

**Estudio de la dinámica temporal de la
mancha de asfalto en maíz y su identificación
en cinco departamentos de Honduras**

Jorge Alfredo Valle Torres

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria**

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

Estudio de la dinámica temporal de la mancha de asfalto en maíz y su identificación en cinco departamentos de Honduras

Proyecto especial de graduación presentado como un requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Jorge Alfredo Valle Torres

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2019

Estudio de la dinámica temporal de la mancha de asfalto en maíz y su identificación en cinco departamentos de Honduras

Jorge Alfredo Valle Torres

Resumen. La enfermedad conocida como mancha de asfalto, es una de las enfermedades más devastadoras para el cultivo de maíz en Latinoamérica. *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y presumiblemente, *Coniothyrium phyllachorae* son el complejo de hongos causantes de esta enfermedad. En Honduras, la enfermedad ha afectado un gran número de variedades, sin embargo, la variedad Tuxpeño ha presentado infecciones variables en ciclos diferentes. El objetivo de este estudio fue evaluar la dinámica temporal de la enfermedad en la variedad de maíz Tuxpeño e identificar por medio de microscopía los hongos involucrados en el complejo mancha de asfalto en cuatro departamentos de Honduras. Se evaluó semanalmente la severidad de la enfermedad en los lotes uno y dos de Zamorano y se recolectaron muestras de cuatro departamentos de Honduras: Olancho, Comayagua, Atlántida y Cortés para realizar una identificación microscópica de los hongos causantes de la enfermedad. El adecuado manejo del cultivo y las condiciones climáticas desfavorables resultaron en un control preventivo exitoso para la enfermedad en Zamorano. Se confirmó la presencia mediante análisis microscópico de *P. maydis* en Olancho, Cortés y Atlántida; y solamente *Microdochium maydis* en los departamentos de Cortés y Atlántida. Por último, se encontraron estructuras que pertenecen a *C. phyllachorae* en Atlántida. La mayoría de muestras de mancha de asfalto presentaron una asociación con *Curvularia spp.*

Palabras clave. *Microdochium maydis*, *Phyllachora maydis*.

Abstract. Tar spot complex is considered one of the mayor foliar disease of maize. *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* and presumably *Coniothyrium phyllachorae*, a hyperparasitic fungus result in the development of the disease. Two objectives were established: Evaluate the temporal dynamic of the disease in the maize cultivar “Tuxpeño” and identify microscopically the fungus involved in the TSC in four departments of Honduras. Visual ratings were made weekly to measure the severity of the disease in the production lots one and two of Zona 1, Zamorano. Leaf samples with clear and potential symptoms of the disease were collected from Olancho, Comayagua, Atlantida and Cortes to identify microscopically the fungus that provoked the disease. The appropriate management to the plantation and the unfavorable weather conditions resulted in an efficient control of the disease in Zamorano. The maize cultivar “Tuxpeño” is tolerant to Tar spot under four preventive fungicide applications and the weather conditions of the 2019. The presence of *P. maydis* was confirmed by microscopic analysis in Olancho, Atlantida and Cortes and *Microdochium maydis* only in Cortes and Atlantida. Ultimately, structures that belong to *C. phyllachorae* were found in samples from Atlantida. Most of the TS samples presented a symbiosis with *Curvularia spp.*

Keywords. *Microdochium maydis*, *Phyllachora maydis*.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
6. LITERATURA CITADA.....	15
7. ANEXOS.....	18

INDICE DE FIGURAS Y ANEXOS

Figuras	Página
1. Distribución geográfica de las plantas seleccionadas para el estudio en los lotes uno y dos de Zona 1, Zamorano	3
2. Promedio de temperaturas de los meses de producción de maíz de los años 2017-2019	7
3. Promedio de humedad relativa de los meses de producción de maíz de los años 2017-2019.....	8
4. Comparación del promedio mensual de precipitación durante los meses de producción entre el año 2017 y 2019	9
5. Sintomatología de muestras colectadas en Comayagua e identificación microscópica.	9
6. Cámara de humedad e identificación de hongos en muestras de Comayagua ...	10
7. Sintomatología de muestras colectadas en Olancho y su identificación microscópica.....	10
8. Sintomatología de muestras colectadas en Atlántida y su identificación microscópica.....	11
9. Sintomatología de muestras colectadas en Cortés y su identificación microscópica	12

Anexos	Página
1. Protocolo para extracción de ADN de hongos MODIFICADO Extracción método pheno:cloroformo:isoamyl alcohol (25:24:1).....	18
2. PCR master mix con primer universales	19
3. Condiciones para el termociclador (CQ-PIF).....	19
4. Cuadro de comparación de temperatura del mes de mayo de los años 2017 y 2019.....	20
5. Comparación de temperatura del mes de junio de los años 2017 y 2019.....	20
6. Comparación de temperatura del mes de julio de los años 2017 y 2019	21
7. Comparación de temperatura del mes de agosto de los años 2017 y 2019	21
8. Comparación de humedad relativa del mes de mayo de los años 2017 y 2019 ...	22
9. Comparación de humedad relativa del mes de junio de los años 2017 y 2019	22
10. Comparación de humedad relativa del mes de julio de los años 2017 y 2019	23
11. Comparación de humedad relativa del mes de agosto de los años 2017 y 2019..	23
12. Protocolo para elaborar 1 litro de Agar agua.....	24
13. Protocolo para elaborar 1 litro de Agar dextrosa de papa acidificado (PDAac) ..	24
14. Protocolo para elaborar un litro de Agar de verdura V8 acidificado (V8ac)	24

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la demanda de alimentos para consumo humano y animal ha ido en constante aumento debido al crecimiento poblacional. En el 2009, la FAO estimó que la demanda de cereales, para el 2050, incrementará en, aproximadamente, 900 millones de toneladas, siendo la cifra actual 2.1 mil millones de toneladas. Además, para muchos países en vías de desarrollo, son considerados una fuente importante de ingresos. En Honduras, la producción de maíz ocupa uno de los primeros lugares en superficie sembrada, alcanzando las 329,693 hectáreas (Rodríguez 2017).

En el año 2017 se observó en Honduras un incremento en el rendimiento de la producción de maíz asociado a altos niveles de precipitación y heliofanía (Lara 2017). Sin embargo, las precipitaciones asociadas con altos niveles de humedad relativa propician el desarrollo de enfermedades fúngicas que afectan el cultivo de maíz.

Anualmente, la inversión para el manejo de enfermedades en maíz es bastante alta y aun así el porcentaje de pérdidas en rendimiento es del 20% siendo esta inversión fundamental para prevenir el potencial impacto provocado por las mismas (Schumann y D'Arcy 2010). En consecuencia, el estudio de enfermedades en granos básicos ha adquirido gran importancia, ya que se han reportado enfermedades que pueden provocar pérdidas del 55.1%, como es el caso de la mancha de asfalto en maíz (Pereyda-Hernandez *et al.* 2009).

El complejo mancha de asfalto es una enfermedad que se documentó por primera vez en 1904 en México y luego se diseminó hacia la mayoría de países latinoamericanos como Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Haití, República Dominicana, Panamá, Perú, Puerto Rico y Venezuela (Mottaleb *et al.* 2018). Es considerada como un complejo porque es causada por la sinergia de los patógenos: *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y presumiblemente *Coniothyrium phyllachorae* (Maublanc 1904; Müller y Samuels 1984), siendo este último muy poco conocido, pero se presume que es un hongo micoparasítico (Hock *et al.* 1992). Por lo general, el desarrollo de la enfermedad está asociada típicamente a climas tropicales, con temperaturas que oscilan entre 17-23 °C, con humedades relativas de más de 75% y periodos de humedad en la hoja de más de 7 horas por noche (Hock *et al.* 1995). Sin embargo, se está convirtiendo en una nueva amenaza para regiones productoras de maíz con temperaturas más frías y que no se encuentran en el trópico, como Estados Unidos.

Los primeros reportes de la mancha de asfalto en Estados Unidos fueron en el 2015, en los estados de Indiana e Illinois y se ha identificado solamente *P. maydis* (Ruhl *et al.* 2016; Wise *et al.* 2016). Se desconoce la capacidad de este patógeno para sobrevivir las bajas temperaturas del invierno en Estados Unidos, pero las continuas apariciones de la

enfermedad tras cada invierno sugieren que el patógeno consigue sobrevivir estas temperaturas extremas, siendo así altamente perjudicial para los agricultores en Estados Unidos (Mottaleb *et al.* 2018).

P. maydis es considerado un parásito obligado, por lo que no sobrevive sin un hospedero. Esto resulta en una limitante al momento de estudiar la enfermedad ya que no se puede realizar aislamientos del hongo en laboratorio ni realizar los postulados de Koch (Ceballos y Deutsch 1991). Por esto, actualmente hay muy poca información publicada sobre la ecología y epidemiología sobre la enfermedad.

Hock *et al.* (1995) estudió la epidemiología del complejo mancha de asfalto en maíz bajo condiciones de campo. Encontró que los primeros síntomas que aparecían como enfermedad eran causados por *P. maydis*, pequeñas (1-2 mm de diámetro) lesiones oscuras y redondas, seguidas por la acción de *M. maydis*, halos elípticos necróticos de color café que rodean a las lesiones de *P. maydis* causando el típico “ojo de pescado” que es común en Latinoamérica. A pesar de que *P. maydis* por sí solo puede inducir el desarrollo de la enfermedad, es solamente con la interacción con *M. maydis* que pueden ocurrir los efectos más devastadores, como pérdidas en rendimiento de hasta 51% (Hock *et al.* 1989; Pereyda-Hernández *et al.* 2009). Sin embargo, *M. maydis* no incurre en ningún daño al hospedero por sí solo, es solamente con la presencia de *P. maydis* que este hongo se convierte en patogénico. Las condiciones ideales para el desarrollo de la enfermedad fueron 17–22 °C con una media de humedad relativa de aproximadamente 75% y más de 7 horas de humedad en la hoja durante la noche. El periodo de incubación de la enfermedad fue de 12 a 15 días. Sin embargo, esta información es muy limitada al momento de querer desarrollar métodos adecuados de manejo de la enfermedad (Hock *et al.* 1995)

La escasez de información dificulta el trabajo para los investigadores no solamente en Latinoamérica, sino que también en Estados Unidos. Además, hay una gran falta de conocimiento no solamente por parte de los pequeños agricultores, sino que incluso las grandes fincas productoras desconocen la ecología, biología y epidemiología de la enfermedad. Es por esto que mucha gente tiende a confundir la mancha de asfalto con otras enfermedades que en muchos casos no son similares, llegando a proveer asesoramientos inadecuados, así como la aplicación errónea de fungicidas. Por eso, el enfoque de esta investigación fue el estudio de la epidemiología y ecología de esta enfermedad bajo condiciones de campo, caracterizándola para explicar cómo se expresa en la planta y usando técnicas de diagnóstico molecular para determinar los hongos relacionados con la enfermedad aquí en Honduras. Se definieron dos objetivos para esta investigación:

- Evaluar la dinámica temporal de la enfermedad en la variedad de maíz Tuxpeño en lotes de producción de semilla en Zamorano.
- Identificar por medio de microscopía la presencia de los hongos involucrados en el complejo mancha de asfalto en cuatro departamentos de Honduras.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio.

El estudio se llevó a cabo desde el mes de mayo hasta agosto de 2019 y consistió en dos etapas. La primera se realizó bajo condiciones de campo, en los lotes de producción uno y dos encontrados en Zona I, Zamorano, Honduras (Figura 1). Una parcela con superficie de 9.1 hectáreas, a una altura de 800 msnm donde se presentó una temperatura promedio de 24.9 °C y una precipitación de 219.9 mm durante la temporada de producción. La segunda etapa se realizó en el laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada en el kilómetro 30 de la carretera Tegucigalpa-Danlí, Honduras.

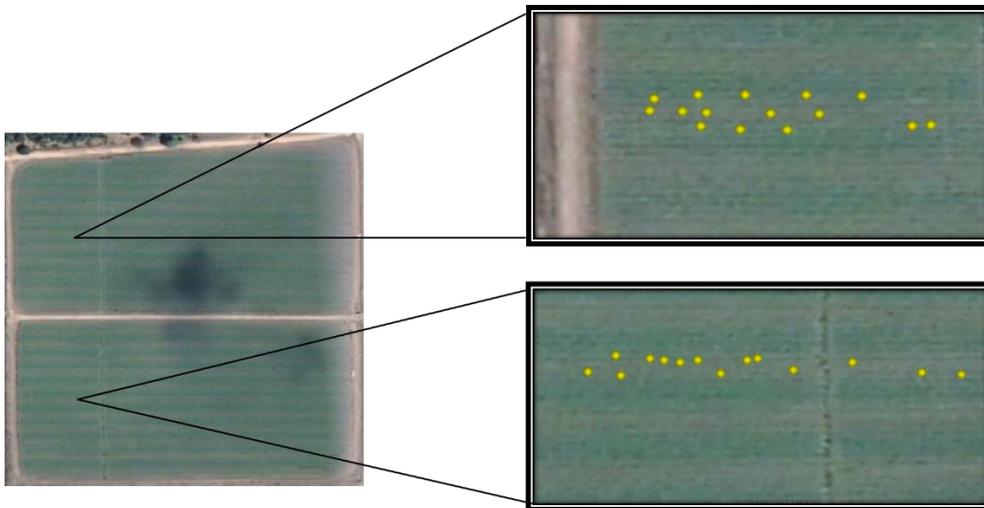


Figura 1. Distribución geográfica de las plantas seleccionadas para el estudio en los lotes uno y dos de Zona 1, Zamorano.

Manejo del cultivo.

Los lotes fueron seleccionados por ser los puntos focales en los que ha existido mayor incidencia y severidad de la enfermedad dentro de Zamorano, según datos históricos. La siembra se realizó el 7 de mayo de 2019 y se utilizó maíz de la variedad “Tuxpeño”, cultivar que es menos susceptible a la mancha de asfalto. Se realizaron cuatro aplicaciones de fungicidas preventivos a partir de los 45 días después de siembra (DDS) hasta los 90 días DDS en un intervalo de aplicaciones cada 12 días. Se realizaron dos aplicaciones de Mancozeb (2 kg/ha) y Benomil (0.5 kg/ha).

Medición de severidad.

Debido a que la enfermedad solamente se presenta al momento de la floración desde las hojas bajas (Bajet *et al.* 1994), la medición de severidad se realizó semanalmente a partir de los 40 días evaluando todas las hojas presentes en 30 plantas distribuidas en los lotes uno y dos de Zona 1. Se empleó la escala de enfermedad 1-5 propuesta por Loladze *et al.* (2019). Esta escala utiliza el valor numérico 1 como altamente resistente o severidad 0%, 2 como tolerante/moderadamente resistente e incluye los rangos desde 1-25% de severidad, 3 como moderadamente resistente a moderadamente susceptible y comprende los rangos desde 26-50%, 4 como cultivar susceptible y abarca de 51-75% de severidad y por último 5 como altamente susceptible incluyendo los rangos de 76-100% de severidad. Con base en los datos de severidad obtenidos, se explicará la curva de desarrollo de la enfermedad con respecto al tiempo y edad fenológica de la planta, cuantificar el área bajo cada una de las curvas y explicar qué modelo temporal se ajusta mejor a esta enfermedad.

Recolecta de muestras.

Se inspeccionaron seis departamentos de Honduras para realizar la recolecta de muestras: Francisco Morazán, El Paraíso, Comayagua, Olancho, Atlántida y Cortés. Esto debido a que la incidencia de mancha de asfalto en estos departamentos es alta durante el invierno (mayo-agosto). Sin embargo, no se encontraron muestras representativas en Francisco Morazán ni en El Paraíso porque nunca se presentaron posibles síntomas de la enfermedad en estas localidades.

La primera recolecta de muestras se realizó en los lotes de producción de un cultivar susceptible a la enfermedad. Se inspeccionó la localidad a profundidad, analizando el dosel completo de la planta y cada una de las hojas. Se encontraron varias plantas infectadas con *Helminthosporium* spp pero no hubo rastro de mancha de asfalto con un claro desarrollo del estroma. Se colectaron muestras de las hojas que presentaban síntomas representativos y que muy posiblemente se puedan convertir en mancha de asfalto. Además, se analizaron los residuos de la cosecha anterior para determinar la posible fuente del inóculo en caso de que los síntomas visibles pertenezcan a mancha de asfalto. El cultivo se encontraba en el estadio reproductivo R1 al momento de colectar las hojas.

La segunda recolecta se realizó con ayuda de la Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA) en la aldea de Guanaja Talgua, municipio de Catacamas, Olancho, Honduras. Se colectaron muestras de seis lotes, todas fueron de la variedad Guayape B a excepción de la muestra cinco que es solamente Guayape. Este lote presentaba severidades medias de mancha de asfalto durante el estadio R3 con presencia de estromas bien desarrollado. Las hojas colectadas fueron de la parte media del dosel y la siembra se realizó el 5 de mayo del 2019.

La tercera recolecta se realizó en una finca productora de maíz en La Ceiba, Atlántida, Honduras. Se recolectaron hojas del dosel inferior de la planta que presentaban altos índices de severidad de la enfermedad y de varias plantas al azar. La plantación se encontraba en el estadio R5 y era un cultivar criollo.

Por último, se colectaron muestras de una finca productora de maíz localizada en la vía hacia Peña blanca, cerca de Yojoa en el Departamento de Cortés. El cultivar de siembra fue una variedad transgénica que se encontraban en el estadio reproductivo R3 al momento de la colecta. En este punto del cultivo se encontraron altos índices de incidencia y severidad, especialmente en el dosel inferior de la planta.

Muestreo para pruebas de laboratorio de sintomatología.

Las hojas se describieron en una ficha técnica detallando la forma de las lesiones presentes junto con la severidad para determinar si los síntomas encontrados pertenecen a alguno de los hongos relacionados con el complejo mancha de asfalto. Una vez descrita la hoja, se la colectó y conservó dentro de una nevera. Para las hojas que no presentan estromas desarrollados, se cortaron las hojas en tres partes iguales y se colocaron en una cámara húmeda para estimular el crecimiento de los hongos que se encuentran en la hoja. Además, se realizaron siembras de explantes usando las lesiones en los medios sintéticos V8 acidificado y Agar agua. Muller y Samuels (1984) definieron al patógeno como un parásito obligado, siendo así incultivable en medios sintéticos o una cámara de humedad, por lo que, si se encontraba algún tipo de crecimiento de hongo, este definitivamente no era el agente causal del complejo mancha de asfalto.

Para muestras con presencia de estromas, se cortó la lesión únicamente y se procedió a macerarla para liberar las ascas junto con las ascosporas de *P. maydis*. Luego de esto, para diferenciar las ascosporas de otras estructuras se utilizó una gota de azul de lactofenol.

Adicionalmente, para la identificación de *M. maydis* y *C. phyllachorae* se realizaron cortes de los márgenes de la lesión (halo necrótico en ciertas lesiones) y se las desinfectó en una solución de cloro al 3% por tres minutos. Seguido de esto, se realizó un lavado con agua estéril por tres minutos y secaron los cortes con papel filtro. Después, con base en los resultados obtenidos por Pereyda-Hernandez *et al.* (2009), se realizó la siembra de explantes en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Todas las muestras en medios de cultivo se incubaron a 25 °C y se monitoreaba el crecimiento de los hongos cada tres días.

Identificación genética del hongo.

Extracción de ADN. La única estructura que posee ADN en la lesión son las ascosporas, localizadas dentro de las ascas en el peritecio del estroma. Conociendo esto, se realizaron 25 cortes únicamente del estroma junto con un poco de tejido de la hoja y se procedió a macerarlo con nitrógeno líquido para liberar las ascas del peritecio. Una vez realizado esto, se procedió a realizar el protocolo para extracción de ADN de hongos por el método phenol:cloroformo:isoamyl alcohol (25:24:1). Para determinar la calidad del material genético extraído se usará el espectrofotómetro Nanodrop “ND-1000”. La cantidad de ng/uL requeridos para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son de 100 ng/uL como mínimo.

Amplificación por PCR. Los primers universales utilizados fueron los ITS4R e ITS5F ya que estos han servido para secuenciar las muestras de la enfermedad en Estados Unidos por Ruhl *et al.* (2016), McCoy *et al.* (2018) y Dalla Lana *et al.* (2019).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia de mancha de asfalto en la EAP Zamorano.

A pesar de que los lotes de Zona I siempre mantienen altos índices de severidad e incidencia de mancha de asfalto según datos históricos, este año no hubo presencia del patógeno en ninguna localidad Zamorano, Cantarranas y Santa Inés.

La ausencia del patógeno podría ser explicada por la ecología del mismo, ya que las condiciones climáticas durante el ciclo de desarrollo del cultivo no fueron favorables para promover la incidencia de la enfermedad. Los principales factores climáticos que influyen en el desarrollo de la enfermedad son: temperatura, humedad relativa y periodos de humedad en la hoja. Hock *et al.* (1995) y Bajet *et al.* (1994) describieron los requisitos climatológicos para el crecimiento del hongo, explicando que la enfermedad es más prevalente y presenta mayores índices de severidad en zonas tropicales con temperaturas frías promedio entre 17-23 °C, junto con altas humedades relativas (> 75%) y periodos extendidos de humedad en la hoja, que favorecen la esporulación del hongo (> 7 horas por noche). Sin embargo, las temperaturas de este año, especialmente en los meses de junio y julio, difieren a la de años anteriores donde sí se presentaron altos porcentajes de incidencia y severidad de la enfermedad como fue el año 2017 (Figura 2).

Los promedios de temperatura en el año 2017 estuvieron dentro del rango requerido para el desarrollo del patógeno (< 24 °C), a diferencia del año 2019, donde se presentaron promedios de temperatura más altos de lo normal (Figura 2). La temperatura para el año 2019 fue muy variable a diferencia del año 2017 donde fue estable y permaneció mucho más tiempo en el rango óptimo para el desarrollo de la enfermedad.

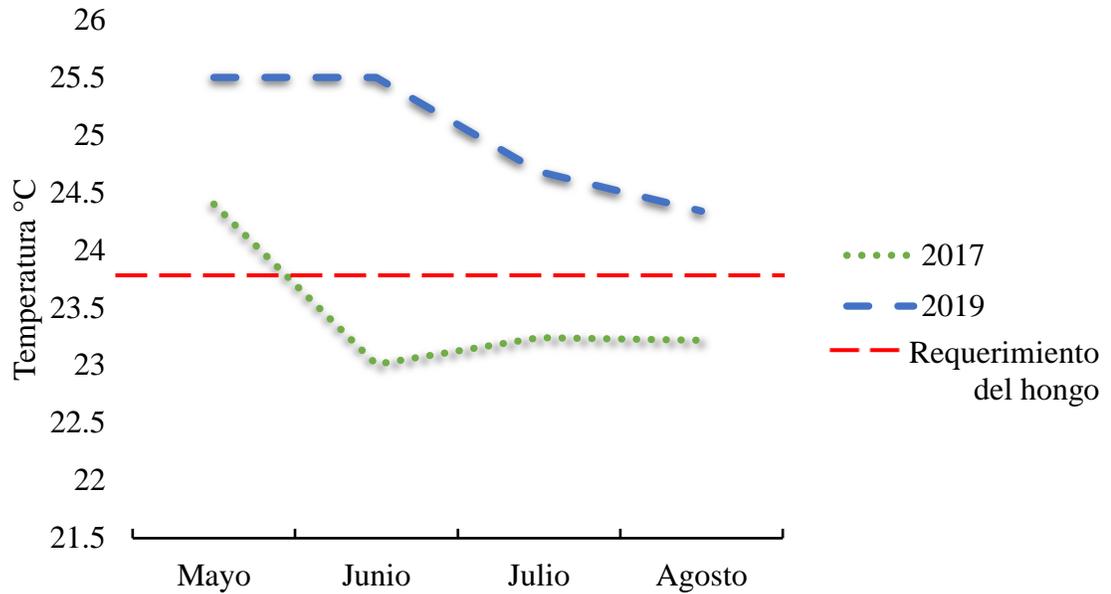


Figura 2. Promedio de temperatura de los meses de producción de maíz de los años 2017-2019 en Zamorano.

La humedad relativa es uno de los factores más determinantes para el desarrollo de una enfermedad. Un claro ejemplo ocurre con *Cercospora kikuchii* en soya (Schuh 1992), donde la enfermedad varía en sus niveles de severidad de acuerdo a cambios drásticos en la humedad ambiental. Los promedios de humedad durante la temporada de producción de maíz en el 2019 no lograron llegar al mínimo requerido para el desarrollo del hongo (Figura 3). Incluso, los picos más altos de humedad durante los meses de junio y julio no llegaron a ser suficientes para suplir los requerimientos del mismo, quedándose en humedades relativas bajas (< 55%). En cambio, el año 2017 fue más estable, con picos altos y bajos normales. Además, el promedio de la humedad va aumentando a medida pasa el tiempo, mientras que en el 2019 fue lo contrario (Figura 3). La respuesta a estos cambios en el clima se le atribuye al cambio climático y calentamiento global que se están experimentando.

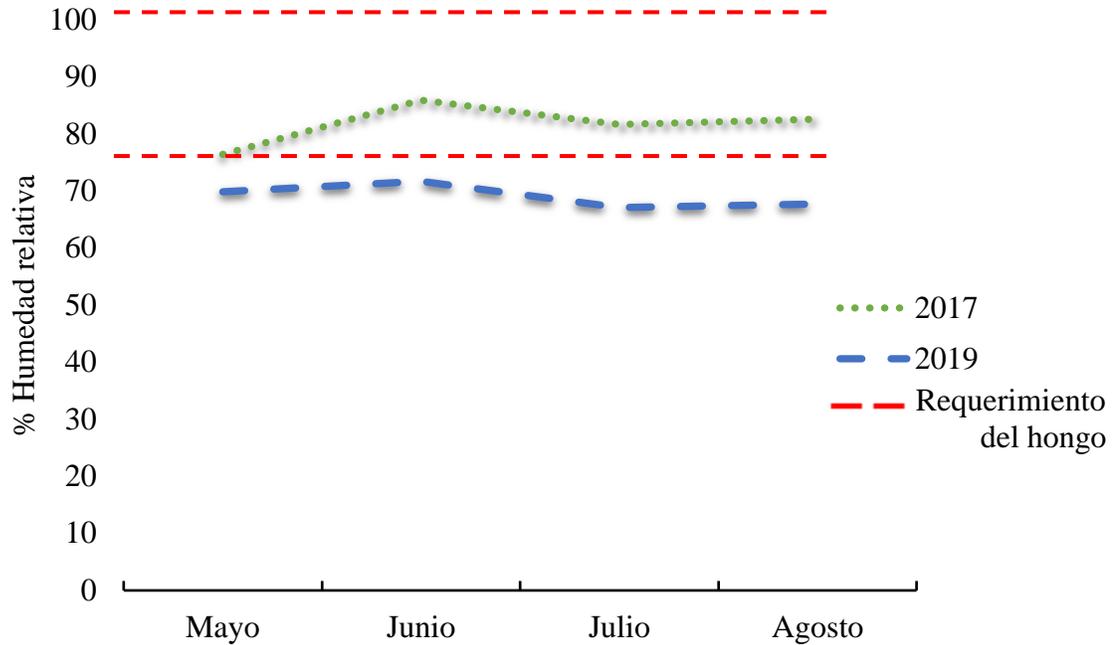


Figura 3. Promedio de humedad relativa de los meses de producción de maíz de los años 2017-2019 en Zamorano.

Por último, el factor más determinante que se comprometió en restringir el desarrollo de la enfermedad fue la precipitación. Hock *et al.* (1995) describió que el hongo *Phyllachora maydis*, para que logre esporular y desarrollarse por completo, requiere de periodos de humedad en la hoja de más de siete horas por las noches, que están altamente relacionados con la precipitación. Las diferencias drásticas en los promedios mensuales de precipitación desde mayo a agosto entre los años 2017 y 2019 explican por qué el hongo no logró desarrollarse este año (Figura 4). La variación fue 105.30 mm, indicando que para el año 2019 no hubo periodos largos de humedad en la hoja.

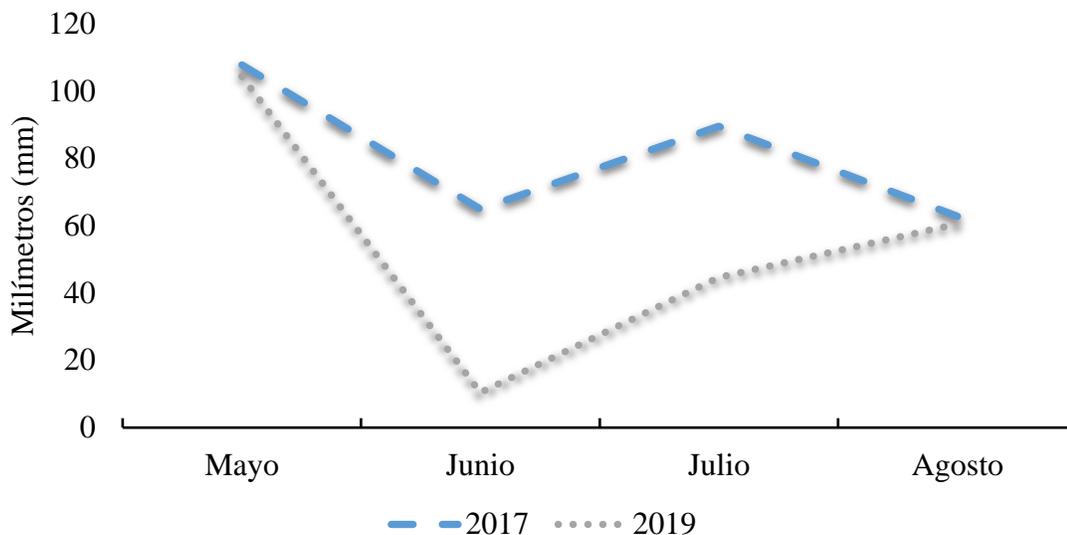


Figura 4. Comparación del promedio mensual de precipitación durante los meses de producción entre el año 2017 y 2019 en Zamorano.

Recolecta de muestras en diferentes localidades.

Muestras colectadas en Comayagua. La escasez de periodos largos de humedad en la hoja durante este periodo limitó el desarrollo de varias enfermedades devastadoras. Hock *et al.* (1995) describió que los primeros síntomas observables en la lámina foliar son causados por *P. maydis*, pequeñas (1-2 mm de diámetro) lesiones oscuras y redondas, seguidas por la acción de *M. maydis*, halos elípticos necróticos de color café que rodean a las lesiones de *P. maydis* causando una forma de “ojo de pescado”.

No se encontró la presencia de ascas ni ascosporas de *P. maydis* ni *M. maydis* en ninguna de las muestras ni en la siembra de explantes. Se logró identificar: *Curvularia* spp. y *Aspergillus* spp. en los medios de cultivo donde estaban sembrados los explantes con halos necróticos de la hoja, siendo *Aspergillus* spp. más dominante frente a *Curvularia* spp. limitando su crecimiento (Figura 5).

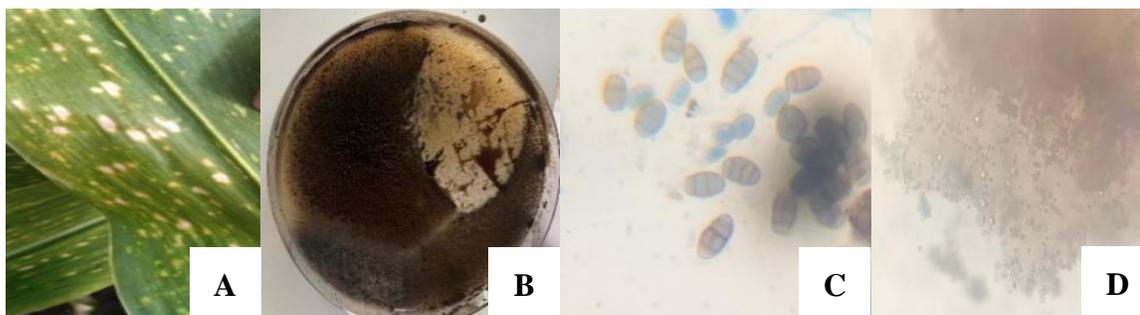


Figura 5. Sintomatología de muestras de maíz colectadas en Comayagua e identificación microscópica. (A) Síntomas encontrados en Comayagua; (B) Crecimiento de hongos en medio de cultivo V8ac a los 15 días; (C) *Curvularia* spp; (D) *Aspergillus* spp.

Alternaria spp cubrió toda la lámina foliar a partir de los 18 días dentro de la cámara de humedad (Figura 6). Esto determinó que no hay presencia de *P. maydis* en la finca de Comayagua. Los síntomas encontrados en la superficie de la hoja pertenecen a la enfermedad mancha foliar por *Curvularia*.



Figura 6. Cámara de humedad e identificación de hongos en muestras de maíz de Comayagua. (A) Crecimiento de micelio en hojas dentro de cámara de humedad; (B) *Alternaria* spp. extraída del micelio.

Muestras de Olancho. Las muestras colectadas en Olancho dieron positivo para la presencia de *P. maydis*. Se encontraron estromas bien desarrollados en el haz de las hojas, pero solamente uno tiene el síntoma característico de la mancha de asfalto en Latinoamérica que es conocido como “ojo de pescado” (Figura 7). Se logró observar las ascas liberadas del peritecio con una coloración azul del patógeno debido a la utilización de azul de lactofenol. El estroma sobresale de la hoja midiendo 1-2 mm. Dentro de él se encuentra el peritecio que está conformado por numerosas ascas que contienen en promedio ocho ascosporas de forma elipsoidal amplia (Figura 7).

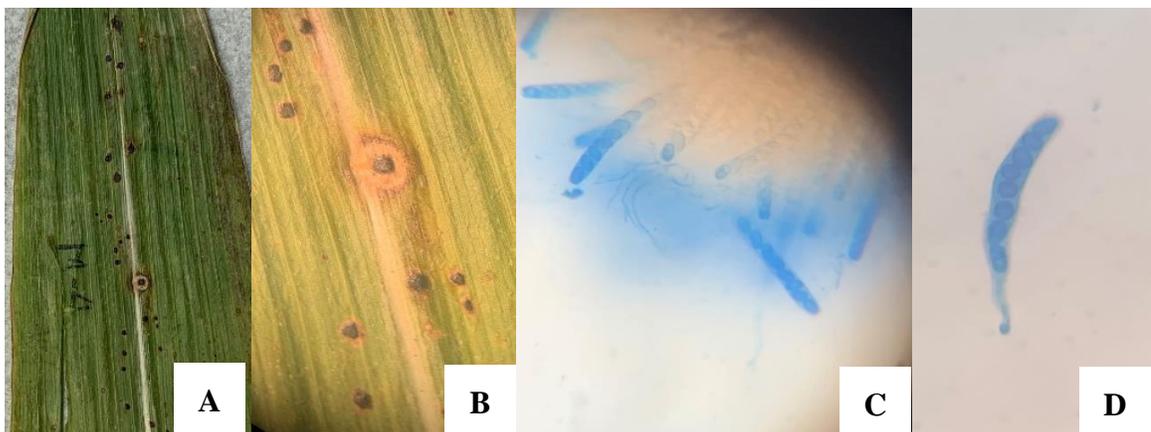


Figura 7. Sintomatología de muestras de maíz colectadas en Olancho y su identificación microscópica. A) Síntomas encontrados en Olancho B) Estromas y "ojo de pescado" visto en estereoscópio C) Ascas liberadas del peritecio del estroma D) Asca con ocho ascosporas de *P. maydis*.

La severidad de la enfermedad está altamente relacionada con la etapa fenológica de la planta (Castaño-Zapata y Del Rio 1994), sin embargo, las severidades encontradas eran bajas para que el cultivar esté en R3. Esto se puede explicar debido a la tolerancia del cultivo contra este patógeno. Microscópicamente no se logró identificar los otros dos hongos involucrados en el complejo mancha de asfalto.

Muestras de Atlántida. La incidencia de la enfermedad en esta finca fue de 90% con severidades desde 5% hasta 40%. En este departamento se encontró alta incidencia del síntoma “ojo de pescado” en la mayoría de los estromas. Las lesiones son en su mayoría estromas circulares e irregulares, oscuras y brillantes midiendo alrededor de 0.5-2 mm de diámetro. Muchas lesiones presentan halos necróticos alrededor del estroma (Figura 8) por lo general, el causante de este último síntoma es *M. maydis*. Sin embargo, este hongo está presente en su forma anamórfica denominada *Microdochium maydis*, que fue identificada microscópicamente. Muy pocos son los estudios que describen la presencia de *M. maydis* en el complejo. Además, *Curvularia spp.* también estaba presente en conjunto con *M. maydis* en grandes cantidades (Figura 8).

En toda la superficie de la hoja, especialmente sobre los estromas, se encontró un hongo micoparasítico, que vació el peritecio del estroma dejándolo sin ascosporas. Microscópicamente no se logró identificar el hongo, pero se presume es *Coniothyrium phyllachorae*, el tercer hongo que está involucrado en el complejo mancha de asfalto. Debido a esto, no se logró encontrar esporas de *Phyllachora maydis* microscópicamente. Por mucho tiempo, la función y sintomatología que provoca este hongo era desconocida. Maublanc (1904) describió que el hongo se ubica en el clípeo y vacía el estroma de *P. maydis*. Este resultado coincide con los encontrados por Hock *et al.* (1995) quienes encontraron que el 50% de los estromas en su estudio estaban infectados con picnidia de *C. phyllachorae* y que aquellas lesiones eran más pequeñas que las que no estaban infectadas. Esto significa que este antagonista puede servir como un control biológico para la enfermedad, ya que evita la futura diseminación de esporas en el campo.

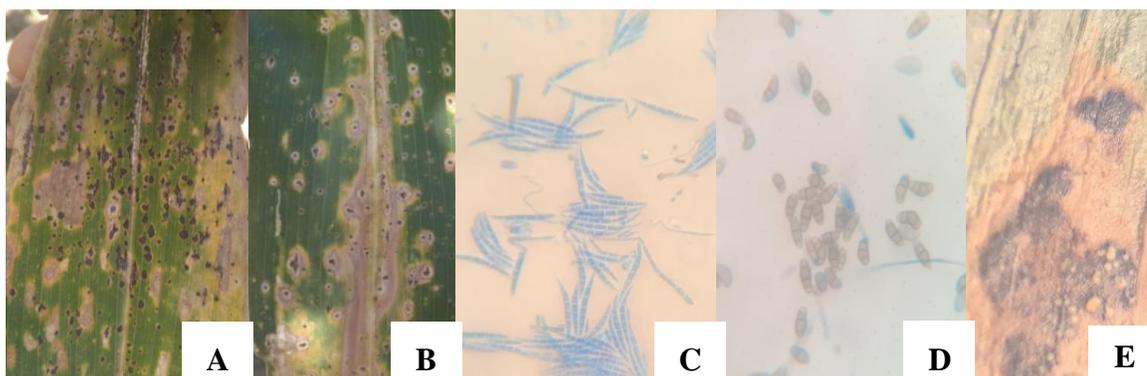


Figura 8. Sintomatología de muestras colectadas en Atlántida y su identificación microscópica. A) Síntomas de mancha de asfalto encontrados en La Ceiba B) Hoja con alta severidad de "ojos de pescado" C) *Microdochium maydis* D) *Curvularia spp.* E) Estroma de *P. maydis* infectado con *C. phyllachorae*.

Muestras de Cortés. Se identificaron síntomas “ojo de pescado” en todas las muestras colectadas, pero no en grandes cantidades. Los estromas presentes en la hoja eran circulares, oscuros y brillantes, con un diámetro promedio de 1 mm. Al igual que en las muestras de Atlántida, la fase asexual de *Monographella maydis*, *Microdochium maydis* y *Curvularia* spp estaban presentes en grandes cantidades. Se encontró una gran cantidad de ascas de *P. maydis* presentes en los estromas de la hoja (Figura 9).

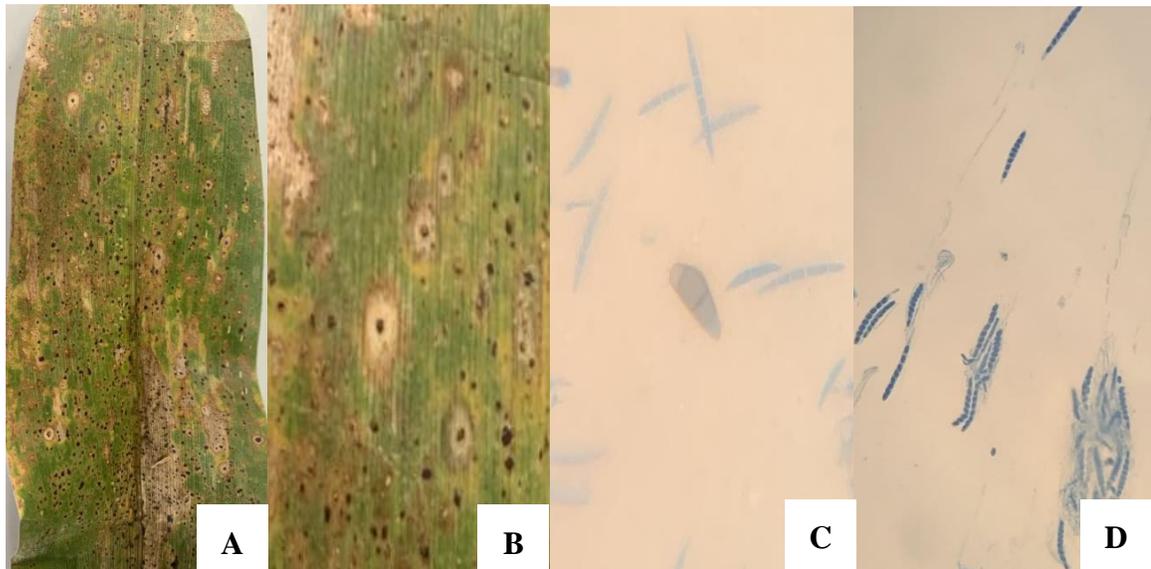


Figura 9. Sintomatología de muestras colectadas en Cortés y su identificación microscópica. A) Síntomas encontrados en Yojoa B) "Ojos de pescado" C) *Curvularia* spp. y *Microdochium maydis* D) *Phyllachora maydis*.

4. CONCLUSIONES

- La variedad de maíz Tuxpeño es tolerante a la mancha de asfalto bajo las condiciones climáticas del presente año y cuatro aplicaciones preventivas de fungicidas.
- Se confirmó la presencia de *Phyllachora maydis* en Olancho, Cortés y Atlántida, pero *Microdochium maydis* solamente en Cortés y Atlántida. Por último, también se encontró posiblemente la presencia de *Coniothyrium phyllachorae* solamente en Atlántida.
- La mayoría de las muestras de mancha de asfalto presentan una asociación con *Curvularia spp.*

5. RECOMENDACIONES

- Realizar inoculaciones bajo condiciones de invernadero para comprender el desarrollo de la enfermedad en variedades comerciales de maíz en Honduras.
- Realizar colectas de muestras de todos los departamentos en Honduras para observar variación de los patógenos según localidad.
- Establecer una base de datos de imágenes para desarrollar una escala diagramática que conlleve a definir niveles de severidad en la planta.
- Realizar secuenciaciones para determinar con más seguridad la presencia de los hongos involucrados en las lesiones de mancha de asfalto.

6. LITERATURA CITADA

- Bajet NB, Renfro BL, Carrasco JMV. 1994. Control of tar spot of maize and its effect on yield. *Int J Pest Manag* 40(2):121–125. [accedido 2019 junio 17]. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19946796775>
- Castañón-Zapata J, Del Río L. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. ISBN 1885995-16-4. 3^{ra} ed. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Ceballos H, Deutsch A. 1991. Inheritance of resistance to Tar spot complex in maize. Centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo (CIMMYT). [accedido 2019 junio 17]. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n05_505.PDF
- Dalla Lana F, Plewa DE, Phillippi ES, Garzonio D, Hesterman R, Kleczewski NM, Paul PA. 2019. First Report of Tar Spot of Maize (*Zea mays*), Caused by *Phyllachora maydis*, in Ohio. In *Plant Disease* 103 (7), p. 1780. [accedido 2019 julio 16] <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-01-19-0070-PDN>
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. 2009. La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. Foro de expertos de alto nivel. Roma, Italia. [accedido 2019 mayo 3] http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_S_P/La_agricultura_mundial.pdf
- Hock J, Kranz J, Renfro B. 1989. El complejo “mancha de asfalto” de maíz: Su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Rev Mex Fitopatol* 7(2):129–135. [accedido julio 20]. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=CIMMYT.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=004322>
- Hock J, Dittrich U, Renfro BL, Kranz J. 1992. Sequential development of pathogens in the maize tar spot disease complex. *Mycopathologia*, 117:157-161. [accedido junio 10]. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00442777>
- Hock J, Kranz J, Renfro BL. 1995. Studies on the epidemiology of the tar spot disease complex of maize in Mexico. *Plant Pathology*. [accedido 2019 mayo 4]; 44(3). Ing. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3059.1995.tb01671.x>

- Lara B. 2017. Hay suficientes granos básicos para atender la demanda de 2018. La prensa. Honduras. [accedido 2019 mayo 3] https://www.laprensa.hn/economia/1129110-410/honduras-prestamos_agr%C3%ADcolas-granos-basicos-maiz-
- Loladze A, Rodrigues FA, Toledo F, San Vicente F, Gérard B, Boddupalli MP. 2019. Application of Remote Sensing for Phenotyping Tar Spot Complex Resistance in Maize. *Front Plant Sci.* 2019;10:552. [accedido 2019 junio 20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6503115/>
- Maublanc A. 1904. Espèces nouvelles de champignons inferieurs. *Bull la Soc Mycol Fr* 20(2):72–74
- McCoy AG, Romberg MK, Zaworski ER, Robertson AE, Phibbs A, Hudelson BD, Smith DL, Beiriger RL, Raid RN, Byrne JM, Chilvers MI. 2018. First Report of Tar Spot on Corn (*Zea mays*) Caused by *Phyllachora maydis* in Florida, Iowa, Michigan, and Wisconsin. In *Plant Disease* 102 (9), p. 1851. [accedido 2019 Agosto 2]. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-02-18-0271-PDN>
- Mottaleb KA, Loladze A, Sonder K, Kruseman G, San Vicente F. 2018. Threats of Tar Spot Complex disease of maize in the United States of America and its global consequences. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change.* [accedido 2019 mayo 4]; 24(2): 281-300. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11027-018-9812-1>
- Müller E, Samuels JG. 1984. *Monographella maydis*: sp.nov. and its connection to the tar-spot disease of *Zea mays*. *Nova Hedwigia* 40: 113–121. [accedido 2019 agosto 2]. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19861318203>
- Pereyda-Hernandez J, Hernandez-Morales J, Sandoval-Islas JS, Aranda-Ocampo S, De Leon C, Gomez-Montiel N. 2009. Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia.* [accedido 2019 mayo 4]; 43(5). Esp. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000500006
- Rodríguez L. 2017. Superficie sembrada de maíz creció 63500 manzanas en 16 años. *El heraldo.* Honduras [accedido 2019 mayo 3] <https://www.elheraldo.hn/economia/1128223-466/superficie-sembrada-de-ma%C3%ADz-creci%C3%B3-63500-manzanas-en-16-a%C3%B1os>
- Ruhl G, Romberg MK, Bissonnette S, Plewa D, Creswell T, Wise KA. 2016. First report of tar spot on corn caused by *Phyllachora maydis* in the United States. *Plant Dis* 100(7):1496. [accedido 2019 julio 30]. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-12-15-1506-PDN>
- Schumann GL, D’Arcy CJ. 2010. *Essential plant pathology.* 2da ed. Minnesota, Estados Unidos: American Phytopathological society.
- Schuh W. 1992. Effect of pod development stage, temperature, and pod wetness duration on the incidence of purple seed stain of soybeans. *Phytopathology* 82:446-451. [accedido 2019 julio 30].

https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992/Abstracts/Phyto82_446.htm

Wise K, Ruhl G, Creswell T. 2016. Diseases of corn Tar Spot. Purdue extension. Purdue University, Indiana, EEUU. [accedido 2019 mayo 4]
<https://www.extension.purdue.edu/extmedia/BP/BP-90-W.pdf>

7. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para extracción de ADN de hongos modificado Extracción método phenol:cloroformo:isoamyl alcohol (25:24:1)

1. Añadir 500 uL de Buffer de extracción CTAB, añadiendo 2.5 uL B-mercaptoethanol/muestra.
2. Colocar los tubos en el disruptor de tejidos a máxima velocidad por 2 minutos.
3. Incubar las muestras a 65 °C de 30-60 min. Cada 10 minutos mezcle la muestra.
4. En la cámara de gases añadir 600 uL de phenol:cloroformo:isoamyl alcohol (25:24:1) a los tubos eppendorf con la muestra. Invertir drásticamente el tubo para mezclar.
5. Centrifugar a 14,000 rpm/10 min a 4 °C.
6. Tomar cuidadosamente el sobrenadante superior del tubo. Transferir este sobrenadante (50-100 uL) a un nuevo tubo eppendorf.
7. Añadir 600 uL de cloroformo:isoamyl alcohol (24:1). Invertir suavemente el tubo para mezclar.
8. Centrifugar a 14,000 rpm/10 min a 4 °C.
9. Tomar cuidadosamente el sobrenadante superior del tubo después de la centrifugación (50-80 uL)
10. Añadir 66 ul de acetato de sodio 3 M seguido de 1350 ul de 100% etanol frío.
11. Centrifugar el tubo a 14,000 rpm/10 min a 4 °C.
12. En el fondo del tubo se observa un pellet que contiene el ADN. Decantar el líquido.
13. Secar el tubo colocándolo boca abajo sobre papel toalla.
14. Cuando el tubo esté completamente seco, añadir 100 uL de Buffer TE al pellet para rehidratarlo.
15. Finalmente colocar la muestra en baño María durante 30 min a 35 °C.
16. Analizar la cantidad del material genético usando el Nanodrop.

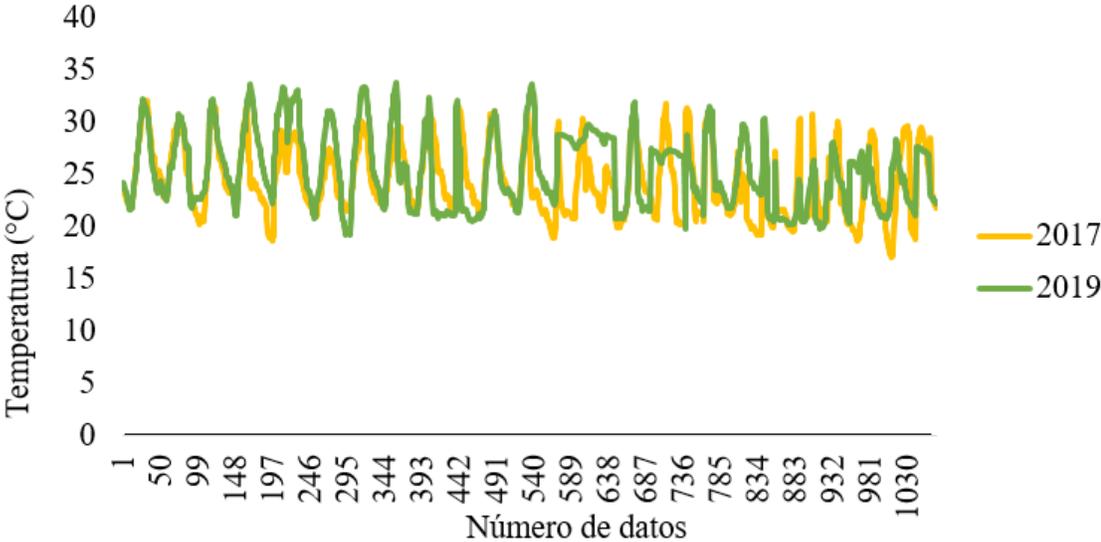
Anexo 2. PCR master mix con primer universales.

Reactivos	1X (25 ul)
ddH ₂ O	14.0
10x PCR Buffer	2.5
dNTPs mix (100 mM)	0.5 (10 mM)
MgCl ₂ (25 mM)	3.0 (2 mM)
Primers universals	2.5 (1.25/primer)
Taq polimerasa (Apex, Quiagen o M166B)	0.5
Muestra de ADN (50 ng/uL)	2.0

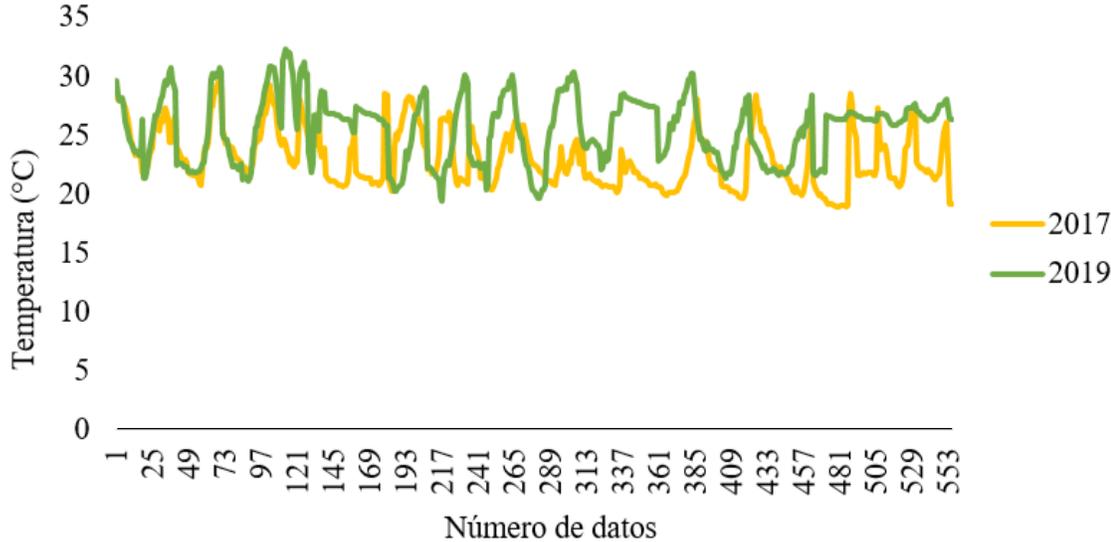
Anexo 3. Condiciones para el termociclador.

Fase	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	1
Desnaturalización	95	20 segundos	36
Acoplamiento	67	15 segundos	
Extensión	72	15 segundos	
Extensión final	72	5 minutos	1
Mantenimiento	10		

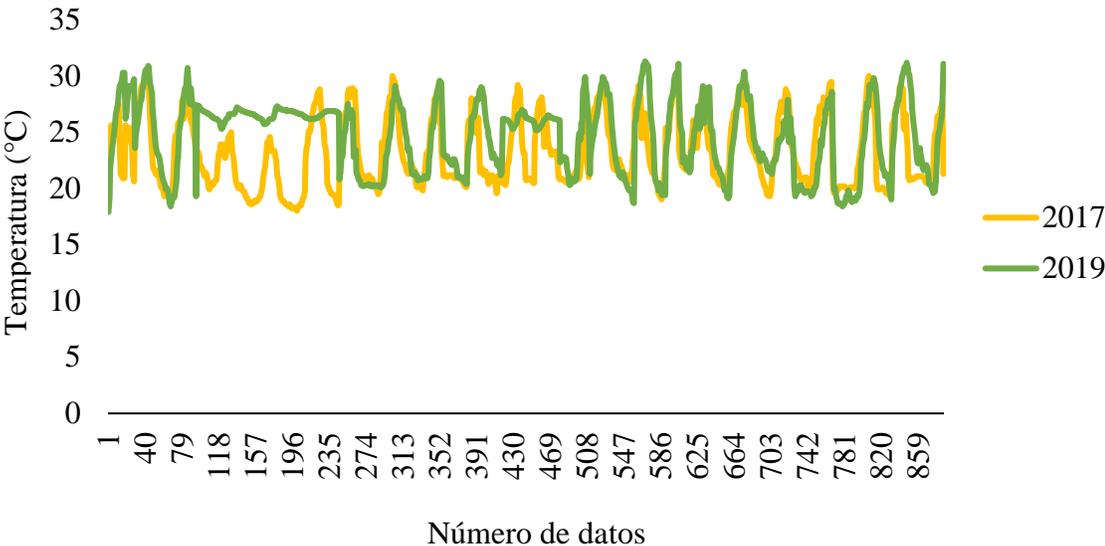
Anexo 4. Comparación de temperatura del mes de mayo de los años 2017 y 2019.



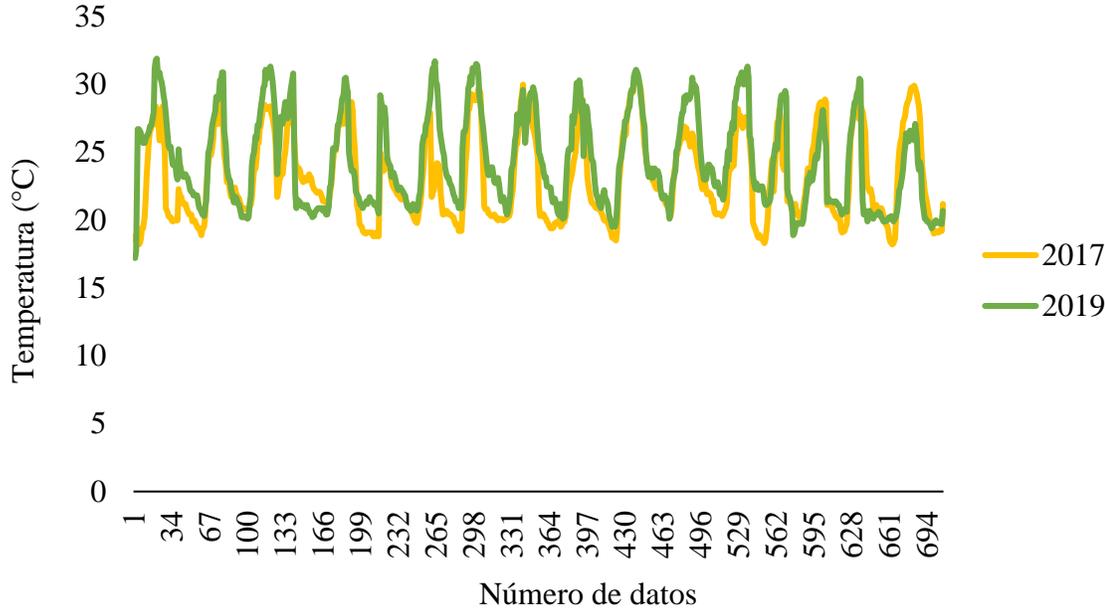
Anexo 5. Comparación de temperatura del mes de junio de los años 2017 y 2019.



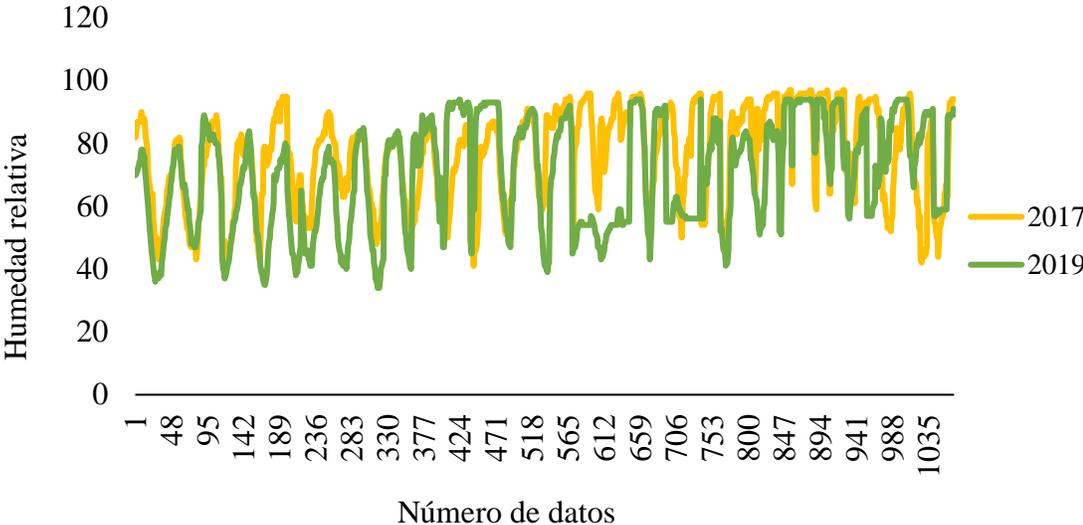
Anexo 6. Comparación de temperatura del mes de julio de los años 2017 y 2019.



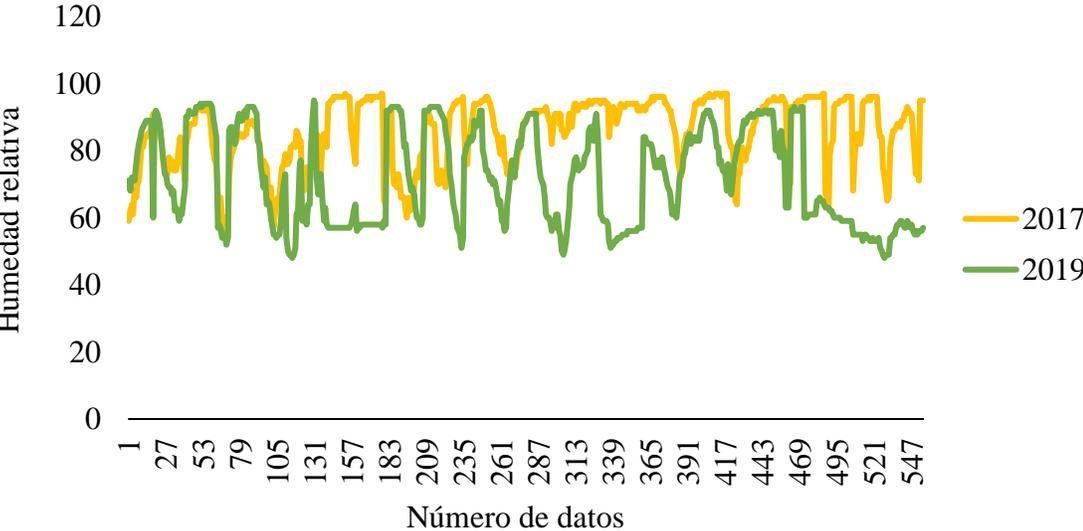
Anexo 7. Comparación de temperatura del mes de agosto de los años 2017 y 2019.



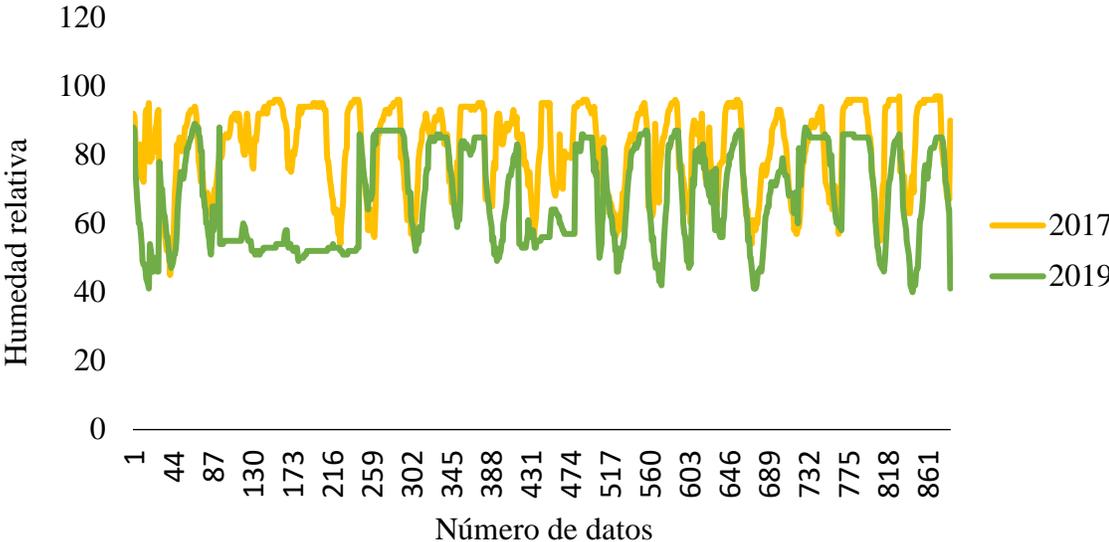
Anexo 8. Comparación de humedad relativa del mes de mayo de los años 2017 y 2019



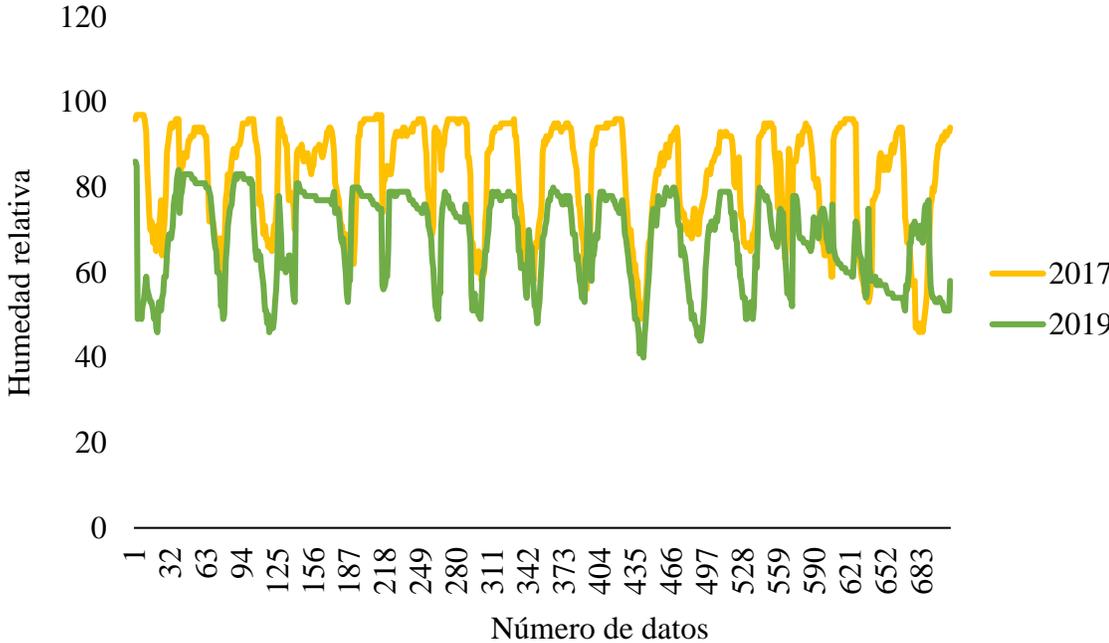
Anexo 9. Comparación de humedad relativa del mes de junio de los años 2017 y 2019



Anexo 10. Comparación de humedad relativa del mes de julio de los años 2017 y 2019.



Anexo 11. Comparación de humedad relativa del mes de agosto de los años 2017 y 2019.



Anexo 12. Protocolo para elaborar 1 litro de Agar agua.

1. Pesar 8 g de bacto-agar
2. Añadir ~992 mL de agua destilada
3. Autoclavar

Anexo 13. Protocolo para elaborar 1 litro de Agar dextrosa de papa acidificado (PDAac).

1. Pesar 39 g de agar PDA
2. Añadir ~960 ml de agua destilada
3. Hervir para disolver
4. Autoclavar
5. Añadir 10 mL de ácido tartárico después del autoclavado

Anexo 14. Protocolo para elaborar un litro de Agar de verdura V8 acidificado (V8ac).

1. Añadir 150 mL de jugo V8
2. Pesar 3 g de carbonato de calcio
3. Añadir 790 mL de agua destilada
4. Mezclar
5. Pesar 15 g de bacto-agar
6. Autoclavar