algunas excepciones donde la productividad del maíz tropical se compara favorablemente con el maíz en los ambientes templados, tal como el maíz cultivado en la época invernal en los trópicos.

El maíz tiene usos múltiples y variados. Es el único cereal que puede ser usado como alimento en distintas etapas del desarrollo de la planta. Las espigas jóvenes del maíz (maíz *baby*) cosechado antes de la floración de la planta es usado como hortaliza. Las mazorcas tiernas de maíz dulce son un manjar refinado que se consume de muchas formas. Las mazorcas verdes de maíz común también son usadas en gran escala, asadas o hervidas, o consumidas en el estado de pasta blanda en numerosos países. La planta de maíz, que está aún verde cuando se cosechan las mazorcas *baby* o las mazorcas verdes, proporciona un buen forraje (FAO 2016).

1. 1. Principales Enfermedades del maíz en trópicos.

El maíz en los ambientes tropicales es atacado por un gran número de patógenos que causan importantes daños económicos a su producción. La monografía de Wellman (1972) *Tropical American plant diseases* informa sobre 130 enfermedades que afectan al maíz en los trópicos, comparadas con 85 que ocurren en los ambientes templados.

El clima húmedo y cálido bajo el que crece gran parte del maíz en los trópicos es sin duda favorable al crecimiento y a la difusión de los patógenos causantes de las enfermedades. Sin embargo, el maíz se cultiva en una gran diversidad de ambientes en las zonas tropicales; por ejemplo, en las tierras altas el maíz se cultiva en áreas muy limitadas donde distintas razas de patógenos han coexistido con el maíz por muchos siglos.

Se han hecho progresos importantes en el desarrollo de formas de resistencia genética estable contra la mayoría de las enfermedades pero, sin embargo, grandes áreas de la zona tropical son aún sembradas con variedades locales, con variedades de los agricultores o con variedades sin mejorar. Esta es otra razón por la cual la situación de las enfermedades en el ambiente tropical parece ser más severa que en ambientes templados donde se siembran cultivares mejorados resistentes a las enfermedades.

Información detallada sobre las enfermedades del maíz es proporcionada por Wellman (1972), Ullstrup (1976, 1977, 1978), Renfro (1985) y Smith y White (1988). La Universidad de Illinois y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (Anónimo, 1973) publicaron el *Compendium of corn diseases* que comprende un relato ilustrado de los problemas patogénicos y no patogénicos que afectan al maíz. De León (1984) publicó una guía de campo ilustrada para la identificación de las enfermedades más importantes del maíz y menciona 44 enfermedades causadas por hongos, tres por bacterias, 10 por virus y una por "mollicutes".

Algunas enfermedades son universales y ocurren en casi todos los ambientes en que se cultiva el maíz; estas incluyen los tizones, las royas y las manchas de las hojas y del tallo y la pudrición de la panoja. Hay algunas enfermedades que son de importancia regional pero que pueden causar importantes pérdidas económicas, por ejemplo, los mildius lanuginosos en Asia que se están difundiendo a parte de África y de América, el virus estriado del maíz en el África subsahariana y el enanismo del maíz en México, América Central y América del Sur. La maleza parásita conocida como *Striga* también causa serias pérdidas en la producción de maíz en el África subsahariana.

En este capítulo se describen las enfermedades importantes que afectan al maíz en varias etapas de su crecimiento. Los síntomas y la epidemiología de las enfermedades se basan en descripciones dadas en Anónimo (1973) y De León (1984). Se describen primero las enfermedades que se encuentran en los ambientes tropicales y después las enfermedades de ocurrencia regional.

1. 2. Las Enfermedades más Difundidas

1. 2. 1. Pudrición de la semilla y enfermedades de las plántulas

Las semillas de maíz que están en el proceso de germinación pueden ser atacadas por algunos patógenos transportados por las semillas o por patógenos del suelo que pueden causar su pudrición antes de germinar o causar la pudrición de la plántula; esto es conocido como podredumbre del cuello de la raíz. Este no es un problema serio en la mayoría de los cultivos de maíz en las tierras bajas tropicales donde la temperatura al momento de la germinación es más bien alta y esta es en general rápida. La pudrición de la semilla y los tizones de las plántulas pueden ser un problema cuando la temperatura al momento de la

germinación es baja y/o los suelos están muy húmedos; sin embargo, tales condiciones no ocurren comúnmente en el verano en las zonas tropicales bajas, pero en el cultivo del maíz en invierno en zonas subtropicales pueden aparecer semillas y plantas en estado de pudrición. El maíz harinoso cultivado en las tierras altas y el maíz dulce son más vulnerables a esta enfermedad. Wellman (1972) opina que los agricultores en zonas tropicales no prestan atención, en general, al problema de la baja densidad de plantas a causa de estos tizones; la resiembra total de la parcela o en los lugares en que faltan muchas plantas es una práctica normal en los trópicos. A medida que la agricultura tropical se intensifica y se hace más competitiva, estas enfermedades y su control merecerán, evidentemente, más atención.

Los tizones son por lo general causados por especies del género *Pythium*, un hongo saprofito común en los suelos tropicales, a cuyo ataque puede escapar una plántula fuerte. El problema puede ser además fácilmente enfrentado sembrando semillas sanas tratadas con un fungicida orgánico en un suelo bien preparado que no esté húmedo y cuya temperatura sea superior a 10°C. La resistencia de las plántulas a las enfermedades puede ser una buena característica del germoplasma de las variedades de maíz que se siembran en invierno en las tierras altas.

La resistencia genética ha sido estudiada y parece ser compleja, involucrando varios genes; se ha informado de fuertes efectos maternos no citoplasmáticos (Renfro, 1985). La prueba del frío para la germinación de las semillas en papel enrollado puede ser usada para una preselección de germoplasma resistente a los tizones (Poehlman, 1987).

1. 2. 2. Pudrición de las raíces

La pudrición de las raíces ocurre en condiciones y ambientes similares a la pudrición de las semillas y a los tizones. La pudrición de las raíces es en general causada por hongos de los géneros *Fusarium* y *Pythium*. La raíz se debilita, se humedece y comienza a pudrirse; consecuentemente, el abastecimiento de alimentos a la planta se retarda y esta puede incluso volcarse. La pudrición puede entrar en las raíces principales y en los tejidos de la plántula y de la corona. En ese momento, otros hongos como *Diplodia maydis* y *Gibberella zeae* pueden entrar a la planta a través de las raíces dañadas y causar la pudrición del tallo. Krueger (1991) informó de una asociación positiva de la incidencia

de la pudrición de la raíz con la pudrición del tallo. La pudrición de la raíz puede ser controlada con las mismas precauciones usadas para la pudrición de la semilla y el tizón, buscando evitar todo tipo de daño a las raíces durante los trabajos de cultivación. Hay formas de resistencia genética a *Fusarium* a través de genes aditivos con efectos dominantes maternos.

1. 2. 3. Pudrición del tallo

La pudrición del tallo tiene importancia en casi todos los ambientes en que se cultiva el maíz. La enfermedad aparece después que se ha iniciado la fase de elongación de la planta y que los entrenudos comienzan a alargarse. Los patógenos de la pudrición del tallo son varios hongos y bacterias, muy a menudo en forma combinada. Los ataques se pueden producir en plantas jóvenes en estado de crecimiento activo antes de la floración o incluso después de ella. La enfermedad causa un secado prematuro de la planta, la rotura del tallo y la muerte de la planta y ocurre en todos los ambientes en que se cultiva el maíz: en climas fríos o cálidos, en tierras bajas, de media altitud o altas, en climas secos o húmedos. Sin embargo, es más importante en climas cálidos con temperaturas por encima de 30°C, alta humedad y altos niveles de fertilidad, buen crecimiento de las plantas y alta densidad del cultivo. Estas condiciones crean una excelente atmósfera para el crecimiento de hongos y bacterias.

Los primeros ataques de bacterias de la pudrición del tallo son causados por *Erwinia* spp. y *Pseudomonas* spp.. Estas bacterias atacan el maíz a mediados de la estación y se difunden rápidamente en la planta, la cual repentinamente cae. Los tallos se vuelven de color marrón, están húmedos, son blandos y delgados y se rompen fácilmente; la descomposición bacteriana produce un olor desagradable. Se ha informado que la resistencia genética a *Erwinia* se debe a dos genes dominantes con algunos efectos epistáticos.

El marchitamiento de Steward es causado por la bacteria *Xanthomonas stewartii*. El patógeno se transmite por la semilla y la infección ocurre en las primeras etapas del desarrollo de la planta; en las hojas se desarrollan lesiones acuosas donde entran los patógenos a través de lesiones hechas por insectos. Estas lesiones crecen y la hoja puede llegar a la necrosis total; el patógeno se difunde hacia el tallo y causa el marchitamiento

general de la planta. La planta muestra un crecimiento anormalmente débil y muere al florecer o inmediatamente después. El uso de semillas sanas y de variedades resistentes puede controlar completamente esta enfermedad. La resistencia es dominante y es gobernada por dos pares importantes de genes complementarios y otro gen secundario. Ullstrup (1977) informó que el olote de color rojo estaba asociado a genes de resistencia y el olote de color blanco a genes de susceptibilidad.

Una pudrición del tallo que aparece en etapas tempranas es causada por especies del género *Pythium*. Los síntomas son similares a la pudrición temprana del tallo causada por bacterias y afecta al primer nudo sobre la superficie de la tierra. El tallo se retuerce y la planta normalmente cae, permaneciendo verde mientras no se rompa el sistema vascular. La mayor parte del daño causado por *Pythium* aparece antes o en el momento de la emisión de la panoja. La resistencia a esta pudrición parece ser cuantitativa con efectos aditivos (Diwakar y Payak, 1975). El uso de germoplasma resistente y de un cultivo limpio es la mejor solución para el control de esta enfermedad.

1. 2. 4. Pudriciones del tallo después de la floración

Estas pudriciones aparecen en las últimas etapas del desarrollo de la planta y causan un daño importante desde el inicio del desarrollo del grano hasta su madurez fisiológica. Hay tres hongos principales que causan estas pudriciones: son especies de *Diplodia*, *Fusarium* y *Gibberella*. Además hay otras pudriciones importantes del tallo: el marchitamiento tardío es causado por varias especies del género *Cephalosporium*, la enfermedad de los haces vasculares negros es causada por *Cephalosporium acremonium* y la pudrición del carbón es causada por *Macrophomina phaseoli*.

La pudrición causada por *Diplodia maydis* aparece por lo general unas pocas semanas después de la floración femenina; las hojas se marchitan y toman un color gris verdoso. Los entrenudos bajos se vuelven de color marrón-pajizo y se hacen esponjosos; la médula se desintegra y se decolora y solo quedan intactos los haces vasculares. Los tallos se debilitan y se rompen fácilmente. Esta enfermedad aparece sobre todo en zonas húmedas y frías.

Otra pudrición del tallo es causada por *Gibberella zeae*; en este caso las hojas se vuelven opacas y de color gris verdoso, y los entrenudos bajos se hacen blandos y de color bronceado a marrón. La médula se desgarran y se vuelve rojiza en la zona afectada.

La pudrición causada por los hongos del género *Fusarium* comprende varias especies: *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*) y *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). La pudrición comienza enseguida después de la polinización y afecta las raíces, la base de la planta y los entrenudos bajos y la enfermedad progresa a medida que la planta madura; se rompen los tallos y ocurre una maduración prematura como en otras pudriciones. Las plantas pueden permanecer erectas aún cuando estén secas pero caerán fácilmente al ser golpeadas; como en la pudrición causada por *Gibberella* la médula se desgarran y los tejidos circundantes se decoloran.

El marchitamiento tardío es causado por *Cephalosporium maydis*. Los síntomas de la enfermedad aparecen en el momento de la floración cuando las hojas se comienzan a marchitar, por lo general primero aquellas en el extremo superior, las cuales se vuelven de un color marrón opaco e inmediatamente después se marchitan y mueren. Los haces vasculares se decoloran y la parte basal del tallo se seca, se contrae y se ahueca. A menudo también hay otros hongos implicados en este proceso y en este caso los síntomas en el tallo se modifican y son variables. La enfermedad se desarrolla en climas cálidos, en suelos secos y pesados pero también en suelos livianos y arenosos. Los patógenos son transmitidos por la semilla y por el suelo y la infección se inicia a través de las raíces o del mesocotilo. Esta es una seria enfermedad en Medio Oriente y sur de Asia, y es la enfermedad más importante del maíz en Egipto. Las variedades locales muestran en general buena resistencia al marchitamiento tardío y están siendo usadas con éxito para desarrollar híbridos resistentes y variedades mejoradas.

La enfermedad de los haces vasculares negros es causada por *Cephalosporium acremonium* y está más difundida que el marchitamiento tardío. La infección aparece cuando la mazorca está bien desarrollada y los granos están en estado pastoso a duros. Los haces vasculares se vuelven de color negro y esta coloración se extiende a través de varios entrenudos; las plantas presentan solo rudimentos de mazorcas con granos contraídos y mal desarrollados. El hongo es transmitido por la semilla y por el suelo y la infección ocurre por lo general a través de lesiones en la corteza y en los tejidos del tallo.

La pudrición carbonosa es causada por *Macrophomina phaseoli*. El hongo entra en las raíces al estado de plántula y algunas veces causa el tizón. Por lo general, el hongo crece a través de las capas exteriores del tallo y llega a los entrenudos bajos. Los síntomas aparecen en la planta cuando esta se acerca a la madurez y muestra una maduración prematura. Los tejidos del tallo muestran una decoloración negra y el desgarramiento de los haces del tejido vascular y el tallo aparece como chamuscado. Esta enfermedad ocurre en ambientes secos y cálidos, especialmente cuando hay estrés de agua y altas temperaturas.

Otros hongos que infectan las hojas de las plantas de maíz también pueden causar la pudrición del tallo. La pudrición antracnósica del tallo es causada por *Colletotrichum grami-nicola* que también es causa de la antracnosis de la hoja. Además de los nueve tipos de pudrición del tallo mencionados aquí, hay algunas formas secundarias que aparecen en las plantas de maíz en las zonas tropicales. Solamente dos de estas pudriciones tienen alguna importancia económica y son causadas por hongos de los géneros *Fusarium* y *Diplodia* (= *Stenocarpella*). Se ha informado que estas dos pudriciones causan pérdidas económicas en cerca del 27% del área de maíz en las tierras bajas tropicales y del 32% del área en las tierras altas subtropicales (CIMMYT, 1988).

El uso de variedades resistentes es la mejor forma de prevención y control de las pudriciones del tallo. De León y Pandey (1989) informaron acerca del mejoramiento del germoplasma tropical por selección recurrente para resistencia a la pudrición de los tallos y de la mazorca causadas por *Fusarium moniliforme*. Una fertilidad del suelo equilibrada con niveles no excesivamente altos de nitrógeno y un aumento de la dosis de potasio ayuda a su control; contrariamente, cualquier estrés durante el período de crecimiento aumenta la susceptibilidad de las plantas a las pudriciones del tallo (Dodd, 1980). Si se reducen los daños a las raíces, a la corteza y a los tallos, disminuyen las posibilidades de entrada de hongos a las plantas, las que se mantienen verdes, con una corteza gruesa y tallos robustos, con aparentemente menos infecciones y pérdidas debido a estas pudriciones (Zuber *et al.*, 1981).

Se ha informado también de varias fuentes de resistencia genética a estas enfermedades. Hay varios genes que participan en este proceso y la herencia parece ser cuantitativa. La

resistencia a la pudrición causada por *Diplodia* involucra la acción aditiva y dominante de varios genes y ocasionalmente la epistasis (Renfro, 1985). Draganic y Boric (1991) informaron que la resistencia a los patógenos de la pudrición es poligénica y si bien el desarrollo de híbridos resistentes es difícil, ha sido posible obtener varios híbridos de alto rendimiento con resistencia horizontal general. En cuanto al marchitamiento tardío, su resistencia es parcialmente dominante y controlada sobre todo por genes de acción de tipo aditivo mientras que los genes de acción de tipo no aditivo son de menor importancia (Khan y Paliwal, 1979, 1980). Shehata (1976) informó que los efectos de dominancia y de epistasis jugaban un papel importante en la herencia de la reacción a la enfermedad en el caso del marchitamiento tardío. El Itriby *et al.*, (1981) informaron que hay por lo menos tres genes importantes que participan en la resistencia al marchitamiento tardío y que la acción epistática de los genes era la más importante. La herencia y la acción de los genes para la resistencia a la pudrición del carbón y de los haces vasculares no son aún bien conocidas.

1. 2. 5. Enfermedades foliares

Las enfermedades foliares son las más visibles en la planta de maíz y, por lo tanto, a primera vista, son más alarmantes. Muchas enfermedades foliares avanzan desde las hojas inferiores hacia las superiores a medida que los azúcares son traslocados de las hojas a las mazorcas. Las enfermedades foliares de importancia global que se encuentran en el maíz en la zona tropical son los tizones, las manchas y las royas de las hojas. Todas estas enfermedades matan un importante área de la hoja y reducen de este modo la superficie fotosintetizadora. Por lo general, estas enfermedades no cubren toda la vida de la planta y esta no muere, continuando con su acción fotosintética en las partes de la hoja que permanecen verdes y libres de la enfermedad; sin embargo, la productividad de la planta se reduce. En el caso de los maíces forrajeros, el total de materia seca disminuye y la calidad del forraje es menor.

Tizones de las hojas

El tizón del Norte es causado por *Exserohilum turcicum* (= *Helminthosporium turcicum*). Este tizón ocurre comúnmente en los ambientes subtropicales y de altura más

frescos; es particularmente severo en los cultivares subtropicales donde el germoplasma de zona templada ha sido retrocruzado y no afecta severamente a los germoplasmas tropicales. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen como manchas ovaladas húmedas en las hojas de la parte baja, progresando después hacia las superiores. Estas manchas se unen unas con otras y crecen en forma alargada como lesiones necróticas de forma ahusada. En el caso de infecciones intensas las hojas pueden secarse completamente y morir prematuramente, sobre todo si las plantas han sido afectadas por la sequía. Se conocen razas hospedantes y razas fisiológicas del hongo específicas y se han encontrado fuentes de resistencia monogénicas y poligénicas que se han usado para desarrollar germoplasma resistente (Hooker, 1977; Ullstrup, 1977). La resistencia poligénica estable a este tizón ha sido desarrollada sobre materiales mejorados y parece ser efectiva contra todas las razas. Están involucrados muchos genes, unos de mayor importancia que otros; los genes para resistencia muestran una dominancia parcial y los genes con acción aditiva parecen ser más importantes que los efectos dominantes o epistáticos. Este tizón es considerado un problema solo cuando germoplasmas de zona templada y no adaptados se introducen en zonas tropicales.

El tizón del Sur es causado por el hongo *Bipolaris maydis* (= *Helminthosporium maydis*); afecta al maíz, al teosinte y al sorgo. Prevalece en ambientes cálidos y húmedos y afecta los cultivos de maíz en la temporada de verano, tanto en las tierras bajas tropicales como en las tierras altas; también afecta al maíz al final de la temporada de invierno cuando la temperatura comienza a aumentar. El tizón del Norte y este tizón pueden encontrarse afectando el cultivo de maíz en diferentes épocas de la misma estación. Se conocen tres razas de tizón del Sur que causan serios daños en los cultivos. Una es la raza "O", que prevalece y se difunde rápidamente en los trópicos; en las primeras etapas sus lesiones son pequeñas y en forma de diamante, posteriormente se elongan pero su crecimiento está limitado por las venas de las hojas. Las lesiones, sin embargo, permanecen pequeñas y rectangulares, aunque más adelante se unen y producen zonas largas secas o "quemadas" sobre la hoja. Las lesiones de la raza O se encuentran solo en las hojas. La raza "T" está asociada con el citoplasma T el que está a su vez involucrado con las líneas masculinas estériles *Tcm* (citoplasma macho estéril Texas). Sus lesiones por lo general son más grandes, ahusadas o elípticas, con halos cloróticos o amarillo verdosos.

La tercera raza es la “C”, fue identificada en 1987 en China y está estrechamente relacionada con la raza T. Las lesiones de las razas T y C, además de aparecer en las vainas de las hojas también se encuentran en las coberturas de las mazorcas y a veces en los tallos y en los olotes. Es difícil distinguir las razas O, T y C solamente por sus síntomas sobre las hojas cuando esta enfermedad se presenta en plantas de citoplasma normal (N). La raza T es particularmente virulenta en las variedades con citoplasma macho estéril Texas, donde ataca las hojas, los tallos y las mazorcas. La raza T llegó a causar gran preocupación en el año 1970 cuando la epidemia de tizón del Sur devastó los cultivos con ese tipo de citoplasma en los Estados Unidos de América. Mercado y Lantican (1961) habían informado anteriormente sobre la extrema susceptibilidad de los maíces con citoplasma macho estéril Texas cultivados en las Filipinas.

La resistencia a este tizón es controlada por el citoplasma y por genes del núcleo de herencia monogénica y poligénica. El uso de germoplasma y de citoplasma resistentes han reducido considerablemente las posibilidades de daño causado por este tizón. La resistencia monogénica y poligénica ha sido usada para el desarrollo de germoplasma resistente; se ha informado que son relativamente pocos los genes involucrados en la resistencia poligénica con efectos genéticos aditivos y dominantes (Ullstrup, 1977; 1978). El sistema de resistencia poligénica reduce el tamaño y el número de las lesiones. El sistema monogénico, con el gen *rhm* en estado homocigota da lugar a pequeñas lesiones cloróticas con escasa esporulación efectiva solo hasta el momento de la floración de la planta (Thompson y Bergquist, 1984). Hooker (1978) describió las fuentes de citoplasma y los genes que dan resistencia a la raza T del tizón del Sur.

El tizón amarillo de la hoja es causado por *Phyllosticta maydis*, que ocurre en ambientes frescos y húmedos. Este hongo muestra una patogenicidad diferencial entre los citoplasmas N y T y afecta especialmente a las plantas con este último citoplasma; se encuentra en todas las etapas del desarrollo de la planta, desde la plántula hasta su madurez. Normalmente aparecen lesiones de color amarillo a crema o bronceado en la parte exterior de la hoja y en las etapas más avanzadas las lesiones pueden llegar a las vainas de las hojas o a la espata de las mazorcas; la parte superior de las hojas puede aparecer marchita y los síntomas, en general, se parecen a los de la deficiencia de nitrógeno. El uso de variedades resistentes es la mejor forma de control y con el abandono

del citoplasma T la enfermedad ha perdido importancia (Smith y White, 1988). La rotación de los cultivos y el mantenimiento limpio de estos minimiza el efecto de las primeras infecciones.

El marchitamiento en bandas de las hojas y de las vainas es causado por el hongo *Hypochoyus sasakii* (*Cotycium sasakii*= *Rhizoctonia solani*); produce grandes áreas decoloradas sobre la hoja, separadas por características bandas concéntricas oscuras. Los síntomas pueden aparecer en las hojas y en las espigas de las mazorcas y la enfermedad da lugar a una pudrición de color marrón de las mazorcas con un moho algodonoso también marrón. Esta enfermedad está causando pérdidas económicas en algunas partes de Asia.

Manchas de las hojas

La mancha de la helmintosporiosis de la hoja es causada por *Helminthosporium carbonum* o *Bipolaris zeicola*; se encuentra en las áreas frescas de las regiones templadas y no tiene mayor importancia en los trópicos. Se han identificado tres razas del hongo y la resistencia genética es bien conocida, controlada por dos genes recesivos para la raza 1; poligenes con efectos genéticos aditivos son responsables por la resistencia a la raza 3 (Halseth, Pardee y Viands, 1991). Se ha desarrollado germoplasma resistente ya que la enfermedad puede ser fácilmente controlada usando variedades con este germoplasma junto con rotación de cultivos y otras prácticas corrientes de cultivo (Smith y White, 1988).

La mancha de la *Curvularia* es causada por los hongos *Curvularia lunata* y *C. pallenscens*. La enfermedad produce pequeñas manchas necróticas circulares a ovales, con un halo ligeramente coloreado y márgenes rojizo marrones a marrón oscuro. Es una enfermedad prevalente en ambientes húmedos y cálidos y los daños económicos no son muy importantes. Se conoce la existencia de resistencia poligénica con efectos aditivos y epistáticos.

La antracnosis es causada por *Colletotrichum graminicola*; el desarrollo de la enfermedad tiene dos fases: la primera, menos importante, con el marchitamiento de la hoja y una segunda fase de pudrición del tallo. Esta no es una enfermedad importante en los trópicos.

Las esporas del patógeno entran en las hojas y causan las manchas pequeñas, redondas a irregulares, húmedas, semitransparentes que aparecen al inicio de la temporada de cultivo. Las manchas posteriormente crecen, se unen y se vuelven de color marrón con los bordes marrón rojizos. El hongo puede causar un tizón de la plántula y la pudrición del tallo. Se ha informado de resistencia poligénica con genes de efecto aditivo y dominancia parcial (Carson y Hooker, 1981).

La mancha marrón es causada por el hongo *Physoderma maydis*, ocurre en ambientes húmedos y cálidos de los trópicos y afecta también al teosinte. Los síntomas aparecen primeramente en la lámina de las hojas bajo la forma de pequeñas manchas amarillas cloróticas; en el medio de los bordes y en las vainas de las hojas, en los tallos y algunas veces en las espigas de las mazorcas las lesiones se desarrollan como pequeñas manchas marrones. Hay fuentes de resistencia genética que involucran hasta cuatro genes con efectos aditivos; también se ha informado de genes con efectos dominantes y epistáticos. Lal y Chakravarti (1977) recomendaron el uso de fungicidas sistémicos para el control de la enfermedad después de que las plantas han sido infectadas.

La mancha en ojo conocida en Japón como mancha marrón es causada por el hongo *Kabatiella zae*; ocurre en ambientes frescos y húmedos y además del maíz afecta a varias especies de teosinte. La enfermedad causa lesiones circulares a ovals, translúcidas, en las primeras etapas del desarrollo de la planta; al principio, las lesiones son acuosas con un punto de color crema a bronceado en su centro, rodeado por un aro de color marrón a púrpura con un halo angosto de color amarillo. Estas tienen la forma de un ojo, lo que da el nombre a la enfermedad. Los síntomas son similares a los de la mancha de la *Curvularia* o a aquellas manchas no patogénicas, fisiológicas y a manchas genéticas que se encuentran en las plantas de maíz en las zonas tropicales. La resistencia genética es parcialmente dominante y debida a unos pocos genes (Reifschneider y Arny, 1983). El uso de variedades resistentes, la rotación de cultivos y el mantenimiento limpio de los maizales controlan la enfermedad en forma bastante efectiva.

La mancha de la hoja *Phaerosphaeria* es causada por el hongo *Phaerosphaeria maydis*; no es una enfermedad muy difundida y se encuentra en el sur de Asia, México y América del Sur, en ambientes frescos y de abundantes lluvias. La enfermedad al principio produce

pequeñas lesiones de color verde pálido o cloróticas que después se aclaran, se secan y desarrollan bordes marrones; las manchas alargadas u oblongas aparecen sobre toda la hoja. El hongo persiste en el campo en los restos de las partes enfermas de las plantas y, bajo condiciones favorables, las esporas germinan e infectan las hojas del próximo cultivo. La rotación de cultivos puede reducir la infección de esta enfermedad.

La *Cercospora* o mancha gris de la hoja es causada por el hongo *Cercospora zeaе maydis* y ocurre sobre todo en ambientes frescos y húmedos. La incidencia de esta enfermedad aumenta cuando el maíz se cultiva en el mismo campo en forma continua, sin rotaciones y con escasas prácticas culturales (Latterali y Rosi, 1983; Donahue, Stromberg y Myers, 1991). La enfermedad produce rayas de color marrón pálido delimitadas por las venas de las hojas o manchas de color gris a bronceado y amarillo a púrpura en las hojas de las plantas maduras. La enfermedad se encuentra en los trópicos pero no causa pérdidas económicas importantes. Se han identificado fuentes de resistencia genética, la que es gobernada por genes de efecto aditivo (Bergquist, 1985; Donahue, Stromberg y Myers, 1991; Bubecket *al.*, 1993). El uso de variedades resistentes, la rotación de cultivos y la labranza convencional han sido recomendadas para minimizar la incidencia de esta enfermedad.

La mancha en bandas de la hoja es causada por el hongo *Gloeocercospora sorghi*; esta enfermedad es importante en el sorgo pero también infecta el maíz en ambientes cálidos y secos. Al principio las lesiones son rojizas a marrones y acuosas; más adelante, se agrandan y producen grandes anillos necróticos característicos. Estas lesiones pueden tener más de cinco centímetros de diámetro en las hojas viejas y maduras.

La mancha de la hoja causada por el hongo *Leptosphaeria michora* ocurre en las áreas húmedas de los maíces en ambientes altos. La enfermedad causa pequeñas lesiones que aumentan de tamaño, se hacen concéntricas y cubren la hoja. Por lo general se limita a las hojas inferiores y aparece en el momento de la floración.

La pústula de la hoja causada por el hongo *Septoria maydis* ocurre en ambientes frescos y húmedos. Las hojas de las plantas infectadas muestran primero pequeñas manchas verde claro a amarillas que crecen y se unen para producir varias pústulas y necrosis.

Las últimas cinco manchas de las hojas citadas se encuentran ocasionalmente y no causan daños importantes en los ambientes de los maíces tropicales. Sin embargo, cualquiera de ellas puede llegar a tener importancia si un gran número de plantas se infectan dentro de un cultivo.

Royas de la hoja

Hay tres tipos de royas de importancia económica que atacan al maíz: la roya común, la roya del sur y la roya tropical. La roya común prevalece en ambientes frescos y tierras altas y la roya del sur es una enfermedad de tierras bajas y ambiente cálido. Estas royas tienen, a veces, una distribución estacional: la roya común aparece al inicio de la estación del maíz y la roya del sur aparece, por lo general, al final de la estación cuando decrecen las lluvias y están cerca de su fin. La roya tropical es más irregular en su distribución. Las variedades locales de maíz donde las royas son endémicas han desarrollado un buen nivel de tolerancia a la enfermedad y, por el contrario, los germoplasmas exóticos o introducidos son atacados más severamente por las mismas.

La roya común es causada por el hongo *Puccinia sorghi* que está ampliamente distribuido; ataca el maíz y el teosinte pero no es frecuente sobre el sorgo y su huésped alternativo es el *Oxalis*. La roya común es más conspicua en las variedades susceptibles de maíz, en el momento de la floración masculina cuando es posible ver pequeñas pústulas pulverulentas de color marrón en ambos lados de las hojas. Las pústulas toman un color marrón oscuro a medida que la planta madura y las bajas temperaturas y la alta humedad favorecen su desarrollo y difusión. Se han identificado varias razas fisiológicas de *Puccinia sorghi* y se han separado por su reacción a diferentes líneas de maíz. Se ha identificado resistencia a razas específicas de este patógeno la cual es controlada individualmente por cinco diferentes genes ubicados en tres cromosomas (Saxena y Hooker, 1974). Tales formas de resistencia se manifiestan por un desarrollo limitado de las pústulas. También hay formas de resistencia general que dan lugar a una reducción en el número de pústulas y en la necrosis de las hojas. Los genes responsables de la resistencia general son pocos y altamente heredables (Kim y Brewbaker, 1977). Puede ser desarrollado germoplasma con resistencia poligénica y estable a la roya común; el uso del germoplasma resistente y el control del *Oxalis* pueden efectivamente eliminar el problema de la roya común.

La roya del sur es causada por el hongo *Puccinia polysora*; ataca al maíz, al teosinte y al *Tripsacum* y prevalece en ambientes húmedos y cálidos. En un principio fue llamada roya americana porque se encontraba solo en el continente americano; sin embargo, alrededor de 1940 fue introducida en África (Wellman, 1972; Renfro, 1985) y en los diez años siguientes se difundió a todos los ambientes maiceros tropicales de África, Asia y el Pacífico. Los síntomas son similares a los de la roya común descritos anteriormente, si bien las pústulas son menores, de color más suave y densamente distribuidas en ambas caras de la superficie de las hojas; se vuelven de color marrón oscuro a medida que la planta se acerca a la madurez y más adelante las hojas se vuelven cloróticas y se secan. La roya del sur no tiene un huésped alternativo coexistente como ocurre con el *Oxalis* y la roya común. Se han identificado varias razas fisiológicas de esta roya y también se han identificado formas de resistencia a varias razas. Hay 11 genes que tienen influencia sobre la resistencia (Scott, King y Armour, 1984) y probablemente también existe resistencia general que puede ser eventualmente usada para el mejoramiento (Smith y White, 1988). Lu *et al.* informaron que en China la resistencia a la roya común estaba altamente correlacionada con la resistencia a la roya del sur.

La roya tropical es causada por el hongo *Physopella zae* y está limitada a regiones cálidas y húmedas de México, América Central, América del Sur y el Caribe. Las pústulas son de color crema a amarillo pálido y se desarrollan debajo de la epidermis presentando una pequeña abertura o poro; más adelante, las pústulas se vuelven de color púrpura, circulares a oblongas, con la parte central que permanece de color crema. No tiene un huésped alternativo y se recomienda el uso de germoplasma resistente. Se sugiere que además del mejoramiento de la resistencia contra una roya específica, tal vez sea más eficaz introducir formas de resistencia a las tres royas en forma conjunta y proporcionar una mejor solución a estos problemas (Wellman, 1972).

1. 2. 6. Enfermedades de la inflorescencia

Hay cinco enfermedades que afectan distintas partes de la inflorescencia, incluyendo las flores, los ovarios en desarrollo y los granos. Estas son: la cabeza loca, que afecta la panoja y también la planta; el carbón de la panoja, que afecta la panoja y la mazorca; el falso carbón, que afecta solo la panoja; el carbón común que afecta sobre todo a la mazorca, y el cornezuelo que afecta la mazorca.

El carbón de la panoja es causado por el hongo *Sphacelotheca reiliana* ocurre en ambientes secos y cálidos; la infección es sistémica ya que el hongo penetra por la plántula y crece después a través de la planta sin que esta muestre ningún síntoma hasta el momento de la floración. La panoja muestra claros síntomas de la enfermedad y se deforma y crece excesivamente. La infección en la panoja puede estar limitada a unas pocas espiguillas causando su crecimiento en forma de tallo o filodio; en otros casos, toda la panoja puede proliferar formando estructuras similares a hojas. Las mazorcas de las plantas infectadas también presentan aspecto de carbón y son reemplazadas por una masa negra de esporas. El teosinte y los híbridos de teosinte y maíz también son afectados por esta enfermedad. Se ha identificado resistencia genética, la que presenta una gran variabilidad en la reacción al hongo (Frederiksen, 1977; Stromberg *et al.*, 1984). En un estudio reciente Bernardo, Bourrier y Oliver (1992) informaron que los efectos aditivos son muy fuertes y condicionan la resistencia a la enfermedad mientras que la dominancia y la epistasia juegan un papel secundario. Se han seleccionado germoplasmas resistentes y su uso es sin duda la mejor forma de control de la enfermedad.

El falso carbón es causado por el hongo *Ustilaginoidea virens* y ocurre en los ambientes cálidos de muchas partes del globo, si bien no constituye un problema económico serio, excepto en algunos lugares aislados. El falso carbón infecta solo unas pocas espiguillas en la panoja y desarrolla agallas del tipo del cornezuelo las que producen masas de esporas de color verde oscuro. Este carbón no afecta los rendimientos ni causa en consecuencia un daño económico serio.

El carbón común es causado por el hongo *Ustilago maydis* (= *U. zae*) y ocurre en todo el mundo en zonas moderadamente secas a húmedas, si bien no es una enfermedad grave. Cualquier parte epigea de la planta de maíz puede ser afectada, en especial los meristemas y otros tejidos jóvenes. La mayor parte del daño ocurre cuando se infecta el meristemo apical de las plántulas. Los síntomas típicos son las agallas que aparecen en el tallo y en las hojas; la enfermedad, si aparece temprano, puede detener el crecimiento y llegar a la muerte de la planta. En las mazorcas, el hongo entra a través de los estambres y forma evidentes agallas blancas en el lugar de los granos; cuando estas agallas se rompen escapa una masa negra de esporas que podrá infectar el cultivo siguiente. Se han reconocido varias razas y es necesaria una forma de resistencia total ya que afecta a numerosas partes

de la planta. Se conocen fuentes de resistencia genética (Bojanowski, 1969); esta es poligénica y de acción cuantitativa, aditiva y no aditiva. La siembra de germoplasma resistente, el evitar daños mecánicos a las plantas y la remoción y quema de las agallas antes de que estas suelten las esporas pueden reducir el nivel de la enfermedad a niveles insignificantes.

El cornezuelo es causado por el hongo *Claviceps gigantea* y la enfermedad está limitada a los valles altos y húmedos de América Central y México. Esclerocios de color blanco a crema, pegajosos y huecos reemplazan a los granos en la mazorca; se encuentran desde uno solo a varios en cada mazorca y producen alcaloides tóxicos.

1. 2. 7. Pudrición de la mazorca

Varios hongos y algunas bacterias infectan las mazorcas y los granos causando su pudrición y muchos de los patógenos que participan en la pudrición del tallo también son responsables por la pudrición de las mazorcas. Algunos de las causantes de la pudrición de las mazorcas están ampliamente distribuidos y muchos de ellos causan daños importantes entre la iniciación de la floración femenina y la cosecha, sobre todo en áreas húmedas y con lluvias abundantes. En las variedades con espatas de la mazorca laxas o cuando estas están dañadas por pájaros o insectos de los granos almacenados en el campo, el cultivo sufre daños adicionales de parte de los hongos de la pudrición. La pudrición de las mazorcas y los granos afecta sensiblemente el rendimiento en los ambientes de las tierras altas y con intensas precipitaciones en el período en que estas disminuyen. Además, la calidad del grano y de la semilla son seriamente afectadas; en los ambientes donde la incidencia de esta pudrición es alta, la producción de semillas y el mantenimiento de un buen poder germinativo es difícil. El desarrollo de germoplasma con altos niveles de resistencia a la pudrición de la mazorca y de los granos es una prioridad en muchos ambientes de cultivo del maíz en los trópicos. Las distintas pudriciones toman su nombre del patógeno que causa la enfermedad; a continuación se describen sus síntomas.

La pudrición de la mazorca de *Diplodia* es causada por los hongos *Diplodia maydis* y *D. macrospora*. Las espatas de las mazorcas infectadas aparecen blanquecinas o de color pajizo; si la infección es temprana, toda la hoja de cobertura toma un color gris marrón y se seca mientras la planta conserva su color verde. Cuando se abre la mazorca tiene una

aparición pajiza, blanqueada y con un crecimiento algodonoso en la mazorca y entre los granos. Las mazorcas infectadas al final de la estación pueden no mostrar esos síntomas extremos pero son muy livianas. La mazorca se dobla en vez de romperse y tiene moho entre los granos, cuyas puntas están decoloradas. En ambientes de lluvias abundantes los problemas de la pudrición de la mazorca pueden ser evitados entre las etapas de la floración femenina y la cosecha, utilizando las mazorcas para su consumo verde. En algunas áreas los agricultores evitan la acumulación de agua dentro de las espigas de la mazorca doblándolas hacia abajo a la altura del entrenudo. El uso de variedades espigas apretadas y período de madurez apropiado pueden reducir las pérdidas por pudrición. Existen variedades con buenos niveles de tolerancia a la enfermedad.

La pudrición de la mazorca y de los granos también pueden ser causadas por el hongo *Fusarium moniliforme* y su variedad *F. m. subglutinans*. El patógeno entra a través de los estambres en el extremo de la mazorca; la infección permanece limitada por un cierto tiempo a algunos granos o a una parte de la mazorca y en los granos se desarrolla un moho pulverulento o algodonoso blanco rosado. Los barrenadores del maíz y los gusanos de la mazorca contribuyen al establecimiento del patógeno sobre los granos y se puede ver el moho creciendo en las galerías hechas por los insectos. Los granos infectados al final de la estación pueden no tener moho y mostrar solo unas rayas en el pericarpio. Esta pudrición se difunde rápidamente en los ambientes tropicales y los granos infectados con *Fusarium* se pueden encontrar en lotes de mazorcas de maíz limpias. El control de los barrenadores y de los gusanos de la mazorca de modo de evitar daño a las mazorcas y el uso de variedades resistentes, son buenos mecanismos preventivos. El germoplasma del maíz tropical tiene considerable variabilidad para susceptibilidad y resistencia. El maíz *opaco-2* y otros maíces con almidón blando muestran mayor susceptibilidad a la pudrición de la mazorca que otros tipos de maíz. Es posible seleccionar y desarrollar variedades con altos niveles de tolerancia a esta enfermedad (De León y Pandey, 1989).

La pudrición de la mazorca causada por el hongo *Gibberella zeae* ocurre en ambientes frescos con intensas precipitaciones, después de la floración femenina. Esta enfermedad da un color rojizo a la mazorca, desarrollando un moho rojizo en los granos infectados; la infección se inicia en la punta de la mazorca y se desplaza hacia abajo. A diferencia de la pudrición del *Fusarium* donde se infectan solo unos pocos granos aislados, esta

enfermedad produce una infección y una pudrición más generalizadas. Si la infección comienza temprano toda la mazorca puede estar cubierta con el moho de color rosado a rojo, creciendo entre espatas y la mazorca. En tales casos, las espatas y los mohos se pegan a la mazorca y a menudo los granos infectados comienzan a germinar; este hongo produce varias micotoxinas. Existen fuentes de resistencia variable (Gendloff *et al.*, 1986; Hart, Gendloff y Rossmann, 1984) y se han desarrollado germoplasmas con varios niveles de resistencia para los ambientes tropicales.

La pudrición gris de la mazorca es causada por el hongo *Physalospora zaeae*; ocurre en tiempo cálido y húmedo y persiste por varias semanas después de la floración femenina. Los síntomas en las etapas iniciales son similares a los de la pudrición de *Diplodia*, y se desarrolla un moho gris blancuzco sobre y entre los granos. Las espatas de la mazorca se blanquean y se adhieren entre ellas; en la madurez las mazorcas enfermas son de color gris oscuro a negro, a diferencia del color gris marrón que ocurre en el caso de la pudrición de *Diplodia*, y permanecen erectas. El tiempo cálido y húmedo durante varias semanas después de la floración es favorable para el desarrollo de esta enfermedad. Las medidas de control son las mismas que para la pudrición de *Diplodia*.

Existe una pudrición de la mazorca causada por el hongo *Penicillium oxalicum*, aunque en los ataques también pueden participar otras especies del parásito. Esta enfermedad se desarrolla sobre las mazorcas dañadas mecánicamente o por insectos. El síntoma característico es un moho pulverulento de color verde o verde azulado que crece sobre y entre los granos, comenzando por la punta de la mazorca, y que puede encontrarse también sobre el olote.

Otra pudrición de la mazorca es causada por varias especies del género *Aspergillus*; la pudrición causada por *Aspergillus flavus* es la más importante porque participa en la producción de al menos dos micotoxinas en este caso llamadas aflatoxinas del maíz. El *Aspergillus niger* es la especie más difundida y origina una masa de esporas pulverulentas negras. Otras especies producen un crecimiento de color verde amarillento o bronceado sobre y entre los granos. Normalmente los granos en la punta de la mazorca son los que se infectan primero. El ataque de las distintas especies de *Aspergillus* puede ser activado o aumentado por el ataque en el campo de gorgojos de los granos almacenados. Algunos otros factores tales como las altas temperaturas y el estrés de las

plantas, especialmente el estrés de humedad antes de la cosecha, están asociados con un aumento de la incidencia de la infección de *Aspergillus* (Widstrom, McWilliams y Wilson, 1984; CIMMYT, 1992). El problema de los compuestos orgánicos tóxicos aflatoxinas y de otras micotoxinas producidas por los diversos *Aspergillus* puede llegar a ser serio cuando la humedad del grano es alta en el momento de la cosecha, de más de 15 a 18% de humedad y cuando el grano infectado es almacenado con un alto contenido de humedad en un ambiente también húmedo y cálido. Las aflatoxinas son sumamente tóxicas para los seres humanos y los animales domésticos a causa de sus efectos carcinogénicos y otros efectos tóxicos. Se ha informado de fuentes de resistencia genética a *Aspergillus* (Wallin, Widstrom y Fortnum, 1991). Barry et al. (1992) informaron que dos cultivares Mo20W x Teosinte e Ibadan B. produjeron menos aflatoxina en granos precosechados. Gorman et al. (1992) concluyeron en base a estudios detallados que el germoplasma que ha sido sometido a un ambiente seco mostraba las más altas concentraciones de aflatoxinas B-1, B-2, G-1 y G-2. Correlaciones sobre aditividad genética basada en los efectos de la habilidad combinatoria general sobre las cuatro aflatoxinas fueron significativas e indicaron que, en general, aumentando la resistencia a una toxina podía llevar a formas de resistencia a las otras tres toxinas. La incidencia de las aflatoxinas puede ser reducida por medio del uso de germoplasma resistente y buenas condiciones de cultivo y de almacenamiento (Zuber, Lillehoj y Renfro, 1987).

La pudrición del olote es causada por el hongo *Nigrospora oryzae*. La planta no muestra ningún síntoma hasta que las mazorcas son cosechadas; estas son livianas y pajizas con la base desgarrada y si los granos se aprietan contra el olote, penetran en el mismo. Las plantas de maíz cultivadas en suelos de baja fertilidad o cuando las plantas están debilitadas a causa de enfermedades o daños, son más susceptibles a este hongo. Esta enfermedad está bastante difundida pero raramente causa daños de importancia económica.

La pudrición de la mazorca y del grano es causada por el hongo *Cladosporium herbarum* que ataca los granos cerca de la base de la mazorca, especialmente los granos dañados. Los síntomas característicos son pústulas o rayas negras o verde negruzcas sobre granos esparcidos en la mazorca. Después de la cosecha y durante el almacena-miento la

infección se puede difundir aún más. Esta enfermedad no tiene importancia desde un punto de vista económico.

La pudrición de la mazorca causada por el hongo *Rhizoctonia zea* puede aparecer cuando persiste el tiempo cálido y húmedo por largos períodos; produce el crecimiento de un moho color salmón rosado en la mazorca. En el momento de la madurez, las mazorcas infectadas se vuelven de un color gris opaco con numerosos esclerocios de color blanco a salmón o negros que se desarrollan en la parte externa de las hojas de cobertura.

1. 2. 8. Mohos del almacenamiento

Algunas especies de hongos, especialmente *Penicillium oxalicum*, *Aspergillum flavus* y *A. niger* que causan la pudrición de los granos en el campo son también parásitos de los granos almacenados y pueden dañar el grano de maíz en el período de almacenamiento. Estos hongos, en el campo, atacan y dañan el grano cuando su humedad es alta, por lo general por encima de 18%. Durante el almacenamiento los hongos atacan y dañan el grano cuando la humedad está entre 14 y 18% (Smith y White, 1988). Estos hongos son un problema cuando el maíz se cosecha mecánicamente y está húmedo y no es correctamente secado antes de transportarlo o almacenarlo. En los trópicos la mayor parte del maíz es cosechado en la mazorca y se seca antes de desgranar; la humedad del grano es en general baja, menor de 14%; en esas condiciones los hongos de los granos almacenados no son un problema. Este tema se discute más adelante en el capítulo *Manejo postcosecha*.

1. 2. 9. Enfermedades Regionales

Estas enfermedades están limitadas a algunas regiones específicas y en general son de importancia económica en la región en que ocurren. Dos de estas enfermedades son causadas por hongos: el mildiu lanuginoso y la mancha marrón; otras dos enfermedades son causadas por un virus y un espiroplasma respectivamente: el estriado del maíz y el enanismo del maíz.

El mildiu lanuginoso fue identificado por primera vez en las Filipinas y hoy es una importante enfermedad en el sur y el sureste de Asia; es una de las pocas enfermedades del maíz originarias del Viejo Mundo. Ahora se encuentra en los ambientes tropicales de otros continentes, por ejemplo en México, América del Sur, África Occidental y Egipto.

Esta enfermedad es causada por hongos de varios géneros y especies: *Peronosclerospora* spp., (= *Sclerospora* spp.), y especies relacionadas de *Sclerophthora* spp.; solo cinco especies son importantes en el maíz. Los mildius más comunes en Asia son: el mildiu de las Filipinas causado por *Peronosclerospora philippinensis*; el mildiu del sorgo causado por *P. sorghi* y el mildiu de la caña de azúcar causado por *P. sacchari*. El cuarto tipo es llamado mildiu lanuginoso de rayas marrones y es causado por *Sclerophthora rayssiae* var. *zeae*. Otros tipos menos importantes son el mildiu de Java causado por *Peronoscle rospora maydis*; el mildiu lanuginoso que rompe las hojas causado por *Peronoscle rospora miscanthi*; el mildiu lanuginoso espontáneo causado por *Peronosclerospora spontana*; la panoja loca causada por *Sclerophthora macrospora* y el mildiu lanuginoso gramínicola causado por *Sclerospora graminicola*. Renfro y Bhat (1981) listaron varios huéspedes alternativos que albergan varios mildius lanuginosos y el papel que juegan en la difusión de la enfermedad. Williams (1984) ha hecho una extensa revisión de los mildius lanuginosos en los cereales tropicales. Hasta hace unos pocos años eran una enfermedad temida y causaban un serio daño a los cultivos de maíz. La sistemática y la clasificación de los hongos que causan estas enfermedades y su epidemiología han sido descritas por Frederiksen y Renfro (1977). Los mildius lanuginosos son enfermedades sistémicas y la infección inicial de las plantas ocurre usualmente por oosporas, mientras el hongo crece junto con la planta. Los primeros síntomas externos se aprecian cuando la planta parece estar enferma y las hojas nuevas no tienen aún color verde oscuro y aparece un vello sobre el envés de las hojas en horas de la mañana. La planta no crece en altura y las hojas presentan barras blancas; la mazorca es reemplazada por estructuras foliáceas o por rudimentos de mazorca que, en un 95%, son estériles. Si se desarrolla una mazorca normal, tendrá unos pocos granos, los cuales estarán invadidos internamente por el micelio del hongo que es de corta vida. La transmisión del mildiu lanuginoso por medio de las semillas de maíz no ha sido claramente demostrada, como ocurre, sin embargo, en el sorgo y en el mijo perla.

Se han hecho importantes trabajos sobre la genética de la resistencia de los distintos mildius lanuginosos y se han identificado variedades locales de maíz y otras fuentes agronómicas de resistencia. Renfro (1985) ha presentado un sumario de los trabajos sobre resistencia genética a varias especies de mildius y se ha informado de la existencia de

resistencia poligénica a todas las especies, pero en el caso de la caña de azúcar, en Taiwán, se encontró resistencia monogénica (Chang, 1972). Kaneko y Aday (1980) concluyeron en base a una serie de estudios que la resistencia a *Peronosclerospora philippinensis* es gobernada por un sistema poligénico. Recientemente, De León *et al.*, (1993), confirmaron a partir de estudios bajo condiciones de inoculación artificial que la resistencia es poligénica y controlada por efectos aditivos. La susceptibilidad es mayormente controlada por efectos de dominancia y epistasia. La herencia cuantitativa mostró una fuerte influencia sobre los cambios en la severidad de la enfermedad. La resistencia mostró una expresión dominante en condiciones de baja presión de la enfermedad; bajo moderada presión, mostró una dominancia parcial, mientras que bajo alta presión de la enfermedad, la susceptibilidad fue dominante. No existe, sin embargo, una variedad completamente resistente bajo condiciones de alta presión de la enfermedad y las mejores variedades muestran en esos casos un 80% de resistencia. En el sorgo existe un sistema poligénico con variación genética aditiva y dominancia que controla la resistencia a la enfermedad (Singburadom y Renfro, 1982). La resistencia al mildiu de barras marrones también está controlada por un sistema poligénico con efectos aditivos, con algún componente de dominancia parcial (Renfro, 1985).

Hay variedades e híbridos resistentes a todos los tipos de mildius lanuginosos y el problema de esta enfermedad está en cierta medida controlado. La resistencia desarrollada en Asia contra el mildiu de las Filipinas y el de la caña de azúcar también muestra resistencia al mildiu del sorgo; además, el tratamiento de las semillas es eficaz contra la enfermedad (Frederiksen y Odvody, 1979). La enfermedad también es controlada con adecuadas rotaciones de cultivos y evitando la siembra con cultivos huéspedes del hongo (Siradhana *et al.*, 1978). Como que las variedades y los híbridos no muestran resistencia completa bajo condiciones de alta presión de la enfermedad, es aconsejable usar germoplasmas resistentes junto con prácticas culturales adecuadas para limitar la presión de la enfermedad al mínimo.

La quinta enfermedad de este tipo es llamada cabeza loca y es causada por el hongo *Sclerotora macrospora*. Aunque es una enfermedad muy difundida es considerada secundaria y solo ocasionalmente una severa infección puede causar daños económicos. Afecta al maíz, al teosinte, a los híbridos maíz x teosinte y se encuentra en más de 140

especies de gramíneas. La enfermedad causa en la planta infectada un exceso de macollaje, enrollando y retorciendo las hojas. Los síntomas más evidentes se aprecian en la flor masculina, la que presenta una excesiva ramificación y un crecimiento vegetativo activo o filodios; de aquí, por lo tanto, el nombre de cabeza loca. El patógeno es transportado por la semilla pero muere fácilmente durante el proceso de secado y almacenamiento del grano (Smith y White, 1988). Las inundaciones de los campos favorecen la enfermedad por lo que es recomendable contar con un buen drenaje. También existen fuentes de resistencia al hongo.

La enfermedad conocida como mancha negra es causada por un complejo de hongos que comprende *Phyllacora maydis* y los hongos asociados *Monographella maydis* y *Coniothyrium phyllacorae*. La enfermedad ocurre en las zonas de altitud media y en las tierras tropicales de México y otros países de América Central. Los síntomas aparecen como pequeños puntos negros en la faz de las hojas inferiores que progresan después a las hojas superiores. El proceso epidemiológico ha sido recientemente aclarado (Dittrich, Hock y Kranz, 1991; Hock, Dittrich, Renfro y Kranz, 1992). La enfermedad puede ser controlada con pulverizaciones foliares de fungicidas en el momento de la aparición de las primeras manchas. Se ha encontrado resistencia monogénica a esta enfermedad y se han obtenido variedades resistentes (González *et al.*, 1992; Vasal, González y Srinivasan, 1992).

El enanismo del maíz se encuentra en el sur de los Estados Unidos de América, México y América Central y es causado por *Spiroplasma kunkelii* el cual es transmitido por los saltamontes del género *Dalbulus*; ataca al maíz y a varias especies de teosinte. La enfermedad es transmitida en las primeras etapas del desarrollo de la plántula y el primer síntoma visible es clorosis en el margen de las hojas del verticilo. Las hojas más viejas se enrojecen como cuando la planta sufre de deficiencia fosfórica en condiciones frías y las hojas nuevas muestran manchas cloróticas que se desarrollan en barras que se extienden hasta la punta de la hoja. Las plantas quedan enanas y producen muchas pequeñas mazorcas en las axilas de las hojas en vez de una sola mazorca bien desarrollada. Se ha seleccionado resistencia genética y hay en este momento disponibilidad de variedades e híbridos resistentes que minimizan las pérdidas causadas por la enfermedad (De León, 1983).

La enfermedad del listado del maíz es importante en el África subsahariana, región a la que está confinada por el momento. Es causada por un virus transmitido por los saltamontes del género *Cicadulina*. La enfermedad causa daños económicos importantes en los ambientes de tierras bajas tropicales y de media altitud al sur del Sahara, especialmente cuando los cultivos sufren sequías. En condiciones favorables, cuando la humedad no es un factor limitante, la planta es capaz de superar la infección del virus sin una mayor reducción de los rendimientos. Las plantas infectadas muestran listas blancas que corren a lo largo de las hojas y enanismo; cuando la infección es fuerte, la planta no produce mazorcas y puede morir. La enfermedad puede ser controlada por medio de la aplicación de un insecticida sistémico que reduzca la población de los saltamontes y la difusión del virus. Se han identificado buenas formas de resistencia, la que se suponía, en un principio, controlada por un solo gen con modificadores (Storey y Holland, 1967); posteriormente se identificaron tres genes con modificadores (Bjarnason, 1986). Kim *et al.*, (1989) informaron que la resistencia es controlada por dos o tres genes que pueden ser fácilmente transferidos a germoplasmas superiores; hoy día existen variedades e híbridos con buenos niveles de resistencia adaptados al ambiente subsahariano (Reynaud, Guinet y Marchand, 1988).

1. 2. 10. Otras Enfermedades Causadas por Virus

Existen otras enfermedades causadas por virus, unas pocas de las cuales están ampliamente difundidas. El virus del mosaico y enanismo del maíz (MDMV) están incluidos en el mismo grupo del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV), del virus del mosaico del sorgo de Alepo (JGMV) y de otros polivirus menos importantes.

Los virus MDMV y SCMV están ampliamente difundidos en los trópicos; estos virus son transmitidos mecánicamente por la savia de la planta a través de un áfido vector (*Rhopalosiphum maidis*) y afectan varios cultivos de cereales y la caña de azúcar. Los primeros síntomas son la presencia de un mosaico de tejidos verdes y cloróticos en las hojas jóvenes; más adelante, estas hojas muestran bandas cloróticas generalizadas y la planta puede tomar un color púrpura y quedar enana.

El virus en bandas del maíz está ampliamente difundido en los trópicos y es transmitido por los saltamontes *Peregrinus* spp. Se producen típicas bandas cloróticas que corren de la base a la punta de las hojas nuevas. Existen otras enfermedades virósicas que no están ampliamente difundidas y parecen estar limitadas a las Américas; estas son la enfermedad del enanismo arbustivo, el virus de enanismo y clorosis, el virus del moteado y clorosis, el virus de la necrosis letal, el virus I del mosaico y el virus de bandas finas del maíz (De León, 1984). El virus del mosaico clorótico del maíz es transmitido por trips (Jiang *et al.*, 1992). Existe resistencia genética para varias de las enfermedades virósicas, la que es controlada por unos pocos genes importantes, por lo general uno o dos, por ejemplo para el virus del mosaico enano, el virus del mosaico y el virus del mosaico en bandas del maíz (Renfro, 1985).

1. 2. 11. *Striga*

La *striga* o maleza de la bruja, *Striga asiatica* y *S. hermonthica*, son dos malezas parásitas que infectan el cultivo del maíz en África y Asia (Hassam, Ransom y Ojiem, 1995). La *striga* se adhiere a las raíces de la planta de maíz inmediatamente después de su germinación, tomando de ella agua y nutrimentos. Posteriormente, el parásito ejerce un potente efecto fitotóxico sobre la planta de maíz causando una reducción tal del rendimiento que va más allá de la competencia que se podría esperar por la sola absorción de agua y nutrimentos (Ransom, Eplee y Palmer, 1990). La *Striga* es una enfermedad del maíz cultivado en ambientes pobres y ocurre en condiciones de baja fertilidad y escasa humedad. La mejora de la fertilidad del suelo, la incorporación de los restos del cultivo y de materia orgánica y el arrancado a mano de las plantas de *Striga* controlan esta maleza (Odhiambo y Ransom, 1995). Kim (1994) informó que hay evidencia de herencia cuantitativa con control poligénico para tolerancia a *Striga hermonthica*. La selección de genotipos de maíz para resistencia/tolerancia a *Striga* y la posibilidad de desarrollar germoplasmas tolerantes están siendo investigadas (Kim y Adetimirun, 1995).

El manchado foliar grave interfiere con la fotosíntesis y causa defoliación prematura y una reducción en vigor de la planta. El ciclo de la enfermedad comienza típicamente con un inóculo primario para la infección inicial en el nuevo follaje en la primavera. Luego continúa con el inóculo secundario en la primavera y el verano para reinfecciones, y

finalmente completa su ciclo en otoño con el hongo en las hojas caídas, que se encuentran en el suelo. Los hongos pueden sobrevivir en los residuos vegetales de hojas infectadas y requieren de agua libre en la superficie de la hoja para la penetración. La enzima poligalacturonasa versiones patógeno, celulosa, pectina y metilesterasa toxina durante el proceso de infección, el daño que inflige y la muerte a los cloroplastos, las mitocondrias y de la propia célula (Irrdb 2007). Los síntomas se desarrollan algunos días después y el patógeno se multiplica y se dispersa por las corrientes de aire o salpicaduras de lluvia, y sigue a la infección secundaria (Thaung M. M. 2008).

2. Mancha de Asfalto en maíz (Tar spot)

2. 1. Manchas de asfalto - patosistema

Mancha de asfalto es una de las enfermedades en maíz más fácil de identificar sus signos y síntomas. Cuando las manchas foliares ennegrecer en su parte superior con cúpula o clípeo-como estroma cubriendo las fructificaciones sumergidas de los patógenos fúngicos, adquieren el término “mancha de asfalto”, un negro mate a brillante. Estos son severos y llamado así porque su aspecto se parece tanto a las gotas de alquitrán en la superficie de las hojas. El estroma se divide para exponer los apotecios subyacente como en *Rhizoma*, o los ostiolas de peritecios inmerso como en *Phyllachora*, para permitir la descarga de ascosporas para la difusión y la infección. Los conidios son poco frecuentes, diminutos, unicelulares y probablemente, podrían funcionar bien como espermacios masculino que como agentes activos de infecciones secundarias. Aunque ascosporas de *P. lespedezae* puede servir como inóculo primario y secundario en mancha de asfalto de *Lespedeza* (Mihail et al. 1997), el ciclo de la enfermedad de una mancha de asfalto es típicamente abreviado (Thaung M. M. 2008).

P. maydis, mancha de asfalto del maíz se desarrolla al máximo entre 10 y 20 ° C, y disminuye por encima de 25 ° C, de este modo, al parecer, explica su predominio en las altas elevaciones, con un clima fresco y húmedo. *P. lespedezae* aumenta en incidencia con sombreado elevado en el dosel (Mihail et al. 1997). Asimismo *R. acerinum*, mancha de alquitrán de arce, tiende a ser más común en los EE.UU. en lugares húmedos y protegidos, con brotes esporádicos en tiempo húmedo (Thaung M. M. 2008).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica del *Phyllachora maydis*

Phyllachora maydis

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Sub-clase: Sordariomycetidae

Orden: Phyllachorales

Familia: Phyllachoraceae

Género: *Phyllachora*

Especie: *Phyllachora maydis*

www.mycobank.org. EOL Encyclopaedia of life.2012. *Phyllachora maydis* Maubl. 1904, *Monographella maydis* E. Müll. & Samuels 1984, *Coniothyrium phyllachorae* Maubl. 1904. Disponible en: http://eol.org/pages/1014516/hierarchy_entries/48655721/overview

Cuadro 3. Clasificación taxonómica del *Monographella maydis*

Monographella maydis

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Sub-clase: Xylariomycetidae

Orden: Xylariales

Familia: Incertae sedis

Género: *Monographella*

Especie: *Monographella maydis*

www.mycobank.org. EOL Encyclopaedia of life.2012. *Phyllachora maydis* Maubl. 1904, *Monographella maydis* E. Müll. & Samuels 1984, *Coniothyrium phyllachorae* Maubl. 1904. Disponible en: http://eol.org/pages/1014516/hierarchy_entries/48655721/overview

Cuadro 4. Clasificación taxonómica del *Coniothyrium phyllachorae*

<i>Coniothyrium phyllachorae</i>	
Reino:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Subphylum:	Pezizomycotina
Clase:	Dothideomycetes
Sub-clase:	Pleosporomycetidae
Orden:	Pleosporales
Familia:	Leptosphaeriaceae
Género:	<i>Coniothyrium</i>
Especie:	<i>Coniothyrium phyllachorae</i>

www.mycobank.org. EOL Encyclopedia of life.2012. *Phyllachora maydis* Maubl. 1904, *Monographella maydis* E. Müll. & Samuels 1984, *Coniothyrium phyllachorae* Maubl. 1904. Disponible en: http://eol.org/pages/1014516/hierarchy_entries/48655721/overview

2. 2. Biología y ecología de Complejo Mancha de Asfalto

Las ascosporas de *Phyllachora spp.* en pastos australianos se descargan de forma activa después de la lluvia o la humedad relativa alta y se acumulan en masas pegajosas en las ostiolas, de la que es probable que estén dispersos por salpicaduras de lluvia (Parbery, 1963a). Hock et al. (1995) reporto atrapar ascosporas transportadas por el viento de *P. maydis* en México durante los periodos de alta humedad, con un máximo en las horas de la noche. La mayor parte de las esporas fueron atrapadas en grupos de tres o cuatro horas; el hongo fue capaz de propagarse hasta 75 m de plantas infectadas. En el laboratorio, las ascosporas germinan mejor entre 10 y 20 ° C, pero fuera de este rango la geminación es mala (Dittrich et al., 1991).

En las tierras bajas del este de México, la mancha de asfalto comienza a aparecer aproximadamente 2 semanas antes de la floración y alcanza una gravedad máxima de aproximadamente 6 semanas más tarde (Hock et al., 1995). La infección también se puede producir en la fase de la hoja 8 a 10 (Hock et al., 1989).

El clipeus (estroma) de las especies *Phyllachora* crece por separado en la epidermis a cada lado de la hoja y no es una extensión de los peritecios (Parbery, 1963b).

Los picnidios del estado asexual *Linachora* aparecen temprano en la infección (Parbery, 1967; Hock et al, 1992). Las esporas de los anamorfos de especies *Phyllachora* probados, no germinaron en agua sobre portaobjetos o en plantas huésped, y probablemente sirven como espermacios en el apareamiento (Parbery y Langdon, 1963).

2. 3. Fisiología y fenología

especies de *Phyllachora* son generalmente parásitos obligados, y no se pueden cultivar en el medio de laboratorio usual (Parbery, 1963b). La actividad necrotrófica aparente de *P. maydis* (Dalby, 1917; Liu, 1973; Bajet et al, 1994) es inusual para un hongo que debería requerir células de plantas vivas por su apoyo, lo que sugiere que el hongo no está totalmente adaptado a su anfitrión.

2. 4. Asociaciones

P. maydis rara vez se encuentra solo en el tejido afectado (Bajet et al., 1994). La forma anamórfica de *Monographella maydis* crece generalmente en las áreas de necrosis de todo el ascoma (Muller y Samuels, 1984; Bajet et al, 1994) y es la causa de la desertificación grave (Hock et al., 1995). En las tierras bajas del este de México, cuando sólo *P. maydis* estaba presente en una hoja, no se produjo ningún tizón de la hoja (Bajet et al., 1994). Las inoculaciones foliares con *M. maydis* no eran exitosas por lo general, a menos que *P. maydis* ya estuvieran presentes en las infecciones, y las lesiones causadas por *M. maydis* no se han observado en el campo sin el hongo de la mancha de alquitrán en el centro (Hock et al., 1992). Este otro patógeno puede estar presente como un endófito (Muller y Samuels, 1984; Bajet et al., 1994) o epífita (CIMMYT, 2003); en cualquier caso, su cambio a la patogenicidad depende principalmente de la infección de la planta por *P. maydis*. Hock et al. (1992) observaron que *P. maydis* se desarrolla primero en las hojas, y que sugieren que puede proporcionar un medio de entrada para el segundo hongo. Los síntomas causados por *M. maydis* aparecieron 2 días después de que *P. maydis* era visible; la mayoría de las lesiones producidas por *M. maydis* se produjo dentro de los 7 días después de que la mancha de asfalto fue vista.

El intervalo de temperatura para la germinación óptima de conidios de *M. maydis* en agua es de 25-30 ° C, y la germinación fue más rápido en la oscuridad (Dittrich et al., 1991). El

rango óptimo de temperatura para el crecimiento en cultivo es 24-27 ° C, y corresponde a la típica de los meses de noviembre a febrero en las tierras bajas de México oriental (Muller y Samuels, 1984). Los conidios en las hojas secas en el laboratorio o en hojas en el suelo de agosto a diciembre en las tierras bajas de México, comenzó a perder viabilidad después de 1 mes, aunque la supervivencia al aire libre era mejor (Hock et al., 1995).

Otro miembro del complejo de hongos asociados con el punto de alquitrán es *Coniothyrium phyllachorae*, picnidios de un hongo que se considera que es un hiperparásito en *Phyllachora*. Maublanc (1904), describió cómo se encuentra en el clypeus ("estroma") y peritecios vacío de *P. maydis*. Hock et al. (1995) encontraron casi el 50% de las lesiones *P. maydis* que contienen picnidios de *Coniothyrium*, dos semanas antes de la cosecha. Su incidencia en *P. maydis* es independiente de la infección lesión por *Monographella maydis* (Hock, 1991). Las lesiones de mancha de alquitrán que contienen *C. phyllachorae* son más pequeños (Hock et al, 1989;., 1995).

2. 5. Distribución del Complejo Mancha de Asfalto

Estos hongos fueron reportados desde partes de México, América Central y Sudamérica y las Indias Occidentales (Hock et al, 1995;., Cline, 2005). En México el complejo "Mancha de asfalto" se presenta en mayor o menor grado en más de 500 mil ha sembradas con maíz, principalmente en Nayarit, Jalisco, Guerrero, Chiapas y Veracruz (Hock et al., 1989). En Guerrero se presenta en las transiciones de las costas hacia la Montaña y en la Zona Centro, en donde afecta anualmente a más de 2 mil ha y cada vez aumenta su presencia (González et al., 2004). En Chiapas se presenta en la región Centro y Fraylesca, con incidencia variable. Conocido sobre todo a partir de las zonas más frías y altas (Malaguti y Subero, 1972;., Bajet et al, 1994), puede ser incapaz de propagarse por sí mismo a través de los trópicos más secos o más caliente. Watson (1971) lo menciona como presente en Brasil, pero Hock et al. (1995) afirman que no hay informes de que allí, o más al sur del continente se encuentre presente.

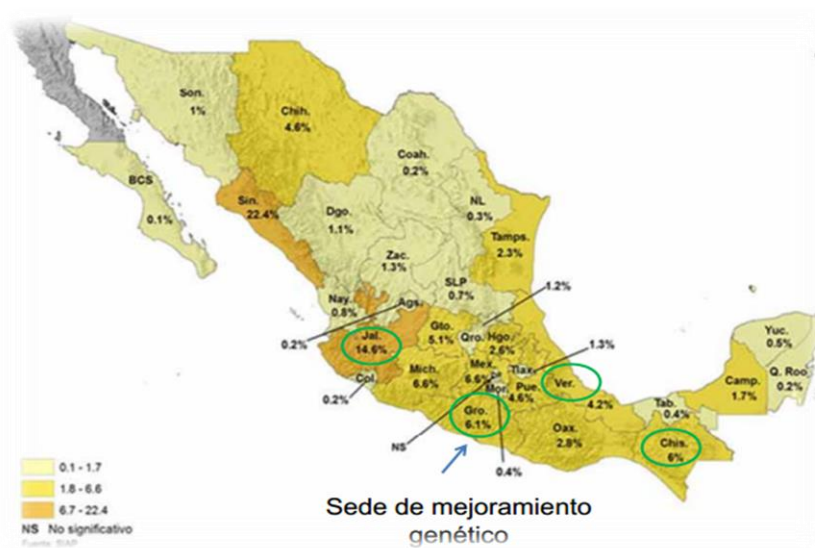


Figura 1. Distribución Geográfica CMA (Datos proporcionados SIAP, INIFAP y SAGARPA)

2. 6. Control del Complejo Mancha de Asfalto (CMA)

2. 6. 1. Control cultural y medidas sanitarias

Las medidas para reducir el inóculo inicial para una nueva cosecha dependerán de la fuente de inóculo y de las prácticas de cultivo. Donde el maíz (*Zea mays*) se cultiva de forma continua en el entorno, no es probable que los esfuerzos de saneamiento sean eficaces. En otra parte, la eliminación de plantas espontáneas o parientes silvestres de maíz puede ser apropiado. Las ascosporas de *P. maydis* sobrevivieron en los restos de cultivos durante 3 meses o más (Hock et al., 1995); la eliminación o destrucción de los restos pueden ser útiles si se sembrará un cultivo nuevo en ese intervalo.

2. 6. 2. Control biológico

Hock et al., 1995 sugiere el control por medio de temprano hiperparasitismo de *Coniothyrium phyllochorae*, reduciendo el tamaño de las lesiones producidas por *P. maydis*. Pudiendo ser adecuado para su uso como un control biológico.

2. 6. 3. El control químico

Fenpropimorf (uno o dos tratamientos) y Mancozeb aplicados se encontraron cada 10 días para ser los fungicidas más eficaces en ensayos con parcela de campo en México (Bajet et al., 1994).

La incorporación de la resistencia en los cultivares de maíz es el método preferido de control debido al costo de los productos químicos, y, en México, el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo) ha desarrollado líneas de mejoramiento y variedades resistentes para diferentes nichos ecológicos (Bajet y col ., 1994). Resistencia a *P. maydis* parece deberse principalmente a un único gen dominante, pero los efectos aditivos también se detectaron (Ceballos y Deutsch, 1992). Aunque el progreso fue lento y difícil, debido a que el problema de la mancha de asfalto consiste en los dos hongos, CIMMYT obtuvo 14 líneas endogámicas que eran "casi inmunes" (Vasal et al., 1999).

3. Mecanismos de variabilidad en Hongos

Los mecanismos por medio de los cuales se genera variabilidad genética en los hongos son: recombinación, mutación, herencia citoplasmática, heterocariosi, parasexualismo y heteroploidia (Rivera. 2007).

La recombinación se da en hongos poseedores de estados teliomórficos o sexuales, en sus ciclos de vida. La recombinación se origina cuando dos gametos haploides (n) se unen para formar el cigoto ($2n$). Posteriormente, en la meiosis, se producen entrecruzamientos, donde partes de la cromátida de cromosoma de un par se intercambian con la de otro. Como resultado de ese proceso pueden aparecer variantes para diversos caracteres, como los asociados a la patogenicidad. De este modo la progenie puede adquirir características nuevas que le permiten la resistencia del hospedero o el efecto de un fungicida específico sobre su metabolismo.

La mutación consiste en un cambio abrupto y espontáneo, en el material genético del organismo, que es transmisible por herencia, a la progenie. En los hongos haploides estas se expresan inmediatamente, mientras que en los diploides y dicarióticos, las mutaciones se pueden mantener ocultas, debido a que generalmente son recesivas. En estos casos la

expresión fenotípica del nuevo carácter ocurre cuando al azar permite reunir los alelos en un individuo.

La herencia citoplasmática o extracromosómica está regida por ADN no ubicado en el núcleo. Esta forma no está sujeta a las leyes mendelianas y permite a un patógeno adquirir nuevas características como por ejemplo: la capacidad de tolerar un fungicida, utilizar nuevos sustratos como fuentes de energía y cambiar su virulencia.

La heterocariosis consiste en la coexistencia de núcleos genéticamente diferentes en un citoplasma común. Esto ocurre cuando dos hifas haploides se unen por medio de anastomosis y hay migración nuclear, de tal manera que una misma hifa o célula quedan dos o más núcleos diferentes. Esta condición permite al organismo adquirir características distintas a las producidas por los organismos homocarióticos originales.

El parasexualismo es un proceso generador de variabilidad sin que medien verdaderos procesos sexuales. Este proceso da inicio con la formación de hifas o células heterocarióticas (núcleos haploides diferentes). Luego, estos núcleos se fusionan, originando estados diploides. Frecuentemente, este estado se perpetúa por división mitótica, pero en algunos casos ocurre una meiosis espontánea, resultando recombinaciones de caracteres que dan origen a genotipos muy distintos a los precursores. La heteroploidía es entendida como la existencia de células, tejidos u organismos con números cromosómicos diferentes a n o $2n$, normal de la especie. Por lo tanto, el número de cromosomas puede ser haploide, diploide, triploide, tetraploide o aneuploide (núcleos con uno o más cromosomas extras o faltantes). La heteroploidía se ha observado en muchos hongos, la cual afecta características como: tasa de crecimiento, tamaño de las esporas, cantidad de ellas, color de las hifas, actividad enzimática y patogenicidad (Rivera, 2007).

4. DGGE

Las técnicas de identificación comúnmente empleadas en microorganismos consisten en el aislamiento y purificación de cepas presentes. Hoy en día se pueden emplear técnicas moleculares muy específicas para la identificación de microbiotas de distintos nichos ecológico, por medio de la secuenciación de ADN de cepas puras (Ercolini, 2004). Por esto, generalmente el ADN es amplificado por medio de la técnica conocida como

reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Carr y Moore, 2012). Pero también existen otras técnicas que permiten la identificación de poblaciones microbianas sin la necesidad de aislar y purificar las cepas, una de estas técnicas es la electroforesis en geles de gradientes desnaturizantes (DGGE) la cual separa los productos amplificados por PCR, basándose en las diferencias de su secuencia (Ercolini, 2004). Cada banda representa teóricamente un diferente microorganismo presente en un nicho ecológico, una vez obtenidas estas bandas, pueden ser retiradas del gel de poliacrilamida, re-amplificadas nuevamente y secuenciadas para identificar los organismos presentes en una muestra (Muyzer y Smalla, 1998).

4. 1. Definición y origen de la técnica.

La DGGE (del inglés: “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”) es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de agentes químicos desnaturizantes del ADN (una mezcla de urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante de 50-65 °C y los fragmentos de ADN de doble cadena migran por el gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida (concentración desnaturizante) a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe. La concentración desnaturizante a la cual las cadenas se separan depende de la secuencia de nucleótidos, es decir, del contenido de dobles o triples puentes de hidrogeno dependiendo de si son pares de bases adenina-timina o citosina-guanina (Myers et al. 1987). Así, fragmentos de ADN con secuencias nucleotídicas diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel. La técnica fue diseñada por Fischer y Lerman (1983), inicialmente para detectar mutaciones puntuales ya que se pueden separar fragmentos de ADN cuyas secuencias de nucleótidos difieren en una sola base nitrogenada (Muyzer y Smalla 1998). Posteriormente, a partir de los trabajos propuestos por Muyzer et al. (1993), los ecólogos microbianos adoptaron la técnica para el análisis de la estructura y dinámica de comunidades microbianas complejas. Así, en la actualidad, la DGGE tiene en la Ecología Microbiana su principal campo de aplicación. Hasta septiembre de 2010, existen clasificados en el sistema bibliográfico PubMed 2,818

publicaciones científicas internacionales con revisión de pares, que mencionan la utilización de la técnica DGGE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, consultado en octubre de 2010).

4. 2. Fundamentos teóricos.

El fundamento teórico de la DGGE radica en las propiedades fisicoquímicas de la molécula de ADN. Dicha molécula contiene dominios con temperaturas de fusión (T_m) características, de manera que cuando se alcanza una determinada temperatura (o concentración de un agente químico desnaturizante), la molécula se desnaturiza total o parcialmente, es decir, se separan las cadenas del ADN al romperse los puentes de hidrógeno que las mantienen unidas. Las temperatura de fusión de esos dominios depende de variaciones en sus secuencias de nucleótidos y, en general, los fragmentos de ADN ricos en guanina-citosina son más estables y sólo se desnaturizan en cadenas sencillas una vez que alcanzan altas temperaturas o concentraciones de un agente químico desnaturizante. El ambiente desnaturizante en la DGGE es asegurado a partir de las siguientes dos condiciones: 1) Sometiendo a las moléculas de ADN a una temperatura constante dentro del rango de 50-65 °C. Esta temperatura fue elegida empíricamente para exceder la T_m de un fragmento de ADN rico en adenina-timina en ausencia de agentes químicos desnaturizantes (Muyzer y Smalla 1998). 2) La presencia de urea y formamida que desnaturizan el ADN al formar puentes de hidrógeno con las bases nitrogenadas impidiendo el apareamiento normal de estas.

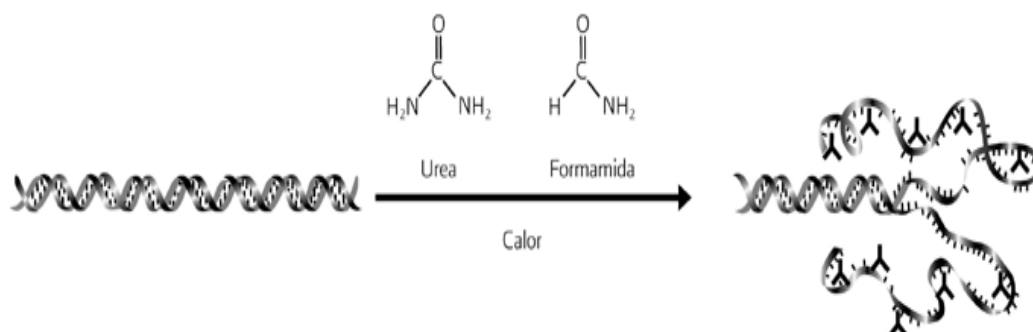


Figura 2. Desnaturización de la molécula de ADN con urea y formamida. La urea y la formamida interactúan directamente con las bases nitrogenadas, compitiendo con la formación de puentes de hidrógeno entre bases complementarias, con lo que impiden un apareamiento correcto entre ellas a temperaturas a las que normalmente estarían apareadas.

4. 3. Aspectos técnicos.

En la práctica, la DGGE consta de varias etapas experimentales cuyo resultado final es la obtención de un patrón de bandas que representa la huella molecular de la muestra analizada. De forma esquemática, el primer paso consiste en la extracción de ADN genómico a partir de la muestra a analizar. En una segunda etapa experimental, este ADN se utiliza como molde para la amplificación por PCR de un fragmento concreto de ADN. Así, se obtiene una mezcla de fragmentos de ADN representativos de todos los alelos presentes en la muestra, o bien, de todas las especies de microorganismos presentes, cuando se trata del análisis de comunidades microbianas. Todos estos fragmentos tienen el mismo tamaño, pero diferente secuencia de nucleótidos, por lo que serán separados en una DGGE, originando un patrón de bandas característico. Las bandas pueden ser identificadas mediante purificación de las mismas y secuenciación.

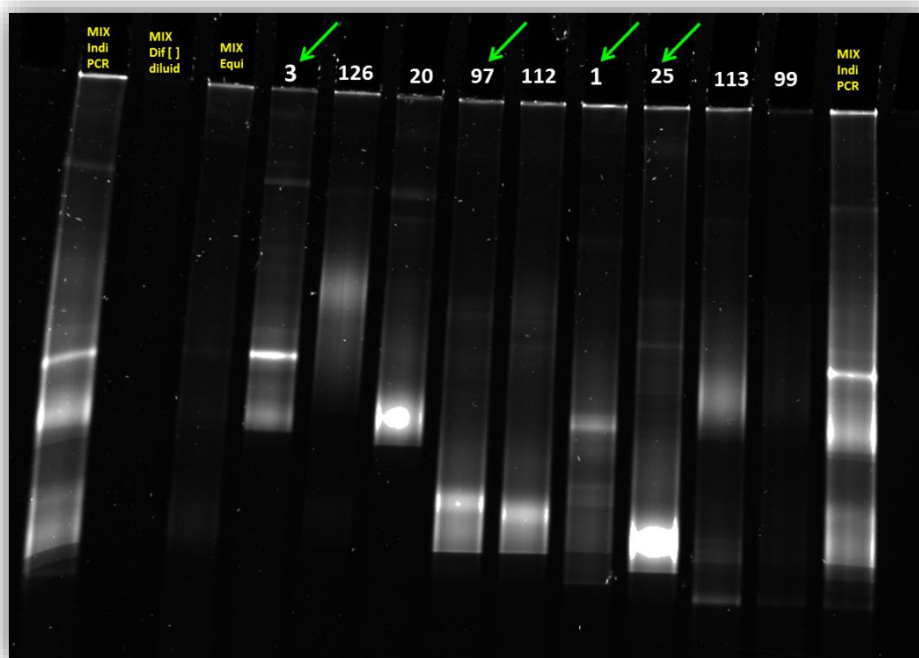


Figura 3. Patrones de bandas generados por la DGGE de 40% al 60% gel del 6%, 50V 58°C 18Hrs. Huella molecular obtenida por DGGE a partir del análisis cepas de hongos conocidas e identificadas molecularmente para la creación de un marcador de referencia, para el estudio de la estructura de comunidades microbianas del CMA. Fotografía tomada de BioRad 1999.

4. 4. Introducción de la grapa GC.

Ya que en un gel con gradiente desnaturizante la resolución óptima se consigue cuando las moléculas de ADN no se desnaturizan por completo, la amplificación por PCR de los fragmentos a analizar por DGGE requiere del uso de iniciadores modificados con la llamada “grapa GC”, que evita que las cadenas de ADN se separen por completo. Esta grapa es una secuencia de 30-50 pares de bases de guanina-citosina, que se añade al extremo 5' de uno de los iniciadores, coamplificándose con el segmento de ADN a analizar (Myers et al. 1987).

4. 5. Optimización de condiciones durante la electroforesis.

Las propiedades de desnaturización de los fragmentos de ADN que se someterán a análisis por DGGE se deben determinar previamente, para optimizar el gradiente desnaturizante y la duración de la electroforesis, de manera que los fragmentos se separen correctamente. Estas propiedades se pueden determinar experimentalmente mediante “geles perpendiculares”, en los que el gradiente desnaturizante es perpendicular a la dirección de la electroforesis, a diferencia de lo que ocurre en la DGGE convencional, en la que el gradiente desnaturizante es paralelo a la dirección de la electroforesis.

En la DGGE perpendicular, existe un solo carril en el que se cargan todos los fragmentos de ADN a analizar. Finalizada la electroforesis, se obtiene una curva con forma sigmoidea, en la que a baja concentración de desnaturizante los fragmentos migran como ADN de doble cadena, mientras que a concentraciones altas migran como cadenas sencillas. Las condiciones útiles son las intermedias, en las que las moléculas se desnaturizan parcialmente (Muyzer y Smalla 1998). El tiempo óptimo se determina mediante electroforesis con gradientes paralelos y es el que permite la máxima resolución entre los fragmentos de ADN (Muyzer y Smalla 1998).

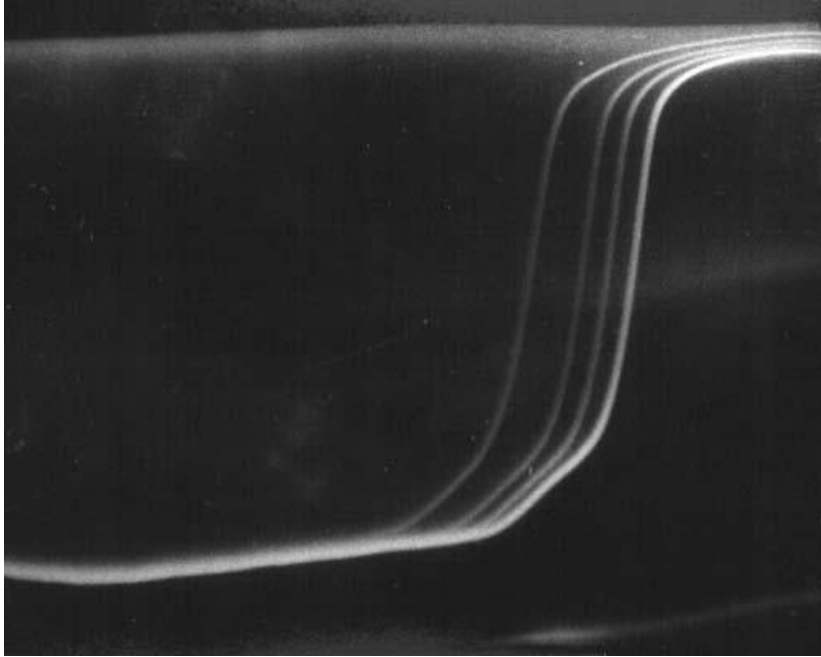


Figura. 4. Electroforesis perpendicular en gel de gradientes desnaturalizantes (DGGE) de 0 al 100%.
Perpendicular a la dirección de la electroforesis.

LITERATURA CITADA

- Anonymous. 1973. *A compendium of corn diseases*. Urbana, IL, USA, University of Illinois and Extension Service, United States Department of Agriculture Publication.
- Bajet NB, Renfro BL, Valdez C JM, 1994. Control of tar spot of maize and its effect on yield. *International Journal of Pest Management*, 40(2):121-125.
- Barry, D., Widstrom, N.W. & Darrah, L.L. 1992. Maize ear damage by insects in relation to genotype and aflatoxin contamination in preharvested maize grain. *J. Econ. Entomol.*, 85: 2492-2495.
- Bergquist, R.R. 1985. Inheritance estimates of resistance in maize (*Zea mays*) to gray leaf spot (*Cercospora zea-maydis*). *Abstr. Phytopath.*, 75: 1310.
- Bernardo, R., Bourrier, M. & Olivier, J.L. 1992. Generation means analysis of resistance to head smut in maize. *Agronomie*, 12: 303-306.
- Bjarnason, M. 1986. Progress in breeding for resistance to the maize streak virus disease. In B. Gelaw, ed. *To Feed Ourselves. Proc. 1st Eastern, Central and Southern Africa Reg. Maize Workshop*, Lusaka, Zambia, p. 197-207. Mexico, DF, CIMMYT.
- Bojanowski, J. 1969. Studies of inheritance of reaction to common smut in corn. *Theor. Appl. Genet.*, 39: 32-42.
- Bruns T D, M Gardes (1993) Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi: taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. *Molec. Ecol.* 2:233-242.
- Bubeck, D.M., Goodman, M.M., Beavis, W.D. & Grant, D. 1993. Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. *Crop Sci.*, 33: 838-847.

- Carr A. C., Moore S.D. 2012. Robust quantification of polymerase chain reactions using global fitting, *PLoS ONE*. 7, 5, 37-64.
- Carson, M.L. & Hooker, A.L. 1981. Inheritance of resistance to anthracnose leaf blight in five inbred lines of corn. *Phytopathology*, 71: 488-491.
- Ceballos H, Deutsch JA, 1992. Inheritance of resistance to tar spot complex in maize. *Phytopathology*, 82(5):505-512.
- Chang, S.C. 1972. Breeding for sugarcane downy mildew resistance in corn in Taiwan. In *Proc. 8th Inter-Asian Corn Improv. Workshop*, p. 114-115. New Delhi, The Rockefeller Foundation.
- CIMMYT, 2003. Maize Diseases: A guide for field identification. 4th Edition., Mexico: International Maize and Wheat Improvement Center, 119 pp. http://www.cimmyt.org/english/docs/field_guides/maize/pdf/mzDis_foliar.pdf
- CIMMYT. 1994. *1993/94 world maize facts and trends*. Mexico, DF.
- Dalby NE, 1917. Phyllachora as the cause of a disease of corn, and a general consideration of the genus Phyllachora. *Transactions of the Illinois State Academy of Science*, 120:230-238.
- De León, C. & Pandey, S. 1989. Improvement of resistance to ear and stalk rots and agronomic traits in tropical maize gene pools. *Crop Sci.*, 29: 12-17.
- De León, C. 1983. Conceptos fitopatológicos en el mejoramiento de poblaciones de maíz. In *Proc. 10th Reunión de Especialistas en Maíz de la Zona Andina*, Santa Cruz, Bolivia. Cali, Colombia, CIMMYT.
- De León, C. 1984. *Maize diseases, a guide for field identification*. Mexico, DF, CIMMYT.

- De León, C., Ahuja, V.P., Capió, E.R. & Mukerjee, B.K. 1993. Genetics of resistance to Philippine downy mildew in three maize populations. *Indian J. Genet. Pl. Breed.*, 53: 406-410.
- Dittrich U, Hock J, Kranz J, Renfro BL, 1991. Germination of *Phyllachora maydis* ascospores and conidia of *Monographella maydis*. *Cryptogamic Botany*, 2(2-3):214-218.
- Dittrich, U., Hock, J. & Kranz, J. 1991. Germination of *Phyllachora maydis* ascospores and conidia of *Monographella maydis*. *Cryptogamic Bot.*, 2/3: 214-218.
- Diwakar, M.C. & Payak, M.M. 1975. Germplasm reaction to *Pythium* stalk rot of maize. *Indian Phytopath.*, 28: 548-549.
- Dodd, J.L. 1980. The role of plant stresses in development of corn stalk rots. *Plant Dis.*, 64: 533-537.
- Donahue, P.J., Stromberg, E.L. & Myers, S.L. 1991. Inheritance of reaction to gray leaf spot in a diallel cross of 14 maize inbreds. *Crop Sci.*, 31: 926-931.
- Draganic, M. & Boric, B. 1991. Survey of studies on maize resistance to stalk and ear rot pathogens in Yugoslavia. *Zastita Bilja*, 42: 173-182.
- El-Itriby, H.A., Khamis, M.N., El-Demerdash, R.M. & El-Shafey, H.A. 1984. Inheritance of resistance to late-wilt (*Cephalosporium maydis*) in maize. In *Proc. 2nd Medit. Conf. Genet.*, Cairo, Egypt, p. 29-44. Cairo, Mediterranean Congress of Genetics.
- Ercolini D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: Novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol, Meth.* 56, 297-314.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United National). 2016. Paliwal R.L. El Maíz En Los Trópicos: Mejoramiento y producción. Introducción al maíz y su importancia. Roma 2001. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s02.htm>

FAO (Food and Agriculture Organization of the United National). 2013. El Consejo Internacional de Cereales baja la estimación de cosecha global de trigo. Agronoticias, America Latina y el Caribe, FAOSTAT.

Fischer S.G. y L.S. Lerman. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 1579-1583.

Flores, O.A., Martínez, S.J.P. y Martínez, E.A.D. 1997. Uso de nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. *Fitopatología* 32:96-111.

Frederiksen, R.A. & Odvody, G. 1979. Chemical control of sorghum downy mildew. *Sorghum Newsl.*, 22: 129.

Frederiksen, R.A. & Renfro, B.L. 1977. Global status of maize downy mildew. *Ann. Rev. Phytopath.*, 15: 249-275.

Frederiksen, R.A. 1977. Head smuts of corn and sorghum. In H.D. Loden & D. Wilkinson, eds. *Proc. 32nd Ann. Corn and Sorghum Ind. Res. Conf.*, Chicago, Illinois, p. 89-105. Washington, DC, ASTA.

Gardes M, T J White, J A Fortin, T D Bruns, J W Taylor (1991) Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69:180-190.

Gendloff, E.H., Rossman, E.C., Casale, W.L., Isleib, T.G. & Hart, L.P. 1986. Components of resistance to Fusarium ear rot in field corn. *Phytopathology*, 76: 684-688.

- Gonzalez C., M, Gomez M, N.O., Pereyda H., J., Cañedo C., J., Reza A., R., Manjarrez S., M y Murillo N., P. 2004- Daños y medidas de control del “complejo Mancha de asfalto” del maíz. Desplegable Técnica No. 5. Centro de Investigación Regional del Pacifico Sur, Campo Experimental Iguala, Iguala Gro.
- González, F.C., Vasal, S.K., Srinivasan, G. & Eaton, D.L. 1992. *Progress from selection for Tarspot resistance in four CIMMYT populations*. Abstract, Int. Crop Sci. Cong. I, Ames, IA, USA.
- Gorman, D.P., Kang, M.S. & Cleveland, T. 1992. Combining ability for resistance to field aflatoxin accumulation in maize grain. *Plant Breed.*, 109: 296-303.
- Halseth, D.E., Pardee, W.D. & Viands, D.R. 1991. Inheritance of resistance to *Helminthosporium carbonum* race 3 in maize. *Crop Sci.*, 31: 612-617.
- Hart, L.P., Gendloff, E.H. & Rossman, E.C. 1984. Effect of corn genotype on ear rot infection by *Gibberella zeae*. *Plant Dis.*, 68: 296-298.
- Hassan, R., Ransom, J.K. & Ojiem, J. 1995. The spatial distribution and farmers strategies to control Striga in maize: survey results from Kenya. In D.C. Jewell, S.R. Waddington, J.K. Ransom & K.V. Pixley, eds. *Maize Research for Stress Environ-ments. Proc. 4th Eastern and Southern Africa Reg. Maize Conf.*, Harare, Zimbabwe, 1994, p. 250-254. Mexico, DF, CIMMYT.
- Henrion B, F Le Tacon, F Martin (1992) Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* 122:289-298.
- Hock J, 1991. [English title not available]. (Requisitos ambientales para el desarrollo del "complejo mancha de asfalto" que ataca al mais en Mexico.) *Phytopathology*, 81:693.

- Hock J, Dittrich U, Renfro BL, Kranz J, 1992. Sequential development of pathogens in the maize tar spot disease complex. *Mycopathologia*, 117(3):157-161.
- Hock J, Kranz J, Renfro BL, 1995. Studies on the epidemiology of the tar spot disease complex of maize in Mexico. *Plant Pathology*, 44(3):490-502.
- Hock J, Kranz J, Renfro BL. 1989. El complejo “mancha de asfalto” de maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*; 7: 129-135.
- Hooker, A.L. 1977. A second major gene locus in corn for chlorotic lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. *Crop Sci.*, 17: 132-135.
- Hooker, A.L. 1978. Genetics of disease resistance in maize. In D.B. Walden, ed. *Maize breeding and genetics*, p. 319-332. New York, NY, USA, J. Wiley & Sons.
- Irrdb (2007) ‘*Colletotrichum* leaf fall.’ (International Rubber Research and Development Board: Kuala Lumpur) Available at <http://www.irrdb.com/IRRDB/NaturalRubber/Diseases/clf.htm> [Verified 16 January 2008].
- Jiang, X.Q., Meinke, L.J. & Wright, R.J. 1992. Maize chlorotic mottle virus in Hawaiian-grown maize: vector relations, host range and associated viruses. *Crop Prot.*, 11: 248-254.
- Kaneko, K. & Aday, B.A. 1980. Inheritance of resistance to Philippine downy mildew of maize, *Peronosclerospora philippinensis*. *Crop Sci.*, 20: 590-594.
- Khan, A.Q. & Paliwal, R.L. 1979. Inheritance of stalk rot resistance in maize. *Indian J. Genet. Pl. Breed.*, 39: 139-145.

- Khan, A.Q. & Paliwal, R.L. 1980. Combining ability for stalk rot resistance in maize. *Indian J. Genet. Pl. Breed.*, 40: 427-431.
- Kim, S.K. & Adetimirin, V.O. 1995. Overview of tolerance and resistance of maize to *Striga hermonthica* and *S. asiatica*. In D.C. Jewell, S.R. Waddington, J.K. Ransom & K.V. Pixley, eds. *Maize Research for Stress Environments. Proc. 4th Eastern and Southern Africa Reg. Maize Conf.*, Harare, Zimbabwe, 1994, p. 255-262. Mexico, DF, CIMMYT.
- Kim, S.K. & Brewbaker, J.L. 1977. Inheritance of general resistance in maize to *Puccinia sorghi* Schw. *Crop Sci.*, 17: 456-461.
- Kim, S.K. 1994. Genetics of maize tolerance of *Striga hermonthica*. *Crop Sci.*, 34: 900-907.
- Kim, S.K., Efron, Y., Fajemisin, J.M. & Buddenhagen, I.W. 1989. Mode of gene action for resistance in maize to maize streak virus. *Crop Sci.*, 29: 890-894.
- Krueger, W. 1991. Investigations into the relationship between root and stalk rot of maize. *Zeitschrift fuer Pflanzenk. und Pflanzens.*, 98: 39-46.
- Lal, B.B. & Chakravarti, B.P. 1977. Root and collar inoculation and control of brown spot of maize by post-infection spray and soil application of systemic fungicides. *Plant Dis. Rep.*, 61: 334-336.
- Latterell, F.M. & Rossi, A.E. 1983. Gray leaf spot of corn: a disease on the move. *Plant Dis. Rep.*, 67: 642-847.
- Liu L-J, 1973. Incidence of tar spot disease of corn in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 42(3):211-216.
- Lu, H.S., Tsai, W.H., Shieh, G.J. & Ho, C.L. 1990. *J. Agric. Res. China*, 39: 269-276.

- Maublanc A, 1904. [English title not available]. (Especies nouvelles de champignons inferieurs.)
Bulletin de la Societe Mycologique de France, 20:70-74.
- Mercado, A.C. & Lantican, R.M. 1961. The susceptibility of cytoplasmic male sterile lines of corn to *Helminthosporium maydis* Nisikado & Miv. *Philipp. Agric.*, 45: 235-243.
- Mihail JD, McGraw RL, Verslues PE, Taylor SJ (1997) Episodic dynamics of tar spot of annual *Lespedeza* within and among years. *Plant Disease* 81, 535–540. doi: 10.1094/PDIS.1997.81.5.535
- Müller E, Samuels GJ, 1984. *Monographella maydis* sp. nov. and its connection to the tar-spot disease of *Zea mays*. *Nova Hedwigia*, 40(1/4):113-121.
- Muyzer G. y K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 127-141.
- Muyzer G., E.C. De Waal y A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer G., K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie van Leeuwenhoek*. 73, 1, 127-141.
- Myers R.M., T. Maniatis y L.S. Lerman. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel-electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155: 501-527.
- Odhiambo, G.D. & Ransom, J.K. 1995. Long term strategies for *Striga* control. In D.C. Jewell, S.R. Waddington, J.K. Ransom & K.V. Pixley, eds. *Maize Research for Stress*

Environments. Proc. 4th Eastern and Southern Africa Reg. Maize Conf., Harare, Zimbabwe, 1994, p. 263-260. Mexico, DF, CIMMYT.

Parbery DG, 1963. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Fckl. I. Ascospores-their liberation and germination. *Australian Journal of Botany*, 2(2):117-130.

Parbery DG, 1963. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Fckl. I. Ascospores-their liberation and germination. *Australian Journal of Botany*, 2(2):117-130.

Parbery DG, 1963. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Fckl. II. Invasion of the host and development of the fungus. *Australian Journal of Botany*, 2(2):131-140.

Parbery DG, 1967. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Nke. in Fckl. A taxonomic monograph. *Australian Journal of Botany*, 15:271-375.

Parbery DG, Langdon RFN, 1963. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Fckl. III. The relationship of certain scolecospores to species of *Phyllachora*. *Australian Journal of Botany*, 11:141-151.

Pereyda-Hernández, Juan, Hernández-Morales, Javier, Sandoval-Islas, J. Sergio, Aranda-Ocampo, Sergio, de León, Carlos, & Gómez-Montiel, Noel. (2009). Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia*, 43(5), 511-519.

Piñero, D., Barahona Ana, Eguiarte Luis, Rocha Olivares Axayácatl, Salas Lizana Rodolfo. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 415-435

Poehlman, J.M. 1987. *Breeding field crops*, 3rd ed. Westport, CT, USA, AVI Publishing.

- Ransom, J.K., Eplee, R.E. & Palmer, A.F.E. 1990. Estimates of the competitive and phytotoxic effects of *Striga* on maize. *Agron. Abstr.*, p. 61.
- Reeves, R.G. & Mangelsdorf, P.C. 1942. A proposed taxonomic change in the tribe Maydeae. *Am. J. Bot.*, 29: 815-817.
- Reifschneider, F.J.B. & Army, D.C. 1983. Yield loss of maize caused by *Kabatiella zae*. *Phytopathology*, 73: 607-609.
- Renfro, B.L. & Bhat, S. 1981. Role of wild hosts in downy mildew diseases. In D.M. Spencer, ed. *Downy mildew diseases*, p. 107-119. New York, NY, USA, Academic Press.
- Renfro, B.L. 1985. Breeding for disease resistance in tropical maize and its genetic control. In A. Brandolini & F. Salamini, eds. *Breeding strategies for maize production improvement in the tropics*, p. 341-365. Rome, FAO, Florence, Italy, Istituto Agronomico per L'Oltremare.
- Reynaud, B., Guinet, I. & Marchand, J.L. 1988. IRAT/CIRAD breeding programme for virus resistance. In *Towards Self Sufficiency. Proc. 2nd Eastern, Central and Southern Africa Reg. Maize Work-shop*, p. 112-136. Harare, CIMMYT.
- Rivera Coto Germán. 2007. Conceptos Introductorios a la Fitopatología. 1ª reimp. De la 1ª ed. Editorial Universidad Estatal a Distancia. ISBN 9968-31-042-5. San José, Costa Rica. Pp 61-63: 346
- Rodríguez Tovar Aída, Xoconostle Cásarez Beatriz, Valdés María. 2004. Ecología Molecular de los Hongos Ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, julio-septiembre, año/vol. 27, número 003. Chapingo, México pp. 267-278.
- Saxena, K.M.S. & Hooker, A.L. 1974. A study on the structure of gene Rp3 for rust resistance in *Zea mays*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 16: 857-860.

- Scott, G.E., King, S.B. & Armour, J.W., Jr. 1984. Inheritance of resistance to southern corn rust in maize populations. *Crop Sci.*, 24: 265-267.
- Shehata, A.H. 1976. Gene action involved in the manifestation of late-wilt (*Cephalosporium maydis*) of maize. *Egypt. J. Genet. Cytol.*, 5: 42-47.
- Shiferaw Bekele, Prasanna Boddupalli M., Hellin Jonathan, Bänziger Marianne. 2011. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Sec.* 3:307–327 DOI 10.1007/s12571-011-0140-5.
- Singburadom, N. & Renfro, B.L. 1982. Heritability of resistance in maize to sorghum downy mildew (*Peronoscleros-pora sorghi* (Weston and Uppal) C.G. Shaw). *Crop Prot.*, 1: 323-332.
- Siradhana, B.S., Dange, S.R.S., Rathore, R.S. & Singh, S.D. 1978. Ontogenic predisposition of *Zea mays* to sorghum downy mildew. *Plant Dis. Rep.*, 62: 467-468.
- Smith, D.R. & White, D.G. 1988. Diseases of corn. In G.F. Sprague & J.W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3rd ed., p. 687-766. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy.
- Storey, H.H. & Howland, A.K. 1967. Transfer of resistance to the streak virus into east African maize. *East Africa Agric. Forest. J.*, 33: 131-135.
- Thaung M. M. 2008. Pathologic and taxonomic analysis of leaf spot and tar spot diseases in a tropical dry to wet monsoon ecosystem of lowland Burma. *Australasian Plant Pathology Society*, 37, 180–197.
- Thompson, D.L. & Bergquist, R.R. 1984. Inheritance of mature plant resistance to *Helminthosporium maydis* race O in maize. *Crop Sci.*, 24: 807-811.

- Ullstrup, A.J. 1976. Highlights in corn pathology during the past half-century. *9th Ann. Brazilian Phytopath. Soc. Meeting Proc.*, p. 113-122. Brasilia, Brazilian Phytopath. Society.
- Ullstrup, A.J. 1977. Diseases of corn. In G.F. Sprague, ed. *Corn and corn improvement*, p. 391-500. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy.
- Ullstrup, A.J. 1978. Evolution and dynamics of corn diseases and insect problems since the advent of hybrid corn. In D.B. Walden, ed. *Maize breeding and genetics*, p. 283-317. New York, NY, USA, J. Wiley & Sons.
- Vasal SK, Srinivasan G, Cordova H, Pandey S, Jeffers D, Bergvinson D, Beck D, 1999. Inbred line evaluation nurseries and their role in maize breeding at CIMMYT. *Maydica*, 44(4):341-351.
- Vasal, S.K., González, F. & Srinivasan, G. 1992. Genetic variation and inheritance of resistance to the "Tar Spot" disease complex. *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 66: 74.
- Wallin, J.R., Widstrom, N.W. & Fortnum, W.A. 1991. Maize population with resistance to field contamination by aflatoxin B-1. *J. Sci. Food Agric.*, 54: 235-238.
- Wellman, F.L. 1972. *Tropical American plant disease (neotropical phytopathology problems)*. NJ, USA, The Scarecrow Press.
- Widstrom, N.W., McWilliams, W.W. & Wilson, D.M. 1984. Contamination of preharvest corn by Aflatoxin. In H.D. Loden & D. Wilkinson, eds. *Proc. 39th Ann. Corn and Sorghum Ind. Res. Conf.*, Chicago, Illinois, p. 68-83. Washington, DC, ASTA.
- Williams, R.J. 1984. Downy mildews of tropical cereals. *Adv. Plant Pathol.*, 2: 1-87.
- Zuber, M.S., Anisworth, T.C., Blanco, M.H. & Darrah, L. 1981. Effect of anthracnose leaf blight on stalk rind strength and yield in F1 crosses in maize. *Plant Dis.*, 65: 719-722.

Zuber, M.S., Lillehoj, E.B. & Renfro, B.L., eds. 1987. *Aflatoxin in Maize. A Proc. of the Workshop*. Mexico, DF, CIMMYT.

CARTA DE ACEPTACIÓN

Rv: AJPS: Acceptance Notification [ID: 2602586]

Dra. Yisa Maria Ochoa Fuentes

09:38 a.m.

Para: Erika Natalia Rios



El Martes, 23 de febrero, 2016 2:14:59, "ajps@scirp.org" <ajps@scirp.org> escribió:

Dear Author(s),

We are writing with our great pleasure to let you know that your manuscript is accepted for publishing by our journal American Journal of Plant Sciences (AJPS) and our heartfelt appreciation for your intellectual contribution.

Paper ID: 2602586

Paper Title: First Report on the presence of Phyllachora sp in corn crops at Toluca, Estado de Mexico

Your paper is ready to be published. To move on to the next step, could you please kindly complete the following steps **within 7 days** from today:

Step 1: Sign the Copyright Form

Step 2: Finish Payment for Article Processing Fee **\$999** and Fill the Remittance Information (**The payment information shown in your user center is the only correct and certified information; please do not be misled by other uncertified payment notification.**)

Step 3: Revise and Format Your Paper in Our Template, and Upload revised version in MS Word through Submission System. Please highlight the revisions in red color in the update version. (The template and review result can be found in our system)

Please login to the system using your login name and password:

<http://papersubmission.scirp.org/login.jsp?journalID=40>

to view all the information.

Additionally, please send the camera-ready file via email if the size of your file is more than 4MB.

If you have any questions, please feel free to contact us.

Best

regards,

Editorial
Scientific
Email:

<http://www.scirp.org/journal/ajps>

Assistant

Research

of

AJPS
Publishing
ajps@scirp.org

© 2016 Microsoft

[Términos](#)

[Privacidad y cookies](#)

[Desarrolladores](#)

[Español](#)

First Report on the Presence of *Phyllachora* sp. in Corn Crops at Toluca, Estado de Mexico

Erika Natalia Ríos-Herrera¹, Laila Pamela Partida-Martínez², Yisa María Ochoa-Fuentes^{3*}, Ernesto Cerna-Chávez³, Francisco Daniel Hernández-Castillo³, Alberto Flores-Olivas³, Víctor Olalde-Portugal⁴, Raúl Rodríguez-Guerra⁵

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México

²Department of Genetic Engineering, CINVESTAV, Irapuato, México

³Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México

⁴Department of Biotechnology and Biochemistry, CINVESTAV, Irapuato, México

⁵General Terán, INIFAP, General Terán, Nuevo León, México

Received 14 February 2016; accepted 27 March 2016; published 30 March 2016

Copyright © 2016 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Abstract

Symptoms of Tar Spot Complex (TSC) in corn appear in the form of black spots surrounded by a chlorotic halo known as fish-eye. The crop with these symptoms was found at San Pablo Autopan, Estado de Mexico. The stromal region of foliar lesions was cut longitudinally, showing perithecia, asci and ascospores typical of *Phyllachora maydis*. The results were confirmed by PCR-ITS with ITS 1 and ITS4 initiators, cloned by pJET, before being sequenced and compared against NCBI's data base. *Phyllachora* identity was confirmed. This is the first report where TSC pathogen has been detected under conditions that had not been previously reported, for instance, at 2600 meters above the sea level.

Keywords

Phyllachora maydis, Tar Spot Complex, ITS

1. Introduction

Corn ranks first as the cereal with higher yield per hectare, and ranks second in total production, after wheat. Corn has great economic importance worldwide as food source, feed and raw material for industrial products. Corn adapted faster to moderate climate regions, which represent 40% of the planted surface area, and 60% of global production. Average yield at moderate climate conditions is significantly higher than in tropical areas. Diversity of the environments, where corn is grown, is greater than for any other crop. However, the growing season of corn cropped in moderate climate regions is longer than in tropical regions, and the relative daily yield of tropical corn is similar to the yields obtained from corn grown in moderate climate. There are few exceptions, in which tropical corn productivity can be compared with the yields obtained in moderate climate; such as corn grown in winter time at tropical regions. Corn grown in tropical environments is subject to the attack of large numbers of pathogens, leading to major economic losses. Paliwal *et al.* [1] have reported 130 tropical corn diseases, compared to 85 diseases that affect corn grown in moderate climate.

In Mexico, corn's tar spot is considered a major disease in tropical regions due to its impact on yield. Foliarblight can appear in less than eight days, by the coalescence of fungal lesions and toxin production. Some additional factors promoting this disease are: high environmental humidity; 10 to 20 cloudy days in a month; high rates of nitrogen fertilization; two corn crops a year; susceptible genotypes; low luminosity; highly vulnerable host's age and virulence of involved pathogens [2].

Tar spot is caused by the interaction of *Phyllachora maydis* and *Monographella maydis*. Furthermore, *Coniothyrium phyllachorae*, a parasitic microorganism, associated to *P. maydis*, *M. maydis* and responsible for the "fish-eye" condition linked to the necrotic spot

at the center of the lesions has also been found. This complex was first described for Mexican corn in 1904; however it has also been found in Bolivia, Colombia, Costa Rica, Dominican Republic, Guatemala, Panama, Peru, Puerto Rico and Venezuela. Tar spot has also been reported in Ecuador, El Salvador and Haiti [3]. Sampling procedures conducted in 1985 and 1988 in Mexico revealed high incidence and severe corn damage in Jalisco, Michoacan, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca and Chiapas, which affected almost 500,000 corn hectares, causing losses of up to 50%, since the crops were infected before blooming [2]. From 2001 to 2005, about 40% of the 3100 corn hectares established at Mochitlan Valley, Guerrero were affected by the disease, leading to severe grain yield losses. In 2005, 600 ha were reported totally lost at Tixtla municipality, Guerrero; and by 2007, the disease had already impacted more than 10 municipalities at Guerrero (González *et al.*, 2008). Tar spot causing agents have been detected at Mochitlan Valley and other municipalities of Guerrero state, Mexico, including: *Phyllachora maydis* Maubl, *Monographella maydis* Müller & Samuels and *Coniothyrium phyllachorae* Maubl, where the disease caused losses of 55.1% in 81 hybrids and 25 open-pollinated corn cultivars that were sampled [4].

Due to the problems caused by the disease, as well as the presence of the related disease complex in Mexico's subtropical region, the goal was to: report for the first time the presence of tar spot in corn grown at San Pablo Autopan, Toluca, Estado de Mexico, located at more than 2660 meters over the sea level with sub-humid moderate climate and mean annual temperature of 13.7°C.

2. Methods and Materials

2.1. Plant Material Collection

50 samples corn leaves from San Pablo Autopan, Estado de Mexico were collected in 2014 fall-winter crop season, at 19°38'9.41" latitude and 99°42'9.82" longitude. The samples were collected ten days after the first symptoms appeared, focusing on plants showing dark stromal lesions with smooth and glossy aspect, oval or circular shape and 0.5 to 2.0 mm in diameter [4] (**Figure 1**). The leaves were dried and pressed at ambient temperature inside paper bags, to preserve them for testing. The level of damage and severity of fungi associated to TSC were assessed using the scale described by Ceballos and Deutsch, 1992; Hock *et al.*, 1992, shown in the following **Table 1**.

2.2. Sample Preparation

Plant material was washed with 5% sodium hypochlorite solution and 2 drops of tween per every 100 mL of water. The material was left standing for 5 minutes before being introduced in a Vortex for one minute. The washing solution was discarded and the washing procedure with hypochlorite solution was repeated three times. The material was rinsed with sterile water before decanting. As a control check, 100 µL of the last rinsing water was plated and incubated for 12 to 18 hours. Finally, the tissue was dried in a laminar flow hood, using absorbent sterile paper.



Figure 1. Corn leaf sample with *Phyllachora* and fish-eye symptoms.

Table 1. Severity scale of tar spot complex in corn (Ceballos and Deutsch, 1992; Hock *et al.*, 1992).

Clase†	<i>P. maydis</i> (No. de lesiones)	<i>M. Maydis</i> (% de área foliar enferma)
0	0 - 0.9	0 - 0.9
1	1 – 100	1.0 - 8.0
2	101 – 400	8.1 - 16.0
3	401 – 1000	16.1 - 24
4	1001 – 2700	24.1 - 32.0
5	2701 – 4000	32.1 - 40.0

†Each class is represented in one third of every leaf's length, in the center.

2.3. Morphological Identification of *Phyllachora* Genus

Stromal lesions were cut and scrapped, slicing them at the stereoscopic microscope's slide, before adding one drop of blue catophenol, in order to observe them at the compound microscope under 10, 40 and 100× fields.

2.4. Genomic DNA

The genomic material for amplification was obtained following DNA's extraction protocol proposed by Wai Kwong Ma [5], using Griffiths *et al.* [6], Kowalchuk *et al.* [7], and Schwarzott and Schussler [8] methods. Stromal lesions were scrapped and 100 μL of sodium hypochlorite solution at 1% (p/v) were added, before stirring inside the Vortex at maximum speed, two times for 30 seconds, followed by centrifugation at 600 rpm/3 min. The liquid was extracted and washed with 100 μL of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ethylenediamine-tetra-acetic acid [EDTA]), centrifuging again at 600 rpm/3min and repeating the washing cycle with sodium hypochlorite solution. TE excess was eliminated. Three crushing/liquid-nitrogen chilling/thawing cycles were performed on the lesions and the material was suspended in 60 μL of TE. An equal volume of phenol was added:chloroform:isoamyl alcohol (24:24:1) before stirring in a Vortex unit for 30 s two times, at maximum speed. The material was centrifuged for 3 min at 3000 $\times\text{g}$. The aqueous phase was extracted and the samples were kept on ice. An equal volume of TE was added to the tube with phenol and the aqueous phase: chloroform: isoamyl alcohol, and the extraction procedure was repeated to increase the yield. In order to eliminate phenol from the aqueous phase, an equal volume of chloroform was added:isoamyl alcohol (24:1) and the tube was placed up-side-down for 10 s, before centrifuging for 3 min at 3000 $\times\text{g}$. The aqueous phase was introduced again in a new tube with two volumes of the solution at 30% (p/v), polyethylene glycol at 4000 and 1.6 M NaCl. The material was incubated at ambient temperature during two hours to precipitate the DNA. Precipitated DNA was centrifuged at 14,000 $\times\text{g}$ for 10 min to achieve sedimentation. The supernatant was eliminated and the sediments were washed with 100 μL ethanol at -20°C at 70% (v/v).

Ethanol was decanted and the resulting tablet was left to dry for 10 min. Lastly the tablet was suspended in 30 μL of distilled, sterile, deionized water. The DNA was quantified and submitted to observation in agarose gel at 1%.

2.5. Amplification by ITSs (PCR)

Genomic DNA was amplified through ITS1 and ITS4 internal transcribed regions between ribosomal genes (rDNA) 18S-5.8S and 5.8S-28S, using oligo pairs ITS1 (KIO Fw 5'-TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA-3'), and ITS4 (KIO Rv 5'-TCCTCCGCTTWTGWTGTC-3'). Each sample contained Buffer 10x + MgCl₂ 2.5 μL ; dNTP's 10 mM 1 μL ; ITS1 a 10 μM , 1 μL ; ITS4 10 μM , 1 μL ; Taq polymerase 1U 0.2 μL . Problematic DNA was adjusted at 40 ng/ μL , 1.5 μL ; and 17.8 μL of ultra-pure sterile water was added to adjust the final volume at 25 μL . The conditions of the PCR reaction were: 1 cycle of initial denaturation at 95°C for 3 minute; 35 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds; 35 cycles of aligning at 48°C for 15 seconds; 35 cycles of extension at 72°C for 45 seconds and 1 cycle of final extension at 72°C for 7 min. The positive check included full DNA of <fungi isolated from strawberry plants (*Fragaria x ananassa*). The amplification was observed in agarose gel at 1% through electrophoresis at 60 V, **Figure 2**.

2.6. Cloning

Cloning had four stages: binding, transformation, extraction of plasmid DNA and digestion. In the first stage the PCR product was introduced in a vector like Pjet 1.2. Later, the component cells were transformed through thermal shock. Amplified PCR products were bound to pJET 1.2 vector (Thermo Scientific). In compliance with the manufacturer's instructions, we continued transforming *Escherichia coli* DH5a competent cells. The transformed cells were plated in LB agar with Carbenicillin (100 mg/L), using three plating dilutions at 50, 100 and 250 μ L that were incubated from 13 to 16 h, at 37° C. After the incubation time, 10 colonies from the plate with large, white isolated colonies were selected at random. An inoculation loop was introduced to those colonies, maintaining a backup sample in a plate with LB and antibiotic; while the colonies were cultured all night, in a tube with LB liquid medium, supplemented by Carbenicillin (100 mg/L) at 37°C. Plasmid DNA was extracted from the bacterial growth. Lastly, Plasmid DNA was digested, using Bgl II enzyme, according to the manufacturer's protocol. The digestion process in agarose gel at 1% was observed in [Figure 3](#), in order to confirm the presence of positive clones, before sending the material to be sequenced.

3. Results and Discussions

3.1. Morphological Identification

At San Pablo Autopan in Toluca, Estado de Mexico, 85% of corn plants presented Tar Spot Complex symptoms, which appeared between 40 and 50 days after planting under field conditions. [Table 1](#) shows sampled plants

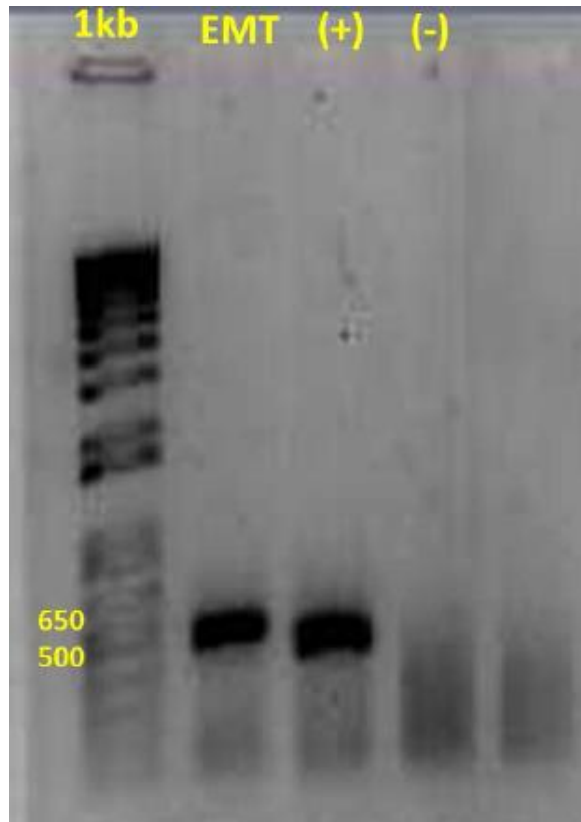


Figure 2. Agarose gel at 1%. The first lane has been marked with the molecular weight, followed by the samples, as well as the positive and negative control checks.

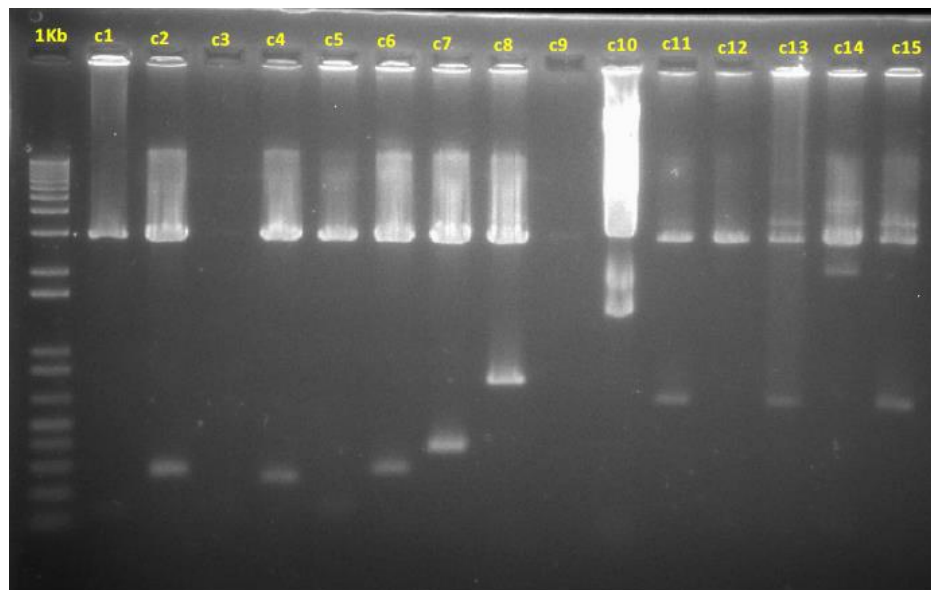


Figure 3. Electrophoresis of agarose gel at 1% in order to observe the selected colonies and their digestion of plasmid DNA.

that were classified according to the severity scale as Class 2 plants, with 40% of Foliar Diseased Area (FDA). The plants showed tar spot symptoms caused by *Phyllachora maydis* in the initial stage, including: dark risen stromal lesions of smooth and glossy aspect, circular or oval shape and 0.5 to 2.0 mm in diameter, forming striations of up to 10 mm in length. The most recent study in 2009 reported losses of 55.1% in hybrid materials; whereas non-official reports have reported 100% crop losses [4]. Asci are cylindrical, with short elongated pedicels ($180 - 100 \times 8.10 \mu$), and eight more-or-less ellipsoidal hyaline ascospores without septa, arranged in mono-serial positions, measuring in average $10.5 \times 6 \mu$ [9], as it's shown in **Figure 2**. TSC is induced by pathogen *Phyllachora maydis* Maubl. However, at least other two organisms can be found at TSC lesions: *Monographella maydis* Muller & Samuels, and *Coniothyrium phyllachorae* Maubl. *M. maydis* is commonly found at the surface of corn leaves, without any apparent reaction of corn plants. *M. maydis* produces necrotic, elliptical brownish-gray halos around *Phyllachora maydis* lesions. Currently, the effect of *C. phyllachorae* is not completely known, but it seems to be hyperparasitic of *P. maydis*. However, *C. phyllachorae* is not frequently found in TSC lesions, like the other two organisms [10] (**Figure 4**).

3.2. Molecular Identification

The sequences of EMT (Estado de Mexico, Toluca) sample clones showed the presence of *Phyllachorales* sp, with access key KM108581.1, proving 87% identity and confirming the results of morphological identification. Hock *et al.* [2] established that the optimal

conditions for the development of tar spot symptoms are the following: 17°C - 22°C mean average monthly temperatures, with at least 7 hours of foliar moisture every night and relative humidity > 75%; or 10 to 20 foggy days a month; or minimum monthly rainfall of 150 mm, and between 1800 to 1900 hours of sunlight a year. In addition, CIMMYT has stated that TSC is commonly found in moderately cool and humid mountain regions, both tropical and subtropical, at 1300 - 2300 meters above the sea level [11]. These were TSC's thriving conditions that had been documented until now. This research work is the first one in recording the presence of fish-eye symptoms, as well as the first report in confirming at morphological and molecular levels the presence of *Phyllachora maydis* under a different set of conditions; as demonstrated by the samples from San Pablo Autopan, Estado de Mexico, located at 19°21'26"N 99°39'27"O and 2609 meters above the sea level. This climate has been classified as moderate sub-humid, with average annual temperature of 13.7°C; and mean annual rainfall ranging from 1000 to 12,000 mm.

4. Conclusion

The characteristic symptoms of tar spot complex are caused by a consortium of fungi that act together to spread the disease, of which the main role is played. *Phyllachora maydis* acts mainly in subtropical climates with

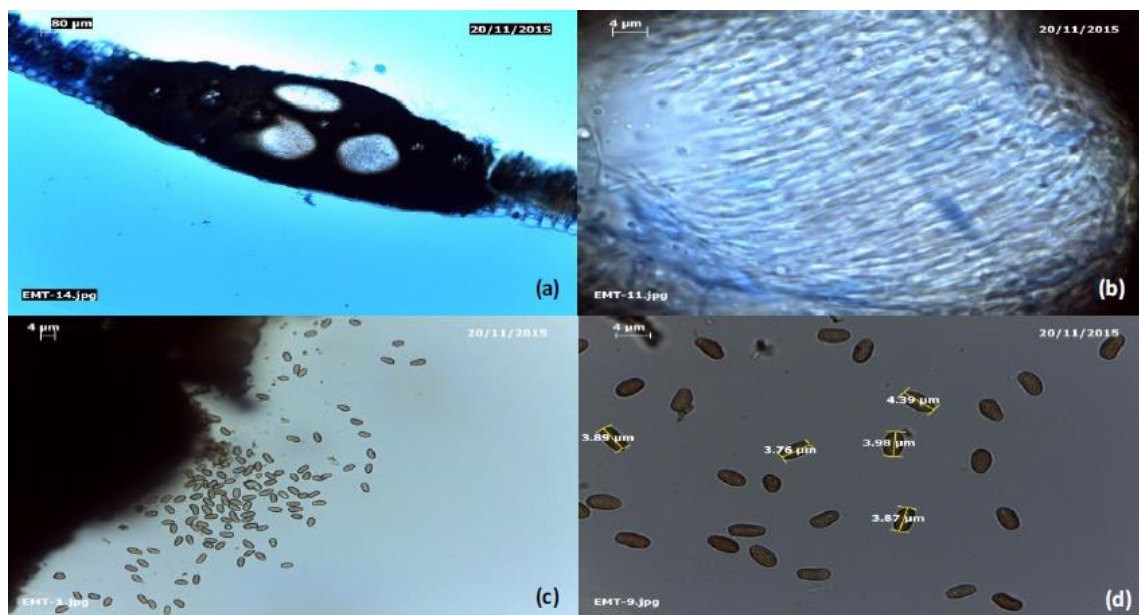


Figure 4. Incisions on TSC lesions. (a) Perithecia; (b) Perithecia with asci and ascospores; (c) *Phyllachora maydis* asospores; (d) *Phyllachora maydis* ascospores under 100×.

ideal propagation conditions ranging from temperature range of 17°C - 22°C, to mean RH > 75% and >7 h of leaf wetness per night [12]. This symptom was identified for the first time in corn samples from San Pablo Autopan, Estado de Mexico. The identity of *Phyllachora maydis* was confirmed at morphological and molecular levels, stressing the pathogen's adaptation to different conditions compared with the conditions previously reported until now.

Acknowledgements

The first author is grateful to the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, the support provided by CONACYT. The authors acknowledge the support provided by the CINVESTAV to carry out this work, and dedicated to the memory of a great friend Juan Antonio Cedillo Martínez.

References

- [1] Paliwal Ripusudan, L., Granados, G., Lafitte, H.R. and Violic, A.D.J.P.M. (2001) El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO, Roma.
- [2] Hock, J., Kranz, J. and Renfro, B.L. (1989) El “complejo mancha de asfalto” de maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **7**, 129-135.
- [3] Hock, J., Dittrich, U., Renfro, B.L. and Kranz, J. (1992) Sequential Development of Pathogens in the Maize Tarspot Disease Complex. *Mycopathologia*, **117**, 157-161. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00442777>
- [4] Pereyda, H.J., Hernández, M.J., Sandoval, I.J.S., Aranda, O.S., de León, C. and Gómez, M.N. (2009) Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachoramaydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia*, **43**, 511-519.
- [5] Wai, K.M. (2004) A Polymerase Chain Reaction and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Procedure for Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Soil. Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, 30-32.
- [6] Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G. and Bailey, M.J. (2000) Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5488-5491. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.12.5488-5491.2000>
- [7] Kowalchuk, G.A., de Souza, F.A. and van Veen, J.A. (2002) Community Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with *Ammophila arenaria* in Dutch Coastal Sand Dunes. *Molecular Ecology*, **11**, 571-581. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01457.x>

- [8] Schwarzott, D. and Schussler, A. (2001) A Simple and Reliable Method for SSU rRNA Gene DNA Extraction, Amplification, and Cloning from Single AM Fungal Spores. *Mycorrhiza*, **10**, 203-207. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00009996>
- [9] Malaguti, G. and Subero, L.J. (1972) La Mancha de Asfalto del Maíz. *Agronomía Tropical*, **22**, 443-445.
- [10] Ceballos, H. and Deutsch, J.A. (1992) Inheritance of Resistance to Tar Spot Complex in Maize. *The American Phytopathology Society*, **82**, 505. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-82-505>
- [11] CIMMYT (2012) Complejo mancha de asfalto del maíz: Hechos y acciones. http://conservacion.cimmyt.org/index.php/es/component/docman/doc_view/922-tarspot
- [12] Hock, J., Kranz, J. and Renfro, B.L. (1995) Studies on the Epidemiology of the Tar Spot Disease Complex of Maize in Mexico. *Plant Pathology*, **44**, 490-502. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb01671.x>

CARTA DE ACEPTACIÓN



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS



REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Texcoco, Estado de México, 11 de febrero de 2016
Referencia: 041-16

Dra. Yisa María Ochoa F.
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
PRESENTE

Por este medio le agradezco y acuso de recibido el manuscrito titulado: "Hongos asociados a la mancha de asfalto en el cultivo de maíz en México", del cual son autores(as) Erika Natalia Ríos Herrera, Yisa María Ochoa F., Ernesto Cerna Chávez, Daniel Hernández Castillo, Víctor Olalde Portugal, Raúl Rodríguez G., que fue enviado para su posible publicación a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Le notificamos que el autor(a) principal y los coautores(as), no podrán alterarse y quedaran como se envía en esta versión.

Asimismo, me permito informarle que su contribución será sometida a revisión técnica por los dictaminadores(as) que se designen; en caso de ser aceptada, se le notificará sobre las observaciones correspondientes.

Sin otro particular reciba un cordial saludo.

Atentamente

DRA. DORA MA. SANGERMAN-JARQUÍN
EDITORA EN JEFA DE LA REVISTA
MEXICANA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

c.c.p. * Archivo
DRSJgtg

Hongos Asociados a la Mancha de Asfalto en el Cultivo de Maíz en México

Erika Natalia Rios Herrera¹, Yisa María Ochoa F², Ernesto Cerna Chávez, Francisco Daniel Hernández Castillo², Alberto Flores Olivas², Víctor Olalde Portugal ³, Raúl Rodríguez G⁴

¹Alumno del Postgrado en Parasitología Agrícola. Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila. CP 25315. ²Profesores investigadores del Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila. CP 25315. ³Investigador del CINVESTAV unidad Irapuato, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León 36821 Irapuato Gto. México. ⁴Campo Experimental General Terán, INIFAP. Km 31 Carretera Montemorelos-China Exhacienda Las Anacuas, General Terán, Nuevo León, México. CP. 67400.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar hongos fitopatógenos asociados con tizones foliares o mancha de asfalto en maíz, en dos estados de la república mexicana; Villaflores, Chiapas; Buenavista, Chilpancingo y Chichihualco, Guerrero. Se realizaron muestreos dirigidos de hojas con síntomas de la enfermedad. La identificación preliminar de los patógenos asociados con los síntomas, se realizó mediante características morfológicas con ayuda de claves dicotómicas y se corroboró mediante la amplificación de los espacios internos de transcripción (ITS) secuenciados y analizados en la base de datos del NCBI. En ambos estados y en las tres localidades se encontró a *Phyllachora maydis*, y *Fusarium* sp. Como primer reporte de la asociación a este síndrome fue *Curvularia lunata*, para Villaflores, Chiapas; en esta localidad también se identificaron: *Puccinia polysora* y *Alternaria* sp.. El análisis morfológico de los hongos asociados a la enfermedad mancha de asfalto en Chilpancingo y Chichihualco, Guerrero, además

de los organismos mencionados, se identificó a *Trichothecium* sp. registrado como el primer reporte asociado con la enfermedad en ambos estados. La importancia de la enfermedad mancha de asfalto en zonas semitropicales del país es alta, donde las condiciones climáticas favorecen su aparición; en condiciones de severidad alta los cultivos pueden atizarse por completo en un periodo de ocho días y provocar pérdidas económicas considerables.

INTRODUCCIÓN

El maíz es considerado uno de los cultivos más importantes en México, en el ámbito social y económico nacional, siendo los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco y Campeche los que concentran más del 30 % de la producción nacional (SIAP, INIFAP y SAGARPA 2010). En la región subtropical que comprende los estados arriba mencionados, las principales enfermedades que causan daños de importancia económica son de origen fungoso, en donde se ha reportado en los últimos cinco años al complejo mancha de asfalto (CMA). Los problemas generando en los cultivos debidos a la variabilidad y el cambio climático aumenta el estrés biótico y abiótico, (Shiferaw *et. al.*, 2011) y en consecuencia se ven afectados por plagas y enfermedades, principalmente causadas por hongos, virus y bacterias. Entre otros dos de los factores como la humedad y temperatura favorecen el desarrollo de tizones foliares, como sucede con la mancha de asfalto, que ocurre con mayor severidad en áreas con alta humedad relativa, localizadas entre 1300 y 2300 msnm (Hock *et al.*, 1989). La mancha de asfalto del maíz toma relevancia en el trópico de México por su impacto en el rendimiento del cultivo; el follaje puede ser atizonado en menos de ocho días, debido a coalescencia de lesiones inducidas por los distintos hongos y atribuido a la producción de una toxina. Factores adicionales que favorecen la enfermedad son: alta

humedad en el ambiente (10 a 20 días nublados en el mes), niveles altos de fertilización nitrogenada, dos ciclos de maíz por año, genotipos susceptibles, baja luminosidad, edad de alta vulnerabilidad del hospedante y, virulencia de los patógenos involucrados (Hock *et al.*, 1989).

La mancha de asfalto (Tar spot) es causada por la interacción de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*. Así mismo *Coniothyrium phyllachorae*, un micoparásito que se encuentra asociado a *P. maydis*, que siempre aparece por primera vez causando la mancha de asfalto. *M. maydis* es responsable del daño "ojo de pez", este se asocia con la mancha necrótica en el centro de la lesión. Este complejo fue descrito por primera vez en 1904 en el maíz mexicano. Este se ha encontrado en Bolivia, Colombia, Costa Rica, República Dominicana, Guatemala, Panamá, Perú, Puerto Rico y Venezuela. También se sabe que se ha presentado en el Ecuador, El Salvador y Haití (Hock J. *et al.*, 1992). Entre 1985 y 1988 muestreos realizados en México, revelaron alta incidencia y severos daños al maíz en Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca y Chiapas, que afectaron aproximadamente 500,000 ha del cultivo y provocaron pérdidas hasta de 50 % en infecciones previas a la floración (Hock *et al.*, 1989). De 2001 a 2005, aproximadamente 40 % de 3,100 ha de maíz establecidas en el valle de Mochitlán, Guerrero, fueron afectadas por la enfermedad con pérdidas severas en el rendimiento de grano; en 2005, se reportó pérdida total en 600 ha en el municipio de Tixtla, Guerrero, y para 2007, la enfermedad se presentó en más de 10 municipios de Guerrero (González *et al.*, 2008).

El CMA, se ha convertido en una limitante en diversas zonas productoras de maíz no solo en México, también en países como Guatemala, Nicaragua y Brasil, quien es el tercer productor de maíz a nivel mundial. Por tal motivo considerando la importancia que ha

tomado la enfermedad en la zona productora de Chiapas, Guerrero, Jalisco, Veracruz y Campeche (INTA, 2013; SAGARPA-SIAP, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO

Se obtuvieron 150 muestras por localidad de los estados; de Chiapas en el Municipio de Villaflores, en el ciclo otoño–invierno 2013, el estado de Guerrero, de las localidades de Buenavista, municipio de Chilapancingo y Chichihualco, Chichihualco, en el ciclo otoño invierno del 2014. La recolección fue realizada, de cuatro a diez días después de la aparición de los primeros síntomas en la planta. El muestreo se llevó acabo en forma dirigida en plantas que presentaran lesiones características del CMA, elevadas oscuras, estromáticas de aspecto liso y brillante, de forma oval a circular, con 0.5 a 2.0 mm de diámetro (Parbery, 1967; Hamlin, 1999; Pereyda-Hernández, *et.al.*, 2009). Las muestras se conservaron en bolsas de papel, se prensaron y secaron para ser procesadas.

DESINFECCION

Se colocó el material vegetal en cortes de medio centimetro cuadrado y para las camaras humedas cortes de 1cm por 3.5 cm y se colocaron en tubos Falcon de 50 mL y se agregó 20 mL de una solución estéril de hipoclorito de sodio al 5% en agua-tween con 2 gotas de tween por cada 100 mL de agua. Esta se llevó a vortex durante un minuto, se desechó el liquido, repitiendo el proceso en tres ocasiones. Aplicando un ultimo lavado con agua

esteril y se decanto el líquido. Finalmente se secó el tejido en campana de flujo laminar de 2 a 5 horas, en papel absorbente estériles.

AISLAMIENTO

Se procesaron 50 muestras por cada localidad; Villaflores del estado de Chiapas, Buenavista y Chichihualco del estado de Guerrero. Colocando muestras de medio centímetro cuadrado previamente desinfectadas, en medio de cultivo SNA, Agar Agua lavado, V8 y PDA, se incubó a 25 °C con un fotoperiodo de 18 horas luz, monitoreando cada 24 h. Realizando montajes de los hongos desarrollados en lacto fenol y agua-Tween. La caracterización morfológica se realizó en base a la correlación con las claves dicotómicas para géneros imperfectos (Barnett & Barry 1972, Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2006). Simultáneo a esto se colocaron igual número de muestras, cortes de tejido de 1 cm por 3.5 cm en cámaras húmedas, para inducir la esporulación en tejido foliar enfermo, y así poder aislar los patógenos presentes. Utilizando cajas Petri, sanitas, y agua destilada estéril. Las muestras se incubaron de 7 a 14 días a temperatura ambiente, realizando evaluaciones cada 24h, con un fotoperiodo de 18 horas. Se monitoreo su crecimiento y desarrollo de estructuras fungicas en la muestra. Al presentarse estructuras de reproducción de los hongos en el tejido o desarrollo miceliar, se obtuvieron muestras y se realizaron aislamientos por transferencia directa de conidios en medio de cultivo PDA, para posterior mente purificar y observar en Agar Agua, PDA, PDA + Gentamicina (100µg/ml) , SNA y V8.

IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Phyllachora*

Para la identificación en el caso del género *Phyllachora*, en muestra previamente de desinfectadas, se realizaron cortes directos de las lesiones (Pereyda-Hernández, *et.al.*, 2009), para buscar la ascas características del género. Se cortaron y rasparon las lesiones estromáticas de *Phyllachora* y se colocaron en un portaobjetos con una gota de agua estéril. Se maceró finamente el material con navaja Gillette®, en caso de requerirse se aplanan con un cubreobjetos. Se agregaron de una a tres gotas de agua estéril para re suspender y recuperar el material macerado. Del material recuperado se colocó una gota en una caja Petri con agar agua en un extremo de la caja, y se corrió al lado opuesto, para dejarla secar abierta en campana de flujo laminar encendida de 30 a 60 min. Para observar las ascas y ascosporas se colocó un microscopio desinfectado, dentro de la campana de flujo laminar. En caso de observarse las ascas muy juntas, se extendió agregando de una a dos gotas de agua estéril y con ayuda de una varilla de vidrio estéril, para dejarla secar nuevamente por 15 minutos. Localizando las ascas y ascospora aisladas bajo el microscopio y se cortó la fracción del medio que las contuvo para transferirlas a una nueva caja Petri y se colocó con la ascospora hacia abajo poniendo en contacto con el medio nuevo utilizando Agar Agua y V8. Se incubo a 25 °C y 18 horas luz y se monitoreo su crecimiento.

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se llevó acabo por medio del método de Doyle y Doyle (1990), modificado por Vázquez con dodecil sulfato de sodio (SDS; Promega Inc). Mediante el

raspado de micelio de cada uno de los aislados en PDA, SNA o Agar Agua, o en el caso de *Phyllachora* directo con el material vegetal de las lesiones. Se maceró 0,2 g de los micelios con un macerador plástico, adicionando 500µL de tampón de extracción (Tris-HCl, pH 8,0 100 mM, EDTA pH 8,5 50 mM, NaCl 50 mM y SDS 2%). El macerado se colocó en el vortex durante 30 segundos para posteriormente tener un tiempo de reposo de 15 min en hielo; transcurrido el tiempo se adiciono 500µL de alcohol cloroformo isoamílico 24: 1, nuevamente se agitó en el vortex, para centrifugar enseguida a 12,000 rpm durante 15 min; se recuperó el sobrenadante en un nuevo eppendorf para añadir igual volumen de isopropanol. La mezcla reposó en hielo durante 15 min, al finalizar fue centrifugada a 12,000 rpm durante 10 min. Se descarta el sobrenadante, para recuperar la pastilla y se deja el tubo inclinado sobre sanitas estériles y en campana de flujo laminar hasta perder casi por completo el líquido. Finalmente se adicionaron 50µL de agua desionizada estéril. La concentración y cuantificación del ADN extraído Se llevó a cabo por medio de dilución (198µL agua y 2 µL ADN) en un espectrofotómetro y su integridad se confirmó por electroforesis en gel de 1% de agarosa a 90V durante 90 min.

PCR-ITS's

Se amplificó mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones internas transcritas ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S-5.8S y 5.8S-28S utilizando el par de iniciadores de secuencia ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) se colocó en cada muestra; ITS1 a 10µM, 0.5 µL; ITS4 10µM, 0.5 µL; Taq -&Go a 5X, 5.0 µL; DNA problema ajustado a 100 ng/µL, 2 µL; y de 17µL de agua ultrapura estéril para ajustar un

volumen final de 25 μ L. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 30 segundos, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 60 °C por 1 min, 30 ciclos de extensión a 68 °C por 1 min y 1 ciclo de extensión final a 68 °C por 5 min. La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis a 60V. Elución del Gel: del producto de PCR se cortaron y eluyeron la bandas con el kit de purificación de bandas de In vitro gen (QuickClean II Gel Extraction Kit).

SECUENCIACIÓN Y BLAST

Se secuenció con un secuenciador automático por servicio de MacroGen Service Center. Los pares de base obtenidos se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nih.gov) mediante el programa BLAST.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

IDENTIFICACIÓN MORFOLOGÍCA

Se identificaron los géneros de *Phyllachora* y *Fusarium* sp en la muestras presentes tanto en el Estado de Chiapas en la localidad de Buenavista, en el ciclo otoño-invierno 2013, como del estado de Guerrero, en los municipios de Buenavista, Chilpancingo y Chichihualco, Chichihualco, en el ciclo de otoño del 2014.

Adicionales a estos géneros, en la Muestras del Estado de Chiapas los géneros de los hongos identificados por medios de cultivo artificiales y cámaras húmedas fueron: *Curvularia lunata*, *Puccinia polysora*, los cuales para este cultivo se han descrito como fitopatógenos, mientras que dentro de los saprófitos se encontró a *Alternaria* sp. (Andersen *et al.* 2001). Mientras que, por medio de cortes directos de las lesiones estromaticas en hojas, con sintomatología de mancha de asfalto, y por técnica de gota en agar agua, se identificó la especie, *Phyllachora maydi* y obteniendo una germinación 1:15 cajas, equivalente a un 6.6 por ciento. (Figura 1).

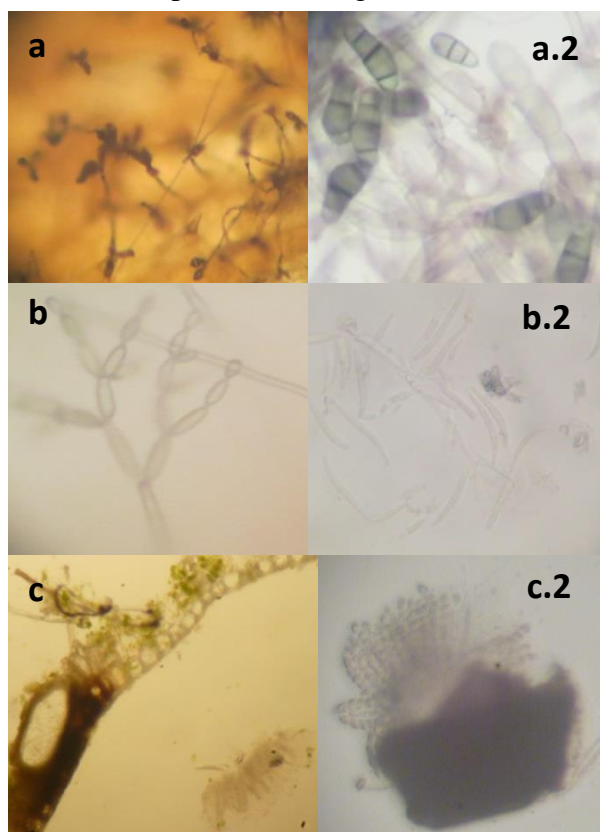


Figura 1. Hongos identificados en recolectas de hojas en maíz sembradas en el Estado de Chiapas, ciclo otoño- invierno, 2013. a) Conidioforos de *Curvularia* sp; a.2) Conidios de *Curvularia* sp; b, b.2) Conidios de *Fusarium*; c) Corte directo de *Phyllachora maydis* ; y c.2) Ascosporas y ascas de *Phyllachora maydis*.

Phyllachora maydis ha sido descrita como el protagonista de la enfermedad denominada mancha de asfalto produciendo lesiones elevadas oscuras, estromáticas de aspecto liso y brillante, de forma oval a circular, con 0.5 a 2.0 mm de diámetro y forma estrías hasta de 10 mm de longitud. Donde en el estudio más reciente, en el 2009, reportaron pérdidas del 55.1 % en materiales híbridos, así como en reportes no oficiales existen pérdidas del 100% del cultivo (Parbery, 1967; Hamlin, 1999; Pereyda-Hernández, *et.al.*, 2009). Los ascos son cilíndricos, cortopedicelados, alargados (180-100 x 8.10 μ), conteniendo ocho ascosporas, más o menos elipsoidales, hialinas, sin septas, dispuestas en posición monoseriadas midiendo, en promedio 10,5 x 6 μ (Malaguti G. y Subero L. J. 1972).

Curvularia spp representa uno de los principales problemas que afectan la producción del cultivo de maíz (*Zea mays* L.), podemos citar a las enfermedades, causadas por diferentes patógenos, entre ellos la mancha foliar de *Curvularia*. Donde Garcés (2011) menciona como el control de este patógeno la resistencia mediante el mejoramiento genético y utilización de variedades resistentes. Conidioforos cafés, principalmente simples, teniendo conidia apical obscura, y células claras, 3 a 5 células terminales, más o menos fusiformes, doblada típicamente, con una célula centran alargada; paratica o saprofítica (Barnett and Hunter, 1972). Los conidióforos son de color pardo, no ramificados, erectos, a veces filiformes, con la base ligeramente más delgada que el ápice; septadas más intensamente hacia el ápice que frecuentemente se presenta geniculado, algo torcido, y con pequeñas nudosidades. Los conidios son ovalados, cilíndricos, no sigmoides, a veces encorvados, de un color castaño claro; por lo general con tres septos transversales, siendo la segunda célula, de tamaño mayor que las restantes, siguiéndole,

en tamaño, la tercera célula; quedando las dos de los extremos más pequeñas e hialinas. A veces las dos células centrales son de igual tamaño, siendo de un color algo más oscuro que las de las extremidades. El hilo es bien visible; así como es evidente, en el conidióforo, la cicatriz de donde se ha desprendido el conidio. El tamaño de los conidios (de las hojas, después de 24 horas en cámara húmeda) es de 19-31 μ de largo X 9-13 μ ancho (media: 24,2 X 11 μ), (Malaguti G. y Subero L. J. 1971).

Fusarium sp, este es un hongo típico de suelo, que en zonas cálidas y húmedas causa marchitamiento de follaje (Agrios 2005; Barnett & Barry 1972). *Fusarium moniliforme* son la presencia de monifiálides con microconidias en forma de cadenas, según las claves de Nelson et al, (1983). En maíz se han reportados diferentes especies *Fusarium graminearum* y *F. moniliforme* inducen pudriciones de mazorca y de tallo y tizón en las plántulas (Macías y Peraza, 2008, De León, 1974 y Zenteno-Zevada, 1963). Además de la presencia de las especies identificadas por Garcia y Martines en el 2010 de aislamientos obtenidos de granos de maíz *Fusarium oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. moniliforme* (Sinónimo *F. verticillioides*), *F. graminearum*, *F. anthophilum*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. sporotrichioides* y *F. proliferatum*. Aun cuando la identificación basada en la morfología presenta en ocasiones un importante grado de dificultad, sobre todo para distinguir especies cercanas, con características fenotípicas muy similares (Unda et al., 2011; Chandra et al., 2011). La identificación por métodos moleculares es una opción para confirmar la identidad de estos hongos y resolver dudas sobre la taxonomía de los mismos (Ochoa et al., 2012). El hongo produce tres clases de esporas: - Microconidias: Esporas generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco

ramificados. Las microconidias tienen 5- 12 μm de largo por 2.5- 3.5 μm de ancho (Nelson, 1981). - Macroconidias: Esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias tiene un tamaño de 27 a 46 μm de largo por 3.0 a 4.5 μm de ancho (Nelson, 1981; Leslie and Summerell, 2006). - Clamidosporas: Esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Se forman simples o en pares, terminales 8 Revisión - *Fusarium oxysporum* El hongo que nos falta conocer, Garcés et al. o intercalares: poseen un tamaño de 5 a 15 μm de diámetro (Nelson, 1981). Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes (Garret, 1977)

Cercospora zae-maydis es la causa de la mancha gris de la hoja de maíz, que se ha convertido en una de las enfermedades más extendidas y destructivas de maíz en el mundo. *C. zae-maydis* infecta hojas través de los estomas, que se basa en la capacidad del patógeno para percibir los estomas y reorientar el crecimiento en consecuencia (Crous *et.al.*, 2006). Los conidióforos son pequeños a moderadamente grandes fascículos (3-14), que emerge a través de los estomas, generalmente divergente, erguido, recto, subcilíndrica a flexuous, distintamente-geniculado sinuosa, no ramificado, 40-180 \times 8.4 micras, oscuramente (0-) 1-8 septadas, olivaceous uniformemente pálido al marrón medio, de pared delgada, lisa; células conidiógenas integrado, terminal, de vez en cuando intercalado, 10-40 micras de largo, conidiógenas loci conspicuamente engrosada y oscurecida, 2-3 micras de ancho. Los conidios solitarios, ampliamente obclavate-subcilíndrica, 30-100 \times 4-9 micras, 1-10 septos, hialinas, de pared delgada, lisa, ápice

obtuso, base de trunca, poco espesó y se oscureció, 2-3 micras de ancho (en función del tipo espécimen), (Kim *et. al.*, 2011).

Puccinia polysora afecta al maíz en las regiones tropicales y subtropicales. Las urediosporas son pequeños, circulares u ovals, de color anaranjado claro, ubicados generalmente en el haz de las hojas y escasamente en el envés (Shurtleff, 1984; Cháves-Medina *et al.*, 2007); Carmona *et al.*, 2008). *Puccinia sorghi* solo ataca al maíz, aun cuando su nombre específico refiere confusamente a sorgo. Es un parásito absoluto y tiene como hospedante alternativo a diferentes especies del género *Oxalis*. Las ecidiosporas procedentes de *Oxalis* spp. llevadas por el viento son depositadas sobre las hojas de maíz, se inicia el proceso de infección y forman uredinios cuando ocurren temperaturas cálidas (16 °C - 23°C) con una óptima de 17°C y humedad relativa del 100% (González, 2005a; Agudelo y Sarria Villa, 2007; González *et al.*, 2008; Carmona *et al.*, 2008).

Alternaria (alternata) produce cadenas de 10 o más conidios muy ramificadas a partir de conidióforos cortos. La ramificación de los conidios surge de conidióforos secundarios desde células conidiales basales o apicales, en relación 1:1, dando un aspecto abierto (Andersen *et al.* 2001). Las cadenas aparecen en los cultivos como manojos densos y aislados (Roberts *et al.* 2000).

Trichothecium sp., se encontró solamente en la muestras de las dos localidades del estado de Guerrero, Villaflores y Chichihualco. De igual forma que en las muestras de la

localidad de Buenavista en Chiapas, se corroboró la presencia de *Fusarium* sp y *Phyllachora Maydis*. En la Figura 2 se observan la estructura y cuerpos fructíferos representativos de los hongos identificados en esta etapa de la investigación.

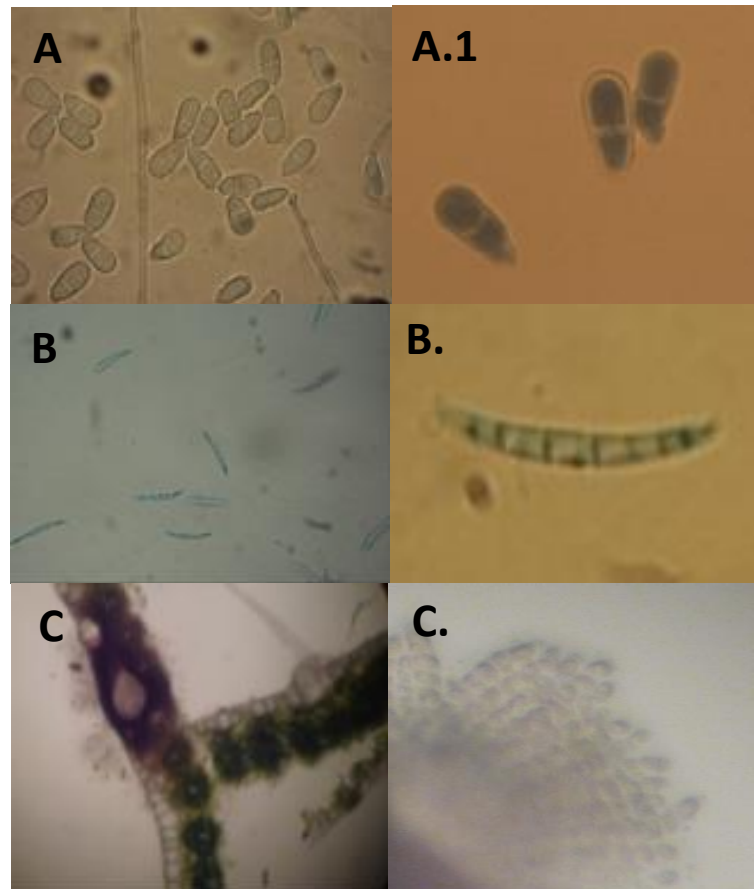


Figura 2. Hongos identificados en recolectas de hojas en maíz sembradas en el Estado de Guerrero, ciclo otoño- invierno, 2014. A) Conidioforos de *Trichothecium* sp ; A.2) Conidios de *Trichothecium* sp; B, B.2) Conidios de *Fusarium*; C) Corte directo de *Phyllachora maydis* ; y C.1) Ascosporas y ascas de *Phyllachora maydis*.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La comparación en el BLAST de la secuencia 141024-05_E03_P2_ITS1 mostró 95 % de identidad y el máximo score con 782 con el clon *Phyllachora* (clone UB06763 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete, Genbank No. de acceso KC683439.1); la secuencia 141024-05_G01_B1_ITS1 mostró 100% de identidad y un máximo score de 941 con la secuencia de *Curvularia lunata* (isolate UFMGCB4427 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene., Genbank No. de acceso KJ404197.1); la secuencia 141024-05_O01_C2_ITS1 mostró 99% de identidad y un máximo score de 976 con la secuencia de *Bipolaris sp.* (G03-90 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, Genbank No. de acceso JF767001.1) y la secuencia 141024-05_E01_A3_ITS1 fue 99 % similar y el máximo score de 896 a la secuencia NR_121315.1 de *Cercospora beticola* (CBS 116456 ITS region; from TYPE material). Esto confirmó los resultados de la identificación morfológica.

DESCRIPTION	SEQUENCES	SCORE T	IDENTIDAD
NCBI			
<i>Bipolaris sp.</i>	JF767001.1)	976	99%
<i>Cercospora beticola</i>	NR_121315.1	896	99%
<i>Curvularia lunata</i>	KJ404197.1	941	100%
<i>Phyllachora</i>	KC683439.1	782	95%

CONCLUSIONES

Phyllachora y *Fusarium sp* fueron identificados como los agentes asociados al CMA en la muestras presentes del Estado de Chiapas y Guerrero. Simultáneamente las muestra del estado de Chiapas se presentaron *Curvularia lunata*, *Bipolaris sp* y *Cercospora beticola*. *Trichothecium sp* fue identificada morfológicamente para las muestras analizadas provenientes del estado de Guerrero. Este es el primer reporte de la presencia de *Curvularia lunata* asociada a la Mancha de Asfalto en el cultivo de maíz en las zona subtropical en México.

Agradecimientos

Al CONACYT por otorgar la beca de apoyo para realizar mis estudios y a mi comité de asesores, por su colaboración en el proyecto.

Literatura citada

- Agrios, G. N. 2005. Fitopatología. 2a. edición. Ed. Limusa. México, 756 pp.
- Agudelo F.V. de y G.A. Sarria Villa 2007. Enfermedades del maíz y su manejo. Fenalce-ICA. Colombia. 55 p.
- Andersen B *et al.* 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Research 105: 291-299.
- Andersen, B, Dongo, A y Pryor, BM. (2008). Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. Mycol. Res. 112: 241-250.
- Andersen, B, Kroger, E y Roberts, RG. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycol. Res. 105: 291-299.
- Andersen, B, Kroger, E y Roberts, RG. (2001). Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycol. Res. 105: 291-299.
- Andersen, B, Kroger, E y Roberts, RG. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. Mycol. Res. 106: 170-182.
- Barnett, H. L.; and Hunter, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3th. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA. 241 p. Vol. 64, No. 4 (Jul. - Aug., 1972), pp. 930-932 Published by: Mycological Society of America Article Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/3757954>
- Bigre, J. P., J. Claude M., M. Tharaud. 1990. Patología de los cultivos florales y ornamentales. Ed. Mundi-Prensa. 139 pp.

- Carmona M.A., Melo Reis E. y R. Trezzi Casa 2008. Identificación y Manejo de las Principales Enfermedades del Maíz. Ed. Horizonte A. 44 p.
- Chandra, N.S., E.G. Wulff, A.C. Udayashankar, B.P. Nandini, S.R. Niranjana, C.N. Mortensen, H.S Prakash, 2011. Prospect of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90:1625-1639.
- Chaves-Medina J.A., Leyva-Lopez N.E. y J.K. Pataky 2007. Resistance to *Puccinia polysora* in Maize Accessions. *Plant Dis.* 91:1489-1495.
- Chou HH, Wu WS. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcriber spacer regions of the genus *Alternaria* and the significance of filament-beaked conidia. 106: 164-169.
- Crous Pedro W., Groenewald Johannes Z., Groenewald Marizeth, Caldwell Pat, Braun Uwe and Harrington Thomas C.. 2006. Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. *Studies In Mycology* 55: 189–197.
- De León, C. 1974. Enfermedades del maíz. Guía para su identificación en el campo. Folleto Técnico de Información 11, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), México, D.F. 77 p.
- Garcés Fiallos Felipe Rafael, Aguirre Calderón Ángel Jefferson, Carbo Morán Jaime Javier, Liubá Delfini Gabriel Antonio. (2011). Severidad de curvularia en 67 líneas autofecundadas S4 de maíz amarillo. *Ciencia y Tecnología* 4(2):39-44.
- García-Aguirre, Genoveva, & Martínez-Flores, Rebeca. (2010). Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. *Revista mexicana de biodiversidad*, 81(1), 15-20. Recuperado en

09 de diciembre de 2013, de
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532010000100003&lng=es&tlng=es.

GARRET, S. D. 1977. Pathogenic root- infecting fungi. Cambridge press. 294p.

González M. 2005a. Roya común del maíz: altos niveles de severidad en la zona maicera núcleo (campaña 04/05). Rev. Agromensajes N°15. FCA-UNR.
<http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/15/2AM15.htm>.
[Verificación: octubre 2008]

González M., Laguna I., Eyherabide G. Y J. Muñoz 2008. Caracterización de factores de resistencia y virulencia en la interacción *Zea mays*-*Puccinia sorghi*. HM-40. Resúmenes 1er° Congreso Argentino de Fitopatología. 28-30 mayo. Córdoba, Argentina.

Hamlin, R.T. 1999. Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes. Vol. I y II. APS Press. St. Paul. Minnesota. pp: 63-64.

Hong, GS, Cramer, RA, Lawrence, CB, Pryor, BM. (2005). Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. Fungal Genet. Biol. 42: 119-129.

Kim H, Ridenour JB, Dunkle LD, Bluhm BH (2011) Regulation of Stomatal Tropism and Infection by Light in *Cercospora zeae-maydis* : Evidence for Coordinated Host/Pathogen Responses to Photoperiod? PLoS Pathog 7(7): e1002113.
doi:10.1371/journal.ppat.1002113

Leslie JF, Summerell BA (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, IA, USA. Blackwell Professional.

Macías Cervantes, J. y S. Peraza Medina. 2008. Enfermedades del maíz en el norte de Sinaloa. Agronet. www.agronet.com.mx/articles.cgi?Action=Viewhistory&Article=3&Type=A; 31.03-2008.

Malaguti G. y Subero L. J. 1971. Manchas Foliares del Maíz Causadas por *Curvularia* en Venezuela. Agronomía Tropical. Vol 21(2): 119-128. 1971. Centro de Investigaciones Agronómicas, Maracay.

Malaguti G. y Subero L. J. 1972. La Mancha de Asfalto del Maíz. Agronomía Tropical. Vol 22(4): 443-445. 1972. Centro de Investigaciones Agronómicas, Maracay.

Montiel, M. R. D. y J. J. Avelar. 2001. Etiología de la enfermedad “clavo del guayabo”. 5ª Jornadas de Investigación (trabajo: AP/UAGRO-06/006). Universidad Autónoma de Zacatecas. 7 pp.

NELSON, P. E., TAMMEN, R. y BAKER, R. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. 51-80. In M. E. Mace, A. A. Bell and C. C. H. Beckman. (Eds.). Fungal wilt diseases of plants. Academic Press. New York.

Nelson, P.E.; Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park. p 193

Ochoa Fuentes Yisa Maria, Cerna Chávez Ernesto, Gallegos Morales Gabriel, Landeros Flores Jeronimo, Delgado Ortiz Juan Carlos, Hernández Camacho Sandra,

- Rodríguez Guerra Raúl, Olalde Portugal Victor. 2012. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Micología*. 36: 27-31.
- Parbery, D. G. 1967. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Nke. *Aust. J. Bot.* 15: 271-375.
- Pereyda-Hernández, Juan, Hernández-Morales, Javier, Sandoval-Islas, J. Sergio, Aranda-Ocampo, Sergio, de León, Carlos, & Gómez-Montiel, Noel. (2009). Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia*, 43(5), 511-519. Recuperado en 11 de febrero de 2014, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000500006 &lng=es&tlng=es&nrm=iso>. ISSN 1405-3195.
- Roberts RG *et al.* 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* 104: 151-160.
- Shurtleff M.C. (ed.) 1984. *Compendium of Corn Diseases*. APS, Minnesota. 105 p.
- Unda, F., J. M. Agüero, M. C. Fariñas, M. L. Martínez, 2011. Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29: 282–285.
- Zenteno-Zevada, M. 1963. Estudios sobre hongos parásitos de gramíneas de la República Mexicana. III. Pruebas de inoculación en plántulas de maíz con *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México* 34:69-83.

Zillinsky, F. J. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). México, D. F. 141 p.