

Araştırma Makalesi
(Research Article)

Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 2018, 55 (2):221-227

DOI:10.20289/zfdergi.372079

Asuman SAĞLAM¹
Necip TOSUN²

Sap ve Koçan Çürüklüğü Etmeni *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton'in Mısır (*Zea mays* L.) Danesinden Real-Time PCR Yöntemi ile Tanısı

Determination of Stalk and Ear Rot Pathogen *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton by Real-Time PCR on Corn (*Zea mays* L.) Kernels

¹ İzmir Ziraat Karantina Müdürlüğü, 35230, İzmir / Türkiye

² Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35100, İzmir / Türkiye

sorumlu yazar: asumanergun@hotmail.com

Alınış (Received): 27.12. 2017

Kabul tarihi (Accepted): 07.02.2018

Anahtar Sözcükler:

Stenocarpella maydis, bitki karantinası, RT- PCR, mısır, çürüklük, dane

Key Words:

Stenocarpella maydis, Plant quarantine, RT- PCR, corn, rot, kernel

ÖZET

Mısrıda fide yanıklığı ve koçan çürüklüğüne sebep olan fungal etmen *Stenocarpella maydis* Afrika, Amerika, Asya ve İtalya, Fransa, Portekiz gibi birçok Avrupa ülkesinde yayılım halinde olup ülkemizde henüz varlığı bilinmemektedir. Sağlıklı tohum kullanımının hastalıkla mücadelede en önemli strateji olduğu etmen için tek zorluk tohumdan güvenilir ve hızlı tanıyı sağlayacak bir metodun varlığıdır. Bu yıkıcı hastalığın tanısında polimeraz zincir reaksiyon 'PCR' temelli yöntemler etmenin ekim öncesi tespitini sağlamakta, fungusit ile mücadelesi mümkün olmayan etmenin yerleşim ve yayılımını önlemektedir. Bu amaçla yürütülen bu çalışma ile Bitki Karantinası Yönetmeliği EK2/A listesinde yer alan ülkemizde varlığı bilinmeyen fungal patojen *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton'e ait izolatanın Real-time PCR yöntemi ile tanısına dair metod validasyonu gerçekleştirilmiş olup hazırlanan protokol ile çeşitli özel ve resmi araştırma kuruluşlarının çalışmalarına katkı sağlanması, böylece etmenin ülkemize girişi, yerleşim ve yayılımının önlenmesi hedeflenmiştir.

ABSTRACT

As a fungal pathogen *Stenocarpella maydis* which leads to seedling blight and ear rot in maize is common in Africa, America, Asia and in many European countries such as Italy, France and Portugal whereas its existence has not been known in our country, yet. The only hardship for the pathogen in which the usage of healthy seed is the most significant strategy in struggling with the disease is the existence of a method that is able to provide a reliable and rapid diagnosis of the seed. The methods derived from Polymerase chain reaction, PCR, provide the determination of the pathogen before sowing, prevent inhabiting and spread of the pathogen. With this study which is carried out with this aim, the method validation concerning the determination of the isolate which is applied with the real-time PCR method and belongs to the fungal pathogen *Stenocarpella maydis* which takes part in EK2/A list of Plant Quarantine Regulation and is unknown in our country has been implemented. Besides, with the protocol which has been prepared, contribution to the studies of various private and official research institutions has been intended, in this way, preventing the entrance, inhabiting and spread of the pathogen has been aimed.

GİRİŞ

Mısır; kullanım alanlarının artışıyla önemi günden güne artan bir bitkidir. Önceden sadece insan ve hayvan beslenmesi için düşünülen mısır danesi, kompozisyonunda taşıdığı besin maddeleriyle nişasta bazı şeker sanayinin, bitkisel yağ sanayinin ve biyodizel yakıt üretiminde hammadde olmuştur. Artık mısırı bir tahıl olarak değil, endüstri bitkisi olarak da düşünmemiz gerekmektedir.

Stenocarpella macrospora (Earle) B. Sutton ve *S. maydis* (Berk.) B. Sutton, dünyada mısrıda enfeksiyon yapan iki *Stenocarpella* türüdür (Crous et.al., 2006; Earle, 1987; Sutton, and Waterston, 1966a; Sutton and Waterston, 1966b). Heriki tür de mısrıda sap, koçan çürüklüğü ve yaprak lekesine neden olmaktadır (Vincelli, 1997). *S. maydis* dünyadaki en dayanıklı ve önemli koçan çürüklüğü patojeni olarak tanımlanmaktadır (Rossouw et.al., 2009). *S. macrospora* ise tropik ve subtropik

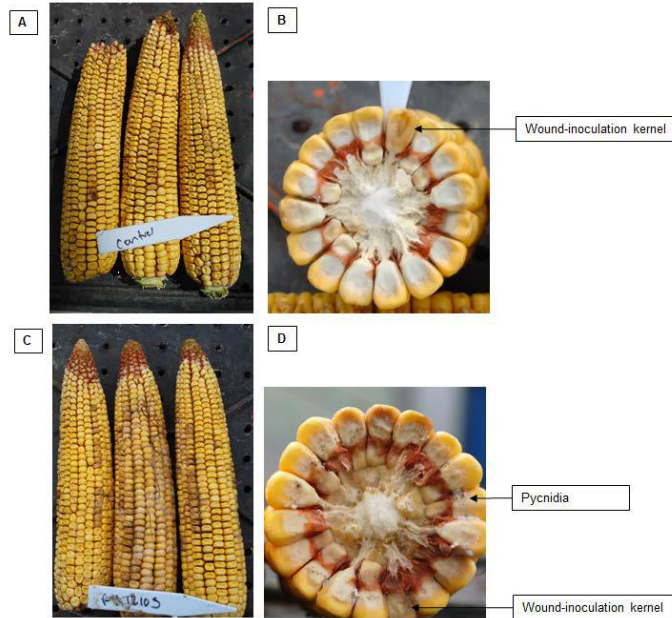
bölgelerde ve özellikle Amerika'da önem teşkil etmektedir (White, 1999). FAO kayıtlarına göre Afrika'da 10 milyon ton mısır kaybına yol açan *Stenocarpella* türleri ile enfekteli mısır tohumları sap, koçan çürüklüğü ve yaprak lekeli hastalıklarına ait makrosporların girişi ve yayılımını sağlayan önemli bir inokulum kaynağıdır. CIMMYT (2004)'e göre ise *Stenocarpella maydis* ile bulaşık tohum ekiminde çimlenme aşamasında üründe % 37 oranında bir kayıp söz konusu olmaktadır.

Ülkemizde varlığı bilinmeyen fungal patojen *Stenocarpella maydis* ile bulaşık fideler kahverengi renkte gelişmekte, skutellum ve koleoptil arasındaki internodda kortikal lezyonlar görülmekte, ikincil kökler sık sık yok olmaktadır. Sapdaki belirtiler püsküllerin oluşmasından birkaç hafta sonrasına kadar görülmemekte, genellikle kök infeksiyonunu takiben

görülmemekte ve 1-10 cm uzunluğunda oval, düzensiz, koyu kahverengi sınırlarla çevrili, merkezi soluk krem-kahverenkli lekeler belirlemektedir. İnfeksiyonun püskül oluşumundan 2 hafta sonra başlaması durumunda tüm koçan yeşilimsi-kahverengi renk almakta, tamamıyla çürüyüp yanmaktadır (OEPP/EPPO, 2006.). Ürün kaybı sap çürüklüğü (Şekil 1) şeklinde başlayıp ilerleyen dönemlerde koçan çürüklüğü şeklinde görülmekte olup (Şekil 2,3) bölgelere göre sap veya koçan çürüklüğü görülme yoğunluğu değişmektedir. Kansas'da yürütülen çalışmalarda koçan çürüklüğünün sap çürüklüğüne göre daha yoğun görüldüğü rapor edilmiştir (Grabow, 2017). Bitki patojeni olmasının yanı sıra ürettiği toksin koyun ve keçilerde sinir sisteminde rahatsızlıklara tavuk ve kazlarda ise akut toksisiteye neden olmaktadır (Kellerman et al., 1985,1991; Rabie et al., 1987).



Şekil 1. Diplodia sap çürüklüğü belirtisi (Anonymous 2017; Grabow, 2017)
Figure 1. Symptoms of Diplodia stalk rot



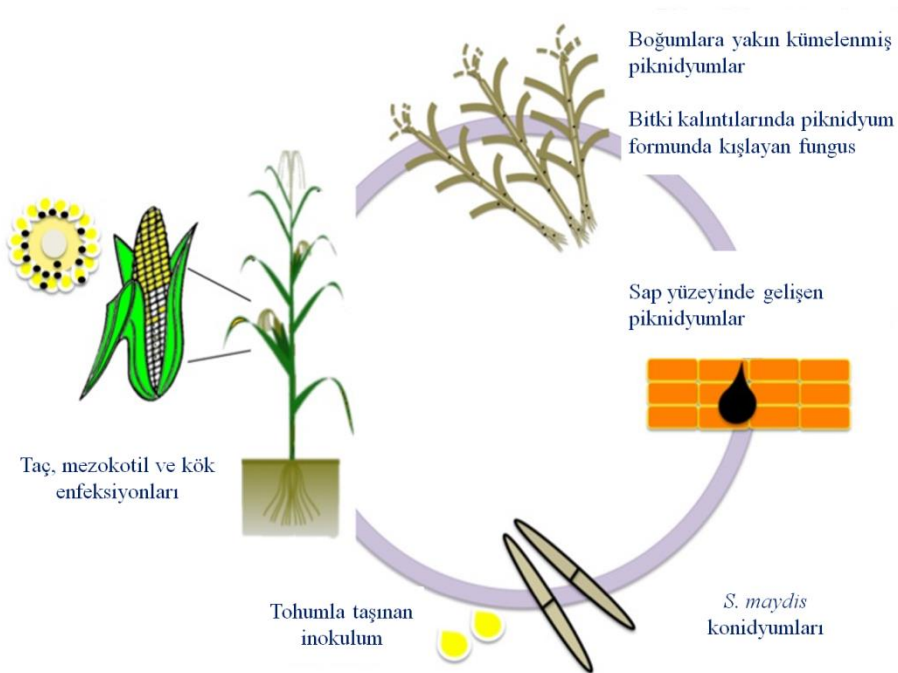
Şekil 2. Kontrol ve hastalıklı koçandaki belirti (Agronomy Center of Research and Education (ACRE) in Tippecanoe County, IN çalışmasından; Luna, 2016).
Figure 2. Control and infected kernel



Şekil 3 Danede zarar yapan *Diplodia* koçan çürüklüğü belirtisi (Grabow,2017)
Figure 3. Symptoms of *Diplodia* ear rot damage to kernels

Mısırın tek konukçusu olduğu etmenin piknidyumları vejetasyon döneminde bitki kalıntılarında canlı kalmakta spor üreterek yüksek nemli ortamlarda yayılmaktadır (Şekil 4) Konidyumlar mısır kalıntısından gelişmekte olan bitkiye sıçramakta koçan enfeksiyonları tozlaşma döneminde seyreden yağışlarda yaygın olarak görülmektedir. Enfeksiyon kök ve taç dokusunda meydana gelmektedir. Püskül oluşumundan iki hafta

önce veya sonra ortaya çıkan hastalığın koçan çürüklüğü formu kurudan ılık, nemli hava koşullarına geçişlerde (26-30°C) aktif durumdadır. Hastalık toprağın az sürüldüğü ve devamlı üretim yapılan yerlerde şiddetli seyretmektedir. Aşırı veya az gübreleme, aşırı bitki popülasyonu, böcek, hastalık veya hava koşullarından kaynaklı yara oluşumları hastalığa davetiye çıkarmaktadır (Grabow, 2017).



Şekil 4. *Stenocarpella maydis* yaşam döngüsü (Cervantes ve ark., 2016)
Figure 4. Life cycle of *Stenocarpella maydis*

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Denemede American Type Culture Collection (ATCC)' dan temin edilen *Stenocarpella maydis* (ATCC® 10235™) izolatu 'CBS 187.55, IFO 6115, IZ 193, NRRL 13608' ırkı kullanılmıştır. Karantina etmeni *S. maydis* tanısı için Fransa'dan ithal edilen üç lot mısır örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışma süresince, İzmir

Zirai Karantina Müdürlüğü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yer alan cihaz ve ekipmanlar kullanılmıştır. PCR temelli çalışmalarda Microsynth firması tarafından sentezlenen MAYDIS 1 ve Altigenbio Life Science firması tarafından sentezlenen MAYDIS 2 primer setleri ile çalışılmıştır. PCR analizi için sentezlenen primerlerin nükleotid dizilimleri ve bant büyüklükleri Çizelge 1' de verilmektedir.

Çizelge 1. *S. maydis* tanısı için sentezlenen primer setleri

Table 1. Sequences of the primer sets used for the detection of *S. maydis*

Primer	Baz Dizilimi (5'3')	Uzunluk	Bant Büyüklüğü
MAYDIS 1F	5'-GTTTCATGACCTGCTCACG-3'	20	
MAYDIS 1 R	5'-TGTTGCTCGGTTTCAGGCTTG-3'	21	221bp
Prob	5'-CGC7ACTG7GACCGC7C7T		
MAYDIS 2 F	5'- ACATTCTGGGCGGTTCC -3'	18	77bp
MAYDIS 2 R	5'-GGTAGTTCGGCAGCTAAGAGC -3'	21	
Prob	Probe upl 123		

Yöntem

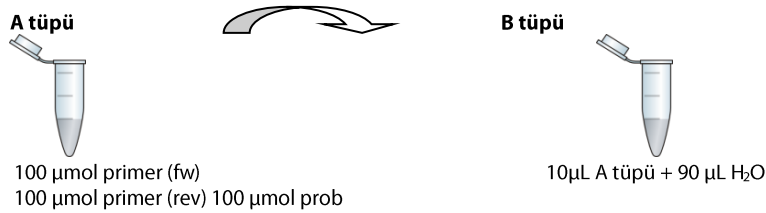
Mısır tohumlarından izolasyonların gerçekleştirilmesi

Fransa'dan ithal edilen üç farklı partiden alınan ve İzmir Zirai Karantina Müdürlüğüne karantina etmeni *S. maydis* tanısı için gönderilen mısır daneleri 3 dakikalık süre ile % 0.05'lik sodyum hipokloritten geçirilmiş, yüzey dezenfeksiyonuna tabii tutulan daneler 2 defa steril saf sudan geçirildikten sonra steril kurutma kağıtlarında 30 dk süre ile kurutulmuştur. İzolasyon işlemi için besi ortamı olarak hazır PDA kullanılmıştır. Ortamda bakteri üremesine engel olmak için PDA nın petrolere dökülmesinden hemen önce 1 litrelik hacime 100 mg. streptomisin sülfat eklenerek ortama homojen olarak karışması sağlanmıştır. Petri kaplarına her birine ortalama 10 adet mısır danesi gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Petri kapları +22°C'de inkübatöre konularak 10 günlük sürede gelişmeleri sağlanmıştır.

İnkübasyon dönemi sonunda *S. maydis* koloni gelişimi açısından makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiş ve temiz bulunmuştur. Örnekler+4 °C'deki buzdolabında muhafaza altına alınmıştır.

DNA izolasyonu protokolü

ATCC'den temin edilen *Stenocarpella maydis* (10235™) izolatından ve seçici besiyerine ekim sonucunda *S. maydis*'den ari olduğu tespit edilen 3 adet mısır tohumundan DNA izolasyonu Roche High Pure PCR Template Preparation Kit versiyon 20 standardına göre gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu sırasında izolasyon solüsyonlarını ve ortamdan kaynaklı bulaşmayı kontrol için negatif kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Elde edilen DNA'lar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. İzole edilen DNA reaksiyon başına en fazla 10 pmol/µL olacak şekilde seyreltilmiştir. Dilüsyon işlemi Şekil 5'de şematize edilmiştir.



Şekil 5. Primer ara stoklarının hazırlanması
Figure 5. Preparation primer stock solution

Gerçek zamanlı (Real-time) PCR çalışmaları

Real-time PCR DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan popüler bir metottür. Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir.

PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda "kinetik PCR", "homojen

PCR", "kantitatif Real-time PCR" gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (Günel,2007).

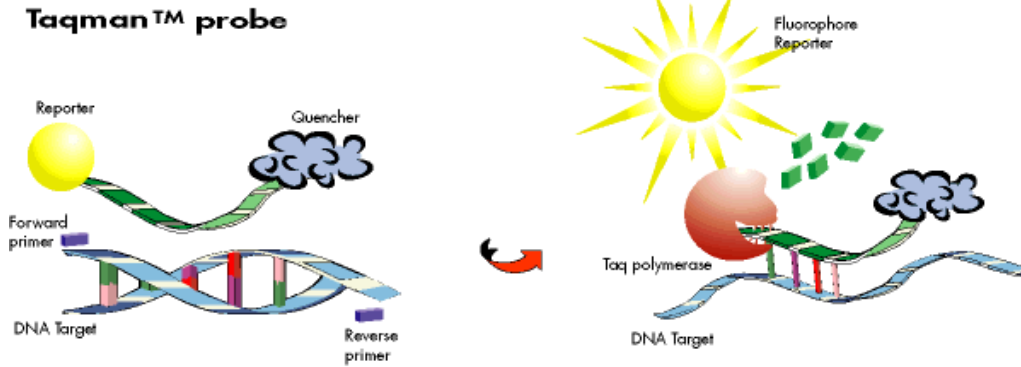
Real Time PCR'da çeşitli floresan teknikler kullanılmaktadır. Bunlar SYBR Green, hibridizasyon probu, hidroliz probu, simple prob vb. gibi tekniklerdir (Külen ve ark., 2011). Çalışmada DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge olduğu için bu bölgenin saptanmasında 5" ve 3" uçlarından florokrom maddelerle işaretli proplar kullanılmıştır. Bu tekniğe göre 3" uçtaki baskılayıcı florokrom (TAMRA) boyası 5" uçtaki raportör florokrom (FAM) boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında "Taq Man" proplar bağlanmaktadır. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlamakta, Probu bağlı olduğu bölgeye geldiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5"-3" nükleaz aktivitesi ile raportör florokrom probdan ayırmaktadır. Serbest hale

geçen FAM sinyal oluşturmakta ve her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam etmektedir (Karakütük, 2017) (Şekil 6).

Çalışmada incelenecek fungal etmene özgü hazırlanan iki primer seti ile yapılan gerçek zamanlı PCR'a ait reaksiyon hazırlama protokolleri Çizelge 2'de verilmektedir.

Plate'in her bir kuyucuğuna yerleştirilen PCR ürünleri, Light Cyclers® 480 II cihazında başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 10 dk, takiben 95°C'de 10 sn, 56°C'de 20 sn (MAYDIS 1 primer seti için), 56°C'de 30 sn (MAYDIS 2 primer seti için) ve 72°C'de 1 sn toplam 45 döngüde çalıştırılmış final inkubasyonu 40 °C'de 30 sn'de gerçekleştirilmiştir.

Roche Diagnostics LightCycler 480 Probes Master seti kullanılarak yapılan analizlerde, pozitif izolat için A1, B1,C1 ve D1 kuyucukları, mısır örnekleri için E1, F1, G1 kuyucukları, negatif kontrol için H1, H2 kuyucukları kullanılmıştır. Veriler cihaza entegre software ile incelenerek fungal patojenlerin varlığı analiz edilmiştir.



Şekil 6. TaqMan probe çalışma sistemi (Anonymous, 2017)
Figure 6. TaqMan probe working principle

Çizelge 2. Real-time PCR çalışma protokolü

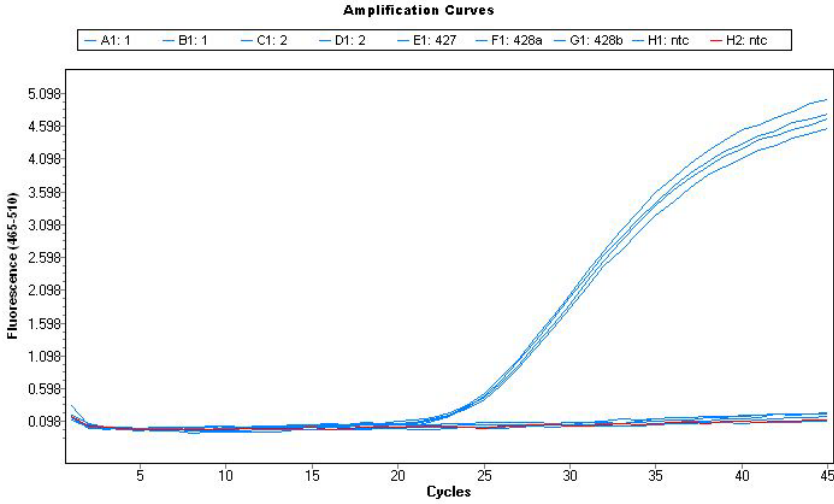
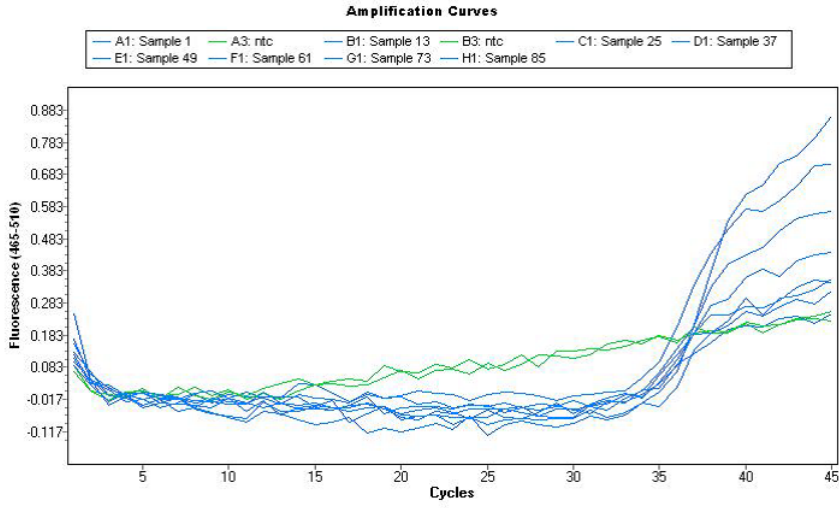
Table 2. Real-time PCR working principle

Ana karışım	MAYDIS1 primer çifti	MAYDIS2 primer çifti
Probes Master Karışımı	10µl	10µl
Forward primer (10 µmol)	1 µl	1 µl
Reverse primer (10 µmol)	1 µl	1 µl
Prob (10 µmol)	0.4µl	0.5 µl
DNA	5 µl	5µl
H2O	3.6µl	2.5µl
Toplam hacim	21 µl	20 µl

ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışma bulgularına baktığımızda Maydis 1 ve Maydis 2 primer setleri ile *Stenocarpella maydis*'in varlığının tespit edildiğini görmekteyiz. Maydis 1 primer setinin 30. döngü itibari ile reaksiyona girdiği, Maydis 2 primer setinin ise yirincinci

döngüde reaksiyonda olduğunu görmekteyiz. Seçici besiyerine ekim neticesinde negatif olduğu belirlenen ve çalışmaya dahil edilen mısır tohumu DNA'larında ise herhangi bir bulaşma görülmemektedir. Çoğalma eğrilerine dair sonuçlar Şekil 7 ve 8'de verilmektedir.



SONUÇ ve TARTIŞMA

Mısırdaki sap ve koçan çürüklüğü etmeni *Stenocarpella maydis*'in tanılmasında besiyerine ekim, Real-time PCR ve konvansiyonel PCR yöntemleri kullanılmaktadır. Normal koşullarda fungal enfeksiyonun ve etmenin tanısı üretim alanlarında rutin olarak yürütülen görsel inspeksiyon veya konvansiyonel mikrobiyolojik metodlar ile gerçekleştirilmektedir. Ancak fungusun gelişimi mısır danesi ile sınırlı olmadığı için görsel inspeksiyonlar enfeksiyon seviyesini belirlemek açısından yeterli değildir. Diğer taraftan konvansiyonel metod mısır danelerinin seçici besiyerine ekilip 7 ile 14 periyodunda inkubasyonuna dayanmakta, morfolojik tanı konusunda uzman mikologlar tarafından yapılabilmektedir. Bu durum tanı aşamasının maliyetli

olmasına ve uzun sürmesine neden olmaktadır. Bu aşamada hızlı ve güvenilir bir tanı metoduna ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda RT-PCR yöntemi ile *S. maydis* tanısı çalışmamızda temel çıkış noktası olmuştur.

Dünyada bu konuda yürütülen çalışmalara baktığımızda Barros ve ark.,(2008) etmene özgü üç spesifik primer ile *S. maydis*'in mısırdaki RT-PCR ile çoğaltılmasını gerçekleştirdiğini görmekteyiz. Eşit oranda çoğalmı elde edilmiş olup metodun uygulanabilirliğini ortaya koymuşlardır. Brezilya tohum sertifikasyon programı önceliğinde yer almakta olan *Stenocarpella* türlerinin tanısı konusunda yoğun çalışmalarda bulunan Barrocas et. al. (2012), *S. maydis*'in PCR tekniği ile tespitinde yöntemin duyarlılığını sorgulamışlardır. Çalışma sonucunda

nemli hücre veya PDA besiyerine ekim ve inkubasyona dayanan biyolojik metodlar ile tanıya göre PCR yöntemi ile ümitvar sonuç elde etmişlerdir. Çalışmada kullandıkları üç farklı primer çifti arasında P1/P2 primerlerin duyarlılığını yüksek bulmuşlardır. Romero and Wise (2015) yürüttükleri çalışmada ise 18-20 nükleotid uzunluğunda primerler ile *S. maydis* ve *S. macrospora*'nın dünyada ilk kez multiplex PCR ile tanısını gerçekleştirmişlerdir.

Dünyada yürütülen araştırmalara paralel olarak ülkemizde ilk kez gerçekleştirilen bu çalışmada RT-PCR

yöntemi dahilinde TaqMan probe sistemi ile *Stenocarpella maydis*'in varlığının tespit edilebilirliği ortaya konulmuştur. Çalışma için sözkonusu türe özel sentezlenen iki primer ve prob çifti ile yöntemin hem geçerliliği hem de primerlerin duyarlılığı belirlenmiştir. Heriki primer çiftinin uygulanabilirliği ancak MAYDIS 2 primer çiftinin çalışmada daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak 7 ile 14 gün süren maliyete ve tecrübeye dayalı tanı yöntemi 1 gün gibi bir süre içerisinde şüphe ve soru işaretlerine mahal vermeden gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonymous 2017. <http://www.biogene.com/Application/notes/Amplification> Erişim: Kasım 2017.
- Barrocas, E.N., Machado, J.C., Almeida, M.G., Botelho, L.S and Pinho, E.V. 2012. Sensibility of the PCR technique in the detection of *Stenocarpella* sp. associated with maize seeds. *Revista Brasileira De Sementes*, vol 34, no 2., p.218-224.
- Barros, E., Crampton, M., Marais, G., Lezar, S. 2008. CSIR-Biosciences. A dna-based method to quantify *Stenocarpella maydis* in maize. *Maydica* 53 (2008): 125-129.
- Cervantes, A.J., Dominguez, E.M.H., Tellez, M.T., Gonzalez, V.M., Flores, Y.M and Gerardo Godinez, G.D. 2016. *Stenocarpella maydis* and *Sporisorium reilianum* Two Pathogenic Fungi of Maize. ISBN 978-953-51-2393-4, Print ISBN 978-953-51-2394-1, DOI: 10.5772/62662.
- CIMMYT. 2004. Maize Diseases, A guide for Field Identification. 4th Edition. 4th Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Stud. Mycol.* 55:235-253.
- Earle, F.S. 1897. New species of fungi imperfecti from Alabama. *Bull. Torrey bot. Club.* 24:28-32.
- Grabow, B. 2017. Diplodia talk and ear rot. <http://www.plantpath.kstate.edu/extension/publications> Erişim: Kasım 2017.
- Günel, T. 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi Real-Time PCR. *Biyoloji ve Genetik, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi. Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007, 27
- Karakütük, S. 2017. *Biyolojik Analiz Yöntemleri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü. Erişim: Haziran 2017.*
- Kellerman, T.S., Rabie, C.J., Van De Westhuizen, G.C.A., Kriek, N.P.J., Prozeski, L. 1985. Induction of diplodiosis, a neuromycotoxicosis, in domestic ruminants with cultures of indigenous and exotic isolates of *Diplodia maydis*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 52: 35-42.
- Kellerman, T.S., Prozeski, L., Schultz, R.A., Rabie, C.J., Van Ark, H., Maartins, B.P., Lubben, A. 1991. Prenatal mortality in lambs of ewes exposed to cultures of *Diplodia maydis* (*Stenocarpella maydis*) during gestation. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 58: 207-308.
- Külen, O., Keskin B., Yüksel B., Onarıcı S. ve Baykal A., 2011. Bitki Moleküler Genetiğinde Son Teknikler Uygulamalı Eğitimi, Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, TÜBİTAK, 24-46 s.
- Luna, M.P.R. 2016. *Stenocarpella Maydis: Identification, Management, and Population Diversity*. Open Access Dissertations. 699. http://docs.lib.purdue.edu/open_access_dissertations/699 Purdue University.
- OEPP/EPP. 2006. Data sheets on quarantine pests No.67: *Stenocarpella macrospora* and *Stenocarpella maydis*. No.67-68.
- Rabie, C.J., Du Preez, J.J., Hayes, J.P. 1987. Toxicity of *Diplodia maydis* to broilers, ducklings and laying chicken hens. *Poultry Sci.* 66: 1123-1128.
- Romero, M. P., and Wise, K. A. 2015. Development of molecular assays for detection of *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora* in corn. *Plant Dis.* 99:761-769. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0917-RE>.
- Rossouw, J.D., Pretorius, Z.A., Silva, H.D., and Lamkey, K.R. 2009. Breeding for resistance to *Stenocarpella* ear rot in maize. *Plant Breed. Rev.* 31:223-246. John Wiley & Sons, Inc.
- Sutton, B.C., and Waterston, J.M. 1966a. *Diplodia macrospora*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Set 9. No. 83. CAB International, Willingford, UK.
- Sutton, B.C., and Waterston, J.M. 1966b. *Diplodia maydis*. CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Set 9. No. 84. CAB International, Willingford, UK.
- Vincelli, P. 1997. Ear rot of corn caused by *Stenocarpella maydis* (= *Diplodia maydis*). Online. University of Kentucky. Cooperative Extension Service. PPA- 43. Lexington, KY. <http://www2.ca.uky.edu/agc/pubs/>.
- White, D.G. 1999. Compendium of Corn Diseases. Page 44. 3rd ed. APS Press, St. Paul, MN.