

Confirmation of the identity of *Exserohilum turcicum*, causal agent of maize leaf blight in Sinaloa

Confirmación de la identidad de *Exserohilum turcicum*, agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa

Rubén Félix-Gastélum*, **Glenda Judith Lizárraga-Sánchez**, Universidad de Occidente, Unidad Los Mochis, Departamento de Ciencias Biológicas, Bulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n Los Mochis, Sinaloa, CP. 81223, México; **Ignacio Eduardo Maldonado-Mendoza**, **Karla Yeriana Leyva-Madriral**, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-IPN Unidad Sinaloa. Departamento de Biotecnología Agrícola. Bulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250. Guasave, Sinaloa, CP. 81101, México; **Gabriel Herrera-Rodríguez**, Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte. Lázaro Cárdenas, PTE. 315, Colonia Centro, Los Mochis Sinaloa, CP. 81200, México; **Silvia Espinoza-Matías**, Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Delegación Coyoacán. CDMX, CP. 04510. *Autor para correspondencia: ruben.felix@udo.mx.

Recibido: 09 de Marzo, 2018.

Aceptado: 03 de Julio, 2018.

Félix-Gastélum R, Lizárraga-Sánchez GJ, Maldonado-Mendoza IE, Leyva-Madriral KY, Herrera-Rodríguez G, Espinoza-Matías S. 2018. Confirmation of the identity of *Exserohilum turcicum*, causal agent of maize leaf blight in Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 468-478.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1803-1

Primera publicación DOI: 07 de Agosto, 2018.

First DOI publication: August 07, 2018

Resumen. Las enfermedades de origen fungoso constituyen una limitante en la producción de maíz en Sinaloa, México. En ciclos agrícolas recientes, una enfermedad foliar ha ocurrido en niveles epidémicos en la región costera del Norte de Sinaloa. Los síntomas de la enfermedad se asemejan a los causados por *Exserohilum turcicum* previamente

Abstract. Fungal diseases constitute an important maize production constraint in Sinaloa, Mexico. In recent growing seasons, a severe foliar epiphytotic disease has occurred in the northern coastal region of this state. The symptoms of the disease resembled those caused by *Exserohilum turcicum*, reported in the high humid valleys in the states of the central plateau of Mexico and other parts of the world with temperate to subtropical climate. The objective of this research was to confirm the identity of *E. turcicum* associated to maize leaf blight and to assess the disease severity in 17 maize hybrids in commercial fields. Variation in color and colony morphology of the fungal isolates was observed in various media. The maize leaf extract agar was the most favorable medium for fast mycelial growth of the fungal isolates. The isolates collected were used in pathogenicity tests, where they exhibited a variation in pathogenicity on the commercial maize

reportados en los valles altos en estados de la Mesa Central de México y otras partes del mundo con clima subtropical o templado. El objetivo de ésta investigación fue confirmar la identidad de *E. turcicum* asociado al tizón foliar del maíz y evaluar la severidad de la enfermedad en 17 híbridos de maíz en lotes comerciales. Variación en color y morfología de los aislados se observó en diferentes medios. El medio extracto de maíz-agar fue el más favorable para el desarrollo micelial de los aislados. En pruebas de patogenicidad, los aislados exhibieron variación en patogenicidad en el híbrido comercial de maíz DK-3000. Los postulados de Koch se cumplieron mediante el re-aislamiento del patógeno de las plantas inoculadas. Aun cuando el teleomorfo (*Setosphaeria turcica*) no se observó, estudios morfométricos y moleculares confirmaron la identidad de *E. turcicum* como agente causal del tizón del maíz. Los híbridos de maíz mostraron una severidad diferencial de la enfermedad, lo cual estuvo relacionado con periodos prolongados de alta humedad relativa. Estudios futuros deberían enfocarse a la determinación de las *formae specialis* importantes para la implementación de un programa de mejoramiento genético para el control de la enfermedad.

Palabras clave: hongo, patogenicidad, severidad, anamorfo, identificación, morfología.

En ciclos agrícolas recientes, una severa enfermedad foliar atacó a varios híbridos de maíz en niveles epifíticos en las regiones costeras del norte de Sinaloa en los meses entre noviembre y enero, que incluyeron periodos diarios con humedad relativa $\geq 90\%$ por 13-17 h, y una temperatura diaria promedio de entre 18 y 26 °C. Los síntomas de la enfermedad se desarrollaron inicialmente en las hojas inferiores, causando lesiones ovaladas, largas, elípticas,

híbrido DK-3000. Koch's postulates were fulfilled by re-isolation of the pathogen from inoculated plants. Although the teleomorph (*Setosphaeria turcica*) was not observed, morphometric and molecular studies indicated that *E. turcicum* is the causal agent of maize leaf blight. Differential disease severity occurred in maize hybrids and was highly dependent on prolonged periods of high relative humidity. Future research should focus on determining the *formae specialis* crucial for maize breeding programs to achieve genetic resistance against the disease.

Key words: fungus, pathogenicity, severity, anamorph, identification, morphology.

In recent growing seasons, a severe foliar epiphytic disease occurred in several maize hybrids in the northern coastal regions of Sinaloa during the months of November through January, including periods of relative humidity $\geq 90\%$ for 13-17 h, and an average daily temperature between 18 and 26 °C. The symptoms of the disease developed initially in the lower leaves causing oval, long, elliptical, grayish-green or tan necrotic lesions of different sizes. Later, symptoms spread to the middle and upper leaves of the plants. Although yield losses are yet to be estimated, personal observations by the author indicate the disease has destroyed up to 65% of the foliage of some commercial maize hybrids grown in the northern coastal region of the state. Although maize leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* (*Et*) is one of the most important foliar diseases in maize grown in Mexico, at the present time, there is not enough scientific evidence on the etiology of the disease, although maize growers and field advisors have shown interest in determining its etiology. Consequently, the main goal of the present study

verde grisáceo o marrones de diferentes tamaños. Más tarde, los síntomas alcanzaron a las hojas medias y superiores de las plantas. Si bien todavía están por determinarse las pérdidas de rendimiento, observaciones personales del autor indican que la enfermedad ha destruido hasta 65% del follaje de algunos híbridos comerciales de maíz sembrados en la región costera del norte del estado. Aunque el tizón foliar del maíz causado por *Exserohilum turcicum* (*Et*) es una de las enfermedades foliares más importantes en el maíz sembrado en México, hoy en día no existe suficiente evidencia científica acerca de la etiología de la enfermedad, aunque los productores de maíz y asesores de campo demuestran interés en determinar su etiología. En consecuencia, el objetivo principal del presente estudio fue confirmar la identidad del agente causal del tizón foliar del maíz a nivel de especie, con base en datos morfológicos y moleculares del anamorfo.

Quince muestras sintomáticas fueron colectadas del mismo número de campos de maíz en los municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa, entre el 16 de diciembre de 2013 y el 15 de enero de 2014. Una muestra de cada campo consistió en cinco hojas sintomáticas recolectadas de las esquinas y el centro de cada campo (n=25). Fragmentos de hojas sintomáticas (5-6 cm de longitud) fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% por 2 min, lavados por 3 min en agua destilada estéril y secados con papel de filtro Whatman Núm. 1. Los fragmentos fueron colocados en una cámara húmeda por 48 h a 25 °C. De los conidios formados en el tejido de las hojas se obtuvieron cultivos monospóricos a través de su transferencia con una aguja de disección a placas de Petri con papa dextrosa y agar (PDA), bajo un microscopio de disección.

Se evaluó el crecimiento micelial de ocho aislados monoconidiales del hongo en los siguientes medios de cultivo: papa dextrosa agar (PDA),

was to confirm the identity of the causal agent of maize leaf blight at the species level, based on morphometric and molecular data of the anamorph.

Fifteen symptomatic samples were collected from the same number of maize fields in the municipalities of Ahome and El Fuerte, Sinaloa, from December 16, 2013 through January 15, 2014. One sample from each field consisted in five symptomatic leaves collected from the corners and center of each field (n=25). Fragments of symptomatic leaves (5-6 cm long) were disinfested in a 0.5% sodium hypochlorite solution for 2 min, washed for 3 min in sterile distilled water and dried on Whatman No. 1 filter paper. Fragments were placed in a moist chamber, for 48 h at 25 °C. From conidia formed on the leaf tissue, monosporic cultures were obtained through direct transference of them with a dissecting needle to Petri plates with potato dextrose agar (PDA), under a dissecting microscope.

Mycelial growth of eight fungal monoconidial isolates were evaluated on the following culture media: potato dextrose agar (PDA), Czapek-Dox agar (CDA), glucose peptone agar (GPA) and Richard's synthetic agar (RSA), and maize leaf extract agar (CLEA) (Dhingra and Sinclair, 1985). After eight days of incubation, under 14-h light/10-h dark regime at 25 °C, the surface color of the fungal colonies in the different culture media were in the olivaceous and dark grayish-olive colors.

All isolates presented light olive pigmentation on the back of the colony in CDA and RSA, but no pigmentation was observed in other media. The radial mycelial growth rate of the isolates on CLEA ranged from 3.7 to 4.9 mm/day and was significantly ($P \leq 0.05$) greater than the growth on the other media. There was a significant interaction ($P < 0.0001$) between the medium and the isolate on radial mycelial growth, indicating that growth

Czapek-Dox Agar (CDA), glucose peptona agar (GPA), agar sintético de Richard's (ASR) y extracto de hoja de maíz agar (EHMA) (Dhingra y Sinclair, 1985). Después de ocho días de incubación, bajo un régimen de luz por 14 h y 10 h de oscuridad a 25 °C, el color de la superficie de las colonias del hongo en los diferentes medios de cultivo variaron de oliváceo y verde olivo grisáceo.

Todos los aislados presentaron una pigmentación de color verde oliva claro en el reverso del cultivo en CDA y ASR, aunque no se observó pigmentación en otros medios. La tasa de crecimiento micelial radial de los aislados en EHMA fue de entre 3.7 y 4.9 mm/día y fue significativamente ($P \leq 0.05$) mayor al crecimiento en los otros medios. Hubo una interacción significativa ($P < 0.0001$) entre los medios de cultivo y el crecimiento radial de los aislados, indicando que las tasas de crecimiento de los aislados dependieron del medio. En PDA, los aislados produjeron de 1 a 3 conidios en la punta del conidióforo (Figura 1). Los conidios eran curvos, ahusados y alargados, con un promedio de cinco septas y una longitud de 44 a 110 μm (promedio de 85.3 μm) de 10 a 21 μm de ancho (promedio de 14.8 μm). No se observaron diferencias en la morfología entre aislados de *Et* obtenidos de hojas sintomáticas del maíz, y las características fueron consistentes con reportes previos (Tang *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2017).

Para observar los conidios bajo el microscopio electrónico, se cortaron fragmentos de 3.5 cm^2 de una colonia de un aislado (*Et3*) en PDA de 8 días de edad y se sumergieron en una solución (FAA: 10% formaldehído, 5% ácido acético, 50% dilución de etanol 96%, y 35% agua). Después de 48 h, las muestras fueron lavadas con agua de la llave por 10 minutos y enseguida fueron deshidratadas incrementando las concentraciones de etanol. Las muestras fueron deshidratadas hasta un punto crítico con CO_2 en una desecadora BAL-TEC CPD030.

rates of the isolates were medium-dependent. On PDA, isolates produced between 1-3 conidia at the tip of the conidiophore (Figure 1). Conidia were curved, spindle and elongated, with an average of five septa, and ranged 44 - 110 μm in length (85.3 μm average) and 10 - 21 μm in width (14.8 μm average). No differences in morphology were observed among the *Et* isolates obtained from symptomatic maize leaves, and the characteristics were consistent with previous reports (Tang *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2017).

For the observation of conidia under the electron microscope, fragments of 3.5 cm^2 of an 8-days-old PDA culture of a maize blight fungal isolate (*Et3*) were cut and immersed in a fixing solution (FAA: 10% formaldehyde, 5% acetic acid, 50% dilution of ethanol 96%, and 35% water). After 48 h, samples were washed with tap water for 10 min and immediately dehydrated by increasing concentrations of ethanol. Samples were dehydrated to a critical point with CO_2 in a desiccant glass BAL-TEC CPD030. Samples were mounted in aluminum sample holders over a conductive carbon strand, and covered with a fine gold layer in an ionizer Denton Vacuum Desk II (Hofstra Group, Ltd. Co; Boston MA, USA). Finally, electron-micrographs of conidia were taken under a scanning electron microscope JEOL JSM-53110 LV (Bozzola and Russell, 1999). Following these procedures, images revealed smooth conidia with a protruding hilum (Figure 1).

For the pathogenicity tests, eight monoconidial fungal isolates were grown on PDA at 24 °C in darkness for 9 days. Three mL of sterile distilled water were added to the colonies and the mycelium with conidia were dislodged from the medium using an inoculation loop; 0.2 mL of the conidial suspensions were evenly distributed over a Petri dish 90 mm in diameter containing PDA medium, and incubated at the same temperature. The

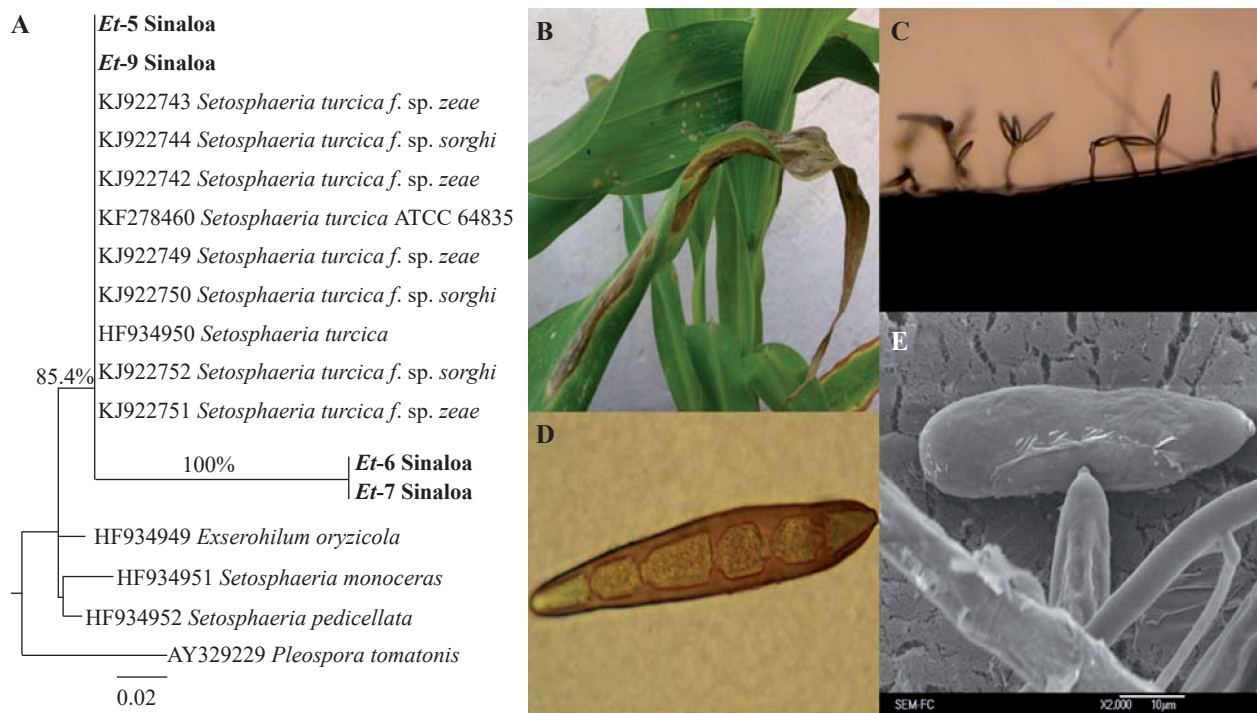


Figura 1. Análisis filogenético de aislados asociados al tizón foliar del maíz de Sinaloa. A) Árbol de verosimilitud (Log likelihood= -1276.64) basado en el traductor interno de espacios (ITS) de cuatro aislados de *Exserohilum* (*Setosphaeria* se refiere al telomorfo of *Exserohilum*). El árbol fue construido con Mega 6.06 (bootstrap = 1000), usando el modelo de sustitución Jukes-Cantor (JC) con sitios invariados (+I). Los aislados caracterizados en este estudio aparecen en negritas. La secuencia correspondiente de *Pleospora tomatonis* fue usada como un grupo externo *Et*=*E. turcicum*. Numero de acésion en la base de datos de las secuencias precede el nombre científico de los organismos. Los valores de bootstrap se muestran como porcentajes. La barra de escala indica le número esperado de sustituciones de aminoácidos.

Morfología de *E. turcicum* del maíz (aislado *Et-2*). B) Lesiones de forma elíptica del tizón foliar del maíz en el híbrido DK-300 inoculado artificialmente con *E. turcicum* en invernadero. C) Mono conidióforo recto o curvo con uno a tres conidios. D) Conidio con forma de mazo, con célula basal protuberante en el punto de conexión. E) Micrografía con microscopio electrónico de barrido de un conidio liso con un hilum protuberante en un cultivo de 8 días en PDA.

Figure 1. Phylogenetic analysis of isolates associated to maize leaf blight from Sinaloa. A) Maximum-likelihood tree (Log likelihood= -1276.64) based on the internal transcribed spacer (ITS) of four *Exserohilum* isolates (*Setosphaeria* refers to the teleomorph of *Exserohilum*). The tree was constructed with Mega 6.06 (bootstrap = 1000), using the Jukes-Cantor (JC) substitution model with invariant sites (+I). The isolates characterized in this study are in boldface. The corresponding sequence of *Pleospora tomatonis* was used as an out group. *Et*=*E. turcicum*. Database accession numbers of the sequences precedes the scientific names of organisms. Bootstrap values are shown as percentages. The scale bar indicates the expected number of amino acid substitutions.

Morphology of *E. turcicum* from maize (isolate *Et-2*). B) Elliptical-shaped lesions of maize leaf blight on maize hybrid DK-300 artificially inoculated with *E. turcicum* in the greenhouse. C) Conidiophore single straight or bent bearing one to three conidia. D) Conidium club-shaped with basal cell swollen at the point of attachment. E) Scanning electron micrograph of a smooth conidium showing a protruding hilum in 8-day culture on PDA.

Las muestras fueron montadas en portaobjetos de aluminio sobre una tira de carbón conductivo y cubiertas con una fina capa de oro en un ionizador

inoculated dishes were sealed with sealing film (Parafilm®) and placed upside down at 24 °C in the dark for 9 days. Conidia were scraped from the

Denton Vacuum Desk II (Hofstra Group, Ltd. Co; Boston MA, USA). Finalmente, se tomaron fotografías de conidios bajo un microscopio electrónico JEOL JSM-53110 LV (Bozzola and Russell, 1999). Mediante estos procedimientos, las imágenes revelaron conidios lisos con un hilum prominente (Figure 1).

Para las pruebas de patogenicidad, se cultivaron ocho aislados monoconidiales del hongo en PDA a 24 °C en la oscuridad por 9 días. Se agregaron tres mL de agua destilada estéril a los cultivos y el micelio y los conidios fueron desprendidos del medio usando un asa bacteriológica; enseguida se distribuyeron 0.2 mL de las suspensiones conidiales sobre una placa de Petri con PDA de un diámetro de 90 mm e incubadas a la misma temperatura. Las placas inoculadas fueron selladas con película selladora (Parafilm®) y colocadas invertidas a 24 °C en la oscuridad por 9 días. Los conidios fueron raspados de la superficie del medio usando una espátula esterilizada y la suspensión de conidios fue filtrada a través de dos capas de malla quesera esterilizada para remover el micelio. Se probó la patogenicidad de ocho aislados fúngicos monoconidiales asociados con el tizón foliar del maíz en el híbrido comercial de maíz DK-3000, que presentó una alta incidencia de la enfermedad en el ciclo agrícola previo. Se ajustó cada suspensión de conidios a una concentración de 2×10^4 conidios/mL con agua destilada estéril y fueron asperjadas sobre cuatro plantas de maíz en estado de desarrollo VS5-6. Las plantas control fueron asperjadas con agua destilada estéril. Después de la inoculación, las plantas fueron colocadas en bolsas de plástico negras para asegurar una humedad relativa (HR) del 100% por 48 h e incubadas a una temperatura de entre 12 y 15 °C. Las plantas inoculadas y las testigo se distribuyeron en un arreglo completamente al azar con cuatro repeticiones (4 macetas 25 x 20 cm, cada una con una planta). Después, las plantas se sometieron

surface of the medium using a sterile spatula and the conidial suspension was filtered through two layers of sterile cheese cloth to remove mycelium. Eight monoconidial fungal isolates associated with maize leaf blight were tested on the maize commercial hybrid DK-3000, which showed high incidence of the disease in the previous growing season. Each conidial suspension was adjusted to a concentration of 2×10^4 conidia/mL with sterile distilled water and sprayed on four maize plants at the VS5-6 developmental stage. Control plants were sprayed with sterile distilled water. After inoculation, plants were placed in black plastic bags to ensure 100% relative humidity (RH) for 48 h and incubated at 12-15 °C. Inoculated and control plants were arranged in a completely randomized block design with four replications (4 pots 25 x 20 cm, each with one plant). Afterwards, plants were subjected to 100% RH for five consecutive days for 12 h daily. The pathogenicity of the isolates was determined 14 days after inoculation, considering the percentage of foliage area diseased (FAD) of plants in the various replications. The experiment was conducted twice in a greenhouse. Greenhouse temperature ranged 8 - 26 °C and 12 - 30 °C in the first and second experiment, respectively. In order to standardize data, percentages of FAD were arcsin transformed. The transformed data were analyzed using ANOVA and the mean separation was achieved following Tukey's test (Little and Hills, 1973). To fulfill Koch's postulates, by the end of the experimental periods, the fungus was isolated from inoculated plants and its identity confirmed using morphological identification of twenty conidia per isolate. All eight isolates of *Et* tested were pathogenic on the maize hybrid DK-3000. Variation in virulence was detected among the isolates. Ten days after inoculation, maize leaves showed typical lesions and blight symptoms similar to those observed under field conditions (Figure 1).

a una HR de 100% por cinco días consecutivos por 12 h al día. La patogenicidad de los aislados fue determinada 14 días después de la inoculación, considerando el porcentaje de área foliar afectada (AFA). El experimento se realizó dos veces en un invernadero. La temperatura del invernadero fluctuó entre 8 y 26 °C, y 12 y 30 °C en el primer y segundo experimento, respectivamente. Para estandarizar los datos, los porcentajes de AFA fueron transformados usando la función de arcoseno. Los datos transformados fueron analizados usando ANOVA y la separación de medias se realizó mediante el procedimiento de Tukey (Little y Hills, 1973). Para cumplir el postulado de Koch, al concluir los de los periodos experimentales, el hongo fue aislado de las plantas inoculadas y su identidad fue confirmada por medio de la identificación morfológica de veinte conidios por aislado. Los ocho aislados de *Et* probados fueron patogénicos en el híbrido de maíz DK-3000. Se detectó variación en virulencia entre los aislados. Diez días después de la inoculación, las hojas de maíz presentaban lesiones típicas y síntomas de tizón foliar similares a los observados en campo (Figura 1). El AFA en las plantas inoculadas varió entre 9.5 y 54.1% y entre 9.0 y 26.9%, con diferencias significativas ($P=0.05$) entre aislados en el primer y segundo experimento, respectivamente. Las plantas control asperjadas con agua destilada estéril permanecieron asintomáticas a lo largo del estudio.

Para la caracterización molecular, la región ITS rDNA fue amplificada usando los primers universales ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). La PCR se realizó en un volumen de 25 µL con un template de ADN de 1 ng, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM de cada dNTP, 0.4 µM de cebadores sentido y anti-sentido y 1 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Brazil, Cat. No. 11615-050). El termociclador se programó para la desnaturalización inicial a 95 °C

FAD in inoculated plants varied from 9.5 to 54.1% and from 9.0 to 26.9%, with significant differences ($P=0.05$) among isolates, in the first and second experiment, respectively. Control plants sprayed with sterile distilled water remained asymptomatic during the study.

For molecular characterization, the ITS rDNA region was amplified using the universal primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). PCR was performed in a 25 µL volume containing 1 ng DNA template, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM of each dNTP, 0.4 µM of forward and reverse primers, and 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil, Cat. No. 11615-050). The thermocycler was programmed for initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C, annealing at 54 °C, extension at 72 °C, each for 1 min and a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis (1% w/v in 0.5 X TAE) and visualized by ethidium bromide staining. PCR products were purified using the QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Cat. No. 28106) and quantified using a Nanodrop 2000. PCR products were sequenced in both directions with an ABI 3730XL sequencer (Applied Biosystems, USA). Sequences were edited in CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) and compared to sequences in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) using the BLAST-N software and the Megablast algorithm. All sequences were deposited in GenBank under the following accession numbers KT253948-KT253952. MEGA 6.06 was used for alignment and phylogenetic analysis. Sequences were aligned together with reference sequences of *Exherohilum/Setosphaeria* species (Tang *et al.*, 2015), using the MUSCLE alignment program. Multiple alignments were subjected to a DNA substitution model analysis in MEGA, to select

por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C, anillado a 54 °C, extensión a 72 °C, cada uno por 1 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (1% w/v en 0.5 X TAE) y visualizados por tinción de bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron purificados con el equipo de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Cat. No. 28106) y cuantificados usando un Nanodrop 2000. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambas direcciones con un secuenciador ABI 3730XL (Applied Biosystems, USA). Las secuencias fueron editadas en CHROMAS Pro 1.6 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) y comparados con las secuencias en el NCBI (Centro Nacional para la Investigación Biotecnológica) usando el software BLAST-N y el algoritmo Megablast. Todas las secuencias fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso KT253948-KT253952. Para la alineación y el análisis filogenético se usó el MEGA 6.06. Las secuencias fueron alineadas con las secuencias de referencia de especies *Exherohilum/Setosphaeria* (Tang *et al.*, 2015), usando el programa de alineación MUSCLE. Múltiples alineaciones fueron sujetas a un análisis de modelo de sustitución de ADN en MEGA para seleccionar el modelo que mejor se ajustara a los datos. Se creó un árbol filogenético usando el modelo Jukes-Cantor (JC) y el modelo de verosimilitud (ML). La variación de la tasa entre sitios fue modelado por una proporción de sitios invariantes (I). El apoyo de la topología del árbol fue evaluado por 1000 réplicas bootstrap.

Secuencias de *S. turcica* (teleomorfo de *Et*) y de diferentes especies de *Setosphaeria/Exserohilum* (*E. oryzae*, *S. monoceras*, *S. pedicellata*) fueron usadas para llevar a cabo el análisis filogenético. Las secuencias de *S. turcica* incluyeron aislados obtenidos del maíz (HF934950, KF278460; secuencia del cultivo de referencia, ATCC64835), algunos de éstos fueron identificados como *formae*

the model that best fits the data. A phylogenetic tree was constructed using the Jukes-Cantor (JC) model and the maximum likelihood (ML) method. The rate variation among sites was modeled by a proportion of invariant sites (I). Tree topology support was assessed by 1 000 bootstrap replicates.

Sequences from *S. turcica* (teleomorph of *Et*) and from different species of *Setosphaeria/Exserohilum* (*E. oryzae*, *S. monoceras*, *S. pedicellata*) were used to conduct the phylogenetic analysis. *S. turcica* sequences included isolates obtained from maize (HF934950, KF278460; reference culture sequence, ATCC64835), some of these identified as *formae specialis zaeae* (all KJ Genbank numbers except for KJ922752) and from sorghum identified as *formae specialis sorghi* (KJ922752) (Tang *et al.*, 2015). The maximum likelihood phylogenetic tree generated with the ITS rDNA sequences showed that the isolates from Sinaloa are closely related to *S. turcica* sequences obtained from maize and sorghum (Tang *et al.*, 2015). These sequences are clearly separated from other *Exherohilum/Setosphaeria* species (Figure 1). Isolates *Et-6* and *Et-7* were different from the rest of *Et* sequences included, but still grouped within *S. turcica*.

Cultural and morphometric characteristics of conidia, colony morphology, and sequencing of the ITS rDNA region of the anamorph indicated that *E. turcicum* [(Pass.) (Leonard and Suggs)] (syn. *Helminthosporium turcicum* Pass.) is the causal agent of the maize leaf blight in Sinaloa, as reported in other maize growing areas in the world (Shi *et al.*, 2017). The analysis performed does not allow to discriminate at the *formae specialis* level. Recent studies have demonstrated the utility of universally primed polymerase chain reaction (UP-PCR) technology to characterize the genetic diversity and phylogenetic relationships among the *formae specialis* of *Et* (Tang *et al.*, 2015). In future, this approach would be useful in the process of discriminating the existence of *formae specialis* in Sinaloa.

specialis zae (todos los números KJ Genbank excepto por KJ922752) y de sorgo identificadas como *formae specialis sorghi* (KJ922752) (Tang *et al.*, 2015). El árbol filogenético de verosimilitud generado con las secuencias ITS rDNA demostraron que los aislados de Sinaloa guardan estrecha relación con secuencias de *S. turcica* obtenidas de maíz y sorgo (Tang *et al.*, 2015). Estas secuencias están claramente separadas de otras especies *Exherohilum/Setosphaeria* (Figura 1). Los aislados *Et-6* y *Et-7* fueron diferentes del resto de las secuencias *Et* incluidas, aunque igualmente agrupadas dentro de *S. turcica*.

Las características de las colonias y la morfometría de los conidios, y la secuenciación de la región ITS rDNA del anomorfo indicaron que *E. turcicum* [(Pass.) (Leonard y Suggs)] (syn. *Helminthosporium turcicum* Pass.) es el agente causal del tizón foliar del maíz en Sinaloa, tal como se ha reportado en otras áreas productoras de maíz del mundo (Shi *et al.*, 2017). El análisis llevado a cabo no permite discriminar al nivel del *formae specialis*. Estudios recientes han demostrado la utilidad de la reacción en cadena de polimerasa cebada universalmente (UP-PCR) para caracterizar la diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre los *formae specialis* de *Et* (Tang *et al.*, 2015). En el futuro, este enfoque será útil en el proceso de discriminación de la existencia de *formae specialis* en Sinaloa.

La severidad del tizón foliar de maíz fue evaluado en 115 parcelas comerciales que variaban desde el estado de espigamiento hasta grano masoso en los municipios de Ahome y El Fuerte, Sinaloa en la temporada de cultivo 2013-2014. Las parcelas inspeccionadas iban desde las 10 hasta las 50 ha. Cada parcela fue muestreada en las 4 esquinas y en el centro para la severidad de la enfermedad; diez plantas fueron extraídas de cada punto de muestreo y una hoja fue tomada al azar de las plantas, para un total de 150 hojas por cada parcela. El porcentaje

The severity of maize leaf blight was assessed in 115 commercial fields ranging from tasseling through kernel dough stage in the municipalities of Ahome and El Fuerte, Sinaloa in the 2013-2014 growing season. The fields inspected ranged from 10 to 50 ha. Each field was sampled in the 4 corners and the center for disease severity; ten plants were taken from each sampling point and one leaf was taken randomly from the plants totaling 150 leaves per field. The average percentage of foliar area diseased (FAD) was determined using a scale ranging 0-4, where 0=No detectable lesion, 1=a few lesions on the leaves ($\leq 5\%$), 2= several small and large lesions on many leaves (5.1-10%), 3=lesions on many leaves (10.1-15%), 4=many enlarged lesions (15.1-20%) Ten symptomatic leaves from each field were placed in an ice chest (8-10 °C) and taken to the laboratory to determine whether *E. turcicum* was associated to the disease. The presence of the fungus on symptomatic tissue was confirmed by the observation of conidia under the stereo and compound microscopes.

The disease severity, reflected as percent FAD, varied according to hybrids and locations. Hybrid P3254W showed the highest disease severity, particularly in the sectors of Despensa-Bolsa de Tosalibampo No. 2, Olas Altas-Bachomobampo, San Isidro-Grullas Derecha, Ahome-Grullas Izquierda and Concheros-9 de Diciembre, with percentage FAD of 17.3, 13.3, 9.0, 7.6 and 3.5%, respectively. The same hybrid presented a reduced disease severity in sectors Aguila Azteca-El Guayabo, El Fuerte, 5 de Mayo-Sufragio, Santa Rosa-Los Tercos with AFA of 3.2, 0.8, 0.4, 0.0 %, respectively. Hybrids XR56 and Máximo exhibited AFA of 11.0% in sector Olas Altas-Bachomobampo. Where hybrid P3254W presented highest disease severity. The hybrids DK 2030, Sultán, Gorila, DK.2038, N1R01, P3254W, XR47, Garañón, MN1078, Caribú, DK3000, Máximo, DK

promedio de área foliar afectada (AFA) fue determinado usando una escala del 0 al 4, donde 0= ninguna lesión detectable, 1= algunas lesiones en las hojas ($\leq 5\%$), 2= varias lesiones pequeñas y grandes en muchas hojas (5.1-10%), 3= lesiones en muchas hojas (10.1-15%), 4= muchas lesiones grandes (15.1-20%). Diez hojas sintomáticas de cada parcela fueron colocadas en una hielera (8-10 °C) y llevadas al laboratorio para determinar si *E. turcicum* estaba asociada a la enfermedad. La presencia del hongo en tejido sintomático fue confirmada por la observación de conidios bajo el microscopio estereoscópico y compuesto.

La severidad de la enfermedad, reflejada como porcentaje de AFA, varió con los híbridos y las ubicaciones. El híbrido P3254W presentó la severidad más alta, particularmente en los sectores de Despensa-Bolsa de Tosalibampo No. 2, Olas Altas-Bachomobampo, San Isidro-Grullas Derecha, Ahome-Grullas Izquierda y Concheros-9 de Diciembre, con porcentajes de AFA de 17.3, 13.3, 9.0, 7.6 y 3.5%, respectivamente. El mismo híbrido presentó una severidad reducida de la enfermedad en los sectores Águila Azteca-El Guayabo, El Fuerte, 5 de Mayo-Sufragio, Santa Rosa-Los Tercos con un AFA de 3.2, 0.8, 0.4, 0.0 %, respectivamente. Los híbridos XR56 y Máximo presentaron un AFA de 11.0% en el sector Olas Altas-Bachomobampo, donde el híbrido P3254W presentó la mayor severidad. Los híbridos DK 2030, Sultán, Gorila, DK.2038, N1R01, P3254W, XR47, Garañón, MN1078, Caribú, DK3000, Máximo, DK 2036, Máximo y DS2301 presentaron un porcentaje promedio de AFA de entre 0.0 y 4.6 %. Los episodios diarios acumulados, en horas, con la humedad relativa (HR) $\geq 90\%$ en el sector Despensa-Bolsa de Tosalibampo No2 del 16 de diciembre de 2013 al 1 de enero de 2014, donde el híbrido P3254W mostró la mayor severidad de tizón foliar, alcanzó las 317 hr mientras que en el sector 5, de Mayo-Sufragio,

2036, Máximo and DS2301 exhibited an average percentage FAD ranging from 0.0 to 4.6% of AFA. The accumulated daily episodes, in hours, with relative humidity (RH) $\geq 90\%$ in sector Despensa-Bolsa de Tosalibampo No2 from December 16, 2013, through January 01, 2014, where the hybrid P3254W showed the highest severity of foliar blight, reached 317 hr, while in sector 5, de Mayo-Sufragio such time periods were of 184 hr and the same hybrid showed 0.4% FAD. In general, a gradual decrement of maize blight was observed, regardless of the hybrid, as distance from the shoreline and elevation increased, from 4 to 100 km and from 0 to 80 masl, respectively.

CONCLUSIONS

The identity of *E. turcicum*, consistently associated to the maize leaf blight disease in Sinaloa, was confirmed by morphometric measurements of conidia, colony morphology, molecular techniques and pathogenicity tests. The present study establishes the starting point for future research dealing with the pathogenic variation of *Et* which is crucial in breeding programs to obtain resistant maize hybrids for the management of the disease.

The high dependence of the pathogen with high relative humidity was evident since the severity of the disease in the most susceptible hybrid was conspicuous in sectors with prolonged periods of relative humidity $\geq 90\%$, but decreased with the decrements of periods with lower humidities.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

dichos periodos de fueron de 184 hr y el mismo híbrido presentó un AFA de 0.4%. En general, se observó una reducción gradual de tizón foliar del

maíz, independientemente del híbrido a medida que aumentaba la distancia a partir de la costa y la elevación de 4 a 100 km y de 0 a 80 msnm, respectivamente.

## CONCLUSIONES

La identidad de *E. turcicum*, consistentemente asociado al tizón foliar del maíz en Sinaloa, fue confirmado mediante medidas morfométricas de los conidios, morfología de las colonias, técnicas moleculares y pruebas de patogenicidad. El presente estudio establece el punto de partida para investigaciones futuras orientadas a la variación patogénica de *Et*, que es fundamental en programas de mejoramiento para obtener híbridos de maíz resistentes para el manejo de la enfermedad.

La alta dependencia del patógeno de la humedad relativa alta fue evidente, ya que la severidad de la enfermedad en el híbrido más susceptible fue

conspicuo en sectores con periodos prolongados de humedad relativa  $\geq 90\%$ , aunque se redujo paralelamente con la reducción de periodos con humedad relativa a dichos niveles.

## LITERATURA CITADA

- Bozzola JJ and Russell LD. 1999. Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists. Jones and Bartlett Publishers. London, UK. 670 p.
- Dhingra OD and Sinclair JB. 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. 355p.
- Little TM and Hills FJ. 1973. Agricultural Experimentation and Analysis. John Wiley and Sons, New York, USA. 350p.
- Shi NN, Du YX, Ruann HC, Yang XJ, Dai YL, Gan L, Chen FR and Liu XZ. 2017. First report of northern corn leaf blight caused by *Setosphaeria turcica* on Corn (*Zea mays*) in Fujian Province, China. Plant Disease 101:831. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-0942-PDN>
- Tang L, Gao ZG, Yao Y and Liu X. 2015. Identification and genetic diversity of formae speciales of *Setosphaeria turcica* in China. Plant Disease 99:482-487. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0570-RE>