

Hongos asociados a la mancha de asfalto en el cultivo de maíz en México*

Fungi associated with the tar spot in maize cultivation in Mexico

Erika Natalia Ríos Herrera¹, Yisa María Ochoa Fuentes^{1§}, Ernesto Cerna Chávez¹, Jerónimo Landeros Flores¹, Melchor Cepeda Siller¹ y Raúl Rodríguez Guerra²

¹Posgrado en Parasitología Agrícola-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. CP. 25315. ²Campo Experimental General Terán-INIFAP. Carretera Montemorelos-China, km 31. Exhacienda Las Anacuas, General Terán, Nuevo León, México. CP. 67400. §Autor para correspondencia: yisa8a@yahoo.com.

Resumen

El objetivo de este estudio fue identificar los hongos fitopatógenos asociados a la mancha de asfalto en maíz, en dos estados de la República Mexicana, Chiapas y 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 criterios morfológicos con 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 se encontró a *Phyllachora maydis*, y *Curvularia lunata* como primer reporte de la asociación a este síndrome denominado mancha de asfalto.

Palabras clave: complejo mancha de asfalto, identificación tradicional, identificación molecular.

El maíz es uno de los cultivos más importantes en México, siendo los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco y Campeche los que concentran más de 30% de la producción nacional (SAGARPA - SIAP, 2010). En la región subtropical que comprende los estados arriba mencionados, las principales enfermedades de importancia económica son de origen fungoso, en donde se ha reportado en los últimos cinco años

Abstract

The objective of this study was to identify phytopathogenic fungi associated to the tar spot in corn in two states of the Mexican Republic, Chiapas and Guerrero. The conducted samples of leaves with symptoms of the disease were performed. The preliminary identification of the pathogens associated with the symptoms was performed using morphological criteria with dichotomous keys and was corroborated by the amplification of the internal transcription spaces (ITS) sequenced and analyzed in the NCBI database. In both states he found *Phyllachora maydis*, *Curvularia lunata* and as first report of the association of this syndrome called tar spot.

Keywords: molecular identification, tar spot complex, traditional identification.

The maize is one of the most important crops in Mexico, with the states of Chiapas, Guerrero, Jalisco and Campeche concentrating more than 30% of the national production (SAGARPA-SIAP, 2010). In the subtropical region comprising the above mentioned states, the main diseases of economic importance are of fungal origin, where has been reported in the last five years the complex tar spot

* Recibido: enero de 2017
Aceptado: febrero de 2017

al complejo mancha de asfalto (CMA). Entre los factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad destacan: la temperatura, niveles altos de fertilización nitrogenada, genotipos susceptibles, baja luminosidad, virulencia de los patógenos involucrados, alta humedad relativa y altitud 1 300 a 2 300 m. La mancha de asfalto del maíz toma relevancia 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 (Hock *et al.*, 1989).

La mancha de asfalto es causada por la interacción de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*. Asimismo *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 *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 el objetivo es: identificar los fitopatógenos asociados a la mancha de asfalto en Guerrero y Chiapas.

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

(CMA). Among the factors favoring the development of the disease are: temperature, high levels of nitrogen fertilization, susceptible genotypes, low luminosity, virulence of the pathogens involved, high relative humidity and altitude 1 300 at 2 300 m. The maize tar spot becomes relevant in the tropics of Mexico because of its impact on crop yield; blighted foliage may be less than eight days due to coalescence lesions induced by various fungi and attributed to the production of a toxin (Hock *et al.*, 1989).

The tar spot is caused by the interaction of *Phyllachora maydis* and *M. maydis*. Also *Coniothyrium phyllachorae* a mycoparasite that is associated with *P. maydis*, which always appears for the first time causing tar spot. The *M. maydis* is liable for damage “fish eye”, this is associated with necrotic spot in the center of the lesion. This complex was first described in 1904 in Mexican corn. This has been found in Bolivia, Colombia, Costa Rica, Dominican Republic, Guatemala, Panama, Peru, Puerto Rico and Venezuela. It is also known that has been presented in Ecuador, El Salvador and Haiti (Hock *et al.*, 1992).

Between 1985 and 1988, samples from Mexico showed high incidence and severe damage to maize in Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca and Chiapas, which affected approximately 500 000 ha of the crop and caused up to 50% losses in infections prior to bloom (Hock *et al.*, 1989). From 2001 to 2005, approximately 40% of 3 100 ha of maize established in the Mochitlan Valley, Guerrero, were affected by the disease with severe losses in grain yield in 2005, total loss was reported in 600 ha in the municipality of Tixtla, Guerrero, and by 2007, the disease appeared in more than 10 municipalities in Guerrero (González *et al.*, 2008).

The CMA has become a constraint in several maize producing areas not only in Mexico, but also in countries such as Guatemala, Nicaragua and Brazil, which is the third maize producer in the world. Considering the importance of the disease in the producing area Chiapas, Guerrero, the objective is to identify the phytopathogens associated with the tar spot in Guerrero and Chiapas.

A total of 150 samples were obtained by locality, from the states of Chiapas in the municipality of Villaflores, in the Autumn-Winter cycle 2013, the state of Guerrero, in the municipalities of Buenavista, Chilapancingo and Chichihualco, Chichihualco, in the Autumn Winter cycle of 2014. The collection was carried out, from four to 10 days after the appearance of the first symptoms in the plant.

Buenavista, municipio de Chilapancingo y Chichihualco, Chichihualco, en el ciclo otoño invierno de 2014. La recolección fue realizada, de cuatro a 10 días después de la aparición de los primeros síntomas en la planta. El muestreo se llevó a cabo en forma dirigida en plantas con lesiones características del CMA, elevadas oscuras, estromáticas de aspecto liso y brillante, de forma oval a circular, con 0.5 a 2 mm de diámetro (Hamlin, 1999; Pereyda-Hernández *et al.*, 2009).

Las muestras se conservaron en bolsas de papel, se prensaron y secaron para ser procesadas. Se colocó el material vegetal en cortes de medio centímetro cuadrado y para las cámaras húmedas cortes de 1 cm 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. Estas se llevaron a vortex durante un minuto, se desechó el líquido, repitiendo el proceso en tres ocasiones. Aplicando un último lavado con agua estéril y se decantó. Finalmente se secó el tejido en campana de flujo laminar de 2 a 5 horas, en papel absorbente estéril.

Se procesaron las 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, agar agua lavado 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 las claves dicotómicas para géneros imperfectos (Barnett y Hunter 1972). 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.

Las muestras se incubaron de 7 a 14 días a temperatura ambiente, realizando evaluaciones cada 24 h, con un fotoperiodo de 18 h. Se monitoreó su crecimiento y desarrollo de estructuras fungicas en la muestra. Al presentarse estructuras de reproducción de los hongos en el tejido o desarrollo micelial, se obtuvieron muestras y se realizaron aislamientos por transferencia directa de conidios en medio de cultivo PDA, para posteriormente purificar y observar en agar agua, PDA, PDA + Gentamicina (100 µg mL⁻¹). Para la identificación en el caso del género *Phyllachora*, se realizaron cortes directos de las lesiones (Pereyda-Hernández *et al.*, 2009), para buscar las 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.

The sampling took place at a targeted manner in plants with lesions characteristic of the CMA, high dark stromal smooth and shiny appearance oval to circular, with 0.5 to 2 mm in diameter (Hamlin, 1999; Pereyda-Hernández *et al.*, 2009).

The samples were stored in paper bags, pressed and dried for processing. The plant material was placed in half-square centimeter sections and for the humidified sections cut 1 cm by 3.5 cm and placed in falcon tubes of 50 mL and 20 mL of a sterile solution of 5% sodium hypochlorite in water-tween with 2 drops of tween per 100 mL of water. These were vortexed for one minute, the liquid was discarded, repeating the process in three occasions. Apply a last wash with sterile water and decant. Finally, the tissue was dried in a laminar flow hood for 2 to 5 hours, on sterile absorbent paper.

The samples were processed by each locality; Villaflores of the state of Chiapas, Buenavista and Chichihualco of the state of Guerrero. Placing half-centimeter samples previously disinfected, in culture medium, washed water agar and PDA, incubated at 25 °C with a photoperiod of 18 light hours, monitoring every 24 h. Making assemblages of fungi developed in lactophenol and water-tween. The morphological characterization was performed on the basis of dichotomous keys for imperfect genera (Barnett and Hunter 1972). Simultaneous to this were placed an equal number of samples, tissue cuts of 1 cm by 3.5 cm in humid chambers, to induce sporulation in diseased leaf tissue, and thus to isolate the pathogens present.

The samples were incubated from 7 to 14 at room temperature, performing evaluations every 24 h with a photoperiod of 18 h. Its growth and development of fungic structures in the sample were monitored. When reproductive structures of the fungi were presented in the tissue or mycelial development, samples were obtained and isolates were made by direct transfer of conidia in PDA culture medium, later to purify and to observe in water agar, PDA, PDA + Gentamicin (100 µg mL⁻¹). For identification in the case of gender *Phyllachora*, direct cuts lesions were performed (Pereyda-Hernández *et al.*, 2009), to find the characteristics asci of the genre. Were cut and scraped *Phyllachora* stromal lesions and placed on a slide with a drop of sterile water.

The material is finely macerated with Gillette® knife. One to three drops of sterile water were added to suspend and recover the macerated material. From the recovered material a drop was placed in a petri dish with water agar at one end of the box, and it was run to the opposite side. In order to

Se maceró finamente el material con navaja Gillette®. 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 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 min. 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 utilizando agar agua y V8. Se incubaron a 25 °C y 18 h luz y se monitoreo su crecimiento.

La identificación molecular se llevó a cabo por la técnica ITS- PCR, La extracción de ADN se realizó por el método de Doyle y Doyle (1991). Se raspó el micelio de cada uno de los aislados, o en el caso de *Phyllachora* directo con el material vegetal de las lesiones. Se maceró 0.2 g del micelio, adicionando 500µL de tampón de extracción (Tris-HCl, pH 8 100 mM, EDTA pH 8.5 50 mM, NaCl 50 mM y SDS 2%). El macerado se colocó en el vortex durante 30 segundos, posteriormente reposó 15 min en hielo; transcurrido el tiempo se adicionó 500µL de cloroformo: alcohol 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 descartó el sobrenadante, para recuperar la pastilla. 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. 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 µL; DNA problema ajustado a 100 ng µL⁻¹, 2 µL; y de 17µL de agua ultrapura estéril para ajustar un volumen final de 25µL.

observe the asci and ascospores, a disinfected microscope was placed inside the laminar flow hood. If the asci were closely observed, it was extended by adding one to two drops of sterile water and using a sterile glass rod, to allow it to dry again for 15 min. Locating the asci and ascospores isolated under the microscope and cut the fraction of the medium that contained them to transfer them to a new petri dish using water agar and V8. They were incubated at 25 °C and 18 h light and monitored for growth.

The molecular identification was carried out by the ITS-PCR technique, DNA extraction was performed by the method of Doyle and Doyle (1991). The mycelium each isolated, or in the case of direct *Phyllachora* with plant material scraped lesion. 0.2 g of the mycelium was macerated, adding 500µL of extraction buffer (Tris-HCl, pH 8 100 mM, EDTA pH 8.5 50 mM, NaCl 50 mM and SDS 2%). The macerate was placed in the vortex for 30 seconds, then rested for 15 min on ice; after the time was added 500µL of chloroform: 24:1 isoamyl alcohol, again vortexed, then centrifuged at 12 000 rpm for 15 min; the supernatant was recovered in a new eppendorf to add equal volume of isopropanol.

The mixture was rested on ice for 15 min, at the end it was centrifuged at 12 000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded to recover the pellet. Finally, 50 µL of sterile deionized water was added. The concentration and quantification of the extracted DNA was carried out by means of dilution (198 µL water and 2 µL DNA) in a spectrophotometer and its integrity was confirmed by electrophoresis in 1% agarose gel at 90V for 90 min. The internal transcribed regions ITS1 and ITS4 were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) method between the ribosomal genes (rDNA) 18S-5.8S and 5.8S-28S using the primer pair ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) was placed in each sample; ITS1 at 10µM, 0.5 µL; ITS4 10µM, 0.5 µL; Taq - & Go at 5X, 5 µL; problem DNA adjusted to 100 ng µL⁻¹, 2 µL; and 17µL sterile ultrapure water to adjust a final volume of 25 µL.

The conditions of the PCR reaction were: 1 initial denaturation cycle at 95 °C for 30 s, 30 denaturation cycles at 95 °C for 30 s, 30 alignment cycles at 60 °C for 1 min, 30 extension cycles at 68 °C for 1 min and 1 final extension cycle at 68 °C for 5 min. The amplification was visualized on a 1% agarose gel by electrophoresis at 60V. Elution of gel: PCR product were cut and the bands eluted with purification kit

Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 30 s, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, 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). Se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nih.gov) mediante el programa BLAST.

Se identificaron los géneros de *Phyllachora* sp. y *Curvularia lunata* en la muestras en el estado de Chiapas y Guerrero. Por medio de cortes directos de las lesiones estromáticas en hojas, con sintomatología de mancha de asfalto, y por técnica de gota en agar agua, se identificó la especie, *Phyllachora maydis*. Esta 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 mm de diámetro y forma estrías hasta de 10 mm de longitud. Donde en el estudio más reciente, en el 2009, reportaron pérdidas de 55.1% en materiales híbridos (Hamlin, 1999; Pereyda-Hernández *et al.*, 2009).

Los ascos son cilíndricos, cortopedicelados, alargados (180-100 x 8.1µ), conteniendo ocho ascosporas, más o menos elipsoidales, hialinas, sin septas, dispuestas en posición monoseriadas midiendo, en promedio 10.5 x 6 µ (Malaguti y Subero, 1972). Por otro lado *Curvularia* sp. 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 café, principalmente simples, teniendo conidia apical obscura, y células claras, 3 a 5 células terminales, más o menos fusiformes, doblada típicamente, con una célula central alargada; parasita 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

bands *in vitro* gene (QuickClean II Gel Extraction Kit). They were compared to the sequences reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) gene bank database (www.ncbi.nih.gov) using the BLAST program.

The *Phyllachora* sp. and *Curvularia lunata* genres were identified on samples in the state of Chiapas and Guerrero. By direct cuts stromal lesions on leaves with symptoms of tar spot, and drop technique in agar water, the species identified *Phyllachora maydis*. This has been described as the protagonist of the disease called tar spot producing dark, stromatic, high-gloss, stromal-like lesions of oval-to-circular shape, 0.5 to 2 mm in diameter and forming striations up to 10 mm in length. Where in the most recent study, in 2009, they reported losses of 55.1% in hybrid materials (Hamlin, 1999; Pereyda-Hernández *et al.*, 2009).

The ascis are cylindrical, shortpedicellate, elongated (180-100 x 8.1µ), containing eight ascospores, more or less ellipsoidal, hyaline, without septa, arranged in monoserial position measuring, on average 10.5 x 6 µ (Malaguti and Subero, 1972). Furthermore, *Curvularia* sp. represents one of the main problems affecting the production of maize (*Zea mays* L.), we can mention the diseases caused by different pathogens, including leaf spot of *Curvularia*. Where Garcés (2011) mentions as the control of this pathogen the resistance through the genetic improvement and the use of resistant varieties. Brown conidiophores, mainly simple, having dark apical conidia, and clear cells, 3 to 5 terminal cells, more or less spindle-shaped, typically folded, with an elongated center cell; parasite or saprophytic (Barnett and Hunter, 1972).

The conidiophores are brown, unbranched, erect, sometimes filiform, with the base slightly thinner than the apex; septated more intensely towards the apex, which frequently appears geniculate, somewhat crooked, and with small knots. The conidia are oval, cylindrical, non-sigmoid, sometimes curved, a light brown color; usually with three transverse septa, the second cell being of larger size than the others, followed in size by the third cell; leaving the two ends smaller and hyaline.

Sometimes the two central cells are of equal size, being of a color somewhat darker than those of the extremities. The thread is well visible; as is evident in the conidiophore, the scar from which the conidium has been detached. The size of the conidia (of the leaves, after 24 h in the humid chamber) is 19-31 µ long X 9-13 µ wide (mean: 24.2 X 11 µ), (Malaguti and Subero, 1971). The molecular identity of both pathogens

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 de las otras extremidades. El hilo esta bien visible; así como es evidente en el conidióforo de la cicatriz donde se ha desprendido o separado el conidio. El tamaño de los conidios (de las hojas, después de 24 h en cámara húmeda) es de 19-31 μ de largo X 9-13 μ ancho (media: 24.2 X 11 μ), (Malaguti y Subero, 1971). Se corroboró la identidad molecular de ambos fitopatógenos mediante ITS, en donde se encontró a *Curvularia lunata* (KJ404197.1) con 100% de similaridad; por otro lado respecto a *Phyllachora* sp (KC683439.1) con 95%.

Conclusiones

Phyllachora sp. y *Curvularia lunata* fueron identificados como los agentes asociados al CMA en la muestras presentes del estado de Chiapas y 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.

Literatura citada

- Barnett, H. L and Hunter, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3th. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA. 64(4):930-932.
- Doyle, J. J and Doyle, J. L. 1991. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 1:13-15.
- Garcés, F. F. R.; Aguirre, C. A. J.; Carbo, M. J. J y Liubá, D. G. A. 2011. Severidad de curvularia en 67 líneas autofecundadas S4 de maíz amarillo. Ciencia y Tecnología. 4(2):39-44.

by ITS, where he found *Curvularia lunata* (KJ404197.1) with 100% similarity was confirmed; on the other hand, regarding *Phyllachora* sp. (KC683439.1) with 95%.

Conclusions

Phyllachora sp. and *Curvularia lunata* were identified as associated agents to the CMA in the samples present state of Chiapas and Guerrero. This is the first report of the presence of *Curvularia lunata* associated with tar spot in the corn crop in the subtropical zone in Mexico.

End of the English version



- González, M.; Laguna, I.; Eyherabide, G y Muñoz, J. 2008. Caracterización de factores de resistencia y virulencia en la interacción *Zea mays*-*Puccinia sorghi*. HM-40. In: 1^{er} Congreso Argentino de Fitopatología. 28-30 mayo. Córdoba, Argentina.
- Hamlin, R. T. 1999. Combined keys to illustrated genera of ascomycetes. APS Press. St. Paul. Minnesota. Vol. I y II. 63-64 pp.
- 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. Rev. Mex. Fitopatol. 7:129-135.
- Hock, J.; Dittrich, U.; Renfro, B. L and Kranz, J. 1992. Sequential development of pathogens in the maize tar spot disease complex. Mycopathologia. 117:157-161.
- Malaguti, G. y Subero, L. J. 1971. Manchas foliares del maíz causadas por *Curvularia* en Venezuela. Agronomía Tropical. Centro de Investigaciones Agronómicas, Maracay. 21(2):119-128.
- Malaguti, G. y Subero, L. J. 1972. La mancha de asfalto del maíz. Centro de Investigaciones Agronómicas, Maracay. Agronomía Tropical. 22(4):443-445.
- Pereyda, H. J.; Hernández, M. J.; Sandoval, I. J. S.; Aranda, O. S.; de León, C y Gómez, M. N. 2009. Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. Agrociencia. 43(5):511-519.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA-SIAP. 2010. Cierre de la producción agrícola por cultivo. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.