



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
DES CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



**Diversidad genética de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*
y respuesta del maíz a la inoculación artificial**

TESIS

**que para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL**

presenta

ING. GABRIELA SOL HERNANDEZ

Directora de tesis

**M.C. María de los Ángeles Rosales Esquinca
(UNACH)**

Co-Director de tesis

**Dr. Eduardo Raymundo Garrido Ramírez
(INIFAP)**

Villaflores, Chiapas, México

Febrero, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V
DIRECCIÓN



VILLAFLORES, CHIAPAS
07 DE FEBRERO DE 2018
OFICIO N° D/33/18

C. GABRIELA SOL HERNÁNDEZ
MAESTRANTE EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
P R E S E N T E.

En atención a que usted ha presentado los votos aprobatorios del Honorable Jurado, designado para su evaluación profesional, de la tesis titulada: "**Diversidad genética de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* y respuesta del maíz a la inoculación artificial**", por este conducto le comunico que se le autoriza la impresión del documento, de acuerdo a los lineamientos vigentes de la Universidad.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR"


M. C. ROBERTO REIMUNDO COUTIÑO RUIZ
DIRECTOR

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS



C. c. p. Archivo



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
DES CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



Esta tesis titulada “**Diversidad genética de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* y respuesta del maíz a la inoculación artificial**” presentada por la **Ing. Gabriela Sol Hernandez**, forma parte del proyecto de investigación “Mecanismos de infección y diversidad genética de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* en el cultivo de maíz” financiado por el Centro de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y Consultive Group for International Agricultural Research (CGIAR), otorgado para su realización en el campo centro de Chiapas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) bajo la responsabilidad del Dr. Eduardo Raymundo Garrido Ramírez.

Se incluye en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: Investigación, desarrollo y transferencia de tecnología en recursos fitogenéticos tropicales del cuerpo académico Caracterización de Recursos Fitogenéticos tropicales, del Cuerpo Académico UNACH-CA-3 Recursos Fitogenéticos Tropicales (CARFIT).

Se incluye en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: Manejo agroecológico de cultivos, del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
DES CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



Esta tesis titulada “**Diversidad genética de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* y respuesta del maíz a la inoculación artificial**” realizada por la Ing. **Gabriela Sol Hernández**, bajo la dirección y asesoría del Comité Tutorial indicado, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

M.C. MARÍA DE LOS ANGELES ROSALES ESQUINCA

CODIRECTOR

DR. EDUARDO RAYMUNDO GARRIDO RAMÍREZ
(INIFAP)

ASESORES

DR. BULMARO DE JESÙS COUTIÑO ESTRADA

DR. RICARDO RENÉ QUIROGA MADRIGAL
(CONSULTOR EXTERNO)



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
DES CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



Esta tesis titulada “**Diversidad genética de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* y respuesta del maíz a la inoculación artificial**” realizado por la Ing. **Gabriela Sol Hernández**, ha sido aprobada por la Comisión Revisora indicada, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMISIÓN REVISORA

M.C. MARÍA DE LOS ÁNGELES ROSALES ESQUINCA

DR. EDUARDO RAYMUNDO GARRIDO RAMÍREZ
(INIFAP)

DR. BULMARO DE JESÚS COUTIÑO ESTRADA

DR. RICARDO RENÉ QUIROGA MADRIGAL
(CONSULTOR EXTERNO)

CONTENIDO

RESUMEN	iiii
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.2 Objetivo general	2
1.2.1 Objetivos específicos.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Mancha de asfalto	3
2.1.1 Condiciones propicias para el desarrollo	4
2.1.2 Epidemiología	4
2.1.3 Signos y síntomas.....	5
2.1.4 Clasificación Taxonómica	5
2.1.5 Morfología	6
2.2 Resistencia genética	6
2.3 Inoculación artificial	9
2.3.1 Inoculaciones en campo	9
2.3.2 Inoculaciones en condiciones controladas.....	9
2.4 Mecanismos de infección de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis</i> y resistencia a estos hongos al maíz.....	11
2.5 Análisis de la región ITS del ADNr	12
2.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	13
2.7 Diversidad genética de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis</i>	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Localización del área de estudio	16
3.2 Siembra de los genotipos en invernadero	16
3.3 Colecta de inóculo en campo	16
3.4 Fase de laboratorio.....	18
3.4.1 Bioensayos	18
3.4.2 Ensayo en fragmentos de hoja de maíz.....	18
3.4.3 Ensayo en planta sana joven	18
3.4.4 Preparación de la suspensión de ascosporas.....	18
3.4.5 Primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	19
3.4.6 Segundo ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	19
3.4.7 Ensayo de inoculación en planta joven	20
3.4.8 Fijación de muestra.....	20
3.4.9 Método de recolección de datos	21
3.4.10 Análisis de los datos obtenidos.....	21
3.5 Aislamiento de <i>Microdochium</i> (anamorfo de <i>Monographella maydis</i>)	21
3.6 Análisis molecular de los hongos del CMA.....	22
3.6.1 Extracción de ADN de <i>Phyllachora maydis</i> , <i>Monographella maydis</i> y <i>Microdochium</i>	22
3.6.2 Cuantificación del ADN	22
3.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
3.6.4 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR	23
3.6.5 Secuenciación.....	24
3.6.6 Análisis filogenético.....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1 Inoculación <i>in vitro</i>	26

4.1.1 Primer ensayo de inoculación en fragmentos de hojas sanas de maíz.....	26
4.1.2 Segundo ensayo de inoculación en fragmentos de hojas sanas de maíz..	27
4.2 Inoculación <i>in vivo</i>	31
4.2.1 Inoculación en plantas jóvenes y sanas de maíz	31
4.3 Diversidad genética	34
4.3.1 Extracción y cuantificación de ADN	34
4.3.2 Amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa.....	36
4.3.3 Secuenciación y comparación de secuencias.....	37
4.3.4 Análisis filogenético.....	40
5. CONCLUSIONES	45
6. LITERATURA CITADA.....	46
7. ANEXOS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación del campo experimental centro de Chiapas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).....	16
Figura 2. Porcentaje de estomas infectados de los genotipos DK-390, SP-500 y P-4083W frente a la inoculación <i>in vitro</i> con <i>P. maydis</i> y <i>M. maydis</i>	27
Figura 3. Porcentaje de estomas infectados de los genotipos DK-390, SP-500, P-4083W, Chapingo Comiteco y Chapingo Tuxpeño por inoculación <i>in vitro</i> con ascosporas de <i>P. maydis</i> y <i>M. maydis</i>	29
Figura 4. Respuesta de los genotipos de maíz DK-390, Chapingo Tuxpeño, P-4083W y SP-500 a la inoculación con ascosporas de <i>P. maydis</i> y <i>M. maydis</i> , en planta jóvenes.....	33
Figura 5. Productos de amplificación de la región ITS del ADNr de <i>Phyllachora maydis</i> , <i>Monographella maydis</i> y <i>Microdochium</i>	37
Figura 6. Relaciones filogenéticas de 11 secuencias de ADN de <i>Phyllachora</i> provenientes de Chiapas y la secuencia 12 como testigo positivo (<i>Phyllachora maydis</i>) mediante el método UPGMA.....	41
Figura 7. Relaciones filogenéticas de 6 secuencias de <i>Monographella</i> provenientes de Chiapas y la secuencias 7 (<i>Monographella</i> sp.) y 8 (<i>Microdochium seminicola</i>) como testigo positivo mediante el método UPGMA.....	42
Figura 8. Relaciones filogenéticas de 2 secuencias de <i>Microdochium</i> provenientes de Chiapas y la secuencia 3 como testigo positivo (<i>Microdochium seminicola</i>) mediante el método UPGMA.....	43
Figura 9. Relaciones filogenéticas de dos secuencias de <i>Coniothyrium</i> provenientes de Chiapas y la secuencias 3 (<i>Coniothyrium</i> sp.) y 4 (<i>Coniothyrium fuckeli</i>) como testigo positivo mediante el método UPGMA.....	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Relación de muestras de maíz con complejo mancha de asfalto, colectadas en diferentes Municipios de Chiapas.....	17
Cuadro 2. Relación de muestras de maíz con complejo mancha de asfalto, colectadas en el municipio de Monjas, Departamento de Jalapa, República de Guatemala.....	18
Cuadro 3. Cebadores utilizados para amplificar la región ITS del ADN	23
Cuadro 4. Composición y concentración de reactivos de la mezcla para PCR, con un volumen final de 50 µL por reacción.....	23
Cuadro 5. Relación de muestras de los hongos causales de la mancha de asfalto enviadas a secuenciar.....	25
Cuadro 6. Valor coeficiente de variación (CV) y Pr>F que presentaron los genotipos DK390, SP500 y P4083W durante el lapso de 12 a 180 horas.....	26
Cuadro 7. Porcentaje de estomas infectados de la inoculación <i>in vitro</i> de <i>P. maydis</i> y <i>M. maydis</i> en los genotipos DK390, SP500 y P4083W.....	26
Cuadro 8. Valor de coeficiente de variación (CV) y Pr>F que presentaron los genotipos DK390, SP500, P4083W y los locales Chapingo Tuxpeño y Chapingo Comiteco durante el lapso de 60 a 300 horas.....	28
Cuadro 9. Porcentaje promedio de estomas infectados por la inoculación <i>in vitro</i> de <i>P. maydis</i> y <i>M. Maydis</i> en los genotipos DK390, SP500, P4083W y los locales Chapingo Tuxpeño y Chapingo Comiteco.....	28
Cuadro 10. Valor de C.V y Pr>F que presentaron los genotipos DK390, SP500, P4083W y Chapingo Tuxpeño durante el lapso de 8 a 45 días.....	31
Cuadro 11. Porcentaje promedio de estomas infectados de la inoculación <i>in vivo</i> de <i>P. maydis</i> y <i>M. maydis</i> en plantas sanas de maíz durante 45 días.....	31
Cuadro 12. Concentración de ADN de muestras de <i>Microdochium</i> provenientes de Chiapas.....	34
Cuadro 13. Concentración de ADN de muestras de <i>Phyllachora maydis</i> provenientes de Chiapas y Guatemala.....	35
Cuadro 14. Concentración de ADN de muestras de <i>Monographella maydis</i> provenientes de Chiapas y Guatemala.....	36
Cuadro 15. Comparación de secuencias de <i>Phyllachora</i> provenientes de Chiapas con secuencias depositadas en el Genbank.....	38
Cuadro 16. Comparación de secuencias de <i>Monographella</i> provenientes de Chiapas con secuencias depositadas en el Genbank.....	39
Cuadro 17. Comparación de secuencias de <i>Microdochium</i> y <i>Coniothyrium</i> provenientes de Chiapas con secuencias depositadas en el Genbank.....	40

INDICE DE ANEXOS

Anexo 7.1 Fotografías de los hongos causales de la enfermedad mancha de asfalto.....	53
Anexo 7.2 Fotografías de los signos y síntomas los hongos causales de la mancha de asfalto	54
Anexo 7.3 Fotografías de los ensayos de inoculación <i>in vitro</i> en fragmentos de hojas de maíz.....	55
Anexo 7.4 Análisis de varianza del primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i> en fragmentos de hojas de maíz de los genotipos DK390, SP500 y P4083W...	58
Tabla 1A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 12 horas del primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	58
Tabla 2A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 36 horas del primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	58
Tabla 3A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 60 horas del primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	58
Tabla 4A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 84 horas del primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	58
Tabla 5A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 108 horas del primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	59
Tabla 6A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 132 horas del primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	59
Tabla 7A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 156 horas del primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	59
Tabla 8A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 180 horas del primer ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	59
Anexo 7.5 Análisis de varianza del segundo ensayo de inoculación <i>in vitro</i> en fragmentos de hojas de maíz de los genotipos DK390, SP500 y P4083W y los locales Chapingo Comiteco y Chapingo Tuxpeño.....	60
Tabla 1B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 60 horas del segundo ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	60
Tabla 2B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 120 horas del segundo ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	60
Tabla 3B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 180 horas del segundo ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	60

Tabla 4B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 240 horas del segundo ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	60
Tabla 5B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 300 horas del segundo ensayo de inoculación <i>in vitro</i>	61
Anexo 7.6 Análisis de varianza del ensayo de inoculación <i>in vivo</i> en plantas jóvenes y sanas de maíz de los genotipos DK390, SP500 y P4083W y el local Chapingo Tuxpeño.....	61
Tabla 1C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 8 días del ensayo de inoculación con esporas de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis in vivo</i> en planta sana joven de maíz.....	61
Tabla 2C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 15 días del ensayo de inoculación con esporas de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis in vivo</i> en planta sana joven de maíz.....	61
Tabla 3C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 23 días del ensayo de inoculación con esporas de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis in vivo</i> en planta sana joven de maíz.....	61
Tabla 4C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 31 días del ensayo de inoculación con esporas de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis in vivo</i> en planta sana joven de maíz.....	62
Tabla 5C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 38 días del ensayo de inoculación con esporas de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis in vivo</i> en planta sana joven de maíz.....	62
Tabla 6C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 45 días del ensayo de inoculación con esporas de <i>Phyllachora maydis</i> y <i>Monographella maydis in vivo</i> en planta sana joven de maíz.....	62
Anexo 7.7 Relación de muestras enviadas a secuenciar y secuencias resultantes de cada una de ellas.	63
Anexo 7.8 Secuencias registradas en el Genbank utilizadas como testigos en el análisis filogenético de las secuencias obtenidas de las muestras con mancha de asfalto.	63

DEDICATORIA

A mi padre el Sr. David Sol Flores por su apoyo incondicional durante el curso de esta maestría.

A mi tía Josefina Ovando Álvarez por ser incondicional conmigo y apoyarme siempre.

A mis hermanas Clara Luz, Margoth y Sandra por ser mi motivo de superación y por darme a los más bellos sobrinos a quienes amo: Brandon, Sofía, Bryan, Ximena, Leonardo y Yeison.

A mi compañero de vida, mi novio y mi amigo, por su compañía y apoyo.

A mi comité tutorial: La M.C Ma. De los Ángeles Rosales Esquinca, Dr. Eduardo Garrido Ramírez, Dr. Ricardo René Quiroga Madrigal y al Dr. Bulmaro de Jesús Coutiño Estrada, por su apoyo incondicional y por los conocimientos que me transmitieron durante este trabajo de investigación cada uno de ustedes hacia mí.

A mis amigos y compañeros de la MCPAT con quienes compartí los mejores momentos; porque son personas muy profesionales y de grandes conocimientos; gracias por permitir que esta experiencia armoniosa de superación.

Al equipo de trabajo, Dr. Garrido, Ing. Areli, Lic. Gaby, M.C. Anayanci, Ing. Gaby Sarmiento, por todo el apoyo incondicional durante mi estancia en el INIFAP.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de otorgada para poder estudiar y terminar de manera satisfactoria esta Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical (MCPAT).

A la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH) por ser mi casa de aprendizaje y formación durante la Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical.

Al Instituto Nacional de Investigación forestal, Agrícola y Pecuaria (INIFAP) apoyo otorgado mediante en financiamiento a través del proyecto “**Mecanismos de la resistencia del maíz al complejo de la mancha de asfalto y selección de germoplasma**” del cual forma parte este trabajo de tesis.

A mi Co-Director Dr. Eduardo Garrido por el apoyo otorgado y brindarme la oportunidad de trabajar en uno de sus proyectos de suma importancia, por la confianza que me fue otorgada.

A Mi Directora la M.C. Ma. De Los Ángeles Rosales Esquinca por ser mi guía en este aprendizaje constante.

A mi asesor Dr. Ricardo Quiroga Madrigal. Por su apoyo otorgado durante la maestría, por creer en mí. Y por exigirme en ser puntual siempre.

A mi asesor el Dr. Bulmaro de Jesús Coutiño Estrada por brindarme la oportunidad de adquirir muchos de sus conocimientos y por la confianza otorgada desde el inicio de esta maestría.

RESUMEN

El maíz tiene sus orígenes en el centro de Mesoamérica y es considerado hasta la fecha uno de los cultivos básicos en la alimentación, principalmente en México. La producción de este cultivo ha ido en decremento debido a diversos factores, uno de ellos son las enfermedades causadas por fitopatógenos. La mancha de asfalto la cual es producida por *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* principalmente, ha provocado pérdidas económicas importantes en México y otros países como lo es Guatemala. Este trabajo de investigación surge a partir de la necesidad de conocer los mecanismos de resistencia del maíz a *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* como también conocer la variabilidad genética de las poblaciones estos patógenos.

Para evaluar la resistencia del maíz a *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* se utilizaron tres variedades comerciales (DK390, SP500, P4083W) y dos maíces locales (Chapingo-Tuxpeño y Chapingo-Comiteco), teniendo así variedades resistentes y susceptibles. Con un diseño completamente al azar (cuatro repeticiones y cinco genotipos), Se realizaron dos ensayos de inoculación *in vitro* en fragmentos de hojas y uno de inoculación *in vivo* en planta sana joven de maíz, con una suspensión de esporas de *P. maydis* y *M. maydis* a una concentración de $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ y $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Se tomaron muestras a las 12, 36, 60, 84, 108, 132, 156 y 180 h en el primer ensayo *in vitro*; 60, 120, 180, 240 y 300 h en el segundo *in vitro* y 8, 15, 23, 31, 38 y 45 días en el ensayo *in vivo*. Se evaluó el número de estomas infectados por tiempo de inoculación. Se realizó el análisis de varianza (ANVA) y la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS (Versión 9.3).

Los resultados para los genotipos DK390, Chapingo-Comiteco y Chapingo-Tuxpeño, mostraron alta incidencia en el proceso inicial de infección a nivel estomático a la enfermedad mancha de asfalto.

El genotipos P4083W presentó incidencia alta en los ensayos de inoculación *in vitro* en fragmentos de hoja; mientras que en el ensayo de inoculación *in vivo* en planta sana y joven de maíz presentó incidencia media de estomas infectados. Mientras que el genotipo SP500 presentó incidencia media en el proceso inicial de infección a nivel estomático a la enfermedad mancha de asfalto.

Para el estudio de variabilidad genética, se realizó una colecta de campo tomando muestras (hojas de maíz) con síntomas y signos de *P. maydis* y *M. maydis* en los municipios de Villaflores, Ocosingo, Oxchuc, Ocozocoautla, Las margaritas, Tzimol, Comitán, Teopisca y Venustiano Carranza y se recibieron muestras procedentes de Monjas Jalapa, Municipio de Guatemala. Se realizó extracción de ADN directo del tejido enfermo, usando el método de Dellaporta *et al.* (1983); con la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizaron los 'primers' ITS1 e ITS4; los productos de PCR se enviaron a secuenciar, las secuencias resultantes se compararon con secuencias depositadas en el Genbank. El análisis filogenético se realizó mediante el método UPGMA el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Versión 7.

Se obtuvieron secuencias de 11 muestras de ADN de *Phyllachora maydis*, seis de *Monographella*, dos de *Microdochium* y dos *Coniothyrium*. Las secuencias MA141501, MA143001, MA141401 procedentes de Huixtán, MA142201, MA142301 procedentes de Villaflores, MA140901, MA141101 y MA141201 procedentes de Oxchuc, MA142401 procedente de Las Margaritas y la secuencia MA142101 procedente de Ocozocoautla, corresponden a *Phyllachora maydis* con un 83 a 99 % de identidad con *Phyllachora maydis* (accesión KU184459).

Las secuencias MA141702 y MA142202 procedente de Villaflores; MA141902 y MA142002 procedente de Ocozocoautla; MA141202 procedente de Oxchuc y la secuencia MA140702 procedente de Ocosingo, tienen una identidad de un 88 a 96% *Monographella* sp. y *Microdochium semicola* (KP859022). Considerando que *Microdochium* es la fase asexual de *Monographella*, se llega a la conclusión que estas secuencias se clasifican como *Monographella* sp. (accesión JN688923).

Las secuencias MA141902 Procedente de Ocozocoautla y la MA140902 procedente de Oxchuc se clasificaron como *Microdochium semicola* (accesión KP859022) con un 94 a 95% de identidad. Mientras que las secuencias MA141304 y la MA141504 procedentes de Huixtán se clasificaron como *Coniothyrium* sp. (accesión HQ115651) con un 94% de identidad.

Palabras Clave: Mancha de asfalto, resistencia, inoculación artificial, diversidad genética.

ABSTRACT

Corn has its origins in the center of Mesoamerica and it is considered to date one of the staple crops in food, mainly in Mexico. The production of this crop has been decreasing due to several factors, one of them are diseases caused by phytopathogens. Tar Spot Complex which is produced by *Phyllachora maydis* and *Monographella maydis* mainly, has caused significant economic losses in Mexico and other countries such as Guatemala. This research work arises from the need to know the resistance mechanisms of corn to *Phyllachora maydis* and *Monographella maydis* as well as to know the genetic variability of the populations of these pathogens.

To evaluate the resistance of maize to *Phyllachora maydis* and *Monographella maydis*, three commercial varieties (DK390, SP500, P4083W) and two local maizes were used (Chapingo-Tuxpeño and Chapingo-Comiteco), thus having resistant and susceptible varieties. With a completely randomized design (four replications and five genotypes), two in vitro inoculation tests were carried out on leaf fragments and one inoculation in vivo on healthy young maize plant, with a spore suspension of *P. maydis* and *M. maydis* at a concentration of $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ y $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Samples were taken at 12, 36, 60, 84, 108, 132, 156 and 180 hours in the first in vitro assay; 60, 120, 180, 240 and 300 hours in the second in vitro and 8, 15, 23, 31, 38 and 45 days in the in vivo assay. The number of infected stomata was evaluated by inoculation time. Analysis of variance (ANVA) and Tukey's means test ($P \leq 0.05$) were performed with the statistical package SAS (Version 9.3).

The results for the genotypes DK390, Chapingo-Comiteco and Chapingo-Tuxpeño genotypes showed high incidence in the initial process of stomatal infection to Tar Spot Complex disease, resulting to be susceptible.

The P4083W genotypes showed high incidence *in vitro* inoculation tests on leaf fragments; while in the in vivo inoculation test in healthy and young maize plants, there was an average incidence of infected stomata. While the SP500 genotype had an average incidence in the initial process of stomatal infection to Tar Spot Complex disease, resulting to be resistant.

For the study of genetic variability, a field collection was carried out taking samples (corn leaves) with symptoms and signs of *P. maydis* and *M. maydis* in the municipalities of Villaflores, Ocosingo, Oxchuc, Ocozocoautla, Las Margaritas, Tzimol, Comitán, Teopisca and Venustiano Carranza and samples were received from Monjas Jalapa, Municipality of Guatemala. DNA extraction was performed directly from the diseased tissue, using the Dellaporta et al. (1983); in the polymerase chain reaction (PCR) using the primers ITS1 and ITS4; the PCR products were sent to be sequenced, the resulting sequences were compared with sequences deposited in the Genbank. Phylogenetic analysis was performed using the Molecular Evolutionary UPGMA Genetics Analysis (MEGA) program Version 7.

Sequences of 11 DNA samples from *Phyllachora maydis*, six from *Monographella*, two from *Microdochium* and two *Coniothyrium* were obtained. The sequences MA141501, MA143001, MA141401 from Huixtán, MA142201, MA142301 from Villaflores, MA140901, MA141101 and MA141201 from Oxchuc, MA142401 from the Margaritas and the MA142101 sequence from Ocozocoautla correspond to *Phyllachora maydis* with 83 to 99% Identity with *Phyllachora maydis* (accession KU184459).

The sequences MA141702 and MA142202 from Villaflores; MA141902 and MA142002 from Ocozocoautla; MA141202 from Oxchuc and sequence MA140702 from Ocosingo, have an identity of 88 to 96% *Monographella* sp. and *Microdochium semicola* (KP859022). Considering that *Microdochium* is the asexual phase of *Monographella*, it is concluded that these sequences are classified as *Monographella* sp. (accession JN688923).

Sequences MA141902 From Ocozocoautla and MA140902 from Oxchuc were classified as *Microdochium semicola* (accession KP859022) with 94 to 95% identity. While sequences MA141304 and MA141504 from Huixtán were classified as *Coniothyrium* sp. (accession HQ115651) with 94% identity.

Keywords: Tar Spot Complex, resistance, artificial inoculation, genetic diversity.

1. INTRODUCCIÓN

El maíz es la base de la alimentación en México, donde se producen aproximadamente 26 millones de toneladas al año, sin embargo, esta producción se ha visto afectada por diversas enfermedades, una de ellas es el complejo mancha de asfalto (CMA), que resulta de la interacción sinérgica de tres hongos, *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Coniothyrium phyllachorae*. Esta enfermedad ha provocado pérdidas económicas significativas en los últimos años.

El CMA fue reportado por Maublanc en el año 1904 por primera vez en México, existen reportes en Nayarit, Jalisco, Guerrero, Chiapas, Veracruz (Hock *et al.*, 1989) y actualmente en el estado de México (Ríos-Herrera *et al.*, 2016). Esta enfermedad se había limitado a áreas específicas de 1300 a 2000 msnm y también en zonas productoras de maíz tropical y subtropical, sin causar daños severos.

De 2001 a 2005, en Guerrero se reportó el 40% de pérdidas de las 3,100 ha sembradas de maíz en el valle de Mochitlán, a causa del CMA, lo que representa pérdidas severas en la producción de grano; en 2005 se reportó la pérdida total de 600 ha en el municipio de Tixtla, con un incremento drástico en año 2007, con pérdidas en más de 10 municipios, convirtiéndose en una importante limitante para la producción de maíz en ese estado. En Oaxaca se reportaron altas incidencias en el año 2012, con pérdidas de más del 50% en la producción de maíz (López *et al.*, 2011).

El CMA es una enfermedad que no solo se encuentra en México, es considerada también de importancia económica en El Salvador, Guatemala, Colombia, Nicaragua, Honduras, y otros países latinoamericanos; es por ello que se ha creado un enfoque integrado de control de esta enfermedad tanto en México como en otros países que consiste en el uso de prácticas culturales y control químico.

Actualmente existen estudios que han evaluado variedades de maíz y respuestas de estos a la infección natural en campo al CMA, tomando en cuenta las condiciones climáticas, las prácticas culturales y la aplicación de fungicidas en la producción. Hasta ahora los resultados más favorables ha sido el uso de variedades resistentes, siendo también el más económico.

Los mecanismos de la resistencia del maíz al CMA no están bien entendidos, no es claro si la respuesta inicial del hospedante es a *Phyllachora maydis*, a *Monographella maydis* o a ambos hongos, los cuales deben estar presentes para que se desarrollen los síntomas principales de la enfermedad (Hock *et al.*, 1995).

Se desconoce la evolución de las cepas de los hongos causales de la mancha de asfalto, existe la necesidad de conocer acerca de la estructura genética de las poblaciones de los patógenos causales del CMA, con el fin de apoyar los esfuerzos de mejoramiento del maíz en la búsqueda de resistencia y/o tolerancia.

1.2 Objetivo general

Analizar los mecanismos de infección que utilizan *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* para provocar daños en el cultivo maíz y determinar la variabilidad genética estos hongos.

1.2.1 Objetivos específicos

- a) Evaluar la respuesta de cinco genotipos de maíz a la inoculación artificial *in vitro* con esporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* en plantas jóvenes.
- b) Estudiar la variabilidad genética de las poblaciones de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* (y su anamorfo *Microdochium*) provenientes de Chiapas y Guatemala mediante secuenciación y análisis filogenético.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Mancha de asfalto

El complejo mancha de asfalto del maíz es una enfermedad producida por la interacción sinérgica de tres hongos *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y el hiperparásito *Coniothyrium phyllachorae* (Maublanc, 1904). Esta enfermedad ha estado presente en los campos maiceros de las zonas tropicales; sin embargo, a partir de 2007, su importancia económica ha crecido, convirtiéndose en una importante limitante, principalmente para la producción en México, América Central y Colombia (Monterroso, 2012).

Rult *et al.* (2016) mencionan que el agente causal del inicio de la enfermedad mancha de asfalto es *Phyllachora maydis* Maubl, mediante la confirmación morfológica a través de exámenes microscópicos en comparación con descripciones publicadas del hongo (Hock *et al.*, 1989).

Phyllachora maydis se ha reportado en México, Cuba, Puerto Rico, Panamá, Nicaragua, El Salvador, Venezuela, Costa Rica, Colombia, Guatemala, Honduras, Brasil, Nueva York, Miami y en Estados Unidos, en este último, se detectaron cargamentos de maíz con *Phyllachora maydis* procedentes de Guatemala y en San Diego, California, en cargamentos procedentes de México (Cline, 2005).

En el 2007 y 2008 en Guatemala se reportaron pérdidas de más del 80 % en la producción de grano (Monterroso 2012, 2014); en el 2011 en Honduras se vio afectada la producción del 35 al 75% (DGSV, 2011); en Oaxaca en el 2012 se reportaron pérdidas del 70 al 90%, y en algunas regiones hubo pérdidas hasta del 100% (Mahuku *et al.*, 2015).

En México se reportó por primera vez a *Linochora* (estado imperfecto de *P. maydis*) y *Monographella maydis* en 1984 por Muller y Samuels; en 1904 Maublanc reporta a *Phyllachora maydis* y *Coniothyrium phyllachorae*. Existen reportes de esta enfermedad del 30% en la etapa de floración, lo que provocó una pérdida en la producción de 400 a 500 mil hectáreas de maíz de los estados de Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Hock *et al.*, 1989).

Actualmente las pérdidas de cosecha que provoca esta enfermedad varían del 15 al 50%, en casos muy graves hasta del 100% y se considera económicamente importante en unas 800 mil hectáreas distribuidas en los estados de Jalisco, Michoacán, Nayarit, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero (González, 2013).

En Chiapas, se reportaron los primeros daños causados por la mancha de asfalto en el año 1985, los únicos hongos reportados en este estado son *Phyllachora* y *Microdochium* (Hock, 1989; Quiroga-Madrigal, 1995). En la Frailesca también existen reportes de daño causado por la mancha de asfalto, aunque se desconoce el impacto económico que ha causado esta enfermedad en esta zona (Martínez y Espinosa, 2014).

2.1.1 Condiciones propicias para el desarrollo

La mancha de asfalto se presenta en zonas relativamente frescas y húmedas de los trópicos; se desarrolla cuando las temperaturas durante el día son de 17° a 22°C y excesos de lluvia que provocan humedad relativa superior al 75% (10 a 20 días nublados en el mes) (Mahuku *et al.*, 2013). La germinación de las ascosporas y la formación de apresorios ocurren cuando se presentan temperaturas de entre 10 a 20°C y se reduce cuando es más de 25°C, lo que explica su predominancia en condiciones de días nublados y frescos (Dittrich *et al.*, 1991).

Cuando las condiciones son propicias para el desarrollo de la enfermedad, la planta de maíz puede secarse por completo de 8 a 14 días después de la infección y si aparece en la etapa temprana, antes de que la mazorca empiece a llenarse, estas presentan poco grano, de poco peso, marchitos y germinan prematuramente. Lo que puede provocar pérdidas en el rendimiento de la producción de maíz de más del 50% (Hock *et al.*, 1989; San Vicente y Mahuku, 2011).

2.1.2 Epidemiología

Phyllachora maydis afecta al cultivo de maíz en el estado de plántula, siendo este el hongo que inicia la infección, después aparecen signos y síntomas por *Monographella maydis*, hongo que por lo general ataca alrededor de la floración, aunque también puede manifestar infecciones precoces cuando las plantas tienen de ocho a diez hojas (Hock, 1989; Hernández *et al.*, 2015). La secuencia de esta enfermedad es observada siempre de la misma forma en campo. Las lesiones que causa la mancha de asfalto empiezan a desarrollarse en las hojas inferiores, la infección continúa hacia arriba, infectando incluso las hojas más jóvenes, ocasionando pérdidas que van de 30 a 100%, esto se debe a que las lesiones necróticas llegan a fusionarse y provocan quemaduras completas del follaje en menos de 8 días, debido a la coalescencia de lesiones inducidas por los distintos hongos y atribuido a la producción de una toxina (Hock *et al.*, 1989; Pereyda *et al.*, 2009).

La germinación de ascosporas y la formación de apresorios de *Phyllachora maydis* se da principalmente cuando se presentan temperaturas entre 10 y 20°C, lo cual explica su predominancia en condiciones de días nublados (Dittrich *et al.*, 1991). La transportación de ascosporas de este hongo se da por el viento, altamente influenciada por las condiciones de luz diurna, alcanza una liberación máxima entre las 17 y 21 horas (Monterroso, 2014).

Phyllachora maydis se ha probado que sobrevive en restos de cosecha, que soporta altas temperaturas quedando en incubación, hasta que inicia el nuevo ciclo del cultivo del maíz, no se ha reportado ningún hospedante alternativo de este hongo (Martínez y Espinosa, 2014). Debido a que se han realizado pruebas del tejido seco con signos y síntomas *P. maydis*, como montajes permanentes en glicerol al 50% diluido en agua y se han observado ascosporas de este hongo (Malaguti y Subero, 1972; Monterroso, 2012).

Phyllachora maydis únicamente se hospeda en el maíz (*Zea mays* L.) (Parbery, 1967), en México hasta ahora no existe reporte de ningún hospedante alterno incluyendo otras especies del género *Zea* (Hock *et al.*, 1995). Tampoco se transmite por semilla; por si solo provoca un bajo nivel de necrosis, aunque este nivel podría ser económicamente significativo en algunas áreas, el daño más importante es causado por la sucesión posterior del hongo *Monographella maydis* (Chalkley, 2015).

Otros factores que contribuyen a la expresión de la enfermedad son los niveles altos de fertilización nitrogenada, las siembras tardías, la repetición de siembra ciclo tras ciclo de maíz por año, el uso de genotipos susceptibles, la baja luminosidad, la edad de alta vulnerabilidad del hospedante y virulencia de los patógenos involucrados, además que el inóculo puede mantenerse de un ciclo a otro en residuos de cosecha (Hock *et al.*, 1989).

2.1.3 Signos y síntomas

Los síntomas de la mancha de asfalto inician en las hojas presentando puntos negros abultados, brillantes y ligeramente abultados de color negro, 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, asociadas a la presencia de *Phyllachora maydis*. Posteriormente ocurren lesiones alrededor de las producidas por *Phyllachora maydis*, de forma elíptica, color verde claro de 1-4 mm inducidos por *Monographella maydis*, a este síntoma en algunas regiones de Veracruz le llaman “ojo de pescado” (Hock *et al.*, 1989). González *et al.* (2004), mencionan que productores locales en el estado de Guerrero le llaman “quemazón”; en la Frailesca, Chiapas, le llaman “fuego” y también se le conoce como “chamusco” o “asollamiento” (García, 1986).

2.1.4 Clasificación Taxonómica

Los hongos asociados a la mancha de asfalto son clasificados de la siguiente manera:

Reino:	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>	<i>Fungi</i>
Phylum:	<i>Ascomycota</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Ascomycota</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Dothideomycetes</i>
Orden:	<i>Phyllachorales</i>	<i>Xylariales</i>	<i>Pleosporales</i>
Familia:	<i>Phyllachoraceae</i>	<i>Incertae sedis</i>	<i>Leptosphaeriaceae</i>
Género:	<i>Phyllachora</i>	<i>Monographella</i>	<i>Coniothyrium</i>
Especie:	<i>P. maydis</i>	<i>M. maydis</i>	<i>C. phyllachorae</i>
Referencia:	Maublanc, 1904	Müller and Samuels, 1984	Maublanc, 1904

2.1.5 Morfología

Phyllachora maydis: Los estromas o “clípeos” están constituidos por un conjunto de ascocarpos (peritecios), casi esféricos, sumergidos en el mesófilo, con un diámetro promedio de 190 μm . Las ascas son cilíndricas, cortas, pediceladas, alargadas (100-180 x 8-10 μm), conteniendo ocho ascosporas, más o menos elipsoidales, hialinas, sin septos, dispuestas en posición monoseriadas, midiendo en promedio 6 X 10.5 μm (Malaguti y Subero, 1972; Monterroso, 2012).

Monographella maydis: El ascocarpo se encuentra inmerso en el tejido del hospedante, a menudo rodeado de hifas intramatriciales, ascosporas alargadas ovoides, hialinas (Müller y Samuels, 1984).

Las especies *Monographella* se caracterizan por la producción de peritecios sumergidos en vainas foliares en sustratos naturales. En cultivo, las peritecias son superficiales, globosas, con perífisis clavadas, muestran un peridio compuesto por células isodiamétricas a subglobosas de textura angularis-epidermoidea y paráfisis apicales libres. Los ascos son oblongos para clavarse, con ocho ascosporas biseriadas, y con un anillo apical refractivo, amiloide, plano y en forma de embudo. Las ascosporas son fusiformes u oblongas, hialinas, rectas o ligeramente curvas, y lisas. *Monographella* actualmente incluye 11 especies (Hernández-Restrepo, *et al.*, 2016).

Microdochium maydis: Esporodoquios superficiales en el tejido de la hoja, con células conidiogénicas simpátricas, a menudo subdenticuladas, y conidios más o menos fusiformes, rectos a algo curvos o falcados, 0-3-septos o incluso pluriseptados, hialinos, con ápices redondeados (Quiroga-Madrigal, 1995; Hernández-Restrepo, 2016). Se sabe que las formas sexuales de las especies de *Microdochium* residen en *Monographella* (*Amphisphaeriaceae*, *Xylariales*) (Parkinson *et al.*, 1981; Samuels y Hallet 1983; Von Arx, 1984; Jaklitsch y Voglmayr 2012; Hernández-Restrepo *et al.*, 2016).

Las especies de *Microdochium* son reconocidas como hongos tipo *Fusarium*; sin embargo, las células conidiógenas en *Microdochium* spp. no son fialídicos como en las especies verdaderas de *Fusarium* y los conidios tienen una base truncada en lugar de células basales (Hernández-Restrepo, *et al.*, 2016).

2.2 Resistencia genética

Se denomina resistencia a la capacidad que tienen un organismo hospedante para limitar, detener, neutralizar o sobreponerse completamente, o en cierto grado a la actividad nociva de un organismo patogénico o virus, después que se ha establecido un contacto íntimo entre el hospedante y el patógeno o cuando este último se ha establecido y ha iniciado su desarrollo (Nicks *et al.*, 1993; Bos y Parlevliet, 1995).

La resistencia, vista desde su expresión fenotípica puede restringir el establecimiento de la relación parasítica entre patógeno y la planta en el lugar y durante el proceso de infección (resistencia completa), o limitar la magnitud de la colonización y/o

reproducción del patógeno en la planta tras el establecimiento de la infección (resistencia incompleta o parcial). En la mayor parte de los casos, especialmente con los patógenos biotróficos, la resistencia completa se expresa como una respuesta de hipersensibilidad (Jiménez-Díaz, 2000), se caracteriza por la muerte celular programada de las células vegetales próximas al sitio de infección y penetración del patógeno (Greenberg, 1997).

Considerada de forma aislada, la reacción de resistencia es regulada en la planta por genes nucleares o citoplásmicos (Jiménez-Díaz, 2000). Por lo tanto, la resistencia es un carácter heredable controlado principalmente por el sistema genético nuclear, y en algunos casos por el citoplásmico. Genéticamente la resistencia está determinada por un único gen, un par de genes o múltiples genes en un complejo sistema poligénico (Paliwal, 2001; Agrios 2005). Por otra parte, se reconocen básicamente dos sistemas de resistencia verdadera: la resistencia vertical (también llamada resistencia monogénica o completa) y la resistencia horizontal (denominada como resistencia poligénica o parcial) (Paliwal, 2001; Niks y Lindhout, 2004).

Vanderplank (1963) fue quien estableció y aclaró las bases y conceptos teóricos de los tipos de resistencia vegetal. La resistencia vertical o de raza específica, también conocida como hipótesis de la relación gen a gen, fue inicialmente formulada en el patosistema lino-roya de lino (Flor, 1956). En este sistema, el fenotipo de resistencia es consecuencia de la interacción entre los genotipos del cultivar y de las raza o razas interactuantes, de manera que por cada gen de resistencia en el hospedante existe un gen específico complementario que condiciona la virulencia en el patógeno (Jiménez-Díaz, 2000; Niks y Lindhout, 2004). Las características básicas de la relación de gen a gen son que la resistencia se expresa como una reacción de hipersensibilidad, la resistencia es generalmente recesiva y regulada por genes individuales independientes, una sola combinación incompatible entre los genómicos interaccionantes (un alelo dominante de resistencia complementado por su alelo dominante de no patogenicidad) es epistática sobre cualquier otra combinación, la susceptibilidad requiere que ninguno de los alelos de resistencia y no patogenicidad funcionen como genes condicionales, es decir, la expresión de uno de ellos solo puede ser reconocida en presencia del otro (Jiménez-Díaz, 2000).

Uno de los aspectos más intrigantes de la resistencia vertical es su alta especificidad. No solo es específica a especies de patógenos, sino también a ciertos genotipos del patógeno. Así, cuando varios genotipos del hospedante son inoculados con varios aislados del patógeno se observa un espectro diferente de virulencia para cada aislado. El espectro de virulencia es la gama de líneas resistentes para las cuales un aislado muestra virulencia; así, aislados con el mismo espectro de virulencia constituye una raza (Niks y Lindhout, 2004). La resistencia vertical tiene múltiples ventajas; las clases fenotípicas resistentes y susceptibles están basadas en tipos específicos de lesiones, por lo que la selección de plantas resistentes en una progenie segregante es relativamente simple, también es simple la transferencia de esa resistencia de un

germoplasma a otro, está dirigida contra razas específicas del patógeno y confiere de una protección completa a la planta que los porta (Paliwal, 2001; Agrios 2005).

El principal inconveniente de la resistencia vertical es su durabilidad, es decir, este tipo de resistencia se puede perder fácil y rápidamente con la mutación de un solo gen, la resistencia específica impone una gran presión de selección para la supervivencia del patógeno (Renfro, 1984); por lo cual este debe cambiar su especificidad por mutación. Los genotipos raros del patógeno con una mejor habilidad para vencer la resistencia son favorecidos y su frecuencia relativa en la población se incrementa. Por otra parte, además de la mutación, la migración y la recombinación genética son relevantes en la ruptura de la resistencia (Niks y Lindhout, 2004). Esta desventaja de la resistencia vertical trae como consecuencia que variedades resistentes suelen ser atacadas repentinamente por una nueva raza virulenta y provocar severas epidemias; por lo que exige un mejoramiento genético continuo.

La resistencia horizontal o no específica, es aquella que confiere una protección incompleta pero permanente (Agrios, 2005), es comparativamente más difícil de manejar, ya que en la misma participan un gran número de genes. Su herencia es poligénica cuantitativa con una variación continua; por ello, las clases de resistencia y susceptibilidad son difíciles de reconocer ya que el efecto de cada gen es limitado (Paliwal *et al.*, 2001). En general esta resistencia es de carácter cuantitativo debido a la presencia de genes menores de efectos aditivos (QTLs); así, cuando se evalúa la progenie de un cruzamiento de dos padres con diferentes niveles de resistencia parcial se observa una segregación con una distribución continua de niveles de infección. Es debido a esta variación que plantas hospedantes completamente susceptibles a determinado patógeno pueden mostrar diferencias cuantitativas en el grado de infección. Tales diferencias son debidas a la reducción de diversos componentes del desarrollo de la epidemia (periodo de latencia, frecuencia de infección y número de esporas producidas por lesión). Por lo tanto, no se puede generalizar sobre qué mecanismos están involucrados en la resistencia parcial (Niks y Lindhout, 2004). Este tipo de resistencia comprende procesos fisiológicos del hospedante que funcionan como mecanismos de defensa y que van más allá de los límites de la capacidad del patógeno para cambiar, es decir, más allá de los límites posibles de su variabilidad (Agrios, 2005).

A diferencia de la resistencia vertical, la resistencia horizontal opera contra todas las razas, incluyendo a las de mayor patogenicidad. Otra característica importante de la resistencia horizontal es su mayor durabilidad y estabilidad debido al efecto amortiguador del sistema poligénico (Paliwal *et al.*, 2001). Esta durabilidad se debe a que aun cuando existe la posibilidad de que exista una relación de gen a gen, y el patógeno sea capaz de romper cada uno de estos genes, la probabilidad de un aislado del patógeno rompa fortuitamente la combinación específica de genes menores en la planta es mínima, generalmente el patógeno podrá romper uno o dos genes de

resistencia parcial, lo que resulta en una disminución en el nivel de resistencia, que en la práctica es difícil de observar (Robinson, 1987).

Finalmente, Vanderplank (1984) señala que la resistencia horizontal y la resistencia vertical pueden coexistir y que la resistencia de cualquier planta puede ser una mezcla de ambos tipos en proporciones variables. Por otra parte Renfro (1984) sugiere que en las plantas de maíz la situación ideal sería la combinación de los dos sistemas operando en forma conjunta. Sin embargo, es difícil reconocer las formas de resistencia poligénica para un carácter dado si está presente la resistencia específica para el mismo carácter (Paliwal *et al.*, 2001).

2.3 Inoculación artificial

Las inoculaciones artificiales se realizan principalmente para determinar la gama de hospedantes de un patógeno y para seleccionar resistencia. Los órganos inoculados pueden ser aéreos o subterráneos. Los patógenos pueden ser parásitos obligados o saprofitos facultativos, la efectividad de un inóculo y la representatividad de lo que ocurre en la naturaleza dependen de los factores esenciales en ambos, inóculo y la planta en prueba (French y Hebert, 1980; Agrios, 2005). Así, en los hongos, el inóculo pueden ser los fragmentos del micelio, las esporas o los esclerocios (masas compactas de micelio), en las bacterias, micoplasmas, virus y viroides, el inóculo siempre está representado por todo el cuerpo de estos organismos y en los nematodos, el inóculo puede ser el individuo adulto, las larvas o los huevecillos de ellos (Urbina 2011).

2.3.1 Inoculaciones en campo

En las inoculaciones en campo se puede simplemente escoger un sitio que ya albergue de forma persistente al patógeno que se desea estudiar y se siembra el hospedante que es susceptible repetidamente, se establece un nivel de infestación o potencial de inóculo apropiado para pruebas de selección de resistencia o de gama de hospedantes. No es probable que exista un solo patógeno, por lo cual puede incrementar otro que confunda los resultados. Si el patógeno que interfiere puede ser controlado selectivamente, se puede mantener el terreno en uso por más tiempo (French y Hebert, 1980).

2.3.2 Inoculaciones en condiciones controladas

Las inoculaciones en condiciones controladas el inóculo debe mantenerse en estado virulento y agresivo y debe tomarse en cuenta que su aplicación con medio nutritivo o en cantidad excesiva puede ser poco representativo y no dar resultados que se correlacione con lo que ocurre en la naturaleza. La condición fisiológica de la planta la vuelve más o menos resistente. Por lo tanto, la edad de la planta, el ambiente en que ha crecido y las condiciones ambientales durante la inoculación pueden ser aspectos críticos, las condiciones ambientales también afectan a los patógenos en este último caso, siendo generalmente más agresivos a la temperatura óptima para su crecimiento

in vitro y requiriendo casi siempre agua libre sobre la superficie de penetración (French y Hebert, 1980)

Los patógenos obligados no pueden ser aislados en medio de cultivo y multiplicados de ese modo (Agrios 2001), se debe proceder a su multiplicación sobre el hospedante bajo condiciones controladas que permitan establecer cultivos puros, de origen monospórico. Los propágulos se pueden cosechar de las lesiones esporulantes y asperjarse sobre plantas de prueba. Otro modo de inocular es suspender sobre las plantas a inocular (hojas) con patógenos esporulantes (royas, *Oidium*), de manera que se desprendan los propágulos maduros y caigan sobre las superficies del hospedante por donde puedan penetrar. El sacudimiento o la vibración de hojas portadoras de propágulos pueden ser un modo efectivo de inoculación.

Los saprófitos facultativos o patógenos no obligados si se pueden reproducir y aislar en medios de cultivo (Agrios, 2001). French y Hebert (1980) mencionan que existen diversos tipos de inoculación con estos patógenos, algunos de estos son:

Vacío parcial: consiste en la inoculación de algunos órganos como bulbos, inflorescencias, tubérculos y hojas los cuales son sumergidos en el inóculo o cubiertos por gotas del mismo y se aplica un vacío en un recipiente cerrado, estos gases salen y cuando se suelta el vacío el inóculo penetra en los estomas.

Absorción por el hospedante: Se realizan cortes transversales en los haces vasculares de la planta siendo una vía de ingreso amplia para el inóculo. Esta técnica se puede realizar, al trasplantar plantas o incluso en aquellas que ya están establecidas en viveros, en el caso de plantas reproducidas por estacas (camote, papa, claveles, etc.) se deben inocular antes de su trasplante. Se debe hacer una suspensión en agua del inóculo a una concentración suficiente y el tiempo de sumersión de la parte cortada puede ser por un instante o varios minutos para lograr una infección.

Vaciado al suelo: Algunos patógenos pueden penetrar al hospedante a través de los órganos subterráneos sin necesidad de contar con heridas artificiales en la planta. En este caso se realiza una suspensión en agua o en el medio en el que se creció el inóculo y se vierte en la maceta hasta saturarla.

Frotación: Algunos hongos y bacterias infectan si se asperjan sobre las hojas del hospedante, pero el inóculo tiene mayor efecto si se frota en la superficie que se desea inocular (hojas). Se debe hacer una suspensión del inóculo y se debe aplicar con ayuda de un hisopo.

Punción: Para realizar este método de inoculación se usa un artefacto punzante como bisturí, una tijera o aguja de disección, se debe colocar el inóculo en el artefacto y posteriormente hacer la punción en una yema en la axila de la planta.

2.4 Mecanismos de infección de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* y resistencia a estos hongos al maíz

Los mecanismos de infección de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* y la resistencia del maíz a estos patógenos aún no son bien comprendidos, se han realizado estudios de híbridos, variedades y líneas y cruzas de éstas, para determinar la resistencia a la enfermedad y se ha determinado que hay condiciones específicas de tiempo y manejo que son determinantes para que exista una interacción entre planta de maíz y los hongos causales de la mancha de asfalto y así pueda desarrollarse la epidemia (Mahuku *et al.*, 2013).

Un estudio realizado en el estado de Guerrero, México, que consistió en la evaluación de 76 híbridos producto de las cruzas entre 19 líneas endogámicas de élite del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias-Iguala (INIFAP-Iguala) y el H-513, H-H-516 y Remaco 32 y 38 adaptados para el trópico húmedo, seco y subtrópico y 25 cultivares comerciales (cinco comerciales, seis sintéticos nuevos, dos tolerantes a sequía, cinco de calidad proteica, una población tropical, una población subtropical y cinco cultivares adaptados a la montaña), por su tolerancia a la mancha de asfalto, fueron puestos en diferentes tratamientos y bajo condiciones naturales iguales, la infección se dio de forma natural. Se observó una severa incidencia de la presencia de los hongos involucrados, donde la mayoría de los híbridos y de los cultivares presentaron daño en tres hojas, en la que envuelve a la mazorca y en las dos inferiores a ella (Pereyda *et al.*, 2009). Esto se debió a que las condiciones de temperatura y humedad fueron las ideales para el desarrollo de la enfermedad (Hock *et al.*, 1995).

Monterroso (2012), menciona que la propagación de esporas se da a través del viento, los análisis de laboratorio de las muestras infectadas con lesiones causadas por *Phyllachora maydis*, han demostrado que el daño es por introducción a través de los estomas de las hojas, dañando las células de la planta, y es el hongo que inicia la infección de la mancha de asfalto. El avance de la infección dependerá indispensablemente de la temperatura y de la humedad relativa principalmente y la severidad del daño del momento en que los hongos ataquen a la planta, si el ataque se da antes de la floración el daño puede ser total (CIMMYT, 2012). En este proceso aún es necesario realizar más estudios que permitan evaluar la evolución e interacción de los hongos de esta enfermedad con la planta de maíz.

Höckerstedt (2014) realizó un estudio en Nicaragua donde se sometieron los agentes causales de la enfermedad complejo mancha de asfalto a pruebas de virulencia mediante pruebas de patogenicidad. Se utilizaron hojas de maíz sanas para determinar la virulencia de los patógenos. Las pruebas se realizaron en condiciones de laboratorio y se repitieron dos veces. Los resultados sugirieron que la enfermedad de la mancha de asfalto ocurre en todas las áreas de las muestras tomadas en Nicaragua y la prevalencia de síntomas fue afectada por la edad de la planta, las infecciones previas, la fertilización del nitrógeno y las variedades usadas de maíz.

Un novedoso estudio basado en resistencia del maíz a la enfermedad mancha de asfalto fue realizado por Mahuku *et al.*, (2016) quienes evaluaron 890 líneas endogámicas de maíz, que representan ampliamente la diversidad genética de maíz tropical y subtropical, incluidas las líneas de maíz del CIMMYT (LMC) y germoplasma derivado de programas de mejoramiento con tolerancia a la sequía, acidez del suelo, bajo nitrógeno, resistencia a insectos y patógenos, utilizando genome-wide association study (GWAS) con datos genotípicos de Illumina MaizeSNP50 BeadChip que contenía 56 K SNPs para diseccionar la genética de la resistencia al complejo mancha de asfalto (CMA) del maíz.

El análisis de GWAS se realizó utilizando un modelo lineal mixto que incluía BLUP, marcador, matriz de parentesco (K) y análisis de componentes principales (PCA) en el software TASSEL (Bradbury *et al.*, 2007). El análisis de GWAS se realizó para cada entorno por separado, y los valores de 'p' para cada marcador se combinaron utilizando el método de Fisher según lo descrito por Chen (2011) y el resultado se utilizó para hacer un gráfico de Manhattan. Los resultados de GWAS se validaron a través del análisis de ligamiento en tres poblaciones bi-parentales derivadas de diferentes padres resistentes y susceptibles. A través de GWAS, se identificaron tres loci de resistencia al CMA en el cromosoma 2, 7 y 8 ($-\log_{10}(p) > 5.99$). Se identificaron 17 líneas endogámicas que eran altamente resistentes al CMA a través de los ambientes. Todas las líneas llevan alelos haplotipos favorables que aumentan la resistencia a CMA en un 9.5-14.6%. Se detectó un locus de resistencia cuantitativa principal (QTL) designado qRtsc8-1 en el contenedor de cromosomas de maíz 8.03. qRtsc8-1, se confirmó en tres poblaciones biparentales independientes y representó el 18-43% de la variación fenotípica observada para el CMA. El análisis del gen candidato reveló que una familia de genes de proteína similar a receptores de repetición rica en leucina (LRR-RLKs) es quizás el gen candidato para qRtsc8-1. La identificación y localización de un condicionamiento de locus mayor la resistencia del CMA proporciona la base para el mapeo fino qRtsc8-1 y el desarrollo de marcadores funcionales para mejorar la resistencia del CMA en programas de mejoramiento de maíz. Siendo este es el primer reporte de un QTL importante para la resistencia del CMA (Mahuku *et al.*, 2016).

2.5 Análisis de la región ITS del ADNr

El ADNr se encuentra en forma de unidades repetidas dispuestas en tándem de hasta 200 copias por núcleo (Butler y Metzzenberg, 1989), se encuentra localizado en el cromosoma en la región de organización nucleolar (NORs, por sus siglas en inglés).

Las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes (18S, 5.8S, y 28S) y los dos espaciadores internos (Internal transcribed spacer) ITS1 e ITS2). También se encuentra asociada a este complejo de genes la región espaciadora intergénica IGS con 2 regiones no codificadoras (ETS-1 y ETS-2) (Iwen *et al.*, 2002). Todas estas regiones del ADNr permiten realizar estudios filogenéticos a

diferentes niveles taxonómicos (Bruns *et al.*, 1991). La región ITS se propone como el código de barras fúngico formal y constituye la elección principal para la identificación molecular de hongos de muestras ambientales (Vrålstad 2011; Schoch *et al.*, 2012).

La secuencia altamente conservada del gen 5.8S, ha sido utilizada como punto de unión de cebadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes, y el ITS1 e ITS2, que si son de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas. Se diseñaron y describieron iniciadores específicos (ITS1 e ITS4) para amplificar y secuenciar varios segmentos del ADNr mitocondrial y nucleico de hongos (White *et al.*, 1990), así mismo se han utilizado los primer ITS1F (Gardes y Bruns, 1993) e ITS4A (Larena *et al.*, 1999) para la identificación de especies dentro del phylum Ascomycota.

Los 'primers' ITS1-ITS4 diseñados por White *et al.*, 1990 son considerados como universales para la amplificación de la región ITS del ADNr de hongos, siendo empleado por la mayoría de los micólogos (Gardes y Bruns, 1993).

Entre las características convenientes para el análisis de las secuencias ITS en hongos, la región ITS completa puede amplificarse fácilmente con iniciadores universales, la naturaleza multicopia de las repeticiones del ADNr, hace de esta región una secuencia fácil de amplificar aun cuando se utilicen muestras de ADN pequeñas, muy diluidas, o altamente degradadas (ADN obtenido de material viejo y especímenes de herbarios) y finalmente, diversos estudios demuestran su utilidad en análisis filogenéticos (Álvarez y Wendel, 2003), (Gardes y Bruns, 1993).

2.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, es una técnica de biología molecular que fue desarrollada por Kary Mullis en 1985. La idea básica de la técnica es sintetizar un gran número de copias de un fragmento específico de ADN utilizando una polimerasa que trabaja a altas temperaturas, como es el caso de la taq polimerasa que proviene de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Eguiarte *et al.*, 2007). Actualmente la Taq polimerasa es la principal enzima que se utiliza para amplificar secuencias de genomas. (Bottema y Sommer, 1993; Mukai y Nakagawa, 1996). La PCR se lleva a cabo en tres pasos: desnaturalización o separación de la cadena doble de ADN en dos cadenas simples, hibridación de los iniciadores o primers en las cadenas originales para la síntesis de una nueva cadena y extensión de la nueva cadena a partir los iniciadores. La reacción es mediada por la ADN polimerasa y da como resultado la síntesis de la porción de ADN deseada (Delidow *et al.*, 1993). Estas tres etapas de la reacción constituyen un ciclo, un protocolo de amplificación por lo general tiene de 30 a 50 ciclos. Cuando cada ciclo térmico se completa, los fragmentos recientemente sintetizados sirven como ADN blanco, y en unos pocos ciclos más, el producto predominante será el fragmento de ADN que corresponde a la distancia entre los iniciadores, así la repetición de ciclos origina un número exponencial de secuencias amplificadas (Torres y Baca, 1995).

2.7 Diversidad genética de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*

Para conocer la variabilidad genética de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* se realizan estudios basados en identificaciones moleculares mediante extracciones de ADN, PCR y clonación, como es el caso reportado por Ríos-Herrera *et al.* (2016), quienes colectaron muestras con síntomas de *P. maydis* provenientes de San Pablo Autopan, Toluca, Estado de México y realizaron extracción de ADN mediante el protocolo propuesto por Wai (2004), usando los métodos de Griffiths *et al.* (2000), Kowalchuk *et al.* (2002) y Shwarzott y Shussler (2001).

En Nicaragua, se examinaron siete campos en Jalapa, un campo en Pueblo Nuevo y siete campos en Nueva Guinea, donde se recolectaron aleatoriamente 20 muestras por campo. Para asegurar la exactitud de la identificación morfológica de la especie, se aisló el ADN de cultivos puros con el método CTAB. El ADN se amplificó con los cebadores universales ITS1 e ITS4; Las regiones ITS de *P. maydis* se clonaron en el vector pGEM-T Easy y se secuenciaron. Todas las secuencias analizadas se alinearon con secuencias de especies conocidas obtenidas de GenBank, Además, se anotaron las regiones ITS de los putativos aislamientos de *P. maydis* y *M. maydis* y se determinaron sus relaciones en el análisis filogenético de unión de vecinos con MEGA 5. (Höckerstedt, 2014).

Los resultados de las búsquedas de secuencias mostraron que ITS-secuencias de *P. maydis* o *M. maydis* no se han añadido a GenBank anteriormente. El análisis filogenético mostró que ambos patógenos formaron su propia rama entre las especies ya conocidas. Los resultados pueden utilizarse cuando se desarrollan cebadores de PCR específicos de especies para ser utilizados en la inspección de semillas, predecir la propagación de la enfermedad y estudios sobre epidemiología, ecología y control de los patógenos fúngicos del maíz en Nicaragua (Höckerstedt, 2014).

Ríos-Herrera *et al.* (2016) mencionan que para amplificación de la región ITSs por PCR usaron los cebadores ITS1 e ITS4, entre los genes ribosómicos (rDNA) 18S 5.8S y 5.8S-28S (White *et al.*, 1990). La clonación de *Phyllachora* tuvo cuatro etapas: unión, transformación, extracción del ADN plasmídico y digestión. En la primera etapa, el producto de PCR se introdujo en un vector como pJET 1.2. Posteriormente, las células competentes se transformaron mediante choque térmico. Los productos de PCR amplificados se unieron al vector pJET 1.2 (Thermo Scientific). Para la extracción de ADN plasmídico, se realizó la transformación de células de la bacteria *Escherichia coli* DH5a, las cuales se sembraron en agar LB con carbenicilina (100 mg/L) utilizando tres diluciones de placas a 50, 100 y 250 μ L que se incubaron de 13 a 16 h, a 37 °C, se seleccionaron al azar 10 colonias blancas y se cultivaron durante una noche en un tubo con LB líquido, suplementado con carbenicilina (100 mg/L) a 37 °C. El ADN plasmídico se extrajo del crecimiento bacteriano. El proceso de digestión se comprobó en gel de agarosa al 1% con el fin de confirmar la presencia de clones positivos. Los resultados de las secuencias de los clones de muestras de Toluca, Estado de México,

mostraron la presencia de *Phyllachora* sp., comprobando un 87% de identidad (Ríos-Herrera *et al.*, 2016).

Rult *et al.*, (2016) realizaron la extracción de ADN directamente de las lesiones causadas por *Phyllachora maydis* de muestras (hojas) provenientes de Indiana y de Illinois. Realizaron la amplificación molecular de las regiones espaciadas transcritas internas generadas usando los primers ITS4 e ITS5. La secuencia de *Phyllachora maydis* resultante de la muestra original de Indiana fue enviada a GenBank (acceso KU184459) siendo esta la primera accesión de *P. maydis* existente en el GenBank.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del área de estudio

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Centro de Chiapas, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Ocozocoautla, Chiapas en las siguientes coordenadas LN 16° 46' 49.3", LW 93° 24' 20.87", a 793 msnm (Figura 1).

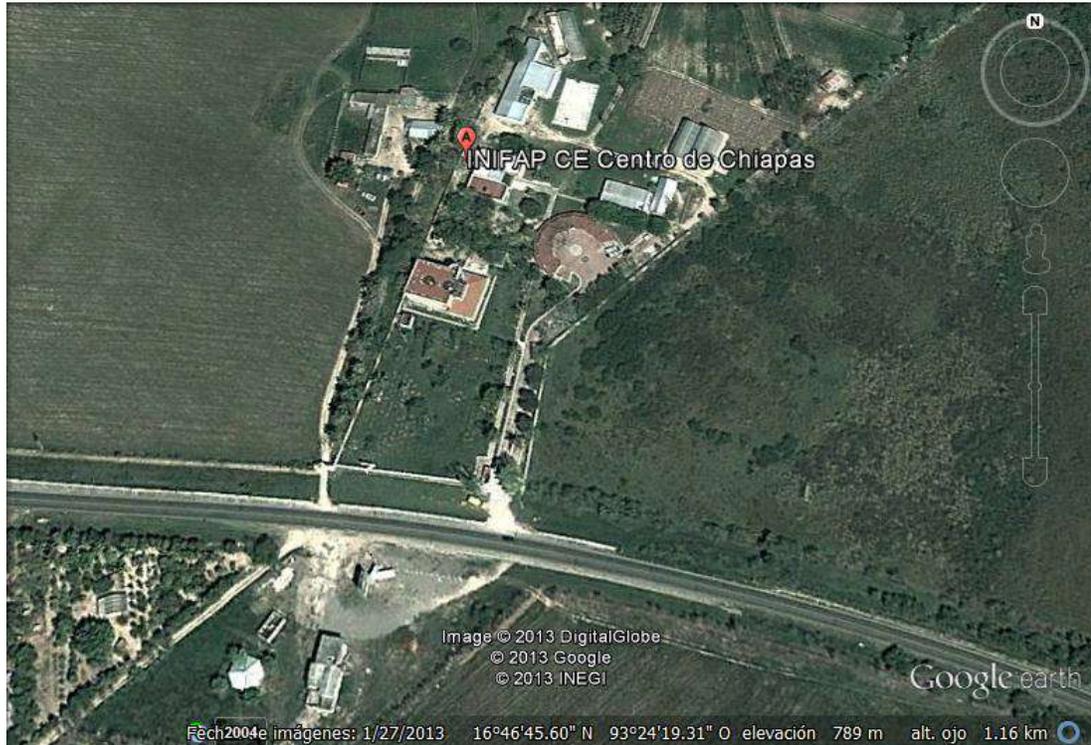


Figura 1. Mapa de ubicación del campo experimental centro de Chiapas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

3.2 Siembra de los genotipos en invernadero

Se sembraron los genotipos de maíz DK390, SP500, P4083W, locales Chapingo-Tuxpeño y Chapingo-Comiteco en suelo directo y en vasos de unicel de un litro en el invernadero del área de fitopatología del INIFAP. La siembra se realizó en el mes de noviembre del 2016, la temperatura osciló entre 12 y 13 °C con una humedad relativa de 70 a 79 %.

3.3 Colecta de inóculo en campo

Se realizó la colecta de muestras específicas con síntomas y signos de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* en los municipios de Chiapas : Villaflores, Ocosingo, Oxchuc, Ocozocoautla, Las margaritas, Tzimol, Comitán, Teopisca y Venustiano Carranza. Se recibieron muestras procedentes de Monjas Jalapa, Municipio de Guatemala (Cuadros 1 y 2).

Cuadro1. Relación de muestras de maíz con complejo mancha de asfalto, colectadas en diferentes Municipios de Chiapas.

Muestra	Localidad	Municipio	ASN	LN	LW
MA1401	Santa Isabel	Ocosingo	854	16° 53' 48.0"	92° 04' 07.3"
MA1402	San Pedro	Ocosingo	879	16° 54' 06.8"	92° 03' 18.0"
MA1403	Predio	Ocosingo	862	16° 53' 20.7"	92° 01' 27.3"
MA1404	Lekillum	Ocosingo	864	16° 53' 20.7"	92° 01' 27.3"
MA1405	Conalep	Ocosingo	881	16° 54' 19.24"	92° 05' 31.74"
MA1406	Barrio Los Pinos 2	Ocosingo	877	16° 54' 04.6"	92° 05' 18.9"
MA1407	El Hongo	Ocosingo	1337	16° 49' 05.7"	92° 08' 38.0"
MA1408	Ocosingo	Ocosingo	1332	16° 48' 58.6"	92° 09' 50.9"
MA1409	Oxchuc	Oxchuc	1785	16° 48' 44.4"	92° 17' 54.8"
MA1410	Oxchuc	Oxchuc	1947	16° 48' 05.1"	92° 19' 48.3"
MA1411	Oxchuc	Oxchuc	2028	16° 47' 29.7"	92° 20' 16.1"
MA1412	Oxchuc	Oxchuc	2179	16° 45' 23.8"	92° 22' 26.6"
MA1413	Huixtán	Huixtán	2043	16° 42' 29.3"	92° 27' 04.8"
MA1414	Huixtán	Huixtán	2184	16° 42' 30.6"	92° 28' 00.4"
MA1415	Huixtán	Huixtán	2362	16° 42' 16.8"	92° 29' 07.2"
MA1416	Villaflores	Villaflores	647	16° 20' 17.86"	93° 23' 36.10"
MA1417	Villaflores	Villaflores	696	16° 18' 53.86"	93° 19' 36.00"
MA1418	Villaflores	Villaflores	707	16° 20' 30.73"	93° 19' 06.36"
MA1419	De Kaib 390 Juan Abadía	Ocozocoautla	756	16° 45' 40.23"	93° 27' 01.45"
MA1420	El Higo Criollo	Ocozocoautla	761	16° 42' 50.87"	93° 26' 16.08"
MA1421	El Higo Dekalb 7500	Ocozocoautla	761	16° 42' 50.87"	93° 26' 16.08"
MA1422	Rancho Guadalajara	Villaflores	571	16° 12' 39.55"	93° 15' 48.04"
MA1423	Cristóbal Obregón	Villaflores	636	16° 25' 35.22"	93° 25' 58.56"
MA1424	El Progreso	Las Margaritas	1651	16° 18' 16.98"	92° 1' 10.85"
MA1425	Ranchería El Progreso	Las Margaritas	1663	16° 17' 49.71"	90° 2' 55.58"
MA1426	Ejido Tierra Y Libertad	Villaflores	707	16° 20' 30.73"	93° 19' 06.36"
MA1427	Tzimol	Tzimol	1427	16° 11' 17.18"	92° 10' 23.71"
MA1428	Las Margaritas	Las Margaritas	1650	16° 18' 14.29"	92° 1' 11.39"
MA1429	Comitán	Comitán	1591	16° 13' 30.63"	92° 6' 23.75"
MA1430	Comitán	Comitán	1566	16° 14' 15.56"	92° 6' 31.61"
MA1431	Chacaljocom	Comitán	1853	16° 17' 51.05"	92° 11' 22.15"
MA1432	Chacaljocom Criollo	Comitán	1855	16° 17' 50.42"	92° 11' 22.83"
MA1433	Laguna Larga	Teopisca	1956	16° 25' 13.46"	92° 15' 38.45"
MA1434	El Sumidero Aguacatenango	V. Carranza	1732	16° 28' 28.49"	92° 25' 331.03"
MA1435	Aguacatenango	V. Carranza	1744	16° 28' 48.59"	92° 25' 40.55'
MA1436	Teopisca	Teopisca	1827	16° 34' 43.07"	92° 29' 45.11"

Cuadro 2. Relación de muestras de maíz con complejo mancha de asfalto, colectadas en el municipio de Monjas, Departamento de Jalapa, República de Guatemala.

Muestra	Localidad	msnm	LN	LW
MA1437	Aldea la Campana	979	14° 30' 46.92"	89° 53' 47.46"
MA1438	Aldea Achiotes	990	14° 32' 44.85"	89° 53' 51.35"
MA1439	Aldea Morazán	998	14° 31' 31.15"	89° 55' 13.12"
MA1440	Aldea Agua Tibio	962	14° 29' 55.11"	89° 51' 22.66"

3.4 Fase de laboratorio

3.4.1 Bioensayos

Los estudios sobre los mecanismos de infección de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* y de resistencia del maíz a estos fitopatógenos fueron analizados mediante ensayos *in vitro* en fragmentos de hojas e *in vivo* en planta sana joven de maíz.

3.4.2 Ensayo en fragmentos de hoja de maíz

Este ensayo consistió en la inoculación *in vitro* en fragmentos de 3.5 cm² de hojas, con una suspensión hecha con los fitopatógenos, los cuales ya inoculados son colocados en cámara húmeda. Este ensayo permitió evaluar rápidamente el comportamiento de la planta en respuesta del patógeno, y el proceso de infección del mismo (Pérez *et al.*, 2006).

3.4.3 Ensayo en planta sana joven

Este ensayo consistió en la inoculación *in vivo* (plantas sanas y jóvenes de maíz) a cada hoja se le marcaron cuadros de 2 cm² y se inoculo por aspersion con una suspensión de esporas de *P. maydis* y *M. maydis* a una concentración de 2x10⁶ mL⁻¹. La inoculación en planta sana es un método que permite evaluar la evolución de infección de un patógeno, la susceptibilidad y resistencia de los genotipos a este; en muy poco tiempo, realizando un mayor número de evaluaciones en un menor espacio (Leiva-Mora, *et al.*, 2010).

3.4.4 Preparación de la suspensión de ascosporas

Las muestras colectadas de *P. maydis* y *M. maydis* se cortaron por lesiones, hasta juntar 2.5 g de cada uno de los hongos y se pulverizaron. Los 5 g de lesiones se

disolvieron en 50 mL de agua destilada estéril y se filtraron con gasas estériles. Posteriormente se realizó un conteo de ascosporas y esporas con la cámara Neubauer. La suspensión de ascosporas se preparó a dos concentraciones, una de $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ y la otra de $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ (esta suspensión se utilizó para la inoculación *in vivo* en planta sana de maíz) y se les agregaron dos gotas de Tween® 20.

La inoculación de los fragmentos de hojas de maíz con la solución de ascosporas de $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ se realizó utilizando el siguiente protocolo:

3.4.5 Primer ensayo de inoculación *in vitro*

El diseño experimental utilizado fue Completamente al azar (CA) con tres genotipos y cuatro repeticiones, se incluyó como testigo fragmentos de hojas inoculados con agua destilada estéril. El ensayo se mantuvo durante ocho días, con intervalos de muestreo a cada 24 horas para observar el fragmento e hoja y observar las lesiones que provoca *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* en los tres genotipos de maíz seleccionados para el ensayo.

Se cortaron 32 fragmentos de hojas de 16 cm^2 (4X4 cm) de plantas sanas de cada uno de los siguientes genotipos: DK390, P4083W y SP500. Los fragmentos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril. A cada una de las 96 cajas Petri estériles se le colocó un papel filtro Whatman™ No. 1 y se humedecieron con agua destilada estéril.

En cada caja Petri con papel filtro se colocó un fragmento de hoja y sobre cada fragmento se colocó un marco de plástico de 4x4 cm con un área libre de 3x3 cm. Se inoculó, cada fragmento de hoja, con 50 μL de la suspensión de ascosporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, a la concentración de $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$. Se realizaron cuatro repeticiones por genotipo. Se incluyó un testigo por cada intervalo de tiempo el cual consistió en fragmentos de hojas de los genotipos en prueba inoculados únicamente con agua destilada estéril.

Por cada genotipo se utilizaron tres repeticiones, con su respectivo testigo, dando así un total de 100 unidades experimentales, los fragmentos colocados en cámara húmeda se mantuvieron incubados a 25°C (temperatura ambiente). La observación microscópica de los fragmentos de hoja se hicieron a las 12, 36, 60, 84, 108, 132, 156 y 180 horas después de la inoculación.

3.4.6 Segundo ensayo de inoculación *in vitro*

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar (DCA), utilizando cinco genotipos y cuatro repeticiones, se incluyeron como testigo fragmentos de hojas inoculadas con agua destilada estéril. El ensayo se mantuvo por 12 días y medio, con intervalos de muestreo cada 3 días, observando la evolución del proceso infectivo.

Se cortaron 20 fragmentos de 16 cm^2 (4X4 cm) de hojas de plantas sanas de los siguientes genotipos: DK390, P4083W, SP500, y los locales Chapingo-Tuxpeño y Chapingo-Comiteco. Los fragmentos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1%

durante 2 min, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril, a cada una de las 100 cajas Petri estériles se les colocó un papel filtro Whatman™ No. 1, y se humedecieron con agua destilada estéril.

En cada caja Petri con papel filtro se colocó un fragmento de hoja y sobre cada fragmento se colocó un marco de plástico de 4x4 cm con un área libre de 3x3 cm. Se inoculó con 50 µL de la suspensión de ascosporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, de la misma concentración que el experimento anterior, y con cuatro repeticiones por genotipo. Se incluyó un testigo, que consistió en fragmentos de hojas de los genotipos en prueba los cuales fueron inoculados únicamente con agua destilada estéril.

Por cada genotipo se utilizaron tres repeticiones, con su respectivo testigo, dando así un total de 100 unidades experimentales, los fragmentos colocados en cámara húmeda se mantuvieron incubados a 25°C (temperatura ambiente). La observación microscópica de los fragmentos de hoja se hicieron a las 60, 120, 180, 240 y 300 horas después de la inoculación.

3.4.7 Ensayo de inoculación en planta joven

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar (DCA) con cuatro genotipos y cuatro repeticiones, se incluyó como testigo negativo una planta inoculada con agua destilada estéril. Se tomaron seis muestras en total, con un intervalo de ocho días entre cada muestra, para evaluar las lesiones que provoca *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* en las primeras etapas de la infección de la enfermedad en cuatro genotipos de maíz.

Se seleccionaron 5 plantas sanas de maíz de 31 días de edad fenológica con 5 a 6 hojas por planta, de los genotipos DK390, P4083W, SP500 y el local Chapingo-Tuxpeño. Las 20 plantas se llevaron del invernadero al laboratorio de fitopatología, a cada hoja de la planta se les marcó cuadros de 2 cm de longitud. A cada cuadro marcado se inoculó mediante aspersión con la suspensión de ascosporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* a una concentración de 2×10^6 mL⁻¹. Se realizaron cinco repeticiones (incluyendo como testigo: planta inoculada con agua destilada estéril) por genotipo. Las plantas inoculadas se mantuvieron incubadas en una cámara húmeda hecha de plástico de 1x80 cm, con un humidificador el cual proporcionó las condiciones necesarias de humedad para el desarrollo de la enfermedad durante los tres primeros días. Posteriormente las plantas se llevaron nuevamente al invernadero donde se les creó un ambiente fresco de 22 a 24 °C. Las plantas se regaron constantemente por aspersión. Las muestras se tomaron a los 8, 15, 23, 31, 38 y 45 días después de la inoculación.

3.4.8 Fijación de muestra

Se tomaron piezas de 1cm² aproximadamente de la parte central de cada fragmento inoculado, los cuales fueron colocados en vasos de precipitado de 40 mL,

posteriormente se les añadió 5 mL de solución Carnoy y se incubaron a 60°C durante 4 horas. Cumpliendo las 4 horas en la estufa, se escurrió la solución Carnoy, y se agregó 5 mL de solución de lactofenol a los fragmentos, y de nuevo se incubaron a 60°C por 5 horas, cumpliendo el tiempo requerido se eliminó el lactofenol.

Los fragmentos se tiñeron con tripán azul al 0.2% y se dejaron a temperatura ambiente durante 1:30 h, después se lavaron con agua destilada estéril hasta eliminar por completo el colorante y se procedió a realizar los montajes.

Por cada montaje se colocaron dos gotas polivinil alcohol, se colocó el fragmento limpio y se cubrió con un cubre objeto y se dejó secar a temperatura ambiente. El mismo procedimiento se realizó por cada muestra, se etiquetaron y se colocaron en una caja porta-montajes.

3.4.9 Método de recolección de datos

El número de estomas infectados de cada muestra (montaje) fueron obtenidos con la ayuda de un microscopio marca Zeiss modelo Primo Star con el lente objetivo de 40X y una cámara digital marca Canon G10. Se tomó como referencia la imagen completa tomada por la cámara y se realizó un conteo total de estomas por imagen.

3.4.10 Análisis de los datos obtenidos

En los ensayos de inoculación *in vitro* se obtuvieron 96 imágenes que corresponden al primer ensayo y 100 imágenes del segundo ensayo y por último se obtuvieron 96 imágenes en el ensayo *in vivo* en planta sana joven, se realizó la cuantificación ordenada de cada imagen capturada, tomando cuatro montajes con su debido testigo (inoculado con agua destilada estéril) por genotipo y por tiempo de incubación.

Teniendo los conteos de estomas infectados por cada uno de los ensayos, se prosiguió a ordenar los datos en un cuadro por genotipo y tiempo de incubación en una hoja de Excel. Se hizo una transformación a raíz cuadrada a los datos de porcentaje de estomas infectados (raíz cuadrada del porcentaje + 0.5) y se realizó el análisis de varianza (ANVA) y la prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS (Versión 9.3).

3.5 Aislamiento de *Microdochium* (anamorfo de *Monographella maydis*)

Se realizaron colectas de muestras con signos de *Monographella maydis* en Chiapas, para realizar el aislamiento de *Microdochium*.

Se cortaron lesiones específicas de ojo de pescado jóvenes y se dejaron reposar en agua destilada estéril durante un minuto, las cuales se colocaron en cámara húmeda dentro de una caja Petri con gasas estériles durante 24 h, Posteriormente se realizaron montajes permanentes en medio polivinil alcohol para observar las estructuras de los conidios de cada colonia que crecieron sobre las lesiones.

Las colonias seleccionadas se sembraron en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron durante 48 horas a 24-26°C (temperatura ambiente), después de las 48

horas se realizaron trasferencias a medio PDA acidificado con ácido tartárico al 10% (PDAA) para evitar el crecimiento de bacterias.

Se aislaron 10 colonias con posibles características de *Microdochium*, a las cuales se les realizó un montaje permanente en polivinil alcohol respectivamente para observar nuevamente los conidios de las colonias y descartar aquellas que no presentaran las características buscadas, cinco colonias correspondieron a *Microdochium*.

3.6 Análisis molecular de los hongos del CMA

3.6.1 Extracción de ADN de *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Microdochium*

La extracción de ADN se realizó con el método de Dellaporta *et al.* (1983), a las muestras colectadas de hojas de maíz con signos y síntomas específicos de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* provenientes de Chiapas y Guatemala y a cinco colonias de *Microdochium* aisladas de muestras de Chiapas a partir de muestras con síntomas de *Monographella maydis*.

La extracción de ADN de los hongos fue de la siguiente manera:

Se colocaron 10 lesiones de los hongos *P. maydis* o *M. maydis* extraídas directamente del tejido vegetal enfermo de maíz y 0.5 g de micelio del tejido por muestras de *Microdochium* en tubos Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente se le agregó 500 μ L de buffer de extracción, se maceró el tejido vigorosamente con un pistilo y se añadieron 33 μ L de SDS al 20% al tejido macerado, las muestras se agitaron vigorosamente en el vórtex para ser incubadas a 65°C por 10 min.

Después de la incubación se le agregaron a cada muestra 160 μ L de acetato de potasio 5M (pH 4.5), nuevamente se agitaron en vórtex y se colocaron en la centrífuga a 10,000 rpm por 10 minutos, en un tubo limpio se colocaron 450 μ L del sobrenadante y se añadió 225 μ L de isopropanol (frío), se agitaron en el vórtex para homogeneizar, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante, y el 'pellet' se lavó con 500 μ L de etanol al 70%, se centrifugaron nuevamente, por 5 minutos a 10,000 rpm, posteriormente se secó el pellet y se re-suspendió en 500 μ L de agua destilada estéril.

3.6.2 Cuantificación del ADN

La cuantificación de ADN se realizó con ayuda de un Nanodrop One marca Thermo SCIENTIFIC en el Laboratorio Polo Tecnológico de Biocombustibles del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, colocando 2 μ L de ADN genómico por muestra en el sensor del Nanodrop. Las lecturas indicaron la concentración, calidad y pureza del ADN.

3.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de la región ITS fue realizada con los iniciadores o Primers ITS1-ITS4 (Gardes y Bruns, 1993; White *et al.*, 1990) (Cuadro 3). La PCR se realizó con el Top

Taq master mix kit 250 QIAGEN más los Primers ITS1-ITS4, la mezcla se preparó para 83 Muestras de ADN, 40 de *Phyllachora maydis*, 36 de *Monographella maydis* y 5 de *Microdochium* más dos controles uno negativo y el otro positivo como se observa en el cuadro 4.

La reacción de la cadena de polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador marca BIO-RAD t100, en un volumen final de 50 µL; compuesta por: 10 µL de ADN genómico, 25 µL del TopTaq master mix, 4 µL de Coral Load 10X (colorante), 9 µL de RNase Water y 0.5 µL de cada primer ITS1 e ITS4.

Para el par ITS1 - ITS4 la desnaturalización se realizó a 95 °C durante 2 min seguida por 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 55 °C por 30 s, 1 minuto a 72 °C y una extensión final durante 10 min a 72 °C (White *et al.*, 1990).

Cuadro 3. Cebadores utilizados para amplificar la región ITS del ADN

Cebador	Locus	Secuencia (5´ — 3´)
ITS1	ADN	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	ADN	TCCTCCGCTTATTGATATG

Cuadro 4. Composición y concentración de reactivos de la mezcla para PCR, con un volumen final de 50 µL por reacción.

Reactivo	Volumen por reacción (µL)	No. muestras	Concentración final (µL)
TopTaq master mix	25	83	2075
Coral Load 10X	4	83	332
RNase Water	9	83	747
Primer ITS1	0.5	83	41.5
Primer ITS4	0.5	83	41.5
Volumen total			3237

3.6.4 Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR

La amplificación de la región ITS del ADNr de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* (asexual *Microdochium*) fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red™ Nucleid acid 2000x. El gel fue preparado de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Se pesó 4.5 g de agarosa en la balanza analítica y fueron mezclados con 450 mL de buffer TAE 1X en un vaso de precipitado.

- La mezcla se colocó en una parrilla eléctrica con una temperatura de 90°C con un imán agitador hasta que la agarosa se disolviese por completo.
- Se dejó enfriar a 65°C y se le agregó 22.5 µL de Gel Red™ Nucleid acid agitándolo.
- El gel fue vertido en la bandeja de la cámara de electroforesis, se colocaron los peines para la formación de los pocillos y se dejó solidificar durante 20 min.
- Una vez solidificado el gel se agregó el buffer TAE 1X y se retiraron los peines formadores de pocillos.
- En cada pocillo del gel se colocaron 5 µL de producto de PCR, se utilizó 5 µL de marcador GEL PILOT de 100 Kb en el primer pocillo para determinar el tamaño de las bandas formadas, 5 µL del control positivo y 5 µL de un control negativo.
- Condiciones de corrida: 90 volt, 100 amp, 120 min.

3.6.5 Secuenciación

Se seleccionaron los productos de PCR de *Phyllachora Maydis*, *Monographella maydis* y *Microdochium* que mostraron amplificación en el gel de agarosa al 1% (cuadro 5) y se enviaron a secuenciar al laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Las secuencias se compararon con las secuencias de la base de datos del GenBank con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Anexo 7.7).

Cuadro 5. Relación de muestras de los hongos causales de la mancha de asfalto enviadas a secuenciar.

Productos de PCR		
<i>Phyllachora maydis</i>	<i>Monographella maydis</i>	<i>Microdochium</i>
MA140701	MA140702	MA170103
MA140901	MA140902	MA170203
MA141101	MA141002	MA170303
MA141301	MA141102	MA170403
MA141401	MA141202	
MA141501	MA141302	
MA141901	MA141502	
MA142001	MA141702	
MA142101	MA141902	
MA142201	MA142002	
MA142301	MA142202	
MA142401	MA143702	
MA143701	MA143802	
MA143901	MA143902	
MA144001		

3.6.6 Análisis filogenético

El análisis filogenético y de evolución molecular se realizó con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Versión 7 (Tamura *et al.*, 2013). Se elaboró una base de datos donde se colocaron las secuencias de forma ordenada para cada uno de los hongos (*Phyllachora maydis*, *Monographella*, *Microdochium* y *Coniothyrium*) y se alinearon. Los árboles filogenéticos se construyeron con el método UPGMA (Sneath y Sokal, 1973; Tamura *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2016).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Inoculación *in vitro*

4.1.1 Primer ensayo de inoculación en fragmentos de hojas sanas de maíz

Los resultados del análisis de varianza (ANVA) para el número de estomas infectados del primer ensayo de inoculación en fragmentos de hojas de maíz, donde se evaluaron los genotipos DK390, SP500 y P4083W, mostraron diferencias estadísticas significativas a las 60 y 84 h y altamente significativas a las 180 h; los coeficientes de variación fluctuaron de 1.02 % a 15.46 % por lo que los resultados obtenidos son confiables (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valor coeficiente de variación (CV) y Pr>F que presentaron los genotipos DK390, SP500 y P4083W durante el lapso de 12 a 180 horas.

HORAS	CV (%)	Pr>F ¹
12	10.94	0.1427
36	15.46	0.1246
60	8.50	0.0135*
84	11.11	0.0187*
108	7.09	0.2538
132	3.82	0.2355
156	3.67	0.0894
180	1.02	0.0007**

¹Significancia: Si Pr>F=0.1 No significativo (NS); Pr>F=0.05 significativo (*); Pr>F=0.01 altamente significativo (**).

En el Cuadro 7 se muestra el número de estomas infectados y se aprecia que la infección fue en ascenso, conforme avanzó el tiempo de inoculación; los genotipos que presentaron estadísticamente mayor daño fueron el DK390 y el P4083W, debido que a las 180 h alcanzaron el mayor número de estomas infectados (100 %), mientras que el genotipo SP500 presentó menor daño (89.01%) de estomas infectados, por lo que este último se considera de severidad media y los dos anteriores de severidad alta de infección a nivel de estomas infectados por la enfermedad mancha de asfalto.

Cuadro 7. Porcentaje de estomas infectados de la inoculación *in vitro* de *P. maydis* y *M. maydis* en los genotipos DK390, SP500 y P4083W.

Genotipo	Horas							
	12	36	60	84	108	132	156	180
SP500	33.83	38.23	44.56 ^b	41.90 ^b	75.85	87.78	91.19	89.01 ^b
P4083W	52.05	68.50	68.69 ^{ab}	54.96 ^{ab}	80.40	97.22	82.74	100 ^a
DK390	44.84	65.38	82.64 ^a	81.89 ^a	93.27	97.62	97.62	100 ^a

*Letras diferentes en columnas (horas) indican diferencia significativa Tukey, P≤0.05). N=96 observaciones, promedio de 4 repeticiones.

Nota: Datos de porcentaje de estomas transformados a raíz cuadrada

Es importante resaltar que el desarrollo de la penetración e infección de los estomas y células adyacentes ocurre más temprano y es más rápido en el genotipo DK390 debido que desde las primeras 12, 36 y 60 horas presentó mayor número de estomas infectados en comparación con el genotipo SP500, el cual aunque presentó infección desde las 12 horas; durante todo el ensayo se mantuvo en un nivel inferior de infección mostrando cierta capacidad de resistencia, en comparación con los genotipos P4083W y DK390, por lo cual puede considerarse como resistente en esta etapa inicial del ciclo de la enfermedad (Figura 2).

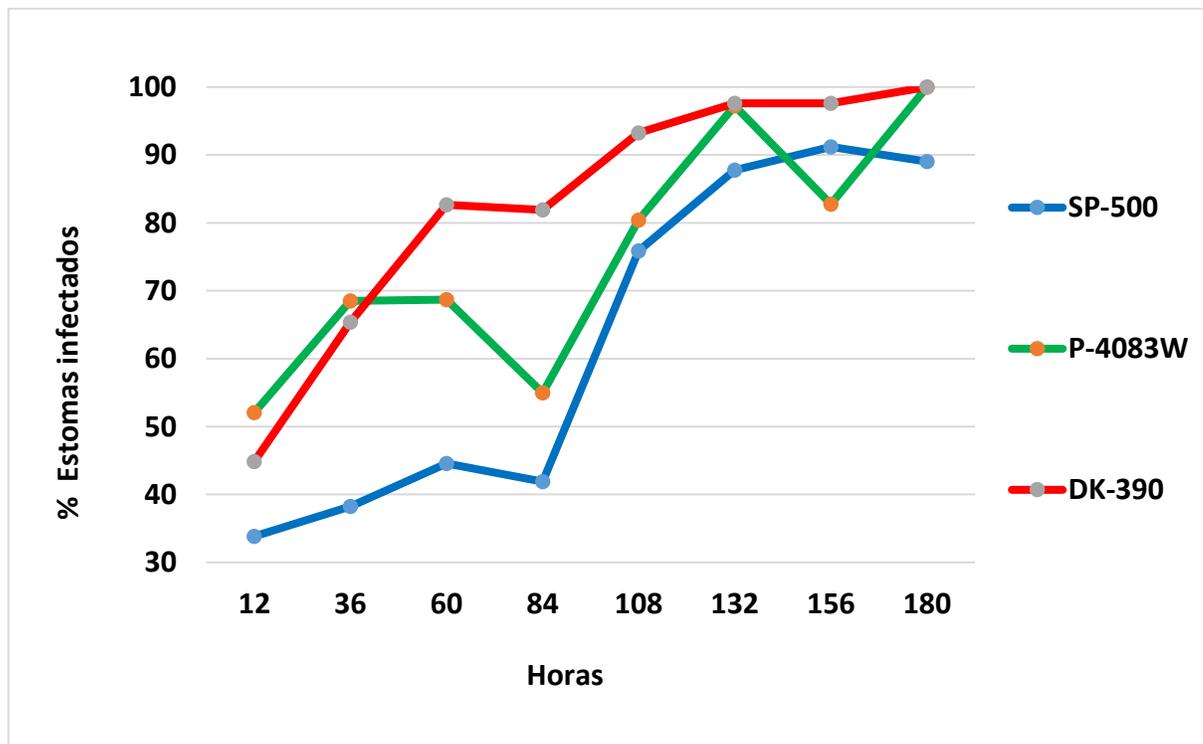


Figura 2. Porcentaje de estomas infectados de los genotipos DK-390, SP-500 y P-4083W frente a la inoculación *in vitro* con *P. maydis* y *M. maydis*.

4.1.2 Segundo ensayo de inoculación en fragmentos de hojas sanas de maíz

Los resultados obtenidos del análisis de varianza (ANVA) para el número de estomas infectados del segundo ensayo de inoculación en fragmento de hojas de maíz, donde se evaluaron los tres genotipos del primer ensayo más dos locales: Chapingo-Comiteco y Chapingo-Tuxpeño, mostraron que existe diferencia estadística altamente significativa a las 300 h (12.5 días) de incubación; los coeficientes de variación fluctuaron entre 2.53 % y 18.53 %, por lo que, los resultados obtenidos son confiables (Cuadro 8).

Cuadro 8. Valor de coeficiente de variación (CV) y Pr>F que presentaron los genotipos DK390, SP500, P4083W y los locales Chapingo Tuxpeño y Chapingo Comiteco durante el lapso de 60 a 300 horas.

HORAS	CV (%)	Pr>F
60	18.53	0.5900
120	10.84	0.2547
180	8.53	0.8454
240	7.25	0.8758
300	2.53	0.0128**

¹Significancias: Si Pr>F= 0.1 No significativo (NS); Si Pr>F= 0.05 significativo (*), Si Pr>F= 0.01 altamente significativo (a/s) **.

Los genotipos que presentaron estadísticamente mayor porcentaje promedio de estomas infectados fueron el Chapingo-Comiteco, seguido del Chapingo-Tuxpeño y del DK390, debido que a las 300 h alcanzaron el mayor número de estomas infectados (100%) al igual que el genotipo P4083W (96.66), mientras que el genotipo SP500 presentó un menor daño de estomas infectados (85.00 %) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje promedio de estomas infectados por la inoculación *in vitro* de *P. maydis* y *M. Maydis* en los genotipos DK390, SP500, P4083W y los locales Chapingo Tuxpeño y Chapingo Comiteco.

GENOTIPO	HORAS				
	60	120	180	240	300
Chapingo Comiteco	64.84	62.99	88.89	95.22	100.00 ^a
Chapingo Tuxpeño	54.31	54.21	78.67	90.05	100.00 ^a
DK-390	56.04	80.56	84.47	90.08	100.00 ^a
P-4083W	50.46	68.74	80.98	87.50	96.66 ^{ab}
SP-500	40.55	56.64	76.99	84.94	85.00 ^b

*Letras diferentes en columnas (horas) indican diferencia significativa según la prueba de medias Tukey ($P \leq 0.05$). N=96 observaciones.

Nota: Datos de porcentaje de estomas transformados a raíz cuadrada

En este segundo ensayo se confirmó el comportamiento de los genotipos observado en el primer ensayo para la etapa inicial de infección (inoculación y penetración). Cabe resaltar que el desarrollo de la enfermedad es más rápido en los genotipos Chapingo-Comiteco, Chapingo-Tuxpeño y el DK390, debido que a las 180 horas presentaron un incremento en la infección en el número de estomas (Figura 3). El genotipo SP500 nuevamente fue el que retrasó la tasa de infección estomatal, de acuerdo a las condiciones del ensayo. Mantuvo un nivel inferior de daño mostrando cierta capacidad de resistencia al ir presentando una infección lenta de estomas, en comparación con

los demás genotipos, por lo cual se podría esperar un comportamiento posterior como planta adulta resistente. Mientras que genotipo P4083W mostró un desarrollo de infección intermedia en el número de estomas durante todo el ensayo, aunque al completarse las 300 horas también alcanzó un nivel alto de estomas infectados al igual que los genotipos Chapingo-Comiteco, Chapingo-Tuxpeño y el DK390, por lo que se podría esperar un comportamiento susceptible a la mancha de asfalto.

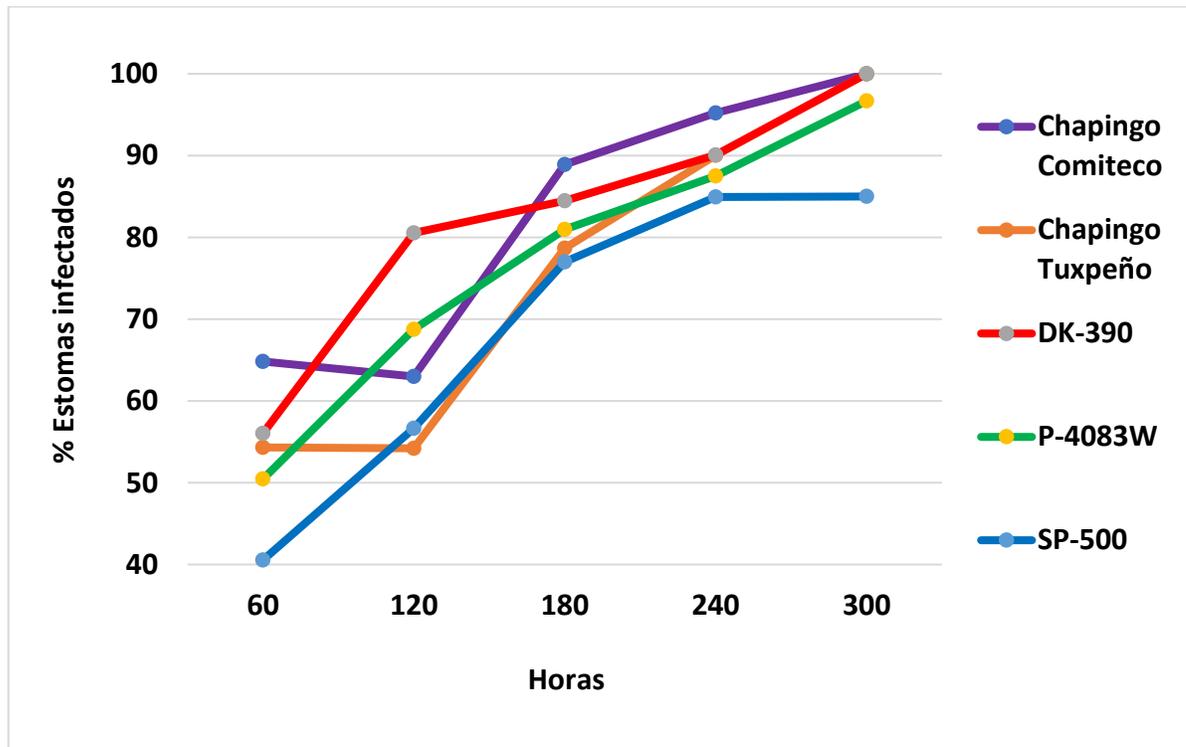


Figura 3. Porcentaje de estomas infectados de los genotipos DK-390, SP-500, P-4083W, Chapingo Comiteco y Chapingo Tuxpeño por inoculación *in vitro* con ascosporas de *P. maydis* y *M. maydis*.

La técnica de inoculación artificial *in vitro* en fragmentos de hojas permitió evaluar el nivel de infección inicial, a nivel de estomas, de los genotipos de maíz a la mancha de asfalto, lo que concuerda por lo mencionado por Pérez *et al.*, (2006) quienes evaluaron esta técnica en bananos y plátanos para estudiar, a nivel monocíclico, la evolución de los síntomas de la Sigatoka Negra causada por *Mycosphaerella fijiensis*.

Los genotipos ensayados *in vitro* en fragmentos de hojas se pueden clasificar como de: a) incidencia media y b) incidencia alta, según las observaciones realizadas en estos estudios. Los resultados de los genotipos DK390, SP500 y el P4083W fueron consistentes en ambos ensayos. Mientras que los locales Chapingo-Tuxpeño y Chapingo-comiteco evaluados en el segundo ensayo presentaron severidad alta a la mancha de asfalto.

Los genotipos que presentaron una severidad mayor fueron el DK390, P4083W y los locales Chapingo-Tuxpeño y Chapingo-Comiteco (evaluados en el segundo ensayo), las plantas de estos genotipos en edad adulta podrían presentar severidad alta a la mancha de asfalto. Aunque Tondopó-Marroquín (2017) menciona que en condiciones de campo los genotipos DK390 y P4083W presentan severidad baja de infección a la mancha de asfalto en el municipio de Ocozocoautla, Chiapas.

Por otro lado, los resultados obtenidos del genotipo P4083W en este estudio tampoco concuerda con lo mencionado por Quiroga *et al.* (2017) quienes evaluaron el mismo genotipo (P4083W) en condiciones de campo y los resultados demostraron severidad baja a la mancha de asfalto. Cabe mencionar que esto pudo deberse a diversos factores como son las condiciones de humedad y temperatura a la que fue expuestas las unidades experimentales en estudio (fragmentos de hojas inoculados con suspensión de ascoporas de *P. maydis* y *M. maydis* colocados en cámara húmeda).

Mientras que el genotipo SP500 fue el genotipo que presentó una severidad media, estos resultados concuerdan con lo mencionado por Quiroga *et al.* (2017) y Tondopó-Marroquín (2017) quienes mencionan el comportamiento intermedio de severidad a la mancha de asfalto presentado de este genotipo en estudios realizados en condiciones de campo en los municipios de Villaflores y Ocozocoautla, Chiapas.

Para los locales Chapingo Tuxpeño y Chapingo Comiteco que presentaron severidad alta, esto se debe a que estos maíces carecen de resistencia a la mancha de asfalto y es necesario realizar un mejoramiento genético a estos maíces amarillos.

Cook y Evans (1987) citados por Quiroga *et al.* (2017) sugieren que la tolerancia y la resistencia funcionan de manera independiente y que la tolerancia se refiere a la cantidad de daño causado por el patógeno en el hospedante. Mientras que la resistencia es la habilidad de la planta hospedante de detener o restringir el desarrollo del patógeno.

Resistencia y susceptibilidad a los fitopatógenos son términos que describen el efecto de la planta en la habilidad del patógeno para reproducirse (Cook y Evans, 1987; Davis y May, 2003, citados por Quiroga *et al.*, 2017). La resistencia cuantitativa o multigénica además de ser más durable que la cualitativa o de genes mayores, es mayormente asociada a patógenos necrotróficos (saprófitos), mientras que la cualitativa está asociada a patógenos biotróficos (parásitos obligados) (Balint-Kurti y Johal, 2009). La combinación de *Phyllachora maydis* que es un parásito obligado (biotrófico) y *Monographella maydis* un saprófito facultativo (necrotrófico), sugiere que los mecanismos de resistencia a la mancha de asfalto puede ser la resultante de una combinación de genes mayores y de genes múltiples aditivos (Quiroga *et al.*, 2017). Ceballos y Deutsch (1992) sugieren que para proveer de una protección efectiva y duradera contra la mancha de asfalto deberían combinarse ambos tipos de resistencia la monogénica y la poligénica.

4.2 Inoculación *in vivo*

4.2.1 Inoculación en plantas jóvenes y sanas de maíz

Los resultados obtenidos del análisis de varianza (ANVA) para el número de estomas infectados del ensayo de inoculación *in vivo* por periodo de incubación en plantas jóvenes y sanas de los genotipos DK390, SP500, P4083W y Chapingo Tuxpeño, mostraron diferencia estadística significativa a los 8, 38 y 45 días; los coeficientes de variación de 0.88% a 4.23%, por lo que son bastante confiables los resultados obtenidos (cuadro 10).

Cuadro 10. Valor de coeficiente de variación (CV) y Pr>F que presentaron los genotipos DK390, SP500, P4083W y Chapingo Tuxpeño durante el lapso de 8 a 45 días.

DÍAS	CV (%)	Pr>F
8	4.23	0.0372 *
15	2.25	0.0776
23	1.84	0.1386
31	1.00	0.0203 *
38	1.48	0.0069 **
45	0.88	0.0028 **

¹Significancias: Si Pr>F= 0.1 No significativo (NS); Si Pr>F= 0.05 significativo (*), Si Pr>F= 0.01 altamente significativo (a/s) **.

En el Cuadro 11 se describe la evolución de la infección de los estomas conforme transcurrieron las horas después de la inoculación con la suspensión de ascosporas de *P. maydis* y *M. maydis*. El genotipo que presentó estadísticamente un mayor daño de estomas infectados a los 45 días fue el DK390 (100 %), seguido del Chapingo-Tuxpeño (98.15 %), mientras que los genotipos P4083W y el SP500 presentaron un menor daño de estomas infectados (93.20 y 93.45 %), por lo cual estos dos últimos se consideran de severidad media y el genotipos DK390 y Chapingo-Tuxpeño de severidad alta de infección a nivel estoma de la enfermedad mancha de asfalto.

Cuadro 11. Porcentaje promedio de estomas infectados de la inoculación *in vivo* de *P. maydis* y *M. maydis* en plantas sanas de maíz durante 45 días.

GENOTIPO	DÍAS DESPUES DE LA INOCULACIÓN					
	8	15	23	31	38	45
DK-390	79.44 ^a	84.64	87.26	91.29	98.15 ^a	100 ^a
P-4083W	67.38 ^{ab}	78.52	83.43	86.72	88.47 ^b	93.45 ^b
SP-500	61.81 ^b	75.58	81.11	86.63	88.52 ^b	93.20 ^b
Chapingo Tuxpeño	70.68 ^{ab}	78.76	81.48	90.86	94.03 ^b	98.15 ^a

*Letras diferentes en columnas (horas) indican diferencia significativa según la prueba de medias Tukey (P≤0.05). N=96 observaciones.

Nota: Datos de porcentaje de estomas transformados a raíz cuadrada

En este ensayo el desarrollo de la enfermedad fue más rápido en el genotipo DK390 y en el Chapingo-Tuxpeño (mayor incidencia) mostraron un alto número de estomas infectados desde los primeros 8 días, manteniéndose así hasta los 45 días de la evaluación alcanzando el máximo nivel de daño de estomas, en comparación con los genotipos SP500 y P4083W. Los genotipos SP500 y P4083W presentaron un desarrollo de la infección con igual comportamiento durante todo el ensayo, con la misma tendencia y tasa de crecimiento, manteniendo un nivel inferior de infección de estomas mostrando cierta capacidad de resistencia, por lo cual se podría esperar que en edad adulta se pudieran considerar como resistentes a la mancha de asfalto (Figura 4).

Agrios (2001), menciona que el grado de susceptibilidad o resistencia depende de los genes de resistencia o susceptibilidad que poseen las variedades, reaccionan de manera diferente a las diversas razas del patógeno y a sus genes de virulencia o avirulencia. La progenie de estas variedades reacciona a los mismos patógenos exactamente en la misma forma que sus progenitores, indicando que la propiedad de resistencia o susceptibilidad contra un patógeno esta genéticamente controlada (heredada). De manera similar, la progenie de cada patógeno produce en cada variedad el mismo efecto que causaban los patógenos progenitores, indicando que la capacidad de virulencia o avirulencia del patógeno sobre una variedad particular esta genéticamente controlada (heredada). De lo anterior se puede mencionar que bajo condiciones ambientales favorables, la infección (susceptibilidad) o no infección (resistencia) en cada combinación patógeno-hospedante es predeterminada por el material genético tanto del hospedante como del patógeno. El número de genes que determinan la resistencia o la susceptibilidad varía de una planta a otra, de la misma manera como el número de genes que determinan la virulencia o avirulencia varía de un patógeno a otro.

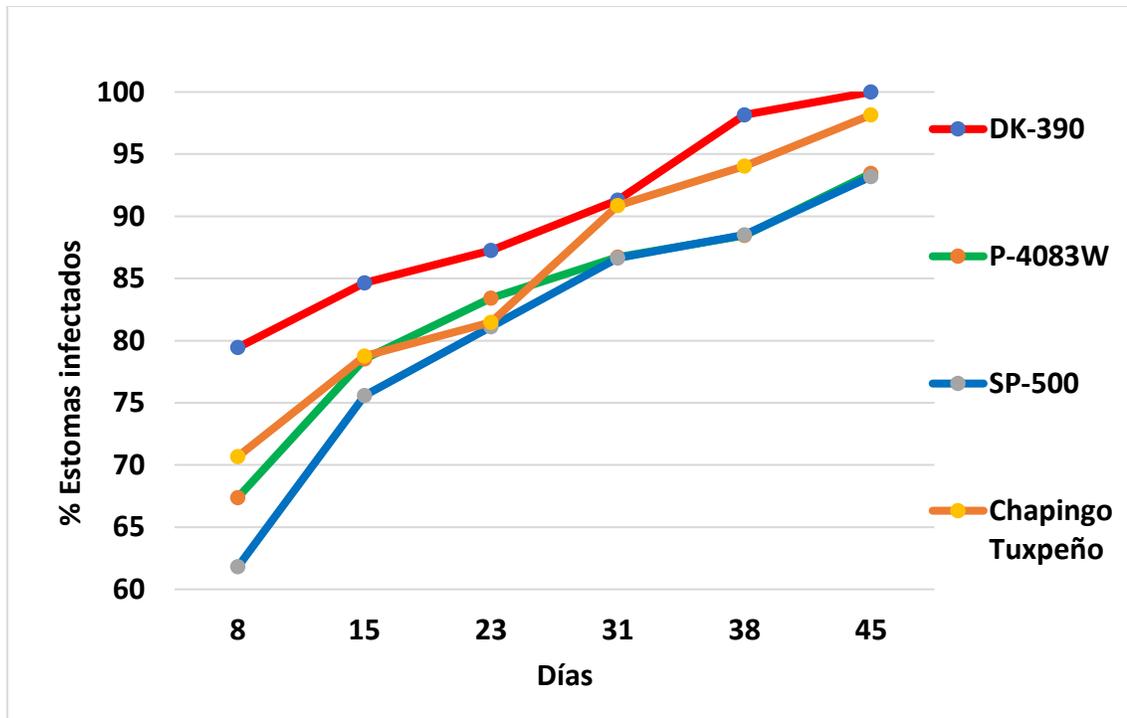


Figura 4. Respuesta de los genotipos de maíz DK-390, Chapingo Tuxpeño, P-4083W y SP-500 a la inoculación con ascosporas de *P. maydis* y *M. maydis*, en planta jóvenes.

Para la evaluación de la infección causada por *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* a nivel estoma, esta técnica se considera eficiente debido a que permite evaluar en menor tiempo un mayor número de muestras.

En este ensayo los genotipos DK390 y el local Chapingo Tuxpeño (maíz amarillo) presentaron mayor incidencia (número de estomas infectados) y los genotipos SP500 y P4083W menor incidencia o número de estomas infectados por *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, por lo cual en edad adulta las plantas de maíz de los genotipos DK390 y el local Chapingo-tuxpeño se esperaría que fueran susceptibles y las plantas adultas de los genotipos SP500 y P4083W se esperaría que fueran resistentes y a la mancha de asfalto.

El local Chapingo Tuxpeño presentó severidad alta de infección a nivel estoma en este ensayo de inoculación artificial. Hasta el momento en los estudios realizados con maíces de grano amarillo no se han identificado materiales que sean resistentes a la mancha de asfalto (Garrido *et al.*, 2016).

Quiroga *et al.* (2017) en los años 2014 y 2015 estudiaron estos mismos genotipos a excepción del local Chapingo Tuxpeño, evaluaron el nivel de severidad a la mancha de asfalto a nivel planta en condiciones de campo mediante inoculación natural, los resultados demostraron que en la etapa R4 el genotipo DK390 presentó severidad muy baja, el genotipo P4083W severidad bajo. Mientras que el genotipo SP500 presentó severidad media de infección a la mancha de asfalto.

4.3 Diversidad genética

4.3.1 Extracción y cuantificación de ADN

Se logró la extracción de ADN de buena calidad de 48 muestras de *Phyllachora maydis*, 44 muestras de *Monographella maydis* y 5 muestras de *Microdochium* provenientes de muestras de plantas de maíz de Chiapas y de Guatemala.

En los cuadros 12, 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de ADN de la muestras de *Microdochium*, *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* respectivamente, cuantificadas con un Nanodrop One obteniendo los datos de concentración de ADN en ng/μL y la relación de absorbancias 260/280 nm como índice de la calidad. Las cuales fueron etiquetadas conforme al lugar de procedencia, cultivo (Maíz), año de recolección (2014) y número de muestra (0101).

Las muestras de ADN presentan buena concentración (ng/μL) y un buen nivel de pureza como se observa en la relación A260/A280 (> 1.5); lo cual concuerda con lo mencionado por Cadavid-Sánchez, *et al.*, (2013), quienes mencionan que el ADN con una absorbancia en la relación A260/A280 de 1.5 es de buena calidad para la realización de pruebas moleculares; como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con muestras de ADN de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* (Jonapá-Montoya 2015).

Cuadro 12. Concentración de ADN de muestras de *Microdochium* provenientes de Chiapas.

<i>Microdochium</i>	ng/μL	A260/A280	A260/A230
1-CH-MA170103	7.0	1.74	0.82
2-CH-MA170203	10.2	1.79	0.87
3-CH-MA140303	9.0	1.60	0.70
4-CH-MA140403	7.5	1.74	0.86
5-CH-MA140503	8.3	1.52	0.71

Nota: CH: Muestras provenientes de Chiapas

Cuadro 13. Concentración de ADN de muestras de *Phyllachora maydis* provenientes de Chiapas y Guatemala.

<i>Phyllachora maydis</i>	ng/μL	A260/A280	A260 / A230	<i>Phyllachora maydis</i>	ng/μL	A260 / A280	A260/A230
1-CH-MA140101	7.2	1.76	0.29	21-CH-MA142101	3.4	1.95	0.29
2-CH-MA140201	5.6	1.65	0.29	22-CH-MA142201	8.2	1.82	0.32
3-CH-MA140301	7.6	1.53	0.19	23-CH-MA142301	16.0	1.61	0.31
4-CH-MA140401	15.1	1.69	0.34	24-CH-MA142401	5.6	1.86	0.30
5-CH-MA140501	11.0	1.77	0.37	25-CH-MA142501	3.4	1.63	0.18
6-CH-MA140601	16.2	1.57	0.33	26-CH-MA142601	5.0	1.37	0.17
7-CH-MA140701	15.1	1.76	0.57	27-CH-MA142701	6.1	1.67	0.23
8-CH-MA140801	5.0	1.70	0.17	28-CH-MA142801	1.6	2.73	0.08
9-CH-MA140901	9.0	1.78	0.41	29-CH-MA142901	1.3	3.54	0.07
10-CH-MA141001	2.8	1.40	0.19	30-CH-MA143001	4.7	2.06	0.11
11-CH-MA141101	13.2	1.57	0.38	31-CH-MA143101	4.2	1.55	0.18
12-CH-MA141201	24.6	1.72	0.59	32-CH-MA143201	1.5	1.74	0.11
13-CH-MA141301	23.6	1.55	0.34	33-CH-MA143301	0.4	2.32	0.03
14-CH-MA141401	14.7	1.85	0.38	34-CH-MA143401	0.5	2.29	0.04
15-CH-MA141501	12.8	1.81	0.36	35-CH-MA143501	5.0	1.65	0.24
16-CH-MA141601	8.0	1.87	0.36	36-CH-MA143601	3.1	1.99	0.13
17-CH-MA141701	28.5	1.84	0.55	37-GU-MA143701	0.5	1.73	0.05
18-CH-MA141801	6.1	1.67	0.34	38-GU-MA143801	1.7	0.59	0.09
19-CH-MA141901	11.9	1.59	0.42	39-GU-MA143901	6.1	1.77	0.21
20-CH-MA142001	10.0	1.61	0.30	40-GU-MA144001	1.5	1.50	0.11

Nota: CH: Muestras provenientes de Chiapas GL: muestras provenientes de Guatemala

Cuadro 14. Concentración de ADN de muestras de *Monographella maydis* provenientes de Chiapas y Guatemala.

<i>Monographella maydis</i>	ng/μL	A260/A280	A260/A230	<i>Monographella maydis</i>	ng/μL	A260/A280	A260/A230
1-CH-MA140102	46.9	1.47	0.36	19-CH-MA141902	7.9	1.59	0.33
2-CH-MA140202	35.5	1.37	0.42	20-CH-MA142002	22.4	1.64	0.43
3-CH-MA140302	35.6	1.30	0.41	21-CH-MA142102	10.5	1.46	0.28
4-CH-MA140402	17.6	1.38	0.36	22-CH-MA142202	12.4	1.55	0.28
5-CH-MA140502	16.0	1.45	0.39	23-CH-MA142302	4.1	1.41	0.21
6-CH-MA140602	13.1	1.37	0.32	24-CH-MA142402	5.5	1.52	0.38
7-CH-MA140702	7.2	1.54	0.29	25-CH-MA142502	17.3	1.55	0.38
8-CH-MA140802	35.2	1.32	0.39	26-CH-MA142602	9.4	1.39	0.31
9-CH-MA140902	13.0	1.57	0.36	27-CH-MA142702	6.5	1.47	0.22
10-CH-MA141002	4.8	1.56	0.17	28-CH-MA142802	3.7	1.55	0.20
11-CH-MA141102	9.1	1.49	0.28	29-CH-MA142902	3.6	1.74	0.18
12-CH-MA141202	10.9	1.70	0.30	30-CH-MA143002	11.3	1.61	0.28
13-CH-MA141302	9.1	1.56	0.34	31-CH-MA143202	9.3	1.53	0.27
14-CH-MA141402	11.0	1.48	0.30	32-CH-MA143502	1.7	1.82	0.17
15-CH-MA141502	15.9	1.73	0.41	33-GL-MA143702	5.1	1.54	0.28
16-CH-MA141602	81.1	1.16	0.59	34-GU-MA143802	1.6	1.41	0.14
17-CH-MA141702	10.4	1.55	0.33	35-GU-MA143902	7.6	1.40	0.25
18-CH-MA141802	13.7	1.34	0.37	36-GU-MA144002	4.5	1.49	0.21

Nota: CH: Muestras provenientes de Chiapas GL: muestras provenientes de Guatemala.

4.3.2 Amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa

Se realizó la amplificación de la región ITS del ADNr de las 48 muestras de *Phyllachora maydis*, 44 muestras de *Monographella maydis* y 5 muestras de *Microdochium* provenientes de Chiapas y Guatemala mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en gel de agarosa al 1%. En la Figura 5 se muestran los carriles 2, 3, 4 donde se presenta una sola banda de aproximadamente 500 pb, pertenecientes a muestras de ADN de *Phyllachora maydis*, los carriles 6, 7, 8 y 11 también presentan una sola banda de aproximadamente 600 pb pertenecientes a muestras de ADN de *Monographella maydis* al igual que los carriles 12 y 13 pertenecientes a *Microdochium* (estado imperfecto de *Monographella maydis*). En los carriles 5, 9, 10 y 14 no existió amplificación.

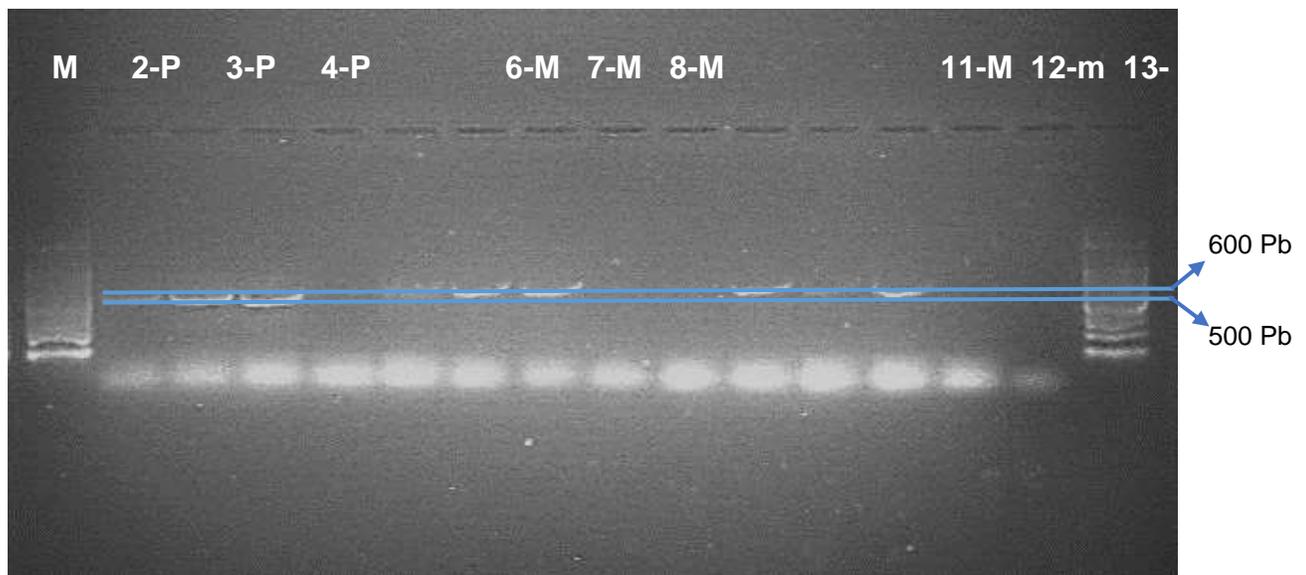


Figura 5. Productos de amplificación de la región ITS del ADNr de *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Microdochium*.

Los resultados anteriores concuerdan con lo mencionado por Jonapá-Montoya (2015) quien señala que la amplificación de la región ITS del ADNr de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* es de aproximadamente 600 pb; y concuerda también, con lo reportado por Begerow *et al.*, (2010) y Nilsson *et al.* (2011) quienes mencionan que los dos espaciadores internos ITS1 e ITS2 y el gen intercalado 5.8S altamente conservado se encuentran en una amplificación de la región de 450-650 pares de bases (pb).

Fujita *et al.*, (2001) analizaron la región ITS de 45 cepas de hongos con los 'primers' ITS1 e ITS4 y encontraron fragmentos de 350–880 pb, demostrando la alta variabilidad de la región ITS a nivel de género y especie. Esto se observó claramente con los 'primers' ITS1-ITS4 para *Phyllachora maydis* y *Monographella* que se encontró por debajo de los 650 pb.

4.3.3 Secuenciación y comparación de secuencias

Se obtuvieron secuencias de 11 muestras de ADN de *Phyllachora maydis*, seis de *Monographella*, dos de *Microdochium* y dos *Coniothyrium*. Las muestras de *Phyllachora* al compararlas con secuencias depositadas en el Genbank mostraron un 83 a 99 % de identidad con *Phyllachora maydis* (accesión KU184459) (Rulh *et al.*, 2016). Lo que comprueba la presencia de *Phyllachora maydis* en los municipios de Ocosingo, Oxchuc, Huixtán, Ocozocoautla, Villaflores y Las Margaritas en Chiapas (Cuadro 15). Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Hock (1989) y Quiroga *et al.*, (2017) quienes afirman la presencia de *Phyllachora maydis* en Chiapas.

Cuadro 15. Comparación de secuencias de *Phyllachora* provenientes de Chiapas con secuencias depositadas en el Genbank. (NCBI, 2017).

Sequence	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
MA140701	353	353	71%	83%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Ocosingo	276	276	34%	93%	<i>Phyllachora</i> sp. KY498121
MA140901	666	666	68%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Oxchuc					
MA141101	701	701	87%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Oxchuc	438	438	89%	87%	<i>Phyllachorales</i> sp. (KM108581)
MA141201	701	701	87%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Oxchuc	427	427	88%	86%	<i>Phyllachora</i> sp. (KX451925)
MA141301	691	691	87%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Huixtán	433	433	89%	87%	<i>Phyllachorales</i> sp. (KM108581)
MA141401	693	693	87%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Huixtán	422	422	88%	86%	<i>Phyllachora</i> sp. (KX451925)
MA141501	695	695	87%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Huixtán					
MA142101	701	701	88%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Ocozocoautla	438	438	89%	87%	<i>Phyllachorales</i> sp. (KM108581)
MA142201	697	697	85%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Villaflores	438	438	89%	87%	<i>Phyllachorales</i> sp. (KM108581)
MA142301	695	695	87%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Villaflores	438	438	89%	87%	<i>Phyllachorales</i> sp. (KM108581)
MA142401	695	695	87%	99%	<i>Phyllachora maydis</i> (KU184459)
Las Margaritas					

Las muestras de *Monographella* mostraron un 88 a 96% de identidad con *Monographella* sp. (Varvas *et al.*, 2013), además también mostraron un 88 a 96% identidad con *Microdochium seminicola* (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016) (Cuadro 16). Hernández-Restrepo menciona que *Microdochium* es el estado asexual de *Monographella*, lo cual explica la identidad de estas secuencias con ambas secuencias encontradas en el Genbank. Estos resultados indican la presencia de *Microdochium seminicola* y *Monographella* sp. en los municipios de Ocosingo, Oxchuc, Villaflores y Ocozocoautla. Estos resultados concuerdan con lo mencionado por Quiroga-Madrigal (1995) quien reporta la presencia de *Microdochium* en el estado de Chiapas. Hasta el

momento no se encuentra disponible ninguna secuencia de *Monographella maydis* y *Microdochium maydis* en el Genbank.

Cuadro 16. Comparación de secuencias de *Monographella* provenientes de Chiapas con secuencias depositadas en el Genbank (NCBI, 2017).

Sequence	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
MA140702 Ocosingo	754	754	86%	96%	<i>Monographella</i> sp. (JN688923)
	832	832	94%	96%	<i>Microdochium seminicola</i> (KP859022)
MA141202 Oxchuc	837	837	94%	96%	<i>Microdochium seminicola</i> (KP859022)
	760	760	86%	96%	<i>Monographella</i> sp. (JN688923)
MA141702 Villaflores	843	843	96%	96%	<i>Microdochium seminicola</i> (KP859020)
	760	760	86%	96%	<i>Microdochium seminicola</i> (KP859022)
MA141902 Ocozocoautla	841	841	95%	96%	<i>Microdochium seminicola</i> (KP859022)
	760	760	86%	96%	<i>Microdochium seminicola</i> (KP859022)
MA142002 Ocozocoautla	606	606	92%	88%	<i>Microdochium seminicola</i> (KP859022)
	545	545	77%	90%	<i>Monographella</i> sp. (KU574705)
MA142202 Villaflores	813	813	94%	96%	<i>Microdochium seminicola</i> (KP859022)
	736	736	86%	95%	<i>Monographella</i> sp. (JN688923)

Las muestras de *Microdochium* mostraron un 94 a 95% de identidad con *Microdochium seminicola* (Hernández-Restrepo *et al.*, 2016) y las de *Coniothyrium* mostraron un 93 a 95% de identidad con *Coniothyrium fuckelii* (Ciardo *et al.*, 2007) y en un 94 % de identidad con *Coniothyrium sp.* (Gorfer *et al.*, 2011). Estos resultados indican la presencia de *Microdochium seminicola* en los municipios de Ocozocoautla y Oxchuc. Mientras que en el municipio de Huixtán, Chiapas indicaron la presencia de *Coniothyrium fuckelii* y *Coniothyrium sp.* (Cuadro 17). Hasta el momento no se encuentra una secuencia de *Coniothyrium phyllachorae* en el Genbank.

Cuadro 17. Comparación de secuencias de *Microdochium* y *Coniothyrium* provenientes de Chiapas con secuencias depositadas en el Genbank (NCBI, 2017).

Sequence	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
MA141902 Ocozocoautla	787	787	95%	94%	<i>Microdochium semicola</i> (KP859022)
MA140902 Oxchuc	795	795	94%	95%	<i>Microdochium semicola</i> (KP859022)
MA141304 Huixtán	785	785	89%	95%	<i>Coniothyrium fuckelii</i> (EF540754)
MA141504 Huixtán	769	769	91%	94%	<i>Coniothyrium sp.</i> (HQ115651)
	730	730	90%	93%	<i>Coniothyrium fuckelii</i> (EF540754)

De las muestras de ADN de *Phyllachora* y *Monographella* aislados de maíces con síntomas de mancha de asfalto en el municipio de Monjas Guatemala, se obtuvieron ocho secuencias muy cortas las cuales no se pudieron comparar con secuencias depositadas en el Genbank.

4.3.4 Análisis filogenético

Se analizó la diversidad genética de las secuencias obtenidas y se muestran las relaciones filogenéticas de 11 secuencias de *Phyllachora*, seis secuencias de *Monographella*, dos secuencias de *Microdochium* y dos secuencias de *Coniothyrium* mediante el método UPGMA. Las secuencias obtenidas de ADN fueron extraídas directamente del tejido vegetal enfermo de muestras provenientes de los municipios Ocosingo, Oxchuc, Huixtán, Ocozocoautla, Villaflores y Las Margaritas, Chiapas.

En la Figura 6 se muestra la relación filogenética de 11 secuencias de ADN de *Phyllachora*. Se observa la formación de dos grupos o ramas en relación a la secuencia de *Phyllachora maydis* encontrada en el Genbank (accesión KU184459, testigo positivo). El primer grupo lo forman las secuencias MA141501, MA143001, MA141401 procedentes de Huixtán; MA142201, MA142301 procedentes de Villaflores; MA140901, MA141101 y MA141201 procedentes de Oxchuc; MA142401 procedente de las Margaritas y la secuencia MA142101 procedente de Ocozocoautla, las cuales están a una distancia menor de 0.02 de la secuencia tipo (accesión KU184459). La segunda rama se forma con una sola secuencia (MA140701) procedente de Ocosingo, la cual está a una distancia mayor al 0.10 de la secuencia tipo.

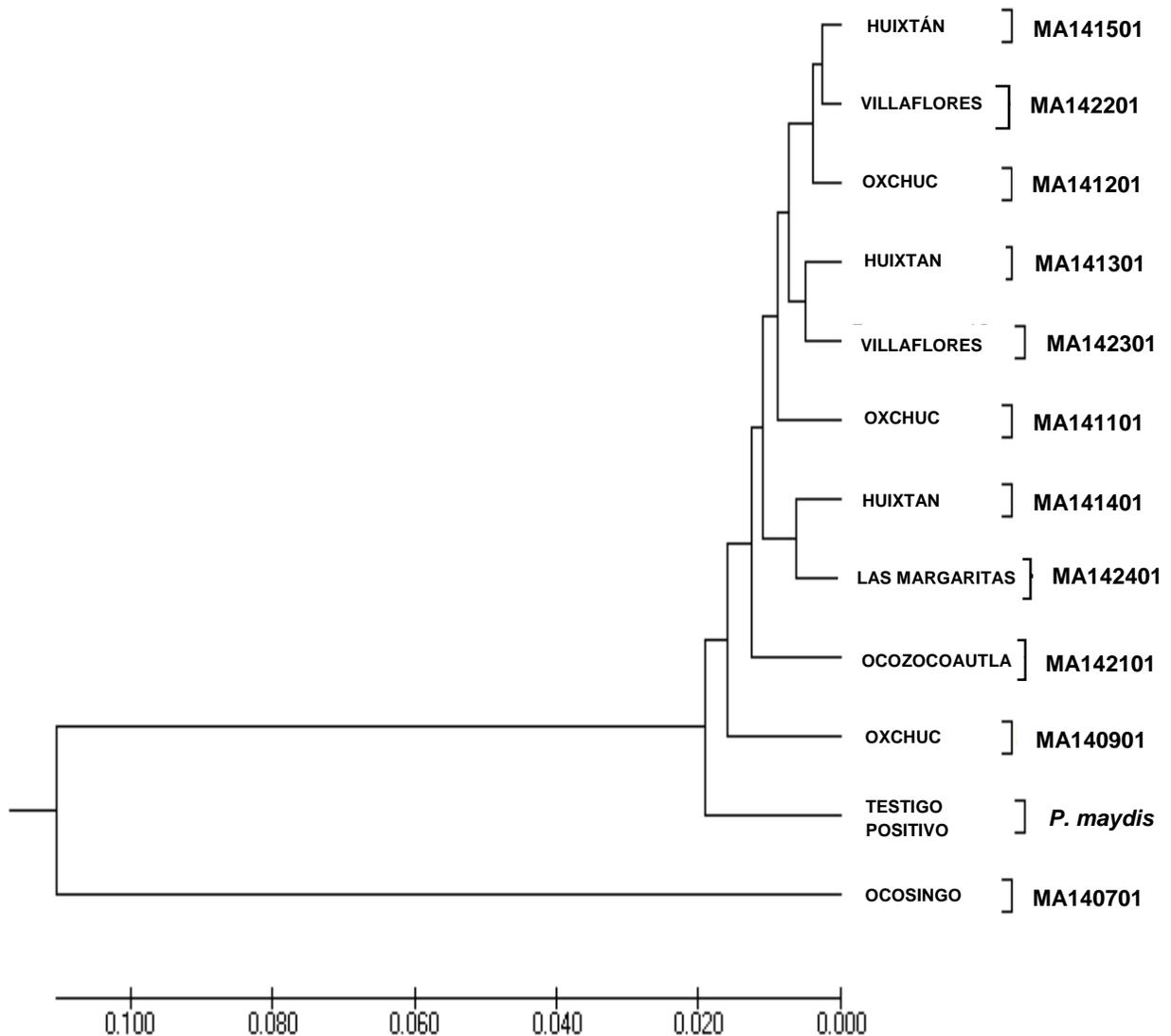


Figura 6. Relaciones filogenéticas de 11 secuencias de ADN de *Phyllachora* provenientes de Chiapas y la secuencia 12 como testigo positivo (*Phyllachora maydis*) mediante el método UPGMA.

En Figura 7 se muestra la relación filogenética de seis secuencias de ADN de *Monographella*, se observa la formación de dos grupos enfilados a los testigos *Monographella sp.* (KP859022) y *Microdochium seminicola* (JN688923) encontradas en el Genbank. Se observa la formación de un primer grupo formado por las secuencias MA141702 procedente de Villaflores, MA141902 procedente de Ocozocoautla, MA141202 procedente de Oxchuc y la secuencia MA140702 procedente de Ocosingo, las cuales son prácticamente idénticas y están a una distancia menor de 0.02 de las secuencias utilizadas como tipo para este análisis. El segundo grupo lo forman las secuencias MA142002 procedente de Ocozocoautla y MA142202 procedente de Villaflores y están a una distancia mayor a 0.04 del grupo de las secuencias tipo.

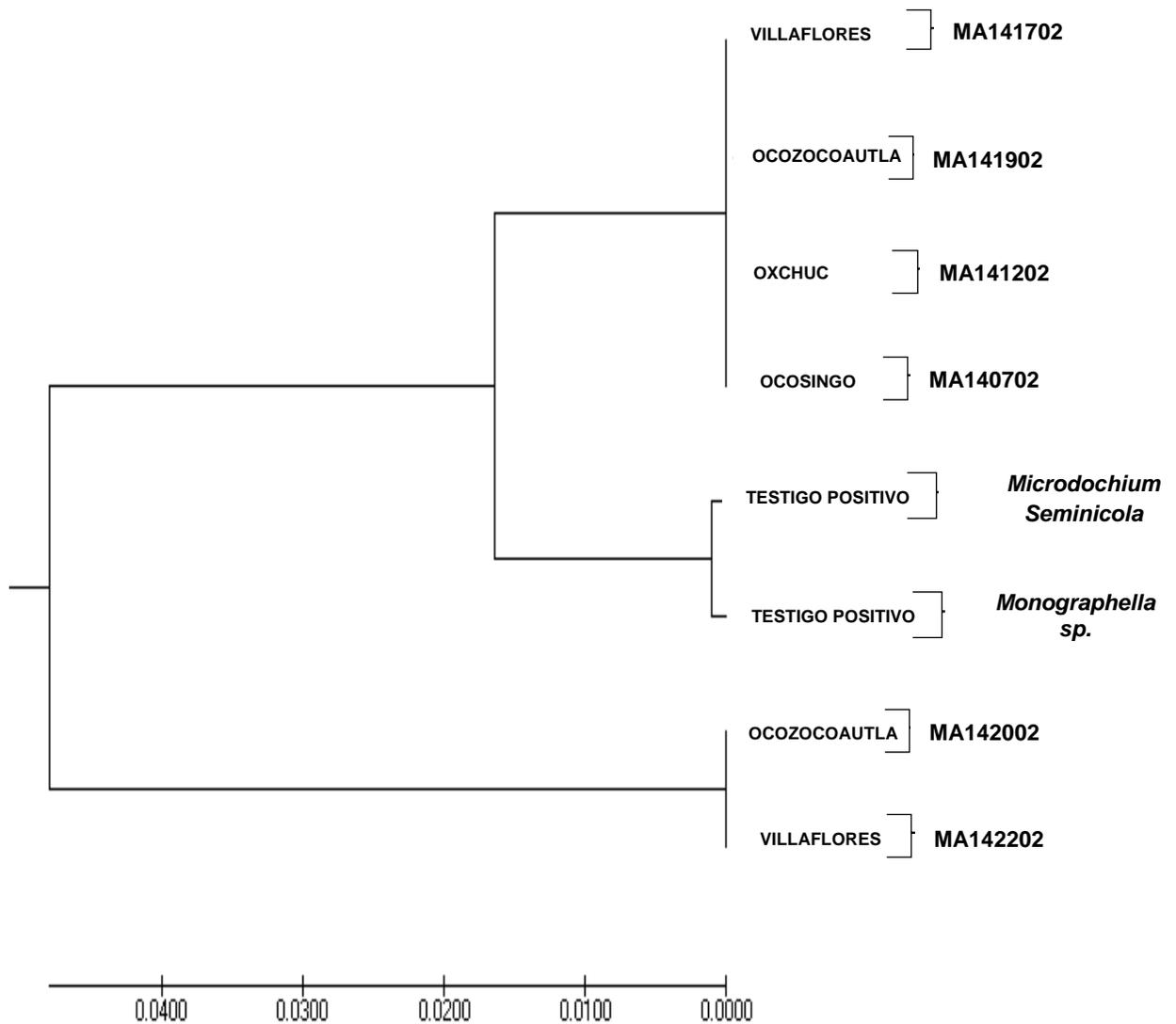


Figura 7. Relaciones filogenéticas de 6 secuencias de *Monographella* provenientes de Chiapas y la secuencias 7 (*Monographella sp.*) y 8 (*Microdochium seminicola*) como testigo positivo mediante el método UPGMA.

En la Figura 8 se observa la relación filogenética de 2 secuencias de *Microdochium*, se observa la formación de un grupo o rama en relación a la secuencia *Microdochium seminicola* encontrada en el Genbank (accesión KP859022 testigo positivo). El grupo lo forma dos secuencia la MA141902 Procedente de Ocozocoautla y la MA140902 procedente de Oxchuc, el cual está a una distancia menor de 0.02 de la secuencia tipo (accesión KP859022) (Figura 8). Cabe mencionar que *Microdochium* es el estado asexual de *Monographella* (Hernández- Restrepo, 2016).

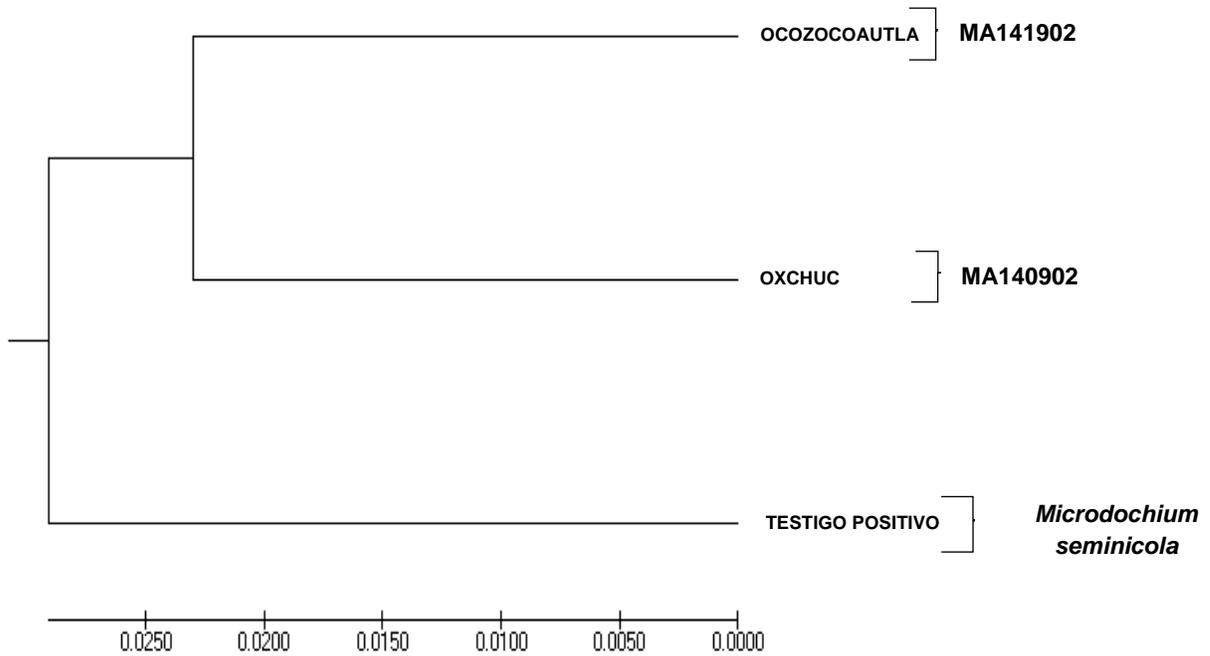


Figura 8. Relaciones filogenéticas de 2 secuencias de *Microdochium* provenientes de Chiapas y la secuencia 3 como testigo positivo (*Microdochium seminicola*) mediante el método UPGMA.

En la figura 9 se observa la relación filogenética de dos secuencias de *Coniothyrium*, se observa la formación de un grupo e relación a las secuencias *Coniothyrium* sp. (accesión HQ115651) y *Coniothyrium fuckeli* (accesión EF540754) testigos positivos, encontradas en el Genbank. El grupo o rama lo forman la secuencia MA141304 y la MA141504 procedentes de Huixtán y se encuentra a una distancia mayor de 0.03 de las secuencias tipo (*Coniothyrium* sp. HQ115651 y *Coniothyrium fuckeli* EF540754).

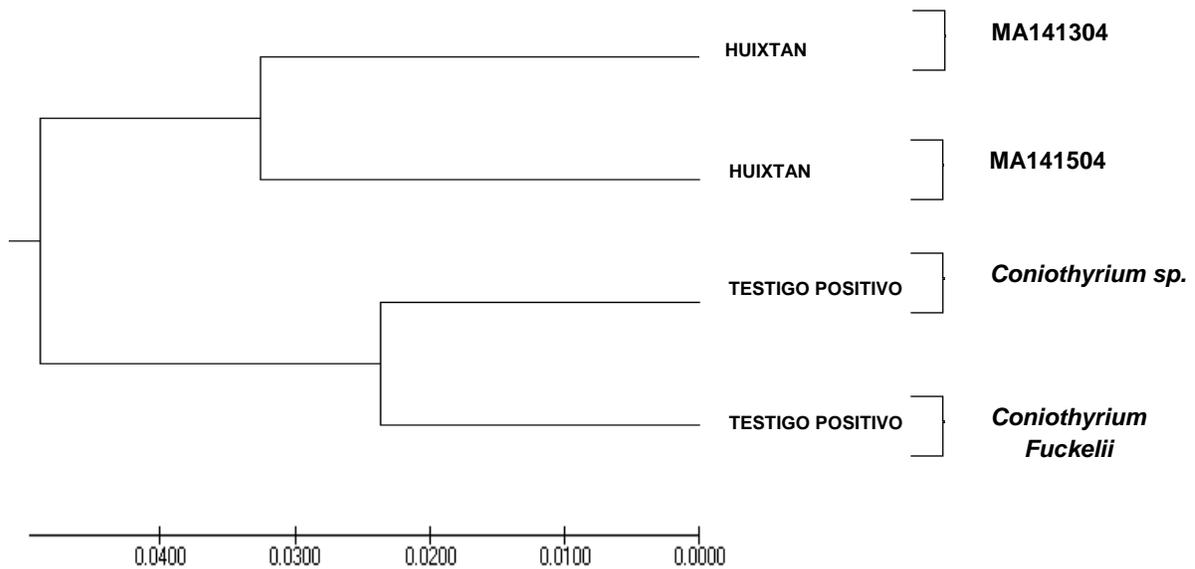


Figura 9. Relaciones filogenéticas de dos secuencias de *Coniothyrium* provenientes de Chiapas y la secuencias 3 (*Coniothyrium sp.*) y 4 (*Coniothyrium fuckelii*) como testigo positivo mediante el método UPGMA.

Los resultados de las secuencias confirman la presencia *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Microdochium sp.*, patógenos causales de la mancha de asfalto, así como *Coniothyrium sp.*, micoparásito de *Phyllachora maydis*, en los municipios de Ocosingo, Oxchuc, Huixtán, Ocozocoautla, Villaflores y Las Margaritas, Chiapas donde las condiciones de temperatura media mensual oscilan entre 12 a 26 °C, con una humedad relativa del 61 a 83 %, con una altitud de 854 a 2400 msnm (INEGI, 2017). Lo cual coincide con lo mencionado por Hock *et al.* (1995) quienes reportan un promedio de 17 °C a 22 °C, con al menos 7 horas de humedad foliar cada noche y humedad relativa >75%; o de 10 a 20 días nublados por mes; o una precipitación mensual mínima de 150 mm, entre 1800 y 1900 horas de luz solar al año. Además, se encuentra comúnmente en regiones montañosas moderadamente frías y húmedas, tanto tropicales como subtropicales, a 1300-2300 msnm (CIMMYT, 2012).

5. CONCLUSIONES

Las técnicas de inoculación *in vitro* en fragmentos de hojas y la técnica de inoculación *in vivo* en planta sana joven de maíz, permitieron evaluar de forma eficiente la infección inicial a nivel estoma en los genotipos de maíz ensayados.

Los genotipos DK390, local Chapingo-Comiteco y local Chapingo-Tuxpeño, presentaron alta incidencia de infección a nivel estomático en el proceso inicial del desarrollo de la enfermedad mancha de asfalto.

El genotipo P4083W presentó incidencia alta de infección a nivel estomático en los ensayos de inoculación *in vitro* en fragmentos de hoja; mientras que en el ensayo de inoculación *in vivo* en planta sana y joven de maíz presentó incidencia media de estomas infectados. Por lo que se concluye que este genotipo *in vitro* es susceptible e *in vivo* es resistente en el proceso inicial de infección a la mancha de asfalto.

El genotipo SP500 presentó incidencia media de infección a nivel estomático de en el proceso inicial del desarrollo de la enfermedad mancha de asfalto, considerándose resistente bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Las secuencias MA141501, MA143001, MA141401 procedentes de Huixtán, MA142201, MA142301 procedentes de Villaflores, MA140901, MA141101 y MA141201 procedentes de Oxchuc, MA142401 procedente de las Margaritas y la secuencia MA142101 procedente de Ocozocoautla, corresponden a *Phyllachora maydis* con un 83 a 99 % de identidad con *Phyllachora maydis* (accesión KU184459).

Las secuencias MA141702 y MA142202 procedente de Villaflores; MA141902 y MA142002 procedente de Ocozocoautla; MA141202 procedente de Oxchuc y la secuencia MA140702 procedente de Ocosingo, tienen una identidad de un 88 a 96% *Monographella* sp. y *Microdochium semicola* (KP859022). Considerando que *Microdochium* es la fase asexual de *Monographella*, se llega a la conclusión que estas secuencias se clasifican como *Monographella* sp. (accesión JN688923).

Las secuencias MA141902 procedente de Ocozocoautla y la MA140902 procedente de Oxchuc se clasificaron como *Microdochium semicola* (accesión KP859022) con un 94 a 95% de identidad.

Las secuencias MA141304 y la MA141504 procedentes de Huixtán se clasificaron como *Coniothyrium* sp. (accesión HQ115651) con un 94% de identidad..

6. LITERATURA CITADA

- Agrios G.N. 2001. Fitopatología. Trad. M. Guzmán Ortiz. 2ª ed. Ed. LIMUSA. México. P. 203.
- Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. 5a edition. Elsevier Academic Press. Nueva York. P. 952.
- Álvarez I. and Wendel J., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 417 – 434.
- Begerow D., Nilsson R. H., Unterseher M., Maier W. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(1): 99–108. doi: 10.1007/s00253-010-2585-4.
- Bos L., Parlevliet J. E. 1995. Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Ann. Rev. Phytopathology* 33(2): 69-102.
- Bottema C.D., Sommer. S.S. 1993. PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat Res.* Vol. 288(1). 93-102.
- Butler D.K., and Metzberg R.L. 1989. Premeiotic change of nucleous organizer size in *Neurospora*. *Genetics*. 122:783-791.
- Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S. 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633–2635.
- Bruns T., White T. and Taylor J., 1991. Fungal Molecular Systematics, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 22, 525 – 564.
- Ceballos H. and Deutsch J.A. 1992. Inheritance of resistance to tar spot complex in maize. *Phytopathology* 82: 505–512.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). 2012. Complejo mancha de asfalto del maíz: hechos y acciones. Folleto CIMMYT. México. 6 p.
- Ciardo D. E., Schär G., Altwegg M., Böttger E. C., Bosshard PP. 2007. Identification of moulds in the diagnostic laboratory an algorithm implementing molecular and phenotypic methods. *Diagn Micr Infec Dis*. 59: 49–60.
- Cifuentes-Hernandez E. G. 2014. Características agronómicas y rendimiento de once híbridos de maíz; Retalhuleu, Retalhuleu. Tesis de licenciatura en Ciencias Agrícolas. Universidad Rafael Landívar. Escuintla, Guatemala. 6 p.
- Chalkley D. 2015. Invasive fungi, tar spot of corn-*Phyllachora maydis*. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Agricultural Research Service, USDA. [https://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/factsheets/pdfPrintFile.cfm?thisApp=Phyllachor maydis](https://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/factsheets/pdfPrintFile.cfm?thisApp=Phyllachor%20maydis)
- Cline E. 2005. *Phyllachora maydis* Maubl. 1904. Nomenclature Fact Sheets. United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. 2 p.
- Cook R., and Evans K. 1987. Resistance and tolerance. P. 179-231 In R. H. Brown and B. R. Kerry (ed.). Principles and practice of nematode control in crops. Marrickville, NSW, Australia: Academic Press.

- National Center for Biotechnology information (NCBI) 2017. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. Consultado por última vez: 01 de diciembre del 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Davis R. F., and May O. L. 2003. Relationships between tolerance and resistance to *Meloidogyne incognita* in cotton. *J. Nematol.* 35:411-416.
- Dittrich U., Hock J., and Kranz J. 1991. Germination of *Phyllachora maydis* ascospores and conidia of *Monographella maydis*. *Cryptogamic Botany* 2(3):214-218.
- Dellaporta S. L., Wood J. and Hicks J. B. 1983. *Plant Mol. Biol. Reporter* 4:19-21.
- Delidow B. C., Lynch J. B., Peluso J. J., White B.A. 1993. Polymerase chain reaction: basic protocols. In BA White, ed, *PCR Protocols. Current Methods.* Humana Press, Totowa, NJ, pp 1-30
- DGSV, 2011. Alerta enfermedad conocida como “mancha de asfalto” amenaza de maíz en Honduras. Boletín relevante emitido por el sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria SINAVEF. Consultado en línea el 15 de octubre 2017 <http://portal.sinavef.gob.mx/infoRelevante4.html>.
- Eguiarte L., Souza V., y Aguirre X. 2007. *Ecología Molecular.* Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. UNAM. México, pp. 594.
- Fujita N., Hasegawa H., Taira T. 2001. The isolation and characterization of a waxy mutant of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). *Plant Sci* 160: 595–602.
- Flor H. H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rusts. *Advances in Genetics* 8:29-59.
- French R. E., Hebert T. T. 1980. *Métodos de investigación fitopatológica.* Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Editorial IICA-Serie No. 43. San José costa Rica. Pp.182-186.
- García-F. R. 1986. Determinación de los hongos que atacan al maíz (*Zea mays* L.) en Villaflores y Villa Corzo, Chiapas, México. Tesis Ing. Agrónomo Parasitólogo. Universidad Autónoma de Chiapas. Villaflores, Chiapas, México. 69 p.
- Gardes M., Bruns T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118
- Garrido-Ramírez E.R., Coutiño-Estrada B., Quiroga-Madrigal R.R, Cardona-Orellana J. A., Monterroso-Salvatierra D., San-Vicente F., Willcox M., Ngugi H. 0 . Informe 2015 del proyecto de investigación “Resistance mechanism of maize to tar spot complex and germplasm selection/Mecanismos de resistencia al complejo de la mancha de asfalto y selección de germoplasma”. CRP MAIZE project number: A 0 .0 . 0. INIFAP, CIMMYT, UNACH, FAUSAC, ICTA. Ocozocoautla, Chiapas, México.46 p.
- González-C. M., Gómez-M. N., 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. Hoja Desplegable Técnica No. 5. INIFAP, Centro de Investigación Regional del Pacífico Sur, Campo Experimental Iguala. Iguala, Guerrero, México.

- González C.M. 2013. Nuevos métodos de control de la mancha de asfalto del maíz. Fichas Tecnológicas Sistema Producto (Nueva Tecnología). Instituto Nacional de Investigaciones, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) 2 p.
- Gorfer M., Blumhoff M., Klaubauf S., Urban A., Inselsbacher E., Bandian D. 2011. Community profiling and gene expression of fungal assimilatory nitrate reductases in agricultural soil. *ISME J.* 5, 1771–1783. doi: 10.1038/ismej.2011.53
- Greenberg J.T. 1997. Programmed cell death in plant-patogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 525-545.
- 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>
- Hernández R.L., 2014. Genética de la resistencia al complejo *Phyllachora maydis* Maubl., *Monographella maydis* Müller & Samuels y *Coniothyrium phyllachorae* Maublanc., en diversos genotipos de maíz (*Zea mays* L.) Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 3-5 p.
- Hernández L., Sandoval J., Mahuku G., Benítez I. y Cruz S. 2015. Genética de la resistencia al complejo mancha de asfalto en 18 genotipos tropicales de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 38(1):39-47.
- Hernández-Restrepo M., Groenewald J.Z. and Crous P.W. 2016. Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia* 36: 57–82.
- Hernández-Restrepo M., Groenewald J.Z. and Crous P.W. 2016. Taxonomic and phylogenetic re-evaluation of *Microdochium*, *Monographella* and *Idriella*. *Persoonia* 36: 57–82.
- Hock J. 1989. El complejo mancha de asfalto del maíz en México. En: Téliz-Ortiz (ed). Enfermedades del maíz, frijol, trigo y papa. Colegio de Posgraduados, Centro de Fitopatología. Montecillo, Texcoco, México. Pp. 16-20.
- Hock J., Kranz J. y 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(2):129-135.
- Hock J., Kranz J., Renfro B.L. 1995. Studies on the epidemiology of the tar spot disease complex of maize in Mexico. *Plant Pathology* 44: 440-502.
- Höckerstedt L. 2014. Sienten *Phyllachora maydis* Maubl. ja *Monographella maydis* Müller & Samuels aiheuttaman asfalttilaikkutaudin esiintyvyyys maissilla (*Zea mays* L.) Nicaraguassa. master's thesis, University of Helsinki. Thesis of Master. Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Agricultural Sciences.
<http://urn.fi/URN:NBN:fi:hulib-201507212251>.
- Jaklitsch W.M., Voglmayr H. 2012. Phylogenetic relationships of five genera of Xylariales and *Rosasphaeria* gen. nov. (Hypocreales). *Fungal Diversity* 52: 75–98.

- Iwen P. C., Hinrichs S. H. and Rupp, M. E. 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 40, 87–109.
- Jiménez-Díaz M.R. 2000. Interacciones planta-hongo: mecanismos de infección, patogénesis y resistencia. En: Llacer G., Lopez M. M., Trapero A., Bello A. 2000. *Patología vegetal*. Sociedad española de Fitopatología. Ed. Mundi Pesa. Madrid. ISBN. 84-7114-900-1.
- Jonapá Montoya R.E. 2015. Identificación de genes de resistencia en maíz (*Zea mays* L.) al complejo de la mancha de asfalto. Informe técnico de residencia profesional. Universidad del Tecnológico. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 1-61 p.
- 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.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. 2016. Mega 7. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874
- Maublanc A. 1904. Espèces nouvelles de champignons inférieurs. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 20 :72 p.
- Mahuku G., San Vicente F. y Sherestha R. 2013. Complejo de la mancha de asfalto del maíz: hechos y acciones. Folleto Técnico. CIMMYT-MasAgro. 6 p. <http://conservación.cimmyt.org/folleto-técnicos> (consulta, agosto 2015).
- Mahuku G., Lockhart B.E., Wanjala B., Jones M.W., Kimunye J.N., Stewart L.R., Cassone B.J., Sevgan S., Nyasani J.O., Kusia E., Kumar P.L., Niblett C.L., Kiggundu A., Asea G., Pappu H.R., Wangai A., Prasanna B.M., and Redinbaugh M. G. 2015. Maize lethal necrosis (MLN), an emerging threat to maize-based food security in sub-Saharan Africa. *Phytopathology* 105:956-965.
- Mahuku G., Chen J., Shrestha R., Narro L.A., Osorio G.K.V., Arcos A.L. and Xu Y. 2016. Combined linkage and association mapping identifies a major QTL (*qRtsc8-1*), conferring tar spot complex resistance in maize. *Theor Appl Genet* (2016) 129:1217–1229. DOI 10.1007/s00122-016-2698-y.
- Malaguti G., y Subero L. J. 1972. La mancha de asfalto del maíz. *Agronomía Tropical* 22(4):443-445.
- Martínez S.J., Espinosa P.N. 2014. Sugerencias para el control del “complejo mancha de asfalto” del maíz en la fraileasca, Chiapas. Campo Experimental Centro de Chiapas, INIFAP. Folleto técnico para productores No. 13. Campo Experimental Centro de Chiapas. Mexico. 15 p.
- Monterroso S.D. 2012. Manual técnico para el manejo del complejo mancha de asfalto del maíz. Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC) e Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA). Guatemala, Guatemala. 28 p.
- Monterroso S.D. 2014. Manejo integrado de la mancha de asfalto del maíz: Manual para la capacitación de capacitadores. Facultad de Agronomía de la Universidad de San

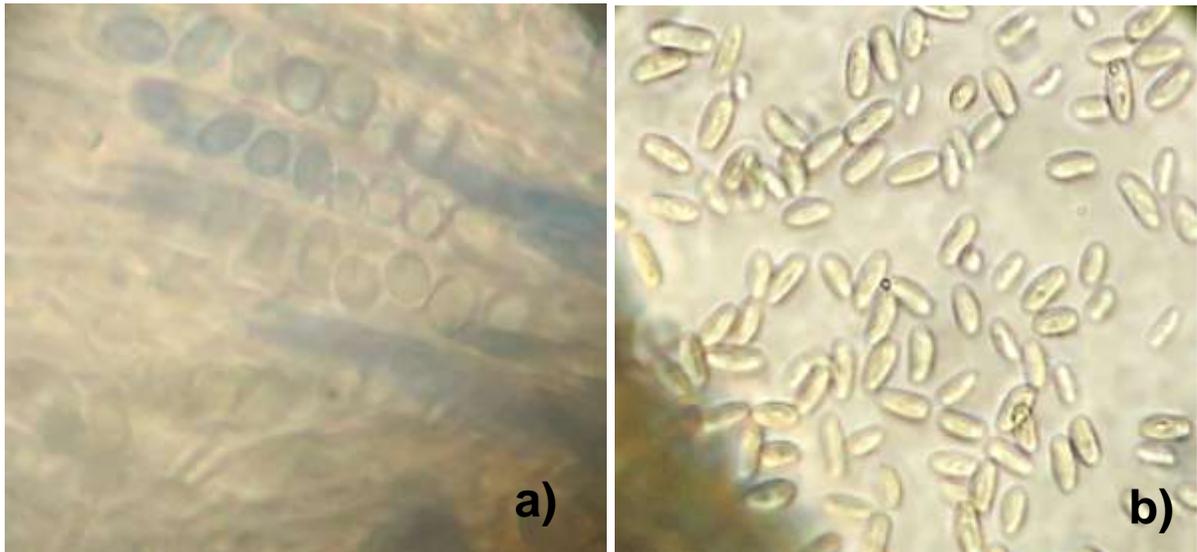
- Carlos de Guatemala (FAUSAC) y Consultoría Técnica Internacional S.A. (COTINSA). Guatemala, Guatemala. 24 p.
- Mukai H., Nakagawa T. 1996. Long and accurate PCR (LA PCR)]. *Nihon Rinsho*. Vol. 54(4). 917-922.
- Müller E. and Samuels G.J. 1984. *Monographella maydis* sp. nov. and its connection to the tar-spot disease of *Zea mays*. *Nova Hedwigia* 40:113-121.
- Nicks R. E., Ellins P. R., Parlevliet J. E. 1993. Resistance to parasites. In Hayward M. D, Bosermark N. O., Romagosa I. (Eds.). 1993. *Plant breeding: principles and prospects*. London, Chapman & Hall. P. 553.
- Niks R. E., Lindhout W. H. 2004. Curso sobre mejoramiento para resistencia durable a patógenos especializados. Tercera Edición. PREDUZA. Wageningen Agricultural University the Netherlands. P. 212.
- Nilsson R.H, Veldre V, Wang Z. 2011. A note on the incidence of reverse complementary fungal ITS sequences in the public sequence databases and a software tool for their detection and reorientation. *Mycoscience* 52(4): 278–282. Doi 10.1007/s10267-010-0086-z
- Larena I., Salazar O., Gonzalez V., Julian M.C., Rubio V. 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75: 187–194.
- Leiva-Mora M., Alvarado-Capó Y., Acosta-Suárez M., Cruz-Martín M., Sánchez-García C., Roque B. 2010. Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. *Biotecnología Vegetal* Vol. 10, No. 2: 79 – 88.
- Paliwal R. 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. 392 p.
<https://curlacavunah.files.wordpress.com/2010/04/el-maiz-en-los-tropicos.pdf>
- Parbery D.G. 1967. Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Nke in Fckl. V. A taxonomic monograph. *Australian Journal of Botany*. 15(2):271-375.
- Parkinson V.O, Sivanesan A, Booth C. 1981. The perfect state of the rice leaf-scald fungus and the taxonomy of both the perfect and imperfect states. *Transactions of the British Mycological Society* 76: 59–69.
- Pérez V., Pérez M., Jiménez M., Jama M. 2006. Ensayo en fragmentos de hojas de bananos y plátanos (*Musa* spp.) para el estudio a nivel monocíclico de la evolución de los síntomas de la Sigatoka Negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Fitosanidad* 10(1): 3-9.
- Pereyda-Hernández J., Hernández M.J., Sandoval 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: 511-519.
- Quiroga-Madrigal R.R. 1995. Enfermedades del maíz en algunas regiones tropicales de México, con énfasis en el Estado de Chiapas. Manual para técnicos, investigadores y

- estudiantes. Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. 116 pp.
- Quiroga- Madrigal R.R., Garrido-Ramírez E.R., Rosales-Esquinca M.A., Salazar-Pinacho W.M. 2017. Manejo integrado del complejo mancha de asfalto del maíz en México. Manual Técnico. Universidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 39 p.
- Renfro B. L. 1984. Breeding methods and genetic control of disease resistance in tropical maize. *Review of Tropical Plant Pathology* 1:225-244.
- Ríos-Herrera E.N., Partida-Martínez L.P., Ochoa-Fuentes Y.M., Cerna-Chávez E., Hernández-Castillo, F.D., Flores-Olivas A., Olalde-Portugal V. and Rodríguez-Guerra R. 2016. First report on the presence of *Phyllachora* sp. in corn crops at Toluca, Estado de Mexico. *American Journal of Plant Sciences*. 7:733-739. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2016.75067>.
- Robinson A. R. 1987. Host management in crop pathosystems. McMillan Publishing Company. New York. P. 280.
- Ruhl G., Romberg M.K., Bissonnette S., Plewa D., Creswell T. y Wise K.A. 2016. First Report of Tar Spot on Corn Caused by *Phyllachora maydis* in the United States. *The American Phytopathological Societ*. 100 (7):1496.
- Samuels G.J., Hallett I.C. 1983. *Microdochium stoveri* and *Monographella stoveri*, new combinations for *Fusarium stoveri* and *Micronectriella stoveri*. *Transactions of the British Mycological Society* 81: 473–483
- San Vicente F. y Mahuku G. 2011. Etiología, manejo de la mancha de asfalto en maíz. Estrategia de mejoramiento. Folleto técnico CIMMYT-Programa Global de Maíz, México. 29 p.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:6241–6246.
- 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>
- Sneath P.H.A., And Sokal R.R. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco.
- Tondopó-Marroquin C. N. 2017. Efecto de fechas de siembra y genotipos en el complejo mancha de asfalto (CMA) del maíz en Ocozocoautla, Chiapas, Mexico. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Chiapas. Villaflores, Chiapas. 32 p.
- Torres A. y Baca B. 1995. Reacción en cadena de la polimerasa. (On line). Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. (10 ago 2010). <http://www.elementos.buap.mx/num23/pdf/16.pdf>
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 30:2725–2729.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the Neighbor-Joining method. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:11030–11035.
- Urbina C.M. 2011. Fitopatología General, Evolución de las enfermedades. 1:1-29.

- Varvas K., Kasvandik S., Hansen K., Järving I., Morell I., Samel N. 2013. Structural and catalytic insights into the algal prostaglandin H synthase reveal atypical features of the first non-animal cyclooxygenase. *Biochim Biophys Acta* 1831: 863–871.
- Vanderplank J. E. 1984 *Disease resistance in plants*. Academic press. 2nda edition. Orlando, Florida. USA. <https://www.amazon.com/Disease-Resistance-Vanderplank-1984-06-28-Paperback/dp/B012YSFY0G>.
- Vanderplank J. E. 1963. *Plant diseases: epidemics and control*. Academic Press, New York and London. P. 349.
- Von Arx J.A. 1984. Notes on Monographella and Microdochium. *Transactions of the British Mycological Society* 83: 373–374.
- Wai K.M. 2004. A polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis procedure for analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in soil. Thesis of Master of Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, 30-32 p.
- White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press. San Diego, California, U.S.A. Chapter 38: 315-322 p. <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>

7. ANEXOS

Anexo 7.1 Fotografías de los hongos causales de la enfermedad mancha de asfalto



a) Ascas con 8 esporas de *Phyllachora maydis*, fotografía tomada con un microscopio compuesto con el objetivo 40X. b) Esporas de *Phyllachora maydis*.

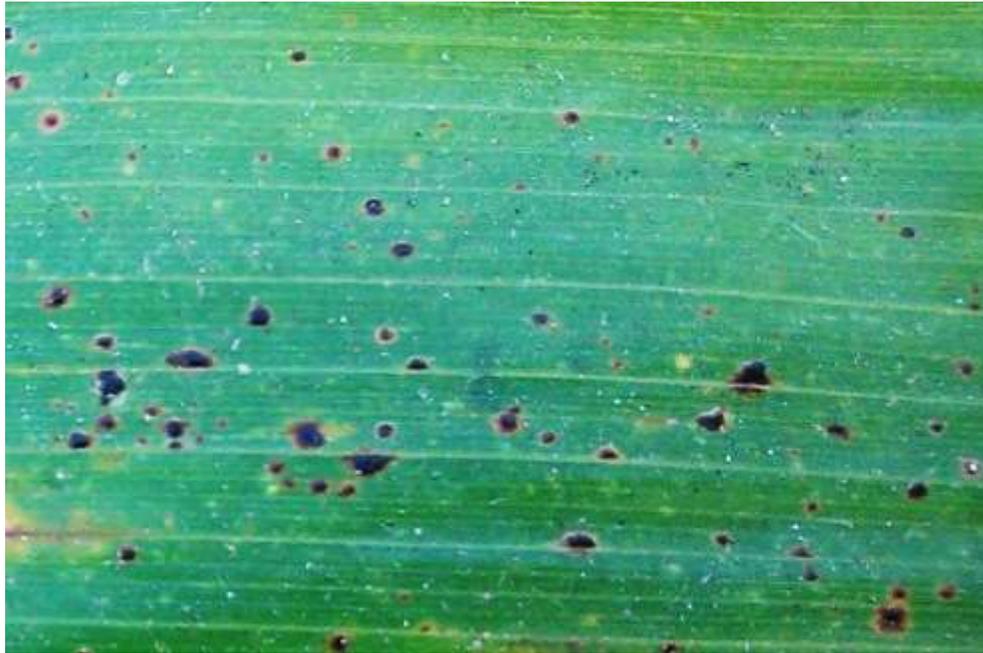


Colonia de *Microdochium* en medio (Papa -Dextrosa-Agar (PDA)).



Conidios de *Microdochium*, fotografía tomada con un microscopio compuesto al objetivo 40X.

Anexo 7.2 Fotografías de los signos y síntomas los hongos causales de la mancha de asfalto



Signos provocados por *Phyllachora maydis*, lesiones observadas en la hoja de maíz, muestra colectada en la comunidad Guadalupe Victoria, Municipio de Ocozocoautla, Chiapas.



Lesiones comunes conocidas como ojo de pescado causadas por *Monographella maydis* (anamorfo *Microdochium*) en la hoja de maíz, foto tomada en la comunidad Guadalupe, Victoria municipio de Ocozocoautla Chiapas.

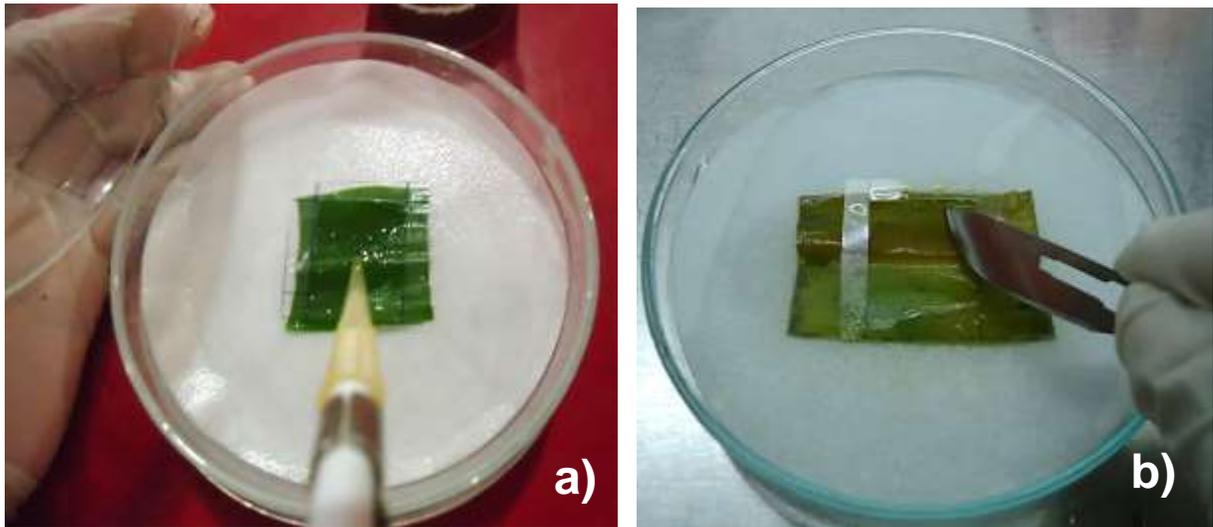


Secamiento en la hoja de maíz causados por *Monographella maydis* (anamorfo *Microdochium*), foto tomada de muestra colectada en el campo del INIFAP centro de Chiapas.

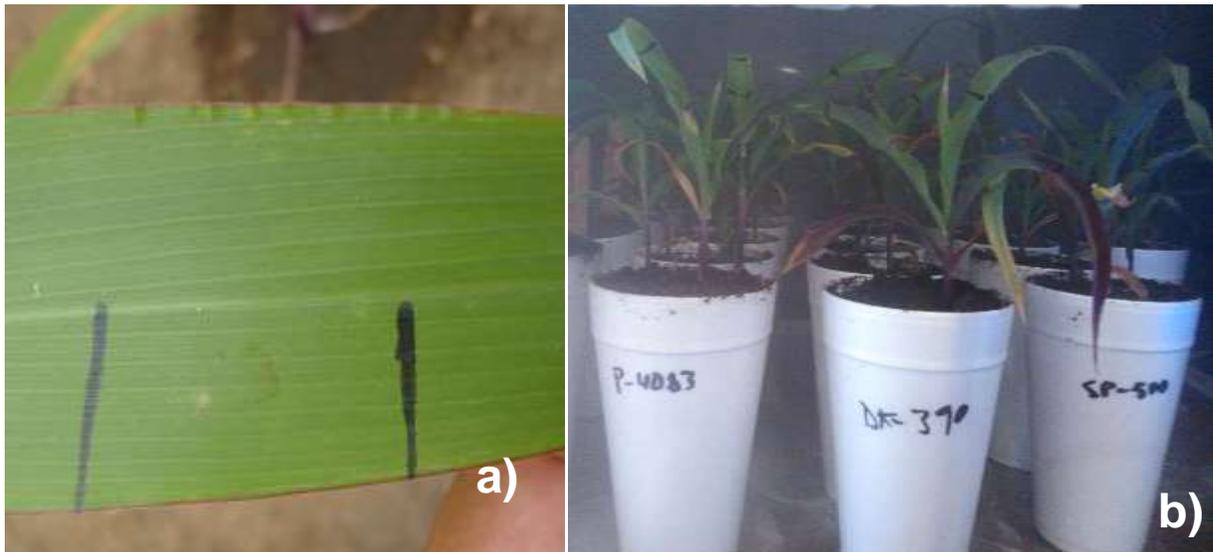


Cortes de lesiones causadas por *Phyllachora maydis* (a) y *Monographella maydis* (b) que se utilizaron para la preparación de la suspensión de ascosporas para inocular fragmentos de hojas y plantas sanas y jóvenes de maíz.

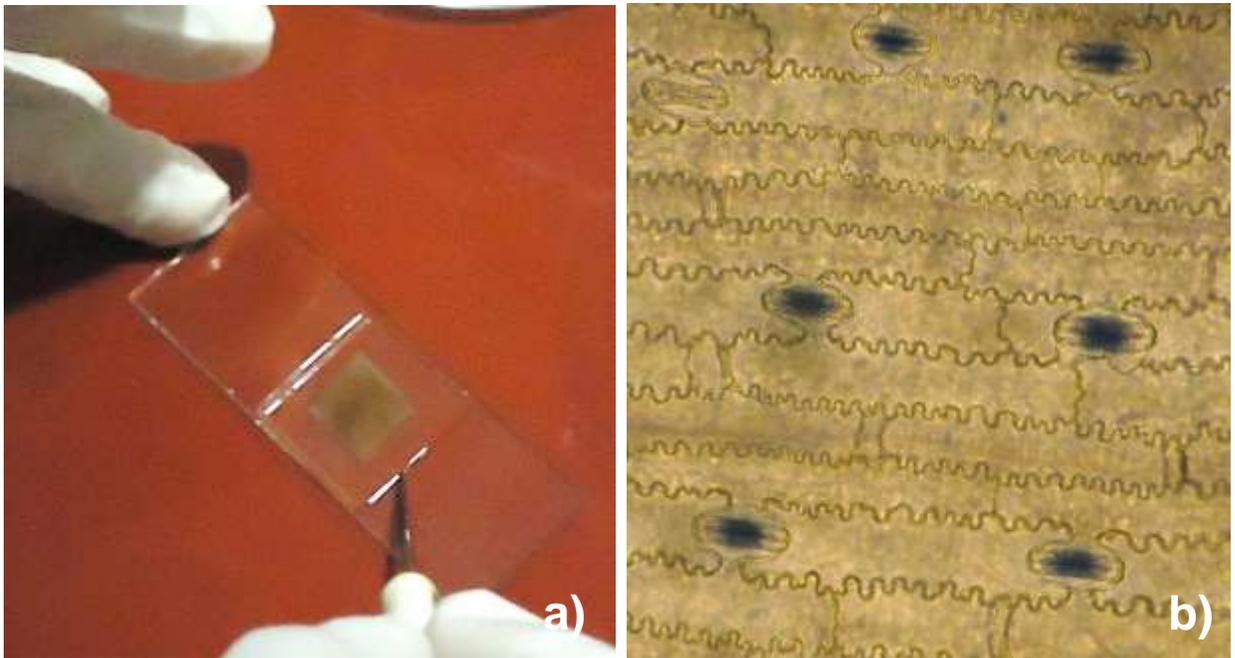
Anexo 7.3 Fotografías de los ensayos de inoculación *in vitro* en fragmentos de hojas de maíz.



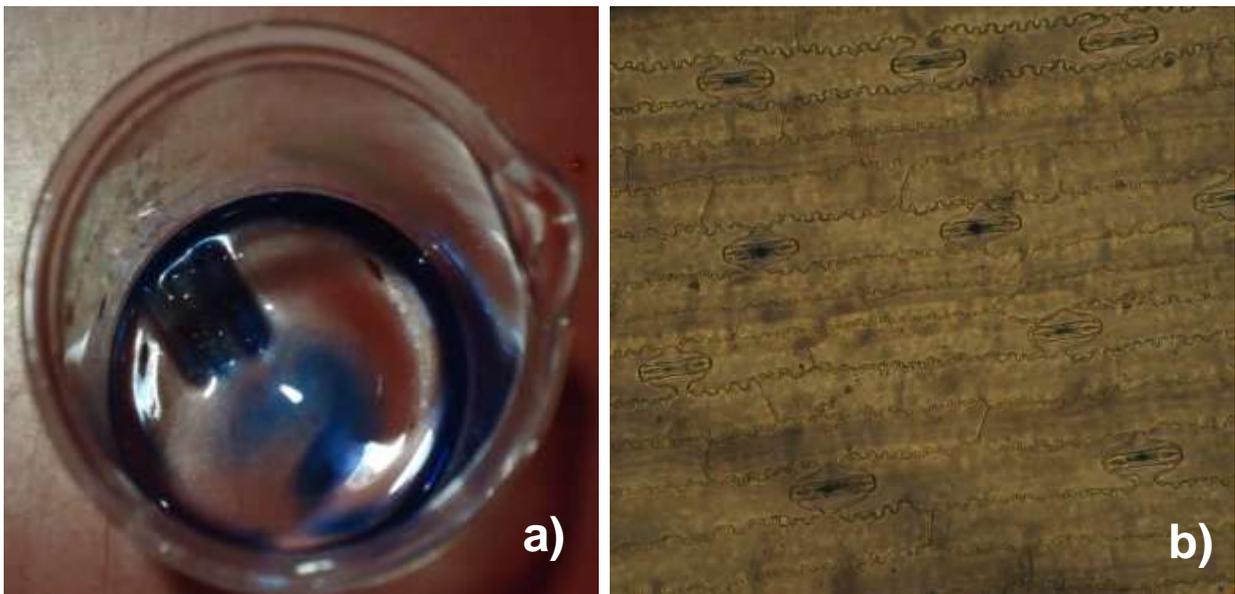
Fragmentos de hoja de maíz del genotipo SP500 inoculado con 50 μ L suspensión de esporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*. a) fragmento recién inoculado. b) Fragmento inoculado después de haber transcurrido 108 h de estar en cámara húmeda.



a) Cuadro marcado sobre la hoja inoculado por aspersion con 50 μ L de suspensión de ascosporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*. b) Plantas inoculadas y colocadas en cámara húmeda.



a) Fragmentos de hoja de maíz del genotipo SP500 en montaje permanente en polivinil alcohol. b) estomas infectados a las 180 h observados con un microscopio compuesto al objetivo 40X.



a) Muestra tomada después de 45 días de inoculación por aspersión con ascosporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, proceso de tñido con tripán azul al 0.2% el cual permitirá identificar el estoma infectado ya que se tñirá del color del colorante. b) estomas infectados del genotipo P4083W a los 45 días, observados con un microscopio compuesto al objetivo 40X.

Anexo 7.4 Análisis de varianza del primer ensayo de inoculación *in vitro* en fragmentos de hojas de maíz de los genotipos DK390, SP500 y P4083W.

Tabla 1A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 12 horas del primer ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	2	2.8476	1.4238	2.74	1.1427
Error	6	3.1167	0.5194		
Total correcto	8	5.9643			

$R^2=0.4774$ CV=10.94% Media= 6.58% estomas infectados.

Tabla 2A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 36 horas del primer ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	2	8.0726	4.0363	3.01	0.1246
Error	6	8.0542	1.3423		
Total correcto	8	16.1268			

$R^2=0.5005$ CV=15.46% Media= 7.49% estomas infectados.

Tabla 3A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 60 horas del primer ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	2	8.9448	4.4724	9.59	0.0135
Error	6	2.7967	0.4661		
Total correcto	8	11.7416			

$R^2=0.7618$ CV=8.50% Media= 8.03 % estomas infectados.

Tabla 4A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 84 horas del primer ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	2	12.3266	6.1633	8.30	0.0187
Error	6	4.4548	0.7424		
Total correcto	8	16.7814			

$R^2=0.7345$ CV=11.11% Media= 7.75% estomas infectados.

Tabla 5A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 108 horas del primer ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	2	1.4581	0.7290	1.74	0.2538
Error	6	2.5162	0.4193		
Total correcto	8	3.9743			

$R^2=0.368$ CV=7.09% Media= 9.12 % estomas infectados.

Tabla 6A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 132 horas del primer ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	2	0.5140	0.2570	1.86	0.2355
Error	6	0.8300	0.1383		
Total correcto	8	1.3440			

$R^2=0.3824$ CV=3.82% Media= 9.72 % estomas infectados.

Tabla 7A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 156 horas del primer ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	2	0.9101	0.4550	3.71	0.0894
Error	6	0.7361	0.1226		
Total correcto	8	1.6462			

$R^2=0.5528$ CV=3.67% Media= 9.52 % estomas infectados.

Tabla 8A. Análisis de varianza de estomas infectados a las 180 horas del primer ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	2	0.6772	0.3136	30.95	0.0007
Error	6	0.0608	0.0101		
Total correcto	8	0.6880			

$R^2=0.9116$ CV=1.02% Media= 9.8333 % estomas infectados.

Anexo 7.5 Análisis de varianza del segundo ensayo de inoculación *in vitro* en fragmentos de hojas de maíz de los genotipos DK390, SP500 y P4083W y los locales Chapingo Comiteco y Chapingo Tuxpeño.

Tabla 1B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 60 horas del segundo ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	4	5.2597	1.3149	0.73	0.5900
Error	10	17.9428	1.7942		
Total correcto	14	23.2025			

$R^2=0.2266$ CV=18.53% Media= 7.22 % estomas infectados.

Tabla 2B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 120 horas del segundo ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	4	4.7649	1.1912	1.58	0.2547
Error	10	7.5602	0.7560		
Total correcto	14	12.3251			

$R^2=0.3866$ CV=10.84% Media= 8.01 % estomas infectados.

Tabla 3B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 180 horas del segundo ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	4	0.8102	0.2025	0.34	0.8454
Error	10	5.9688	0.5968		
Total correcto	14	6.7790			

$R^2=0.1195$ CV=8.52% Media= 9.05 % estomas infectados.

Tabla 4B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 240 horas del segundo ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	4	0.5532	0.1383	0.29	0.8758
Error	10	4.7170	0.4717		
Total correcto	14	5.2702			

$R^2=0.1049$ CV=7.25% Media= 9.46 % estomas infectados.

Tabla 5B. Análisis de varianza de estomas infectados a las 300 horas del segundo ensayo de inoculación *in vitro*.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	4	1.3822	0.3455	5.56	0.0128
Error	10	0.6216	0.0621		
Total correcto	14	2.0038			

$R^2=0.6897$ CV=2.53% Media= 9.82 % estomas infectados.

Anexo 7.6 Análisis de varianza del ensayo de inoculación *in vivo* en plantas jóvenes y sanas de maíz de los genotipos DK390, SP500 y P4083W y el local Chapingo Tuxpeño.

Tabla 1C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 8 días del ensayo de inoculación con esporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* *in vivo* en planta sana joven de maíz.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	3	1.7407	0.5802	4.61	0.0372
Error	8	1.0063	0.1257		
Total correcto	11	2.7470			

$R^2=0.6336$ CV=4.23% Media= 8.37 % estomas infectados.

Tabla 2C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 15 días del ensayo de inoculación con esporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* *in vivo* en planta sana joven de maíz.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	3	0.4036	0.1345	3.32	0.0776
Error	8	0.3242	0.0405		
Total correcto	11	0.7278			

$R^2=0.5545$ CV=2.25% Media= 8.93 % estomas infectados.

Tabla 3C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 23 días del ensayo de inoculación con esporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* *in vivo* en planta sana joven de maíz.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	3	0.2100	0.0700	2.45	0.1386
Error	8	0.2288	0.0286		
Total correcto	11	0.4388			

$R^2=0.4785$ CV=1.84% Media= 9.15 % estomas infectados.

Tabla 4C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 31 días del ensayo de inoculación con esporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis in vivo* en planta sana joven de maíz.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	3	0.1595	0.0531	5.87	0.0203
Error	8	0.0725	0.0090		
Total correcto	11	0.2320			

$R^2=0.6874$ CV=1.00% Media= 9.45 % estomas infectados.

Tabla 5C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 38 días del ensayo de inoculación con esporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis in vivo* en planta sana joven de maíz.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	3	0.5301	0.1767	8.63	0.0069
Error	8	0.1638	0.0204		
Total correcto	11	0.1640			

$R^2=0.7638$ CV=1.48% Media= 9.62 % estomas infectados.

Tabla 6C. Análisis de varianza de estomas infectados a los 45 días del ensayo de inoculación con esporas de *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis in vivo* en planta sana joven de maíz.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F VALOR	Pr>F
Modelo	3	0.2628	0.0876	11.61	0.0028
Error	8	0.0604	0.0075		
Total correcto	11	0.3232			

$R^2=0.8131$ CV=0.88% Media= 9.82 % estomas infectados.

Anexo 7.7 Relación de muestras enviadas a secuenciar y secuencias resultantes de cada una de ellas.

Número de secuencia	Secuencia
<p>7</p> <p>CHIAPAS MA140701</p>	<p>GATGTAGCGGATCCCGACTTCGTCTCACTCTTGTGTATCTTACTGAC CCGTCTGCTGTGCGACTAGCAGACAGTTAAACTTTCAACAACGGAT CTCTTGGCTCTGGCATCTGTGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA GTGTGAATTGCAGAACTCTGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCGCCAGTATTCTGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATCTC AACCCCTCGCGCCTAGCGTTTGGTGTGATTGACTGCCATTAGTATTC TAGTGAAAATCATTGTGAGCGCACTTTGGCCCGAGCGTAGAACT ACACATTTTCGCTCGTGGGCCAAAGCTGCGCTCCTCCCAAACAGTGG AGGACTAGTCTCGCGCTGACCTCGGATCAGGCTCGATCACGCTCGG GACTTAACCGTATCCGACGGCCATAGAACGCTCCTTTCCCTTCGGGA TAGGGCAACTTTTTAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG CTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA</p>
<p>9</p> <p>CHIAPAS MA140901</p>	<p>CTGTAGCGGATCTTTATTTCTCTCCTCTTTGTATTTACTGGCCTCTC TGAGCACTAGCAGACAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATT GCAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATCTCAACCCTCG GGCCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCCGCCGAGCCCCCG AAAATCATTGGCGGGTGCACAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACA CCTCGCTCGCGGGCGCCGCGGTGCCGCCCTCTGCTAAAAGAGAAGAC CTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAACAATTGCGTCTGCGAGGGGAC GTGACCCGCGTCCACGAAGCAACATTACCGTCTTTGACCTCGGATCA GGTAGGGATACCCGCTGAACTTACGCATATCACTAAGCGGAGAAA</p>
<p>11</p> <p>CHIAPAS MA141101</p>	<p>CCCAGCGGATTCTAATTTCTTCTCCTCTTTGTATTTACTGGCCTCTCT GAGCACTAGCAGACAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTG CAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATCTCAACCCTCGG GCCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCCGCCGAGCCCCCGA AAATCATTGGCGGGCGCACAAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACAC CTCGCTCGCGGGCGCCGCGGTGCCGCCCGCCGTA AAAAGAGAAGAC CTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA</p>
<p>12</p> <p>CHIAPAS MA141201</p>	<p>CTCGTAGCGGGATTTAATTTCTTCTCCTCTTTGTATTTACTGGCCTCT CTGAGCACTAGCAGACAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGC TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAAT TGCAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCG CCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATCTCAACCCTCG GGCCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCCGCCGAGCCCCCG AAAATCATTGGCGGGCGCACAAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACA CCTCGCTCGCGGGCGCCGCGGTGCCGCCCGCCGTA AAAAGAGAAGA CCTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACT TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA</p>

Número de secuencia	Secuencia
<p>13</p> <p>CHIAPAS MA141301</p>	<p>CTATAGCGGTTATTATTCTTTCTCCTCTTTGTATTTACTGGCCTCTCTG AGCACTAGCAGACAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCT GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTG CAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATCTCAACCCTCGG GCCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCGCGCAGCCCCCGA AAATCATTGGCGGGCGCACAAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACAC CTCGCTCGTGGCGCCGCGGTGCCGCCCGCCGTAAGAGAGAAGAC CTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>14</p> <p>CHIAPAS MA141401</p>	<p>TTGTAGGCGTGTCTTATGCTTCTCCTCTTTGTATTTACTGGCCTCTCT GAGCACTAGCAGACAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTG CAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATCTCAACCCTCGG GCCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCGCGCAGCCCCCGA AAATCATTGGCGGGCGCACAAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACAC CTCGCTCGTGGCGCCGCGGTGCCGCCCGCCGTAAGAGAGAAGAC CTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>15</p> <p>CHIAPAS MA141501</p>	<p>TGGTAGCGGGTTTTATTTCTTCTCCTCTTTGTATTTACTGGCCTCTCT GAGCACTAGCAGACAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTG CAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATCTCAACCCTCGG GCCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCGCGCAGCCCCCGA AAATCATTGGCGGGCGCACAAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACAC CTCGCTCGTGGCGCCGCGGTGCCGCCCGCCGTAAGAGAGAAGAC CTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>19</p> <p>CHIAPAS MA141901</p>	<p>TGGTAGCGGATTCTTATTTGCTCCAATCTGTGAACCTTACCACTGTTG CCTCGGTGGTTGGTGCCTTAGCTTGTGCCGCCGGTGTCTGACT AAACTCTTTGTCAACTTTGTCAAATCTGAATCTAAACTAAGAAATAAGT TAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTCTTGGCATCGATGAAGAACG CAGCTAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGC CTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTGGGAG ACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAACAGTGCGGAGTCTCTC GTGCTCTGAGCGTAGTAATTTCTATCTCGCTTGTGTGAACACGGTGG TCGACGGCCATAAACCGCTCCTTTCCCTTCGGGATAGGGCAACTTTT TAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA TATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>21</p> <p>CHIAPAS MA142101</p>	<p>CCTAGCGGATCTTATTCTTCTCACTCTTTATATTTACTGGCCTCTCTG AGCACTAGCAGACAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCT GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTG CAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATCTCAACCCTCGG GCCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCGCGCAGCCCCCGA AAATCATTGGCGGGCGCACAAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACAC CTCGCTCGCGGGCGCCGCGGTGCCGCCCGCCGTAAGAGAGAAGAC CTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACTT AAGCATATCAATAAGCGGAGGAA</p>

Número de secuencia	Secuencia
22 CHIAPAS MA142201	CTGGTAGCGGGTTTTACTTCGTCTCCTCTTTGTATTTACTGGCCTCTC TGAGCACTAGCAGACAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATT GCAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCG CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTCAACCCTCG GGCCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCGCCGCAGCCCCCG AAAATCATTGGCGGGCGCACAAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACA CCTCGCTCGCGGGCGCCGCGGTGCCGCCCGCCGTAAAAGAGAAGA CCTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACT TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
23 CHIAPAS MA142301	TTCGGTAGCGGGTATTATTCTTCTCCTCTTTGTATTTACATGGCCTCT CTGAGCACTAGCAGACAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGC TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATT TGCAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCG CCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTCAACCCTCG GGCCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCGCCGCAGCCCCCG AAAATCATTGGCGGGCGCACAAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACA CCTCGCTCGCGGGCGCCGCGGTGCCGCCCGCCGTAAAAGAGAAGA CCTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACT TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
24 CHIAPAS MA142401	ACTGTAAGCGGATCTTATTCTTCTCCTCTTTGTATTTACTGGCCTCTC TGAGCACTAGCAGACAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATT GCAGAACTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCG CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTCAACCCTCG GGCCGAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCGCCGCAGCCCCCG AAAATCATTGGCGGGCGCACAAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACA CCTCGCTCGCGGGCGCCGCGGTGCCGCCCGCCGTAAAAGAGAAGA CCTAGTACCACGTTGACCTCGGATCAGGCAGGAATACCCGCTGAACT TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
37 GUATEMALA MA143701	GTCGTAGCGGATCTTATTCTATTCTACCCGAGGAAAG
39 GUATEMALA MA143901	GATCGTAGCGGATTCTAATATTGTGTCGTTGCCGGAAGAA
40 GUATEMALA MA140702	GATCAGTAGCGGGTCTTATTTTGTTCGTTCCGGGGAGAACG
47 CHIAPAS MA140802	TTAGTAGCGGGAGTATTATTCTTCTCATCTGTGAACCTTACCACTGTTG CCTCGGTGTTGGTGCCCTAGGGCGCTGCCGCCGGTGAGACAAA CTAAACTCTTTGTCAACTTTGTCAAATCTGAATCTAAACTAAGAAATAA GTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCAT GCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTGGG AGACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAACCAGTGCCGGAGTCCTC TCGTGCTCTGAGCGTAGTAATTTCTATCTCGCTTGTGTGAACACGGT GGTCGACGGCCATAAACCGCTCCTTTCCCTTCGGGATAGGGCAACTT TTAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAGCGGAGGAA

Número de secuencia	Secuencia
<p>49</p> <p>CHIAPAS MA140902</p>	<p>TTCGGTAGCGGAGACGGTGCTCTTCTGTGAACTTACCACTGTTGC CTCGGTGGTTGGTGCCCCTAGGGCGCTGGGCAAGAGATGGACAAAC TAAACTCTTTGTCAACTTTGTCAAATCTGAATCTAAACTAAGAAATAAG TTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC GTCGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCAT GCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTGGG AGACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAACCAGTGGCGGAGTCCTC TCGTGCTCTGAGCGTAGTAATTTCTATCTCGCTTGTGTGAACACGGT GGTCGACGGCCATAAACCGCTCCTTTCCCTTCGGGATAGGGCAACTT TTAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>50</p> <p>CHIAPAS MA141002</p>	<p>GATCGTAGCGGATATTACATTATTCTCGCCCGATAC</p>
<p>51</p> <p>CHIAPAS MA141102</p>	<p>AAAAAAAAATGATTACCCCGGAAAAAACTCCTTTCCATCTCACTTCTA ATTTAAAAAAGTGAAAAAAAGGGTCTTAGTCAGAACATAAGCTTT GTAAAAAGGGTTTTTTAATTTTTTTTTCTTTTG</p>
<p>52</p> <p>CHIAPAS MA141202</p>	<p>CTCGTAGCGGATCTAATGCTTCGTATCTGTGAACTTACCACTGTTG CCTCGGTGGTTGGTGCCCCTAGGGCGCTGCCGCCGGTGGACAAACT AAACTCTTTGTCAACTTTGTCAAATCTGAATCTAAACTAAGAAATAAGT TAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCAT GCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTGGG AGACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAACCAGTGGCGGAGTCCTC TCGTGCTCTGAGCGTAGTAATTTCTATCTCGCTTGTGTGAACACGGT GGTCGACGGCCATAAACCGCTCCTTTCCCTTCGGGATAGGGCAACTT TTAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>53</p> <p>CHIAPAS MA141302</p>	<p>GTTGGTAGCGGGTCTTATTTTTGTCTCGGGGCCTCAGGGCAACCG GGTGGCTTCGCGCCGATTCTGCACCCTTTTTTTACGAGCACCTT CGTTCTCCTTCGGAAGGGCAACCTGAAGCTGGAATTATAAACCTT TTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAACAATCGTTACAACTT TCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT TGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGAGCATGCCTGTTCCG AGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTGATGTTGGGCGTGTGCC CGCCTCTGCGCGGACTCGCCCAAATTCATTGGCAGCGTCTTT GCCTCCTCTCGCGCAGCACAAATTGCGTCTGCGAGAGGGCTTGACCC GCGTCCACGAAGCAACATTACAGTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGG ATACCCGCTGAACTTAACCATATCAATAAGCGGAAGAA</p>

Número de secuencia	Secuencia
<p>55</p> <p>CHIAPAS MA141402</p>	<p>CTCGTACGTATATTATTCTTGTGCGTCCGGACTCCGGGCAAGCGGGT GGTTCGCGCCGGATTCCCTGCACCCTTTTTTTTACGAGCACCTTCGTT CTCCTTCGGAAGGGCAACCTGCCGCTGGAACCTATAAAACCTTTTTTT GCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAACAATCGTTACAACCTTCAA CAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC GATAAGGAGTGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCAAATTGCGCCTCTTGGTATTCGATGGGGCATGCCTGTTTCGAGC GTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCATGGTGTGGGGCTGTGCCCGC CTCTGCGCGCGGAATCGCCCAAATTCATTGGTAGCGGTCTTTGCCT CCTCTCGCGCAGCACAATTGTGTCTGCGAGAGGGCGTGACCCGTGT ACGCGAAGCATCATTACAGTCTTTGACCTCGGATGAGTTAGGGATAC CCGCTGAACTTAGGCATATCACTAAGCGGAGGAA</p>
<p>57</p> <p>CHIAPAS MA141502</p>	<p>ACGTAGCGTTTTATGCATACTCGCTCAACATGTGAACTTACCCTGTT GCCTCGGTGGTTGGTGCCCCTAGGGCGCTGCCGCCGGTGGACAAA CTAAACTCTTTGTCAACTTTGTCAAATCTGAATCTAAACTAAGAAATAA GTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCAT GCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGG AGACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAACCAGTGGCGGAGTCCTC TCGTGCTCTGAGCGTAGTAATTTCTATCTCGCTTGTGTGAACACGGT GGTCGACGGCCATAAACCGCTCCTTTCCCTTCGGGATAGGGCAACTT TTAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAGCGGAGGAA</p>
<p>59</p> <p>CHIAPAS MA141902</p>	<p>CTCGTAGCGGAGTATTATTCTTCTCACATGTGAACTTACCCTGTTGC CTCGGTGGTTGGTGCCCCTAGGGCGCTGCCGCCGGTGGACAAACTA AACTCTTTGTCAACTTTGTCAAATCTGAATCTAAACTAAGAAATAAGTT AAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATG CCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTTGGGA GACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAACCAGTGGCGGAGTCCTCT CGTGCTCTGAGCGTAGTAATTTCTATCTCGCTTGTGTGAACACGGTG GTCGACGGCCATAAACCGCTCCTTTCCCTTCGGGATAGGGCAACTTT TTAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGC ATATCAATAAGCGGAGGA</p>
<p>60</p> <p>CHIAPAS MA142002</p>	<p>GGATTCTAGTAAGCGGTTGTCGACTCTCTCTACATGGAGGAACTTTA CCTACTGTTGCCTTCGGGTGGTTGGTGCCCCTAGGGGCGAGGGAGA GGGAGAGGGGAACTAAACTCTTTGTCAACTTTGTCCACCAAAAAA AGAAAATAAGAAATAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT CTGGCATCGATGAAGATTTTCTCCCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT TGCAAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCAT TAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAA GCCTAGCTTAGTGTTGGGAGACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAAA CCAGTGGCGGAGTCCTCTCGTGCTCTGAGCGTAGTAATTTCTATCTC GCTTGAGTGAACACGGTTTTTTTTTTGGCCATAAACCGCTCCTTTCCCT TCGGGATAGGGCAACTTTTTAATGGTTGACCTCGGATCAAGGTAGGA ATACCCGCTGAACTTAAGCGTATGAATAAGCGGAGAAATT</p>

Número de secuencia	Secuencia
62 CHIAPAS MA142102	GATCGTAGCGGAGTAGGTTCTCTCGCCTGTGAACTTACCACTGTTGCCTCGG TGTTGGTGCCCCTAGGGCGCTGGGAAGGGGGACAACTAACTCTTTGTC AACTTTGTCAAATCTGAATCTAACTAAGAAATAAGTTAAAACCTTTCAACAACG GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCA TTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTA GCTTAGTGTGGGAGACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAACCAGTGGCG GAGTCTCTCGTGCTCTGAGCGTAGTAATTTCTATCTCGCTTGTGTGAACACG GTGGTCGACGGCCATAAACCGCTCCTTTCCCTTCGGGATAGGGCAACTTTTT AATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT AAGCGGAGGAA
73 GUATEMALA MA143702	AAATATAGTTGTAGCCCGCGCATCCTAATTGGAAG
74 GUATEMALA MA143802	GATCGTAGCGGATGTCGACGCGCTTAGGGAGTATG
75 GUATEMALA MA143902	GATCGTAGCGTATATTATGACTTCTTAGCGCGGGATACCC
77 CHIAPAS MA170103	GATCGGTAAGCGGATGTGCGATACTTCCCTGATGAACATACCTATACGTTGC CTCGGCGGAATCAGCCCAGCCACGTAAGGGGAAAAGAGAAGGGGCCCG AGGACCCCTAACTCTGTTTTTTCGGAATTAATGAGTAAACAACAATA AATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGTTTTACCGC AGAAGAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCACAATTCAGTGAATCATCGAATCT TTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGC GTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCG TTCCCAAATCGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCATA CACCTCGTACTGGTAATCGTTTTTGTTCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGA ATGTTGACCTCGGATCAGGTTTTGATTTATCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT AAGCGGAGGAAAA
78 CHIAPAS MA170203	GATACTAGCGTAGTCGGTTCGCTCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGG CGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAGGGACGGAGGCGCCCGAGGACCCCTA AACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAACAACAATAAATCAAACTTT CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGA TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT TGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCC TCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCAAAATCGA TTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTG GTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGG ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA GAATAGTAGCGTAGCTGATTCCTCTTGTGGAACATACT
79 CHIAPAS MA170303	GAATAGTAGCGTAGCTGATTCCTCTTGTGGAACATACT
80 CHIAPAS MA170403	AATCGTAGCGGGGGTGACGCGATCTCTGATGCAC

Anexo 7.8 Secuencias registradas en el Genbank utilizadas como testigos en el análisis filogenético de las secuencias obtenidas de las muestras con mancha de asfalto.

Nombre y clave	Secuencia
KU184459.1 <i>Phyllachora maydis</i> (Ruhl <i>et al.</i> , 2016)	CAGCGGAGGGATCATTACAGAAGGCACCTCTTCTACACTCTTTGTATTTACTGGCCTCTC TGAGCACTAGCAGACAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATG AAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAACTCAGTGAATCATCGAAT CTTTGAACGCACATTGCGCCCGCTAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCACTC TCAACCCTCGGGCTAGCGCCTGGTGTGGGGGACTGCGGCCGCCGAGCCCCCGAA AATCATTGGCGGGCGCACAACGGCCCCGAGCGTAGTAGCACACACCTCGCTCGCGGC GCCGCGGTGCCGCCCGCCGTAAGAGAGAAGACCTAGTACCACGTTGACCTCGGATCA GGCAGGAA
EF540754.1 <i>Coniothyrium fuckelii</i> (Ciardo, <i>et al.</i> , 2007)	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGATCATTATCCATCTCAAACCAGGTGCGGTGCGGGCC CCCGGGGGCTTGTCTCCCGGGTGGTAGGGGTAACACCTGCACGCGCCGCTGCCTGTA CCCTCTTTTACGAGCACCTTTCTGTTCTCCTTCGGCGGGGCAACCTGCCGCTGGAACCA AAACAAAACCTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAACAATCGTTACAACCTT CAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAG TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTA TTCCATGGGGCATGCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCGTTGGTGTGG GCGTCTGTCCCGCTCTGCGCGCGGACTCGCCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCTTTGC CTCCTCTCGCGCAGCACAAATTGCGTCTGCGGGGGGGCGTGGCCCGCTCCACGAAGC AACATTACCGTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA ATAAGCGGAGGA
KP859022.1 <i>Microdochium seminicola</i> (Hernandez-Restrepo, 2016)	CATTACTGAGTTTTCAACTCGTGAACCTACCCTGTTGCCCTCGGTGGTTGGTGCCCTCAC GGGCGCTGCCGCCGGCGGACAAACTAAACTCTTGTCAACTTTGTCAAATCTGAATCTAA ACTAAGAAATAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA ACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACC CTTAAGCCTAGCTTAGCGTTGGGAGACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAACCAGTGG CGGAGTCTCTGTGCTCTGAGCGTAGTAATCTTTATCTCGCTTGTATGAACGCAGTGGT CGACGGCCATAAACCGCACCTCTCCTTCGGGTGAGGGCACCTTTTTAATGGTTGACCTC GGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
HQ115651 <i>Coniothyrium sp.</i> (Gorfer <i>et al.</i> , 2011)	AAGTCGTAACAAGGTTTTCCGTAGGTGACCTGCGGAAGGTCATATCCATCTCAACCAGGA GTGGTGGCGGCCAGGCATTGCGTCTCGGTTACGCCCGCTTTTCTGCATCCTTTTTTTT ACGAGCACCTTTCTGTTCTCCTTCGGCGGGGCAACCTGCCGCTGGAACCTTAACAAAACCT TTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAACAATCGTTACAACCTTTCAACAATGGA TCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGC AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGG GCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGTTGGTGTGGGCGCTGTGC CCGCCTCTGCGCGCGGACTCGCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCTTTGCCCTCCTCTCG CGCAGCACAAATTGCGTCTGCGAGGGGGCGTGGCCCGCTCCACGAAGCAACATTACC GTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA GAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA ATTTGAAATCTGGCTCCCCTTGGGGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTTGGCA TTGACGGCGGTCTAAGTTCTTGAACAGGACATCACAGAGGGTGAAGATCCCGTACG TGGTGCCTGTCTTGCATGTAAGTCTCCTTCGACGAGTGCAGTTGTTTGGGAATGCA GCTCTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGC ACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGTACTTTGAAAGAGAGTCAAAAAGCACGTGA AATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTTGCCTGCAGTTGCTCACCTAGGCTTT CGCCTGGGGCACTCTTCTGCGGGCAGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTTGGATAAAGGC CTCTGTACGTATCTCCTTCGGGGTACCTTATAGGGGAGGCGCAATGCAACCAGCC CGGACTGAGGTCCGCGCATCTGCTAGGATGCTGGCGTAATG
JN688923.1 <i>Monographella sp.</i> (Kasekamp, 2011)	TGTGAACCTACCCTGTTGCTCGGTTGGTGGCTCACGGGCGCTGCCGCCGGCG GACAAAATAAACTTTGTCAACTTTGTCAAATCTGAATCTAAACTAAGAAATAAGTTAAAA CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCAT AGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGCG TTGGGAGACTGCGCTAAACCGCAGCTCCTCAAACCAGTGGCGGAGTCTCTGTGCTC TGAGCGTAGTAATCTTTATCTCGCTTGTATGAACGCAGTGGTGCAGGGCCATAAACCGC ACCTCTCCTTCGGGTGAGGGCACCTTTTTAATGGTTGACCTCGGATCAGG