



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**INOCULACIÓN, VIRULENCIA Y PRODUCCIÓN DE
TOXINAS POR *Monographella maydis* (Müller &
Samuels) EN ZONAS TROPICALES DE MÉXICO**

TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:
JAVIER FLORES FUENTES



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2018

INOCULACIÓN, VIRULENCIA Y PRODUCCIÓN DE TOXINAS POR
Monographella maydis (Müller & Samuels) EN ZONAS TROPICALES DE
MÉXICO

Tesis realizada por **JAVIER FLORES FUENTES** bajo la supervisión del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de

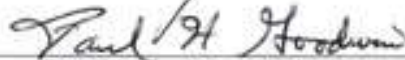
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

ASESOR:



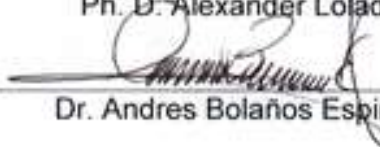
Ph. D. Paul Goodwin

ASESOR:



Ph. D. Alexander Loladze

ASESOR



Dr. Andres Bolaños Espinoza

CHAPINGO, EDO. DE MÉXICO, JUNIO DE 2018

CONTENIDO GENERAL

DATOS BIOGRÁFICOS.....	vii
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
1.1 OBJETIVOS.....	4
1.1.1 Objetivo General:.....	4
1.1.2 Objetivos Específicos:	4
1.2 HIPOTESIS.....	4
2. Capítulo II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 EL cultivo de Maíz	5
2.1.1 Importancia del Maíz en México	5
2.1.2 Botánica del Maíz	5
2.2 Enfermedades del Maíz	6
2.2.1. Pérdidas causadas por hongos en el cultivo del maíz	6
2.3 Complejo macha de asfalto	6
2.3.1 Síntomas	7
2.3.2. Ecología	7
2.3.2. Distribución.....	8
2.4 Incidencia y severidad de enfermedades	8
2.5 Literatura Citada	9
3. Capítulo III. INOCULACIÓN, VIRULENCIA Y PRODUCCIÓN DE TOXINAS POR <i>Monographella maydis</i> (Müller & Samuels) EN ZONAS TROPICALES DE MÉXICO	12
3.1 Resumen	12
3.2 Abstrac	12
3.3 Introducción	13
3.4. Materiales y Métodos.....	14
3.4.1. Localización del ensayo	14
3.4.2 Obtención e identificación de las cepas	14
3.4.3. Cultivos Monospóricos	16
3.4.3. Obtención de Cepa de <i>Monographella maydis</i>	17
3.4.4. Evaluación de Severidad de Toxina	18
3.4.5 Evaluación de Virulencia a partir de Esporas	21
3.5. Resultados y Discusiones.....	22
3.5.1 Identificación de la especie <i>Monographella maydis</i>	22
3.5.2 Obtención de cepas.....	23
3.5.3 Severidad de Toxina.....	24
3.5.3 Virulencia de Esporas.....	26
3.6. Conclusiones	30
3.7. Literatura citada.....	30

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. MUESTRAS DE CEPAS EN EL SUR DEL MÉXICO.....	15
CUADRO 2. TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN EL ENSAYO.....	19
CUADRO 3 ESCALA VISUAL PARA EVALUACIÓN DE SEVERIDAD DE <i>M. MAYDIS</i> EN HOJA DE MAÍZ.....	20
CUADRO 4. PESO EN GRAMOS DEL MICELIO DE <i>MONOGRAPHELLA MAYDIS</i>	24
CUADRO 5. CUANTIFICACIÓN DE ESPORAS DE <i>MONOGRAPHELLA MAYDIS</i> EN 1 mL. ...	24
CUADRO 6. MEDIAS DE VIRULENCIA DEL HONGO Y SEVERIDAD DE TOXINA DE CEPAS DE <i>MONOGRAPHELLA MAYDIS</i>	28

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 AISLAMIENTO DE <i>MONOGRAPHELLA MAYDIS</i> . A) DAÑO CARACTERÍSTICO DEL COMPLEJO DE MANCHA DE ASFALTO EN MAÍZ. B) FRAGMENTADO DE HOJA COMO INOCULO. C) MEDIO DE CULTIVOS.....	16
FIGURA 2. ESTABLECIMIENTO DEL ENSAYO EN CONDICIONES CONTROLADAS	18
FIGURA 3. ESCALA VISUAL DE SEVERIDAD DEL PATÓGENO (<i>M. MAYDIS</i>).	21
FIGURA 4. ESCALA VISUAL DE SEVERIDAD DEL PATÓGENO (<i>M. MAYDIS</i>).	22
FIGURA 5 CONIDIOS DE <i>MONOGRAPHELLA MAYDIS</i>	22
FIGURA 6. DIFERENTES CRECIMIENTOS MICELIALES EN <i>MONOGRAPHELLA MAYDIS</i>	23
FIGURA 7. HALOS AMARILIENTOS EN HOJAS, SÍNTOMA CARACTERÍSTICO DE <i>MONOGRAPHELLA MAYDIS</i>	25
FIGURA 8. REAISLAMIENTO DEL PATÓGENO A PARTIR DE TEJIDO INFECTADO.....	25
FIGURA 9. SEVERIDAD DE TOXINA DE CEPAS EN MEDIO DE CULTIVO NATURAL DE HOJA DE MAÍZ.....	26
FIGURA 10. SEVERIDAD DE TOXINA DE CEPAS EN MEDIO DE CULTIVO NATURAL DE HOJA DE MAÍZ.....	27
FIGURA 11. MUESTRA DEL DAÑO DE LAS CEPAS MÁS AGRESIVAS EN PLANTAS DE MAÍZ	27
FIGURA 12. MUESTRA DEL DAÑO DE LAS CEPAS MENOS AGRESIVAS EN PLANTAS DE MAÍZ	28
FIGURA 13. REGRESIÓN POLINÓMICA PARA SEVERIDAD DE TOXINA VERSUS VIRULENCIA SIN EL PUNTO CONTROL	29

DEDICATORIA

A mi esposa Karla Yareli Aguilar Villalba y mi hijo Ivan Alejandro Flores Aguilar, por ser el motor de mi vida brindándome su amor y cariño. Por aguantar tanto sacrificio y desvelos que les hice pasar en verdad muchas gracias los amo.

A mis padres Judith Fuentes Márquez y Javier Flores Heredia por darme la vida e inculcarme los valores esenciales e importantes para ser una persona correcta en mi vida.

A mi tío L.A.L.F y su compañera de vida A.I.B.G por brindarme su apoyo, que fueron parte fundamental en este proyecto que emprendí aventurando pero sin miedo. Por aconsejarme y animarme, por abrirme las puertas de su casa, les agradezco de todo corazón.

A mis hermanos Fernando Flores Fuentes y Liliana Flores Fuentes ya saben que los quiero mucho, aunque el amor que nos demostramos es diferente e único, siempre estaremos unidos y contarán conmigo para lo que necesiten por siempre.

A mis tíos Norma Alicia Fuentes Márquez y Juan Carlos Benítez, por proyectarme esa admiración de ardo trabajo que hacen ayudando a los demás sin recibir nada a cambio, muchas gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** y al **Departamento de Parasitología Agrícola**, por abrirme sus puertas y así poder seguir creciendo profesionalmente.

Al **Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo** CYMMIT, por ayudarme a realizar este proyecto de investigación.

Al **Dr. Sandro Loladze**, por su infinita ayuda en brindarme todo lo necesario en realizar este proyecto y lo más importante por sus consejos que me dio a lo largo de estos dos años.

Al **Dr. Santos Gerardo Leyva Mir**, por su amabilidad de ayudarme en todo lo que necesitara, por sus consejos que me sirvieron a lo largo de este proyecto.

Al **Dr. Paul H. Goodwin**, por sus grandes ideas para la elaboración de este proyecto, por demostrarme su gran dedicación a la ciencia y por todo el apoyo que me brindo.

Al **Dr. Andrés Bolaños Espinoza**, por aconsejarme e apoyarme, muchas gracias Dr.

A **Carlos Muñoz**, por brindarme su mano en todo lo que necesite en mi estancia en CIMMYT, por tus grandes consejos, gracias Carlos.

A **M. C. Ana Castillo**, por transmitirme todo sus conocimientos que me fueron de gran ayuda en mi estancia en CIMMYT, muchas gracias.

A mis compañeros Aldo, Ivan, Ramiro, Paola, Cristian, Imelda, por aventurar conmigo este proyecto de vida en verdad los aprecio mucho, muchas gracias por todo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Javier Flores Fuentes
Fecha de Nacimiento	23 de septiembre de 1991
Lugar de Nacimiento	Guamúchil, Sinaloa
No. Cartilla Militar	D-1651021
CURP	FOFJ910923HSLLNV07
Profesión	Ingeniería Agronómica con Acentuación en Protección Vegetal
Cédula profesional:	9241742

Desarrollo académico

Bachillerato	Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios No.45
Licenciatura	Universidad Autónoma de Sinaloa Facultad de Agronomía

RESUMEN GENERAL

INOCULACIÓN, VIRULENCIA Y PRODUCCIÓN DE TOXINAS POR *Monographella maydis* (Müller & Samuels) EN ZONAS TROPICALES DE MÉXICO

El maíz (*Zea mays* L.), es una de las especies alimenticias más cultivadas y productivas, su importancia económica mundial radica en su uso como alimento humano, alimento para ganado e insumo para la producción industrial, sin embargo se ve afectada por una amplia variedad de patógenos. El complejo de la mancha de asfalto del maíz, inducido por los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, es una enfermedad de importancia económica en México, debido a que provoca severas pérdidas en el rendimiento y deterioro en la calidad del forraje. Dada su importancia se requieren métodos estandarizados de cuantificación de los daños ocasionados por la enfermedad. Por lo que el objetivo de la presente investigación fue desarrollar métodos de producción de toxinas a partir de aislados de hojas infectadas por *Monographella maydis*, así como la evaluación de incidencia y severidad de la toxina. La evaluación consideró a cinco cepas de *M. maydis* (15008, 16007, 16038, 16054, 16063) en 7 medios de cultivo caracterizando la forma del crecimiento, enseguida se evaluó la severidad en plantas de maíz v3. Los resultados muestran que *M. maydis* puede reproducirse a nivel laboratorio y extraer con facilidad la toxina por medios líquidos. La cepa 16054 resultó ser la más agresiva hasta en un 90 % por arriba del testigo absoluto.

Palabras claves: *Monographella maydis*, identificación, virulencia, severidad, *Zea mays* L.

GENERAL ABSTRACT

INOCULATION, VIRULENCE AND PRODUCTION OF TOXINS FOR *Monographella maydis* (Müller and Samuels) IN TROPICAL ZONES OF MÉXICO

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most cultivated and productive food species. Its worldwide economic importance lies in its use as human food, cattle feed and as an input for industrial production; however, it is affected by a wide variety of pathogens. The tar spot complex in maize, induced by the fungi *Phyllachora maydis* and *Monographella maydis*, is a disease of economic importance in Mexico because it causes severe yield losses and deterioration in forage quality. Given its importance, standardized methods of quantifying the damage caused by the disease are required. Therefore, the objective of this research was to develop toxin production methods from isolates of leaves infected by *Monographella maydis*, as well as assess the incidence and severity of the toxin. The evaluation I consider five strains of *M. maydis* (15008, 16007, 16038, 16054, 16063) in 7 culture media to characterize the growth form, after which the severity in v3 corn plants was assessed. The results show that *M. maydis* can be reproduced at laboratory level and that the toxin can be easily extracted by liquid media. Strain 16054 turned out to be the most aggressive, reaching up to 90 % above the absolute control.

Key words: *Monographella maydis*, identification, virulence, severity, *Zea mays* L.

1 Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL

México es considerado centro de origen del maíz (*Zea mays* L.) además de tener uno de los niveles más altos en cuanto a diversidad genética en el mundo (Brush *et al.*, 1988; Kato *et al.*, 2009). El maíz es una gramínea de producción mundial, cuya adaptabilidad permite su cultivo en más de 113 países, los principales usos son la alimentación humana y animal, por otra parte, es un insumo para la elaboración de productos industriales (Nuñez, 2013). Los cambios producidos por el ataque de hongos pueden ser de naturaleza nutricional y/o cualitativa como pigmentación, decoloración, pudrición, desarrollo de malos olores y sabores desagradables. Sin embargo, la consecuencia más notable de su presencia, es la contaminación del producto por hongos productores de micotoxinas (Kazakiewicz, 1989). Las principales enfermedades que afectan el cultivo del maíz son de origen fungoso, se encuentran diseminadas en todo el país y su aparición es sujeta a las condiciones ambientales que favorezcan la infección y multiplicación del patógeno (Varón y Sarria, 2007). El Complejo de la mancha de asfalto (CMA) es una enfermedad producida por la interacción sinérgica de tres hongos: *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y el hiperparásito *Coniothyrium phyllachorae*. Ocurre con mayor frecuencia en zonas frescas y húmedas (Hock *et al.*, 1989), especialmente en campos que se encuentran cerca de las riberas o en suelos que acumulan mucha humedad y tienden a inundarse. El CMA fue reportado por primera vez en México en 1904 (Maublanc, 1904) y posteriormente lo reportaron en Colombia, Costa Rica, El Salvador, Panamá y Venezuela (Abbott, 1931), aunque siempre puede encontrarse en campos de maíz, su importancia económica no fue hasta 2007 que ha crecido dramáticamente, convirtiéndose en una limitación importante para la producción de maíz en México, América Central y Colombia, causando pérdidas de 21% a 100% (Maublanc, 1904; Guillen *et al.*, 2013; Mahuku *et al.*, 2013; Monterroso *et al.*, 1974; Quiroga *et al.*, 2017).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General:

- Desarrollo de métodos de producción de toxinas a partir de aislados de hojas infectadas por *Monographella maydis*.

1.1.2 Objetivos Específicos:

- Confirmar la producción de fitotoxinas de *Monographella maydis*.
- Determinar si la producción de fitotoxinas está relacionada a la virulencia.

1.2 HIPOTESIS

- ❖ *Monographella maydis* produce una toxina que es un factor de virulencia la cual afecta al cultivo de maíz.
- ❖ *Monographella maydis* puede aislarse en laboratorio y reproducir sus síntomas en invernadero.

2. Capítulo II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 EL cultivo de Maíz

EL nombre proviene del latino mahis, pero en México, los nahuas lo denominaron *centi* (a la mazorca) o *tlaolli* (al grano) (Cabrera, 2006). El maíz es el cultivo agrícola más importante de México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social (Barkin, 2003). La clasificación botánica del Maíz, según Garcés N.(1987) es;

División: Angiosperma

Clase: Monocotiledóneas

Subclase: Macrantineas

Orden: Glumiflorales

Familia: Poaceae

Género: *Zea*

Especie: *Mays*

2.1.1 Importancia del Maíz en México

El Maíz es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total (Paliwal *et al.*, 2001; Harlan, 1992). Al término del año 2014 en el mundo se produjeron 1, 037, 791,518 t de maíz en una superficie total cosechada de 184, 800,969 ha según estadísticas del FAOSTAT (2017). México ocupa el lugar número 7 entre el grupo de países productores de este grano (USDA, 2017), durante el año agrícola 2016, se cosecharon en México 7, 099,723 ha con rendimiento promedio de 3.48 t ha⁻¹, una producción de 24,694046 t y un valor de la misma de \$84, 523, 647,000 (SIAP, 2015).

2.1.2 Botánica del Maíz

Presenta un tallo principal que al llegar al estado de ocho a diez hojas es posible apreciar indicios de la panoja (Parsons 1998; Verissimo, 1999), posee flores femeninas están agrupadas en espigas de largas brácteas (CYMMYT, 1994). La diversidad de los ambientes bajo los cuales es el cultivo el maíz es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo (SIAP, 2014).

2.2 Enfermedades del Maíz

Existen gran variedad de organismos dañinos que atacan al cultivo o compiten con él; con esto, afectan su crecimiento y desarrollo, limitando seriamente su producción y por lo tanto ocasiona que no se alcance el rendimiento potencial del cultivo, lo cual llega a demeritar el esfuerzo del agricultor con bajas ganancias y alta inversión (Luna, 2008; White, 2004). Los cambios producidos por el ataque de hongos pueden ser de naturaleza nutricional y/o cualitativa como pigmentación, decoloración, pudrición, desarrollo de malos olores y sabores desagradables. Sin embargo, la consecuencia más notable de su presencia, es la contaminación del producto por hongos productores de micotoxinas (Kazakiewicz, 1989)

2.2.1. Pérdidas causadas por hongos en el cultivo del maíz

Las principales enfermedades que afectan el cultivo del maíz son de origen fungoso, se encuentran diseminadas en todo el país y su aparición es sujeta a las condiciones ambientales que favorezcan la infección y multiplicación del patógeno (Varón y Sarria, 2007), a pesar de haber una amplia variedad de enfermedades fungosas que afectan el follaje del maíz, solamente se mencionan aquellas que por su incidencia y severidad son catalogadas de importancia económica como lo es la mancha de asfalto.

2.3 Complejo mancha de asfalto

El complejo mancha de asfalto del maíz o “TSC” por su acrónimo en inglés Tar spot Complex, es una enfermedad endémica de América confinada a este continente (Hock *et al.*, 1992), descrita en 1904 por primera vez en México sobre hojas de maíz (Maulblanc, 1904). La enfermedad es inducida por un complejo de hongos, *Phyllachora maydis* (parasito obligado) y *Monographella maydis* (parasito facultativo) la asociación de ambos es la responsable directa de la excesiva necrosis foliar que ocurre en plantas infectadas, adicionalmente se encuentra *Coniothyrium phyllachorae* como un hiperparásito de los peritecios de *P. maydis*. Menos frecuente es encontrar al *Microdochium maydis* (anamorfo de *M. maydis*) (Dittrich *et al.*, 1990).

2.3.1 Síntomas

Se ha observado que siempre el maíz es primeramente infestado por *P. maydis* (Hock *et al.*, 1989) produciendo pequeñas manchas negras, en forma de costras carbonosas sobresalientes, que por su aspecto se les denomina manchas de asfalto o brea (tarspot). Posteriormente, si las condiciones climáticas son apropiadas, se forma un halo necróticos alrededor de cada una de las lesiones de *P. maydis* debido a la infección de *M. maydis*, el síntoma típico creado por la asociación de ambos hongos es conocido comúnmente como “ojo de pescado” (Hock *et al.*, 1989), este aparece una semana después de la manifestación de *P. maydis* (Hock *et al.*, 1992). Müller & Samuels (1984) señalan que *M. maydis* se encuentra regularmente en las hojas de maíz como endofítico, pero se torna patogénico cuando entra en contacto con *P. maydis*. De todos los organismos asociados *M. maydis*, el causante de la necrosis foliar, tiene el efecto más devastador, bajo condiciones favorables del desarrollo de la enfermedad, el follaje tiende a secarse completamente en menos de 8 días debido a la fusión de las lesiones de los tres agente y a la posible producción de una toxina (Hock *et al.*, 1989; Hock *et al.*, 1995).

2.3.2. Ecología

La ecología es del complejo mancha de asfalto es típica ya que se desarrolla en las zonas montañosas comúnmente en las regiones tropicales y subtropicales de México y Centro América, en zonas frescas y húmedas (Malaguti & Subero, 1972). El desarrollo severo de la enfermedad está relacionado con una temperatura media mensual de 16 a 22 °C, 150 mm mensuales de precipitación o su equivalente a una humedad relativa mayor al 75 %, un mínimo de 7 h por noche de humedad en hojas, 10 a 20 días nublados por mes, baja insolación media anual de 1800 a 1900 horas y una evaporación anual de más de 500 mm (Hock *et al.*, 1989, 1995; Pereyda *et al.*, 2009). La dispersión de los agentes asociados a la enfermedad es por esporas a plantas de maíz adyacentes (Lii-Jang, 1972), los conidios de *M. maydis* germinan en un rango de 5 a 35 °C (Dittrich *et al.*, 1990).

2.3.2. Distribución

Aunque siempre puede encontrarse en campos de maíz, su importancia económica no fue hasta 2007 que ha crecido dramáticamente, convirtiéndose en una limitación importante para la producción de maíz en México, América Central y Colombia, causando pérdidas de 21% a 100% (Maublanc, 1904; Guillen *et al.*, 2013; Mahuku *et al.*, 2013; Monterroso *et al.*, 1974; Quiroga *et al.*, 2017). Pereyda (2009) menciona que durante el 2001 a 2005 cerca del 40 % de 3100 ha cultivadas en Mochitlán (Guerrero) fueron afectadas y un gran deterioro de la calidad del forraje. En 2005 se reportaron pérdidas del 100 % en 600 ha del municipio de Tixtla Guerrero (Gonzales *et al.*, 2008). En 2012 el complejo de la mancha de asfalto causo pérdidas del 70 a 90 % en varias extensiones de maíz en Oaxaca. Finalmente, en Mexico la enfermedad se considera económicamente importante en unas 800 mil ha distribuidas en los estados de Jalisco, Nayarit, Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero (González, 2013).

2.4 Incidencia y severidad de enfermedades

La evaluación de pérdidas causadas por patógenos y la medición de desarrollo de la enfermedad han sido muy descuidadas dentro del estudio de la patología vegetal, la medición de enfermedades también llamada “Fitopatrometria” (Muller y Samuels, 1984). La incidencia y severidad mide la cantidad de enfermedad presente, sin necesariamente hacer referencia a la respuesta del hospedero. El tipo de reacción es la respuesta que se observa en el hospedero (Chester, J. S. 1950; Fernández, M.V. 1975). Las variables comúnmente utilizadas para determinar el nivel de ataque de la enfermedades son la severidad (porcentaje de área foliar o enferma respecto del total), la incidencia en planta (porcentaje de plantas enfermas respecto del total) y la indicencia en hoja (porcentaje de hojas con al menos 1 pústula respecto del total de la hoja muestreada).

2.5 Literatura Citada

- Abbott E.V. 1931. Further notes on plant diseases in Peru. *Phytopathology* 21 (11): 1061-1071.
- Barkin. D.R. 2003. El Maíz: la persistencia de una cultura en México: Cahiers des Amériques Latines N° 40.
- CIMMYT. "Centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo" 1994. Manejo de Ensayos e Informas de Datos de Ensayos Internacionales de Maíz. México D.F. CIMMYT. p. 23.
- Parsons, D. 1998. Manual para la Educación Agropecuaria. Edición Trillas. Pp. 36, 37, 38, 71, 72.
- SIAP. "Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera". <http://www.siap.gob.mx> (Consulta: 19 de Febrero de 2017)
- Verissimo, L. 1999. Enciclopedia Practica de la Agricultura y la Ganadería. Edición Trillas. Pp. 309- 314.
- Garcés, N. 1987. Cultivos de la Sierra. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agronómicas. Quito. Pp. 5-9.
- Cabrera, H. A. J., 2006. Aplicación de un polímero orgánico hidrofílico en la producción de maíz (*zea mays* L.) elotero en Chapingo, México. Universidad Autónoma Chapingo. 80p.
- Varón-De Agudelo, F. Sarria, V.G.A. (2007). Enfermedades del maíz y su manejo. Instituto colombiano agropecuario. Grupo transferencia de tecnología. Bogotá, Colombia. 55 p.
- Luna, F. M. 2008. El cultivo de maíz en Zacatecas. Universidad Autónoma de Zacatecas. México, 129 p.
- White, D. G. 2004. Plagas y enfermedades del maíz. 289 p. 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* 7:129-135.
- Hock J., Kranz J. and Renfro B.L. 1995. Studies on the epidemiology of the tar spot disease complex of maize in Mexico. *Plant Pathology* 44(3): 490-502.
- Pereyda, H. J., J. M. Hernández., S. J I. Sandoval., S. O. Aranda., C. León., y N. M. Gómez. 2009. Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia* 43:511-519.
- Maublanc A. 1904. Espèces nouvelles de champignons inferieurs Bulletin de la Société Mycologique de France 20:72.
- Guillén E., López M. y Cano M.F. 2013. Informe de daños en cultivo de maíz en comunidades del municipio de Las Cruces, Petén. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Guatemala, Guatemala. 5 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. México. 6 p.
- Monterroso-Salvatierra D., Gallardo N. y Zúñiga J.A. 1974. Informe del programa de investigación de maíz y frijol. Proyecto de Colaboración Ministerio de Agricultura-Facultad de Agronomía (FAUSAC). Mimeografiado. Guatemala, Guatemala. 80 p.

- Quiroga-Madrigal R. R., Garrido-Ramírez E. R., Rosales esquina M. A. y Salazar-Pinacho W. M. 2017. Manual técnico: Manejo integrado del complejo mancha de asfalto del maíz en México. Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 39 p.
- Hock, J.; Kranz, J.; 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.
- Müller, E., & Samuels, G. J. (1984). *Monographella maydis* sp. nov. and its connection to the tar-spot disease of *Zea mays*. *Nova Hedwigia*, 40(1/4), 113-121.
- Hock, J.; Dittrich, U.; Renfro, B. L.; Kranz, J. 1992. Sequential development of pathogens in the maize tar spot disease complex. *Mycopathologia*. 117: 157-161.
- 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.
- Dittrich, U.; Hock, J.; Kranz, J.; Renfro, B.L. 1990. Germination of *Phyllachora maydis* ascospores and conidia of *Monographella maydis*. *Cryptogamic Botany*. 2: 214-218.
- Maublanc, A. 1904. Espèces nouvelles de champignons inferieurs. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 20:72.
- González, C. M. Gómez, M.N. Pereyda H. J. Muñiz, E.J. 2008. Obtencion de hibridos de maíz elotero tolerantes al complejo mancha de asfalto en el estado de Guerrero. INIFAP. Folleto técnico 17. Iguala, Guerrero, México. 27p.
- 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 Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2p.
- Pereyda, h. J. Hernández, M. J. Sandoval, I. J. S. Aranda, O. S. de León, C. Gómez, M. N. 2009. Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia*. 43 (5): 511-519.
- Harlan, JR. 1992. *Crops & Man*. American Society of Agronomy, Science. 284 p.
- Paliwal, R.L. 2001. El Maíz en los trópicos: mejoramiento y producción. Producción y protección vegetal Volumen 28 de FAO. Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 392 p.
- USDA. (United States Department of Agriculture). 2017. Grain: World Markets and Trade. <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-corncoarsegrains.pdf>. Consultado el 03/07/17.
- Lii-Jang, L. 1972. Incidence of tar spot disease of corn in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of University of Puerto Rico*. 211-216.
- FAOSTAT.2017. Estadísticas. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> (Fecha de consulta: Marzo de 2017).
- Chester J. S. 1950. Plant diseases losses. Tha ir appraisal and interpratation. *Plant Diseases Reporter Supplement*. 193: 190- 340.
- Fernández V. M. V. Introducción a la fitopatología. 3ª ed. Buenos Aires. Instituto Nacional de Tecnología Agrícola. 1975. 821p.

- Brush, S. B., Corrales, M. B., & Schmidt, E. (1988). Agricultural development and maize diversity in México. *Human Ecology*, 16(3), 307–328.
- Kato, Y. T. A., Mapes, L. M., Mera, J. A., Serratos, J. A., & Bye, R. A. (2009). Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. 116.
- Núñez, G. L. D. (2013). Producción de maíz en México y en el mundo. *El Economista*. Recuperado de <http://viaorganica.org/produccion-de-maiz-en-mexico-y-el-mundo-2/>.

3. Capítulo III. INOCULACIÓN, VIRULENCIA Y PRODUCCIÓN DE TOXINAS POR *Monographella maydis* (Müller & Samuels) EN ZONAS TROPICALES DE MÉXICO

INOCULATION, VIRULENCE AND PRODUCTION OF TOXINS FOR *Monographella maydis* (Müller and Samuels) IN TROPICAL ZONES OF MÉXICO

Javier Flores Fuentes¹ y Santos Gerardo Leyva Mir²

3.1 Resumen

El maíz (*Zea mays* L.), es una de las especies alimenticias más cultivadas y productivas, su importancia económica mundial radica en su uso como alimento humano, alimento para ganado e insumo para la producción industrial, sin embargo se ve afectada por una amplia variedad de patógenos. El complejo de la mancha de asfalto del maíz, inducido por los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, es una enfermedad de importancia económica en México, debido a que provoca severas pérdidas en el rendimiento y deterioro en la calidad del forraje. Dada su importancia se requieren métodos estandarizados de cuantificación de los daños ocasionados por la enfermedad. Por lo que el objetivo de la presente investigación fue desarrollar métodos de producción de toxinas a partir de aislados de hojas infectadas por *Monographella maydis*, así como la evaluación de incidencia y severidad de la toxina. La evaluación considero a cinco cepas de *M. maydis* (15008, 16007, 16038, 16054, 16063) en 7 medios de cultivo caracterizando la forma del crecimiento, enseguida se evaluó la severidad en plantas de maíz v3. Los resultados muestran que *M. maydis* puede reproducirse a nivel laboratorio y extraer con facilidad la toxina por medios líquidos. La cepa 16054 resultó ser la más agresiva hasta en un 90 % por arriba del testigo absoluto.

Palabras claves: *Monographella maydis*, identificación, virulencia, severidad, *Zea mays* L.

1 Tesista

2 Director de tesis

3.2 Abstract

The Maize (*Zea mays* L.) is one of the most cultivated and productive food species. Its worldwide economic importance lies in its use as human food, cattle feed and as an input for industrial production; however, it is affected by a wide variety of pathogens. The tar spot complex in maize, induced by the fungi *Phyllachora maydis* and *Monographella maydis*, is a disease of economic importance in Mexico because it causes severe yield losses and deterioration in forage quality. Given its importance, standardized methods of quantifying the damage caused by the disease are required. Therefore, the objective of this research was to develop toxin production methods from isolates of leaves infected by *Monographella maydis*, as well as assess the incidence and severity of the toxin. The evaluation I consider five strains of *M. maydis* (15008, 16007, 16038, 16054, 16063) in 7 culture media to characterize the growth form, after which the severity in v3 corn plants was assessed. The results show that *M. maydis* can be reproduced at laboratory level and that the toxin can be easily extracted by liquid media. Strain 16054 turned out to be the most aggressive, reaching up to 90 % above the absolute control.

Key words: *Monographella maydis*, identification, virulence, severity, *Zea mays* L.

3.3 Introducción

El maíz es uno de los cultivos de mayor importancia en la alimentación del pueblo mexicano desde la época precolombina, pues constituyó el pilar de la alimentación y del desarrollo de las culturas mesoamericanas, a quienes también les debemos la domesticación de esta planta, a lo largo de cientos de años de selección (Galarza *et al.*, 2004). El primer reporte de mancha de asfalto en maíz por el hongo *Phyllachora maydis* Maubl., se hizo en México (Maublanc, 1904). Esta enfermedad produce lesiones elevadas oscuras, estromáticas de aspecto liso y brillante, de forma oval a circular, con 0.5 a 2.0 mm de diámetro y forma estrías hasta de 10 mm de longitud (Parbery, 1967; Hamlin, 1999). Un segundo hongo asociado a la enfermedad es *Monographella maydis* Müller & Samuels, el cual provoca lesiones alrededor de las producidas por *P. maydis*. Al principio se observa un halo de forma elíptica, color verde claro de 1–4 mm, posteriormente es necrótico y provoca el síntoma conocido como ojo de pescado. En lesiones jóvenes, es común encontrar a *Microdochium sp.*, anamorfo de *Monographella maydis*. También, en tejido necrótico se puede observar a *Coniothyrium phyllachorae* Maubl. (Müller y Samuels, 1984), que confiere una textura ligeramente áspera al tejido dañado. Los factores adicionales que favorecen la enfermedad son: alta humedad en el ambiente (10 a 20 días nublados en el mes), niveles altos de fertilización nitrogenada, dos ciclos de maíz por año, genotipos susceptibles, baja luminosidad, edad de alta vulnerabilidad del hospedante, virulencia de los patógenos involucrados (Hock *et al.*, 1989). Generalmente la enfermedad tiende a presentarse después de la floración, sin embargo, bajo condiciones de lluvias continuas se puede presentar en prefloración y ocasiona pérdidas que van del 30 a 100 %. Cuando la infección es severa en la etapa de embuche o en floración, la pérdida del rendimiento de grano puede ser total, y si la enfermedad incide después de la floración el rendimiento puede disminuir en 50 % debido principalmente a que el grano no completa su desarrollo y resulta con menor peso específico (Marino *et al.*, 2008). A la fecha no se tienen estudios sobre de producción de fitotoxinas del complejo por separado, específicamente de *Monographella maydis* a partir de aislados de hojas infectadas

por el complejo de la mancha de asfalto. Esta información sin duda ayudaría a identificar de manera más rápida la enfermedad en la producción de maíz y con ello contribuir a la creación de información para un manejo posterior adecuado. El presente estudio tiene la finalidad determinar si es posible la producción de esta fitotoxina y si esta está relacionada con la virulencia en el maíz con solo uno de los hongos del complejo de la mancha de asfalto.

3.4. Materiales y Métodos

3.4.1. Localización del ensayo

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Patología del Maíz y un Invernadero pertenecientes al Centro de Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

3.4.2 Obtención e identificación de las cepas

Las cepas de *Monographella maydis*, fueron obtenidas a partir de muestras de hojas que presentaban el daño característico del complejo de la mancha de asfalto (**Cuadro 1**). Sobre la hoja se recortó con ayuda de un bisturí estéril fragmentos del daño de la hoja, fueron sembrados en medio solido PDA (agar papa dextrosa), se incubaron a 27°C por una semana. Una vez desarrollado el crecimiento micelial (**Figura 1**) fue reaislado, se sembró micelio en nuevas cajas petrí con medio solido PDA, según el color de crecimiento, con lo cual se obtendrían cepas separadas de los distintos hongos presentes en el primer aislado del daño. Se realizaron preparaciones de todos los aislados con lactofenol en un portaobjetos y se observaron en un microscopio compuesto en los objetivos 10 y 40X, identificaron aquellas cepas de *M. maydis* con base en las características morfológicas descritas por Müller & Samuels, en 1984. De los aislados se realizó cultivos monosporicos con la finalidad de obtener un cultivo puro para las pruebas de la evaluación de la toxina.

Cuadro 1. Muestras de Cepas en el sur del México.

Cepa	Localidad	Fecha
15008	Agua Fría, Puebla	Abril 2015
16003	Agua Fría, Puebla	Marzo 2016
16006	Agua Fría, Puebla	Marzo 2016
16007	Agua Fría, Puebla	Marzo 2016
16009	Agua Fría, Puebla	Marzo 2016
16015	Agua Fría, Puebla	Abril 2016
16016	Agua Fría, Puebla	Abril 2016
16018	Agua Fría, Puebla	Abril 2016
16019	Agua Fría, Puebla	Abril 2016
16023	Cajales, Guerrero	Marzo 2016
16024	Cajales, Guerrero	Marzo 2016
16025	Cajales, Guerrero	Marzo 2016
16029	Piedras Negras, Veracruz	Abril 2016
16030	Piedras Negras, Veracruz	Abril 2016
16031	Piedras Negras, Veracruz	Abril 2016
16033	Zihualtepec, Oaxaca	Abril 2016
16034	Zihualtepec, Oaxaca	Abril 2016
16035	Zihualtepec, Oaxaca	Abril 2016
16036	Zihualtepec, Oaxaca	Abril 2016
16037	Zihualtepec, Oaxaca	Abril 2016
16038	Zihualtepec, Oaxaca	Abril 2016
16052	Piedras Negras, Veracruz	Sept. 2016
16054	Piedras Negras, Veracruz	Sept. 2016
16055	Portillo, Chiapas	Octubre 2016
16060	Mochitlan, Guerrero	Octubre 2016
16061	Mochitlan, Guerrero	Octubre 2016
16063	Mochitlan, Guerrero	Octubre 2016
16064	Mochitlan, Guerrero	Octubre 2016

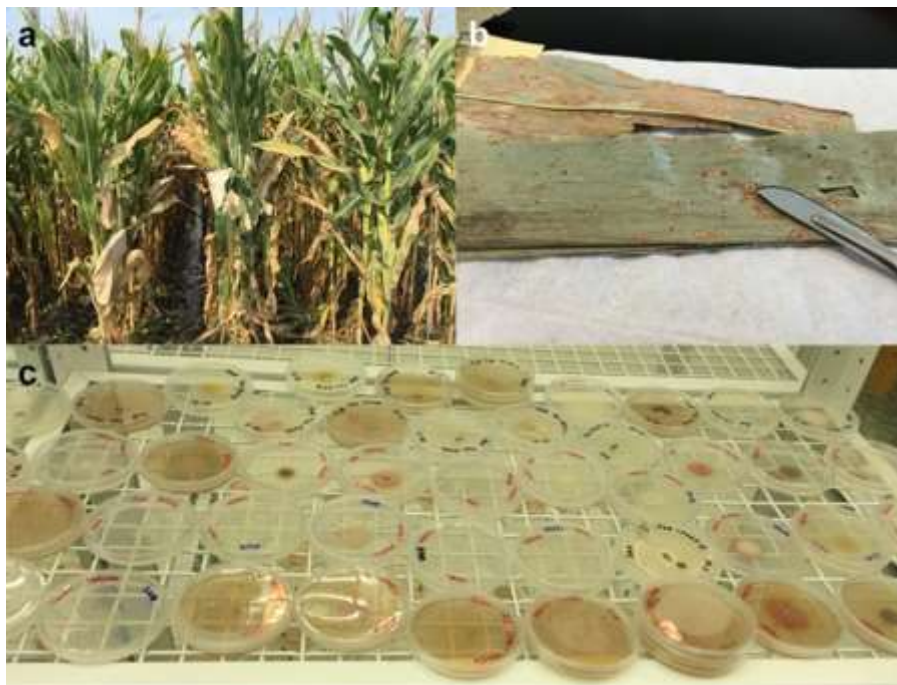


Figura 1 Aislamiento de *Monographella maydis*. A) Daño característico del complejo de mancha de asfalto en maíz. B) Fragmentado de hoja como inoculo. C) Medio de cultivos.

3.4.3. Cultivos Monospóricos

El desarrollo morfológico del hongo se observa en el microscopio compuesto cuando el micelio fúngico ha cubierto la superficie de la placa petri para verificar que las esporas y los conidióforos estén presente correctamente en el cultivo. Posteriormente para la obtención de una sola espora del patógeno se utilizó un asa para sembrar bacteria, se hidrató con agua destilada-estéril. Con un movimiento suave se recolecta parte del micelio fúngico y se colocó dentro de un tubo de 2 mL, se colocaran en agitación y vertieron en cajas petri con medio de AA homogenizándolas con movimientos circulares, se mantuvieron inclinadas en total oscuridad por 18 horas a temperatura ambiente. Con ayuda de un Estereoscopio y aguja se tomó una sola espora y se sembró en una nueva caja petri con medio de PDA natural con cuadros de 2 mm de papel filtro secante estéril, se incubaron a 25°C con 12 horas luz por 2 semanas, cuando el micelio fúngico cubrió la superficie de la placa se sacaron los cuadros de papel filtro colonizados y se colocaron dentro

de una caja petri estéril sin medio de cultivo para eliminar la humedad dentro de la campana de flujo por tres días. Los pedazos de papel filtro previamente secos se colocaron dentro de tubos de plástico con tapa de 2ml. Se realizaron dos repeticiones, un tubo se refrigeró a 4°C que fue el de uso continuo y otro a -20°C que se conservó.

3.4.3. Obtención de Cepa de *Monographella maydis*

Seleccionadas las 28 cepas pertenecientes a *Monographella maydis* se procedió a realizar pruebas de incremento del hongo de interés, con objeto de conocer cuáles eran las mejores cepas, capaces de producir el mayor número de esporas en menor micelio, se evaluó la cantidad de esporas producidas en un gramo de micelio en los medios PDA, SNA y Frijol Chino, con una cámara de Neubauer se realizó la cuantificación de esporas.

A partir del medio de mayor eficiencia en producción de esporas, se evaluaron siete medios líquidos: SNA, PDA Natural, CZAPEK, V8, Frijol Chino, Hoja de Maíz y Espiga de Maíz, para una mayor facilidad, rapidez y sencillez en la obtención de la toxina para las pruebas de severidad de la toxina, seleccionando aquel medio capaz de producir el mayor número de esporas; se sembraron 4 discos del hongo a partir del medio solido de PDA en matraces Erlenmeyer de 200 mL con cada medio y se dejó en agitación una semana a 80 rpm. Trascurrido el tiempo, el crecimiento micelial del medio fue homogeneizado con una licuadora y tamizado con filtros Watman ya que estos solo permiten el paso del líquido del medio junto con la toxina, mas no el micelio. El sobrante en el filtro fue colocado en 100 mL de agua destilada estéril para realizar el conteo de esporas en la cámara de Neubauer, una segunda repetición de estos se dejó secar el micelio sobre el papel filtro por 48 horas a 25° en un estufa desecante para su pesado.

3.4.4. Evaluación de Severidad de Toxina

Se probaron distintas formas de inoculación, inyecciones a nervadura, a tallos, presión directa a la hoja con jeringas, roció con atomizador, sin embargo el cortar el tallo para la absorción a través de los haces vasculares fue la técnica elegida, se montó el ensayo en un diseño completamente al azar en laboratorio dentro del cuarto de muestras de condiciones controladas (**Figura 2**), las unidades experimentales constaba de 3 plantas por 3 repeticiones, se trataban de plántulas de maíz en etapa v3 (13 días de edad), dentro de tubos de ensaye estériles, los tratamientos evaluados se observan en el Cuadro 2. Con base en la escala de severidad según el grado del síntoma provocado por *M. maydis* (Cuadro 3 y Figura 3), realizada; cada 12 horas dentro de las 48 horas después de la inoculación, se evaluó la severidad. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico de comparación de medias de Tukey con un alfa al 1% usando el software SAS 9.0.



Figura 2. Establecimiento del ensayo en condiciones controladas

Cuadro 2. Tratamientos empleados en el ensayo

Trat	Descripción de los tratamientos en volumen.
C. abs.	7 ml de agua destilada estéril.
C1	5 ml de Control Medio Líquido (SNA) + 2 ml de agua destilada estéril.
C2	5 ml de Control Medio Líquido (PDA) + 2 ml de agua destilada estéril.
C3	5 ml de Control Medio Líquido (CZAPEK) + 2 ml de agua destilada estéril.
C4	5 ml de Control Medio Líquido (V8) + 2 ml de agua destilada estéril.
C5	5 ml de Control Medio Líquido (FC) + 2 ml de agua destilada estéril.
C6	5 ml de Control Medio Líquido (HM) + 2 ml de agua destilada estéril.
C7	5 ml de Control Medio Líquido (EM) + 2 ml de agua destilada estéril.
T1	5 ml de Medio Líquido SNA (cepa 15008) + 2 ml de agua destilada estéril.
T2	5 ml de Medio Líquido SNA (cepa 16007) + 2 ml de agua destilada estéril.
T3	5 ml de Medio Líquido SNA (cepa 16038) + 2 ml de agua destilada estéril.
T4	5 ml de Medio Líquido SNA (cepa 16054) + 2 ml de agua destilada estéril.
T5	5 ml de Medio Líquido SNA (cepa 16063) + 2 ml de agua destilada estéril.
T6	5 ml de Medio Líquido PDA (cepa 15008) + 2 ml de agua destilada estéril.
T7	5 ml de Medio Líquido PDA (cepa 16007) + 2 ml de agua destilada estéril.
T8	5 ml de Medio Líquido PDA (cepa 16038) + 2 ml de agua destilada estéril.
T9	5 ml de Medio Líquido PDA (cepa 16054) + 2 ml de agua destilada estéril.
T10	5 ml de Medio Líquido PDA (cepa 16063) + 2 ml de agua destilada estéril.
T11	5 ml de Medio Líquido CZAPEK (cepa 15008) + 2 ml de agua destilada estéril.
T12	5 ml de Medio Líquido CZAPEK (cepa 16007) + 2 ml de agua destilada estéril.
T13	5 ml de Medio Líquido CZAPEK (cepa 16038) + 2 ml de agua destilada estéril.
T14	5 ml de Medio Líquido CZAPEK (cepa 16054) + 2 ml de agua destilada estéril.
T15	5 ml de Medio Líquido CZAPEK (cepa 16063) + 2 ml de agua destilada estéril.
T16	5 ml de Medio Líquido V8 (cepa 15008) + 2 ml de agua destilada estéril.
T17	5 ml de Medio Líquido V8 (cepa 16007) + 2 ml de agua destilada estéril.
T18	5 ml de Medio Líquido V8 (cepa 16038) + 2 ml de agua destilada estéril.
T19	5 ml de Medio Líquido V8 (cepa 16054) + 2 ml de agua destilada estéril.
T20	5 ml de Medio Líquido V8 (cepa 16063) + 2 ml de agua destilada estéril.
T21	5 ml de Medio Líquido FC (cepa 15008) + 2 ml de agua destilada estéril.
T22	5 ml de Medio Líquido FC (cepa 16007) + 2 ml de agua destilada estéril.
T23	5 ml de Medio Líquido FC (cepa 16038) + 2 ml de agua destilada estéril.

T24	5 ml de Medio Líquido FC (cepa 16054) + 2 ml de agua destilada estéril.
T25	5 ml de Medio Líquido FC (cepa 16063) + 2 ml de agua destilada estéril.
T26	5 ml de Medio Líquido HM (cepa 15008) + 2 ml de agua destilada estéril.
T27	5 ml de Medio Líquido HM (cepa 16007) + 2 ml de agua destilada estéril.
T28	5 ml de Medio Líquido HM (cepa 16038) + 2 ml de agua destilada estéril.
T29	5 ml de Medio Líquido HM (cepa 16054) + 2 ml de agua destilada estéril.
T30	5 ml de Medio Líquido HM (cepa 16063) + 2 ml de agua destilada estéril.
T31	5 ml de Medio Líquido EM (cepa 15008) + 2 ml de agua destilada estéril.
T32	5 ml de Medio Líquido EM (cepa 16007) + 2 ml de agua destilada estéril.
T33	5 ml de Medio Líquido EM (cepa 16038) + 2 ml de agua destilada estéril.
T34	5 ml de Medio Líquido EM (cepa 16054) + 2 ml de agua destilada estéril.
T35	5 ml de Medio Líquido EM (cepa 16063) + 2 ml de agua destilada estéril.

Dónde: Trat.: Tratamiento; C. abs.: Control absoluto; FC: Frijol Chino, HM: Hoja de Maíz y EM: Espiga de Maíz.

Cuadro 3 Escala visual para evaluación de severidad de *M. maydis* en hoja de maíz.

%	Descripción
0	Hoja sana (verde y sin síntomas)
1-25	Hoja verde con puntos pequeños cloróticos moderados
26-50	Hoja verde con puntos pequeños cloróticos severos
51-75	Hoja amarilla con puntos pequeños cloróticos
76-100	Hoja muerta



Figura 3. Escala Visual de Severidad de toxina del Patógeno (*M. maydis*).

3.4.5 Evaluación de Virulencia a partir de Esporas

Con el objetivo de muestrear la virulencia bajo las condiciones óptimas del hongo, se realizó una prueba en un invernadero controlado de cristal del CIMMYT, mediante la inoculación de las esporas con un aerosol provocando un golpe de presión sobre las hojas (Figura 3), con los aislados de las cepas 15008, 16007, 16038, 16054, 16063, probando concentraciones bajas (1×10^4 , 1.5×10^4 y 2×10^4) y altas (2×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 y 2×10^6) esporas mL^{-1} en medio de cultivo a partir de hoja de maíz. Se realizaron dos evaluaciones tomando en cuentas las primeras tres hojas de la planta, basado en la escala de estimación de severidad del patógeno (**Cuadro 3**), tal como se muestra en la **Figura 4**, con el fin de verificar si el daño observado en las hojas de maíz fue provocado por el patógeno en estudio, se aislado en un medio de cultivo.

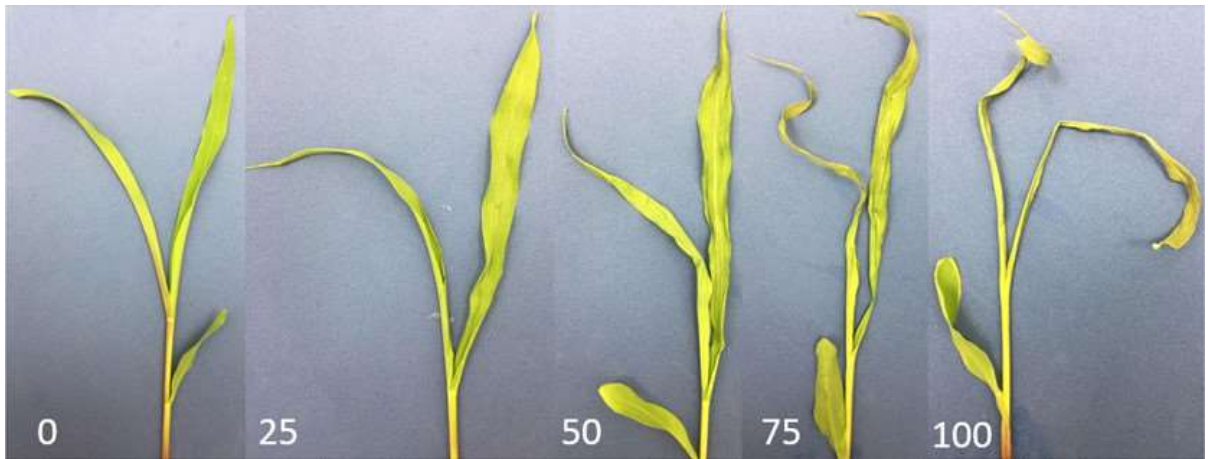


Figura 4. Escala Visual de Virulencia del Patógeno (*M. maydis*).

3.5. Resultados y Discusiones

3.5.1 Identificación de la especie *Monographella maydis*

Se logró aislar e identificar uno de los hogos del complejo de la mancha de asfalto, específicamente *Monographella maydis*, a través de la caracterización de sus estructuras reproductivas y somáticas. Las imágenes digitalizadas de las estructuras de los aislados del hongo, se visualizó conidios de 3 a 9 septas, coincidiendo con lo descrito por Müller & Samuels (1984).



Figura 5 Conidios de *Monographella maydis*.

Por otra parte la colonia de *Monographella maydis* cultivada en medio SNA presento un micelio blanquecino con crecimiento en forma de camelia, sin embargo en medio PDA tuvo un crecimiento en camelia pero rosado (Figura 6).



Figura 6. Diferentes crecimientos miceliales en *Monographella maydis*

3.5.2 Obtención de cepas

La selección se llevó a cabo con la correlación entre el peso de micelio y la cantidad de esporas producidas en un 1mL de la solución stock. Las cinco mejores cepas (15008, 16007, 16038, 16054, 16063) como se muestra en los cuadros 4 y 5. Además se demostró que el mejor medio de cultivo para la reproducción del hongo fue aquel que se extrajo de manera natural a partir de hojas sanas de maíz, esto debido a que el hongo se encuentra en las condiciones óptimas de desarrollo al ser su hospedante natural.

Cuadro 4. Peso en gramos del micelio de *Monographella maydis*

CEPA	V8	CZAPEK	HOJA de Maíz	PDA	SNA	Espiga de Maíz	FRIJOL CHINO
15008	0.208	0.159	0.013	0.062	0.008	-0.048	0.007
16007	0.243	0.208	0.022	0.052	-0.006	0.003	0.002
16016	0.219	0.160	0.041	0.066	0.026	-0.020	0.015
16030	0.251	0.170	0.048	0.033	0.023	-0.022	0.017
16035	0.209	0.125	0.060	0.066	0.043	0.056	0.015
16038	0.230	0.126	0.022	0.066	0.040	-0.036	0.047
16054	0.281	0.170	-0.046	0.016	0.046	-0.002	0.038
16063	0.247	0.143	-0.029	0.070	0.039	0.024	0.004

Cuadro 5. Cuantificación de esporas de *Monographella maydis* en 1 mL.

CEPA	V8	CZAPEK	Hoja de Maíz	PDA	SNA	Espiga de Maíz	FRIJOL CHINO
15008	3.57X10 ⁵	6.66X10 ⁵	9.85X10 ⁵	1.117X10 ⁶	8.8X10 ⁵	2.165X10 ⁶	1.5X10 ⁵
16007	1.3X10 ⁴	1.8X10 ⁴	1.59X10 ⁵	1.67X10 ⁵	9.36X10 ⁵	1.4X10 ⁴	1.3X10 ⁴
16016	1.3X10 ⁴	5.12X10 ⁵	2.13X10 ⁵	1.35X10 ⁵	3.43X10 ⁵	1.35X10 ⁵	6X10 ⁴
16030	2.9X10 ⁵	1X10 ⁴	4.73X10 ⁵	3.3X10 ⁴	1.336X10 ⁶	1.1X10 ⁴	7.12X10 ⁵
16035	2.1X10 ⁴	3X10 ⁵	3.78X10 ⁵	1.125X10 ⁶	1.256X10 ⁶	21X10 ⁴	1.38X10 ⁵
16038	2.8X10 ⁴	1.175X10 ⁶	1.88X10 ⁵	1.366X10 ⁶	7.11X10 ⁵	3.25X10 ⁵	5.2X10 ⁴
16054	6.29X10 ⁵	3X10 ⁴	1.35X10 ⁶	2.105X10 ⁶	5.01X10 ⁵	8.9X10 ⁴	1.8X10 ⁴
16063	4.31X10 ⁵	1.185X10 ⁶	4.22X10 ⁵	1.366X10 ⁶	6.60X10 ⁵	7.5X10 ⁴	7.38X10 ⁵

3.5.3 Severidad de Toxina

Los aislamientos de *M. maydis*, mostraron ser patógenos al ser inoculadas las toxinas en las plantas de maíz en la etapa V3, ocasionando síntomas de daño en las hojas, mismos que fueron reaislados de ese daño, lo que permitió comprobar los postulados de Koch, verificando que los halos amarillos establecidos en las hojas inoculadas (Figura 7) correspondieron al desarrollo del patógeno, tal y como se observa en la Figura 8.



Figura 7. Halos amarillentos en hojas, síntoma característico de *Monographella maydis*.



Figura 8. Reaislamiento del patógeno a partir de tejido infectado.

Tal y como se observa en la Figura 8, se aprecian las diferencias estadísticas entre cada cepa según el porcentaje de severidad, siendo las cepas 16054 y 16038 las más agresivas con respecto al control absoluto, seguidas de las cepas 16063, 15008 y 16007. Las plantas establecidas en el medio control absoluto (sin toxina) y en agua estéril, no mostraron daño superior a 10 % en las hojas. Coincidiendo con lo descrito y estudiado por Garrido-Ramírez (2017) quién observó una reducción en la concentración de proteínas totales a medida que la infección avanzaba, debido a una proteína 15kDa asociada a la infección del CMA, teniendo síntomas de secamientos.

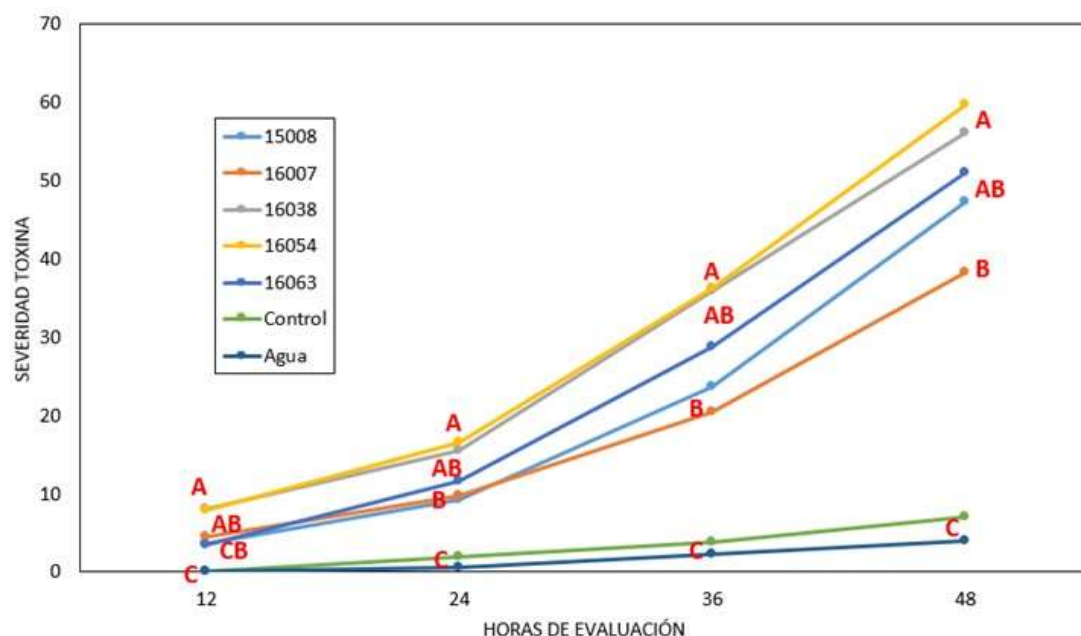


Figura 9. Severidad de toxina de cepas en medio de cultivo natural de hoja de maíz

3.5.3 Virulencia de Esporas

Una suspensión de esporas del *M. maydis* a una concentración de 2×10^6 ascosporas/ml es suficiente para infectar directamente a los fragmentos de hojas de maíz, resultado similar a lo reportado por Garrido-Ramírez (2017) quién a evaluó la misma cantidad de esporas y observó el mismo comportamiento. La cepa 16054 se mostró como la más agresiva con un 80 % de virulencia. Sin embargo, entre la cepa 15008, 16063 y el control no se detectaron diferencias significativas encontrando severidades por debajo del 20 % (Figura 10).

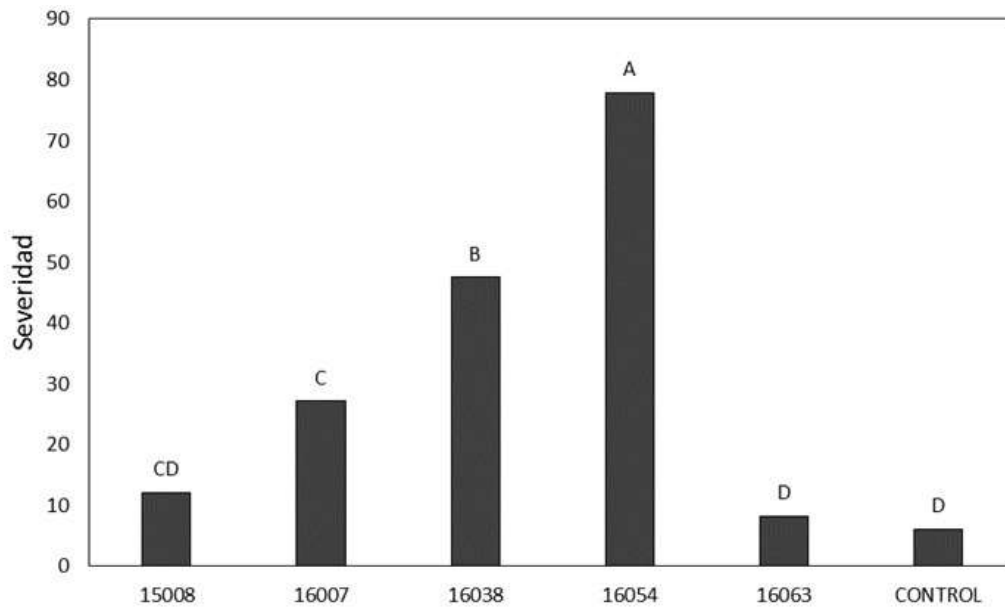


Figura 10. Severidad de toxina de cepas en medio de cultivo natural de hoja de maíz

En Figuras 11 y 12, se muestran los daños del hongo sobre hojas de maíz después de la inoculación de esporas. Las cepas se comportaron de igual forma que las pruebas de evaluación de severidad de la toxina demostrando con ello que las cepas más agresivas son 16054 y 16063 (Figura 11) y las menos agresivas 15007, 16008 y 16038 (Figura 12).



Figura 11. Muestra del daño de las cepas más agresivas en plantas de maíz



Figura 12. Muestra del daño de las cepas menos agresivas en plantas de maíz

Con el objetivo de mostrar una posible correlación entre la severidad de la toxina y la virulencia del hongo a través de esporas (cuadro 6), El grafico se realizó dos ocasiones, la primera se partió teniendo en cuenta el punto “control” y posteriormente se generó la línea de regresión. El modelo con mayor ajuste, fue el logarítmico, el cual tuvo un ajuste del 46% cuando se trataba desde el punto control (Figura 13). Cuando se excluyó el punto control, la regresión que mejor se ajustó fue la polinómica con un ajuste de 54% (Figura 14).

Cuadro 6. Medias de virulencia del hongo y severidad de toxina de cepas de *Monographella maydis* en base a el nivel de asignación de ambas lecturas.

CEPA	VIRULENCIA DE ESPORAS	SEVERIDAD DE TOXINA
Control	6.07	7
16007	27.14	38.17
15008	12.14	47.17
16063	8.21	51
16038	47.5	56
16054	77.86	59.7

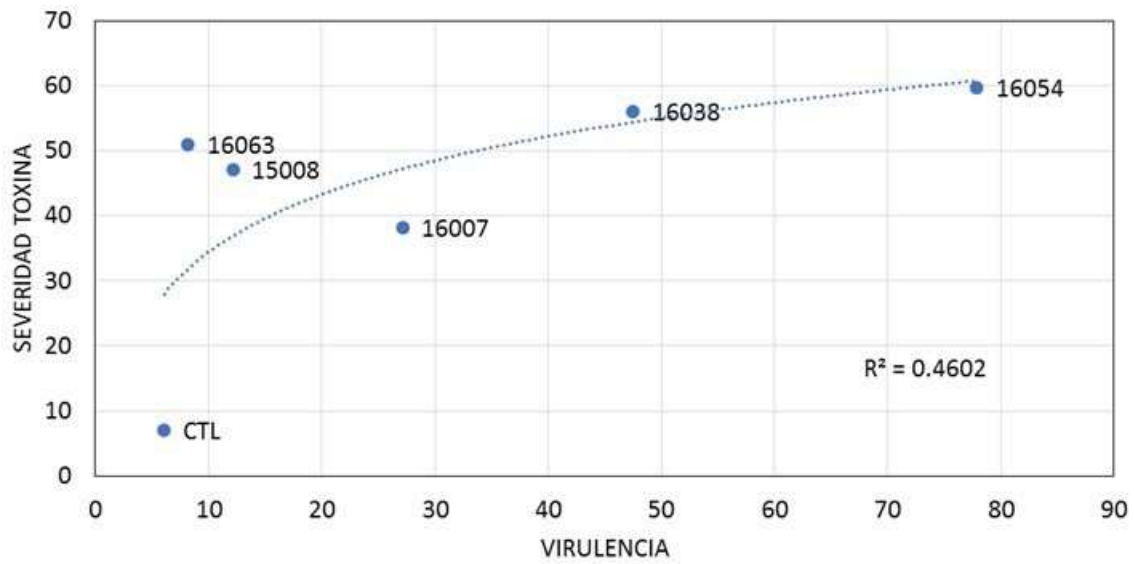


Figura 13. Regresión polinómica para severidad de toxina versus virulencia con el punto control

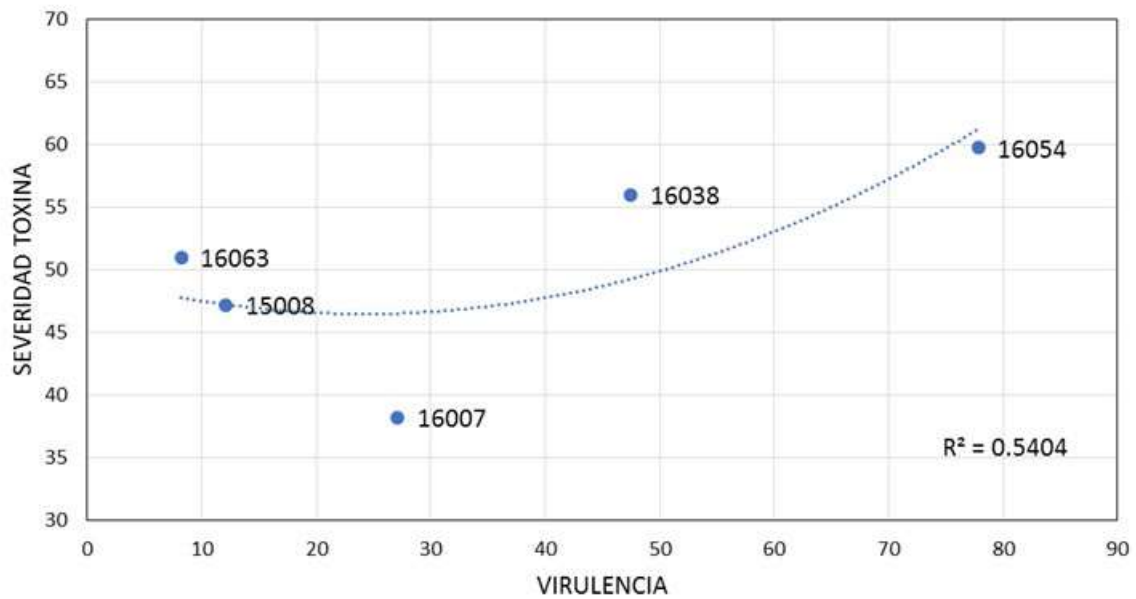


Figura 14. Regresión polinómica para severidad de toxina versus virulencia sin el punto control

3.6. Conclusiones

Se puede separar del complejo de mancha de asfalto solo al hongo *Monographella maydis*; a partir de aislados de hojas infestadas.

Los síntomas y virulencia se pueden lograr reproducir a nivel de condiciones controladas así como en campo.

La producción de la fitotoxina se encuentra directamente relacionada a la virulencia del hongo, siendo las cepas 16054 (Piedras Negras, Veracruz) y 16038 (Zihualtepec, Oaxaca) las más agresivas esto por el lugar de procedencia de la muestra ya que cuentan con las condiciones ideales para el desarrollo del hongo.

3.7. Literatura citada

- Müller, E., & Samuels, G. J. (1984). *Monographella maydis* sp. nov. and its connection to the tar-spot disease of *Zea mays*. *Nova Hedwigia*, 40(1/4), 113-121.
- Maublanc, A. 1904. Espèces nouvelles de Champignons inferius. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 20: 72.
- Parbery, D. G. (1963). Studies on graminicolous species of *Phyllachora* Fckl. I. Ascospores, their liberation and germination. *Aust. J. Bot.* 11: 117–130.
- Hamlin, R.T. (1999). Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes. Vol. I y II. APS Press. St. Paul. Minnesota. pp: 63–64.
- Hock, J., J. Kranz, y B. L. Renfro. (1989). El "complejo mancha de asfalto" de maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 7: 129–135.
- Galarza M., J. M; U. Miramontes P.; D. Muñoz P.; G. Hernández R. (2004). Situación actual y perspectiva del maíz en México 1990-2004. Servicio de Información y estadística agroalimentaria y pesquera. México, D.F. pp. 135.
- Marino, G. C.; Gómez M., N. O.; Pereyra H., J.; Muñiz, E. (2008). Híbridos de maíz elotero tolerante al complejo "Mancha de asfalto" en el estado de Guerrero. CEIGUA-CIRPAS-INIFAP. Folleto técnico Núm. 17. 36 p.

Garrido-Ramirez, E. R. (2017). Mecanismos de infección del maíz por los hongos involucrados en el complejo mancha de asfalto. Suplemento de la revista mexicana de fitopatología. 35: S14-S15pp..