

Diagnóstico molecular diferencial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.)

Differential molecular diagnosis of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* in yam (*Dioscorea* sp.)

Yeimy Alexandra Pinzón Gutiérrez*, Silvia Lizette Bustamante*, Gustavo Buitrago Hurtado*

Resumen

Las enfermedades de origen fúngico son responsables de las mayores pérdidas reportadas en los cultivos de ñame colombianos, entre ellas la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. se destaca por ser la más devastadora. En los últimos años, hongos con baja prevalencia pero con alto poder de diseminación como *Fusarium* spp., han ampliado su presencia en los cultivos de ñame favoreciendo el desarrollo de enfermedades como la pudrición del tubérculo en postcosecha. A pesar de la importancia del cultivo de ñame en las regiones de la Costa Atlántica colombiana, el Pacífico y la Amazonia, este es considerado un cultivo huérfano en razón a que son pocos los esfuerzos que en investigación se realizan a nivel mundial y particularmente en Colombia. Con el propósito de aportar al diagnóstico correcto y oportuno de fitopatógenos que afectan el cultivo de ñame, se obtuvieron aislamientos fúngicos a partir de hojas con manchas necróticas. De los aislamientos obtenidos, cinco presentaron morfología propia del género *Colletotrichum* y tres de *Fusarium*. La identidad de las especies implicadas se determinó por secuenciación de los ITS del ADNr, correspondiendo a *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*. La evaluación de marcadores moleculares para la detección de forma diferencial y simultánea de estos patógenos, permitió seleccionar la amplificación del factor de elongación alpha (EF- α) como la mejor prueba de diagnóstico. Las pruebas de patogenicidad confirmaron la capacidad de los aislados de *C. gloeosporioides* para causar sintomatología de antracnosis en folíolos y de los aislados de *F. oxysporum* para desencadenar pudrición en tubérculo, la presencia de este último en hojas se podría asociar a su fácil y rápida dispersión conidial, a su acentuada incidencia en suelo que es su hábitat natural y a su prolongada sobrevivencia.

Palabras clave: ñame, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, factor de elongación alpha (EF- α), antracnosis, pudrición.

Abstract

Fungal diseases are responsible for the greatest losses in the Colombian yam crop, among these the anthracnose stands out as the most devastating. In recent years, fungi with low prevalence but high spread power such as *F. oxysporum* have expanded its presence in yam crops favoring the development of rot disease. Despite the importance of yam crop on the Colombian Caribbean Coast, the Pacific and the Amazon, this is considered an orphan crop because are few efforts made in its investigation in the world and particularly in Colombia. In order to contribute to the correct and timely diagnosis of fitopathogens that affect the yam crop, this study obtained fungal isolates from leaves with necrotic spots. Of these isolates, five showed morphological characteristics of *Colletotrichum* and three of *Fusarium* genus. The species identity was determined by ITS sequencing, corresponding to *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. The evaluation of molecular markers for differential and simultaneous detection of these pathogens allowed to choose the elongation factor alpha (EF- α) as the best diagnostic test. Pathogenicity test confirmed the capacity of *C. gloeosporioides* to cause anthracnose symptomatology in leaves and *F. oxysporum* isolates to trigger rot in tuber, whose presence

* Grupo de Investigación en Ñame, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. yapinzong@unal.edu.co, slbustamante@unal.edu.co, gbuitragoh@unal.edu.co

in leaves could be associated to its easy and fast conidial spread, to its heightened incidence in soil which is its natural habitat, and its prolonged survival.

Key words: yam, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, elongation factor alpha (EF- α), anthracnose, rot.

Recibido: julio 15 de 2012

Aprobado: junio 22 de 2013

Introducción

El ñame (Familia *Dioscoreaceae*, género *Dioscorea*) es un tubérculo originario de Asia, África y América, las especies y variedades más comerciales se introdujeron en América probablemente desde África durante la Conquista (Rodríguez 2000). Se encuentra distribuido en las regiones tropicales de alta pluviosidad y el área mundial cultivada comprende: África occidental, sur de Asia, Oceanía y los países del Caribe (Ammirato 1984). Colombia es uno de los 12 países del mundo con mayor producción de ñame con 395.374 ton reportadas para 2010 y ocupa el primer lugar en cuanto a rendimiento con 28,3 ton/ha (Reina 2012). El área cultivada se concentra en los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Cesar y Atlántico en donde es considerado un producto de consumo básico (Bustamante y Buitrago 2006). A pesar de su importancia es considerado un cultivo huérfano en razón a que es poca la investigación dirigida a su estudio. Este trabajo se enmarca en un programa de investigación participativa que vincula organizaciones de pequeños productores de ñame, con doble propósito, aportar al conocimiento sobre el cultivo, validar y aplicar en campo los resultados del programa.

En Colombia las especies de mayor importancia tanto por el área sembrada como por su demanda son ñame criollo (*Dioscorea alata*) y ñame espinoso (*Dioscorea rotundata*) (Guzmán y Buitrago 2000). El programa de ñame en Colombia busca aprovechar cualidades de este tubérculo como alimento por ser fuente de vitaminas, especialmente A y C y carbohidratos gracias a su alto contenido en almidón (Norman *et al.*, 1984; O'Hair 1990; Chacón *et al.*, 2005; Alvis *et al.*, 2008; Montes *et al.*, 2008), como fitoterapéutico al ser utilizado como fuente de componentes activos biológicos, en especial de saponinas a las que se les atribuyen propiedades medicinales para el tratamiento de infecciones micóticas, cáncer, artritis, reuma, trombosis (Li *et al.*, 2003; Sautour *et al.*, 2004), gastritis, inflamaciones, irritaciones y espasmos (Pérez *et al.*, 2005); adicionalmente, por su hidrólisis se obtienen sapogeninas esteroidales, de gran interés por ser precursores en la

síntesis de anticonceptivos orales, hormonas y corticoides (Purseglove 1972).

Entre los problemas fitosanitarios en los cultivos de ñame se destacan su susceptibilidad a hongos y virus, pero las enfermedades de origen fúngico son las que más han causado pérdidas en Colombia, siendo la antracnosis ocasionada por *Colletotrichum* spp. la más devastadora (Green *et al.*, 2000). Por otro lado, el género *Fusarium* reportado como fitopatógeno de ñame (Morse *et al.*, 2000; Amusa *et al.*, 2003; Aboagye *et al.*, 2005) ha ampliado su presencia favoreciendo el desarrollo de la pudrición del tubérculo en postcosecha.

El hongo *Colletotrichum* spp. está distribuido ampliamente en regiones tropicales y subtropicales. Ocasiona graves pérdidas económicas en una amplia gama de cultivos que incluyen cereales, pastos, legumbres, vegetales y cultivos perennes, incluyendo árboles frutales (Afanador *et al.*, 2003). La especie *gloeosporioides* agente causal de la antracnosis es la más devastadora en cultivos de ñame, con pérdidas de productividad reportadas hasta de un 80% (Green *et al.*, 2000; Abang *et al.*, 2003). Este hongo desarrolla una estrategia de patogenidad hemibiótrofa, que comienza por una biotrofia asintomática post-penetrativa seguida por una fase necrótropa destructiva, finalizando con la aparición de síntomas de la enfermedad y producción de conidios por el patógeno (Bailey *et al.*, 1992). Ataca las hojas de las variedades susceptibles de ñame, produciendo puntos marrones o negros que suelen unirse o expandirse para formar largas manchas que reducen notablemente el área fotosintética (Abang *et al.*, 2003). La transmisión de la enfermedad se da por la dispersión de las conidias del hongo a través de lluvia y rocío adyacente a hojas y tallos, también se encuentra comúnmente en restos vegetales contaminados (Winch 1984; Abang *et al.*, 2003).

Fusarium spp. habita suelo y plantas, en especial especies tropicales. Además de ser un contaminante, representa uno de los principales géneros fúngicos patógenos de plantas. Posee la capacidad de sobrevivir inactivo en el suelo en forma de clamidosporas durante varios años, incluso en ausencia de plantas hués-

ped (Allen *et al.*, 1982; Haware *et al.*, 1996; Freeman y Maymon 2000). Diferentes especies de *Fusarium* entre ellas *oxysporum*, *moniliforme* y *solani*, se han encontrado asociadas a pudrición seca del tubérculo en etapa de almacenamiento, los síntomas se caracterizan por la presencia de un borde rosado o amarillento en el tejido infectado. Las estructuras de conservación de *F. oxysporum* garantizan su sobrevivencia hasta encontrar condiciones propicias para germinar y proliferar (Morse *et al.*, 2000; Amusa *et al.*, 2003; Aboagye *et al.*, 2005).

La reducción del inóculo de estos patógenos en el ambiente restringe su eficacia, por tanto, su rápida detección permite tomar medidas preventivas en cuanto al manejo del cultivo, que aunque es difícil por su capacidad de sobrevivencia, permite disminuir su prevalencia y evitar su diseminación. La identificación de hongos fitopatógenos por morfología macroscópica y microscópica toma varios días, además de hacerse difícil y en muchos casos imposible hasta el nivel de especies. Estas limitaciones ponen en riesgo un diagnóstico confiable y oportuno (Rodríguez-Tudela *et al.*, 2008) que permite la selección de alternativas de manejo adecuadas para el control del patógeno, a pesar de ello es la alternativa de diagnóstico inmediata para los agricultores. En contraste la detección molecular por estar basada en el estudio de características genómicas, permite la identificación y diferenciación de organismos fitopatógenos de forma más sensible, específica, certera y rápida (Alves *et al.*, 2002; Abd-El salam *et al.*, 2003; Patino *et al.*, 2004; Sreenivasa *et al.*, 2008), especialmente la secuenciación de regiones del ADN altamente variables como los ITS o el EF- α (descritos a continuación) que son comparadas contra bases de datos internacionales (Martínez-Hormazábal 2006), no obstante esta herramienta por costos y tiempo de procesamiento pueden hacer lenta la obtención de resultados, razón por la cual es de gran importancia encontrar otras alternativas de diagnóstico más accesibles para los productores.

La amplificación de los espaciadores internos transcritos conocidos como ITS por sus siglas en inglés (Internal Transcribed Spacer) contenidos en el ADN ribosomal (ADNr), es una de las metodologías de diagnóstico molecular más utilizadas (White 1990; Hibbett 1992; Virtudazo *et al.*, 2001; Nagao *et al.*, 2005; Pérez-Vera *et al.*, 2005) para diferenciar entre géneros, especies y variedades de hongos relacionados, difíciles de distinguir fenotípicamente (Moricca *et al.*, 1998; Abd-El salam *et al.*, 2003; Baird *et al.*, 2008), gracias a que se han derivado cebadores específicos de sus secuencias.

Mills *et al.* (1992) sintetizaron primers especie-específicos a partir de ITS para identificar *C. gloeosporioides*, los cuales han sido de uso para su detección en diferentes cultivos (Brown *et al.*, 1996; Freeman y Maymon 2000; Afanador *et al.*, 2003). Para el género *Fusarium* se han utilizado cebadores como FUM1 (anteriormente FUM5) que permiten la amplificación del gen responsable de la biosíntesis de fumonisinas, metabolito secundario tóxico característico de algunas especies, entre ellas *oxysporum*, *proliferatum*, *graminearum*, *verticillioides* y *anthophilum* (Bluhm *et al.*, 2004; Baird *et al.*, 2008; Proctor *et al.*, 2008; Sreenivasa *et al.*, 2008) que causan diversas patologías en animales y humanos (Agrios 2005). Así mismo, existen cebadores universales de utilidad filogenética debido al alto nivel de secuencias polimórficas que muestran entre especies estrechamente relacionadas; un ejemplo es el gen del EF- α que codifica una parte esencial de las proteínas que hacen parte de la maquinaria de traducción (O'Donnell *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2004; Tanabe *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda, estandarización e implementación de herramientas moleculares para la identificación de patógenos asociados al cultivo de ñame de forma rápida, confiable y accesible.

Materiales y métodos

Aislamientos fúngicos e identificación morfológica

A partir de hojas de ñame espino (*D. rotundata*) y criollo (*D. alata*) con puntos o manchas necróticas se aislaron patógenos asociados al cultivo. El material vegetal fue recolectado por el grupo de investigación y por los productores previa capacitación, en el municipio Los Córdoba vereda La Salada, departamento de Córdoba, Colombia.

Se extrajeron de las lesiones pequeños fragmentos de tejido que fueron tratados con solución de hipoclorito de sodio al 5.25% por espacio de 1 minuto y lavados tres veces con agua destilada estéril. A continuación se secaron con papel absorbente estéril para ser sembrados en placas de Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) más 0,05 g/ml de cloranfenicol y se incubaron a 25°C.

Diariamente se hizo seguimiento y se repicaron los crecimientos miceliares en nuevos medios. La identificación de los fúngicos se realizó por observación de las características macroscópicas y microscópicas a partir de microcultivos, procedimiento que se repitió tres veces. Los aislados fueron conservados por el

método de criopreservación y cultivo periódico con aceite mineral según Pinzón *et al.* (2009).

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo utilizado por Abang *et al.* (2002) con modificaciones realizadas por Pinzón *et al.* (2011) que consistieron en lisar el tejido fúngico con perlas de cristal de 0.5 mm (Scientific Industries, Inc.) en el equipo perturbador celular AC (Mundequipo). La cuantificación del ADN extraído se realizó con el fluorómetro Qubit (Invitrogen) y las concentraciones se ajustaron por dilución con agua ultra pura a 10 ng/μL.

Secuenciación de regiones ITS

La identificación molecular a nivel de especie de hongos fitopatógenos asociados a plantaciones de ñame, se llevó a cabo por secuenciación de los ITS. Para la amplificación de la región completa de los espaciadores se usaron cebadores universales denominados ITS1 e ITS4 (tabla 1) bajo las siguientes condiciones: buffer NH₄ 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.2 mM, cebadores 0.3 μM, 1 unidad de Taq Polimerasa (Bioline) y 40 ng de ADN muestra en un volumen final de 20 μl; el programa de termociclaje (termociclador MWG Primus 96) correspondió a un ciclo inicial de 2 minutos a 95°C, 34 ciclos de amplificación (desnaturalización por 1 minuto a 95°C, anillamiento por 30 segundos a 50°C y extensión por 2 minutos a 72°C) y un ciclo

de extensión por 10 minutos a 72°C. Los amplímeros obtenidos se purificaron con la solución Sure Clean Plus de Bioline y se enviaron a Macrogen, Korea, para su secuenciación en ABI 3700, secuenciador automático. Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit y comparadas para identificación por similitud contra bases de datos internacionales con la herramienta BLAST.

Amplificación con cebadores específicos

Se seleccionaron cebadores reportados en la literatura para la detección específica de las especies fúngicas identificadas por secuenciación y se realizaron ensayos por triplicado (tabla 1).

Para la amplificación del EF-α y las regiones ITS específicas para *C. gloeosporioides* se evaluaron los cebadores EF-1, EF-2 y CGInt, ITS4; respectivamente. Las condiciones usadas fueron las mismas que para la amplificación de ITS universales, con la siguiente única modificación en el programa de amplificación para el EF-α: 40 ciclos con desnaturalización de 30 segundos a 95°C, anillamiento a 55°C por 30 segundos y extensión durante 1 minuto a 72°C. En el caso de ITS específicas para *F. oxysporum* y gen de la fumonisina, se empleó buffer NH₄ Taq 1X, MgCl₂ 1.75 mM, dNTP 0.2 mM, cebadores en concentración 0.3 μM, 2 unidades de Taq Polimerasa (Bioline) y 10 ng de ADN muestra, en un volumen final de 20 μl. El programa inició con una temperatura de 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C

Tabla 1: Cebadores evaluados para detección de fitopatógenos fúngicos asociados al cultivo de ñame

Cebador		Secuencia	Bibliografía
ITS Universales	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White, 1990
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
ITS para <i>C. gloeosporioides</i>	CGInt	5'-GGCCTCCCGCTCCGGGCGG-3'	Mills <i>et al.</i> , 1992
	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
ITS para <i>Fusarium sp.</i>	Fu-f	5'-CAACTCCCAAACCCCTGTGA-3'	Bluhm <i>et al.</i> , (2004)
	Fu-r	5'-GCGACGATTACCAGTAACGA-3'	
	ITS-f	5'-AACTCCCAAACCCCTGTGAACATA-3'	
	ITS-r	5'-TTTAACGGCGTGGCCGC-3'	
Gen de la fumonisina	FUM1-f	5'-CCATCACAGTGGGACACAGT-3'	Bluhm <i>et al.</i> , (2004)
	FUM1-r	5'-CGTATCGTCAGCATGATGTAGC-3'	
EF-α	EF-1	5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3'	O'Donnell <i>et al.</i> , 1998
	EF-2	5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'	

por 1 minuto, anillamiento a 58°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto) y un ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos. Finalmente los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con SYBR® safe (Invitrogen).

Pruebas de patogenicidad

Para evaluar si los aislados fúngicos obtenidos de foliolos de ñame son causantes de la sintomatología observada, se probaron los postulados de Koch. Se utilizaron hojas y tubérculos sanos de ñame (Variedades espino y criollo) y los aislados fúngicos identificados previamente.

Luego de lavar el material vegetal con agua corriente, tratarlo con hipoclorito de sodio al 1% por 2 minutos y agua destilada estéril; se infectó su superficie con discos de agar de 0,5 cm³ de cada uno de los aislamientos fúngicos. Seguidamente, los ensayos se almacenaron en bolsas de plástico resellables que contenían toallas de papel húmedas (agua destilada estéril) y se incubaron a 24°C. En el ensayo se evaluaron diferentes condiciones con tres repeticiones: el aislado evaluado a) inicia su colonización en hoja o tubérculo por sí solo, b) requiere lesiones en el tejido para poder iniciar la colonización, c) se asocia con otros patógenos para iniciar su colonización, puesto que no poseen la maquinaria de penetración necesaria. El progreso de la infección se siguió diariamente.

Resultados y discusión

El estudio de las características macroscópicas y el reconocimiento de estructuras microscópicas con base en las descripciones de Barnett y Hunter (1998) y la base de datos Mycobank, permitieron identificar dos géneros fúngicos asociados a enfermedades de ñame, cinco aislados con rasgos propios de *Colletotrichum* sp. y tres de *Fusarium* sp. Este método de diagnóstico demandó entre 10 a 12 días adicionales al proceso de aislamiento de hongos, necesario para la implementación de todas las metodologías evaluadas y no permitió identificar a nivel de especies.

La secuenciación de ITS obtenidas con cebadores universales y su posterior comparación con secuencias previamente reportadas e identificadas, permitió identificar las especies *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* presentes en hojas de ñame. El proceso tomó un tiempo aproximado de 20 días de los cuales 18 obedecen al tiempo en espera de los resultados de secuenciación, sin embargo, fue menos laborioso y permitió una identificación confiable.

La búsqueda de marcadores moleculares arrojó los siguientes resultados: La amplificación con iniciadores universales para ITS y la posterior visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, mostró pequeñas variaciones en el tamaño de los fragmentos dependiendo del género fúngico evaluado, 550 pb para *F. oxysporum* y 570 pb para *C. gloeosporioides* (figura 1A). Con primers ITS específicos para *C. gloeosporioides*, no se observó amplificación para los aislados de *F. oxysporum*, para *C. gloeosporioides* se obtuvo un fragmento de 450 pb (figura 1B). La amplificación con primers específicos para *Fusarium* sp. y cebadores del gen de biosíntesis de fumonisina dio como resultado fragmentos del mismo tamaño para las especies evaluadas, 390 pb y 183 pb respectivamente (figura 1C, D y E); según estudios realizados por Sreenivasa *et al.* (2008) y Abd-El salam *et al.* (2003) estos primers muestran buenos resultados en la detección específica de especies de *Fusarium*, sin embargo, para el diagnóstico diferencial de hongos relacionadas con cultivos de ñame se observa una alta inespecificidad. Los cebadores que amplifican regiones características del EF- α permitieron visualizar bandas de 700 pb para *F. oxysporum* en concordancia con los experimentos de Kim *et al.*, (2005) y de 520 pb para *C. gloeosporioides* (figura 1F), resultados que perfilan a este marcador como una excelente metodología de diagnóstico diferencial entre *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides*, en una misma reacción y en un tiempo aproximado de dos días, significativamente más rápido que las otras metodologías evaluadas.

Las pruebas de patogenicidad para las dos especies evaluadas permitieron confirmar que el hongo *C. gloeosporioides* fue el causante de la sintomatología observada en hojas de ñame, el mismo hallazgo fue realizado por Akem (1999). Cinco días postinfección se observó el signo más característico del patógeno, la formación de acérvulos y completado el día decimo se inició la formación de una mancha necrótica en la superficie foliar (figura 2A). Por otro lado, el microorganismo tuvo la capacidad de penetrar el tejido vegetal y desarrollar la enfermedad por sí solo, sin necesidad de condiciones facilitadoras de la interacción como daño mecánico o asociación con otro patógeno. Al respecto son conocidos los mecanismos especializados empleados por *C. gloeosporioides* para establecerse en el tejido, entre ellos formación de tubos germinales, apresorio, hifas intracelulares e hifas secundaria necrotólicas (Perfect *et al.*, 1999; Cano 2004). Los ensayos en tubérculo fueron negativos, no se observaron signos del hongo ni síntomas en el material (figura 3A), probablemente las condiciones no son las favorables para su establecimiento y desarrollo.

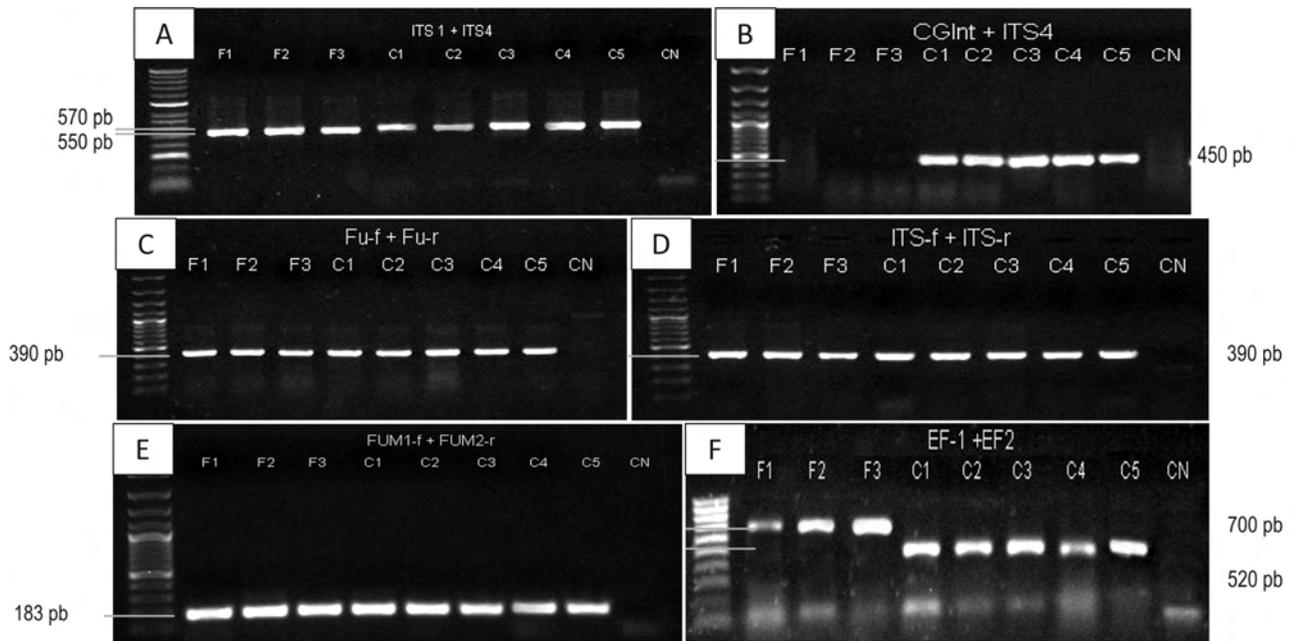


Figura 1: A. Amplificación con ITS universales; B. ITS específicos para *C. gloeosporioides*; C, D y E. Cebadores específicos para *F. oxysporum*; F. Cebadores para EF- α .

Marcadores de peso: HyperLadder II y IV (Bioline). **Muestras:** F1, 2 y 3: *F. oxysporum*; C1, 2, 3, 4 y 5: *C. gloeosporioides* y CN: Control Negativo

Fusarium sp. tiene antecedentes de causar daños en tubérculos de ñame en postcosecha (Morse *et al.*, 2000; Amusa *et al.*, 2003; Aboagye *et al.*, 2005), pero no directamente en las hojas. En este estudio se detectó la presencia de *F. oxysporum* en afecciones foliares de ñame, datos coincidentes con los estudios realizados por Akem (1999). Las pruebas de patogenicidad mostraron que aunque el hongo desarrolla micelio, no causa ningún tipo de sintomatología en hojas, aún si se evade su paso por barreras físicas facilitando su entrada por daño mecánico o asociación con hongos capaces de penetrarlas (figuras 2B y C). La presencia de este patógeno en cultivos de ñame ha venido en aumento, probablemente por el ambiente que es favorable para su crecimiento, el hecho del suelo ser su reservorio natural, su capacidad de sobrevivir en latencia y su fácil y rápida dispersión conidial (Agrios 2005); razones que pueden explicar su detección en hojas como habitante y no como patógeno de las mismas.

Los ensayos de patogenicidad en tubérculo confirmaron que *F. oxysporum* causa pudrición, aumentando la severidad de la afección con daño mecánico preexistente (figura 3B). Según Aboagye *et al.* (2005) a los 15 días de infectado el tubérculo de ñame con *F. oxysporum*, la severidad de la pudrición alcanza cerca de 150 cm² de área superficial afectada; datos simila-

res a los observados en este estudio. La capacidad del hongo para penetrar e infectar con tal rapidez el tubérculo, se puede deducir según Morse *et al.* (2000) por la ausencia en estos de una cutícula protectora y por su delgado tejido peridérmico y meristemático. Esta condición hace necesaria la toma de medidas preventivas que minimicen afecciones en tubérculo causadas por daño mecánico o presencia de insectos durante su cosecha, transporte o almacenamiento (Morse *et al.*, 2000; Amusa *et al.*, 2003).

Conclusiones

Este estudio evidencia que la amplificación de regiones intrónicas del EF- α es una herramienta de diagnóstico diferencial que permite identificar simultáneamente *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, principales agentes fúngicos que afectan los cultivos de ñame en Colombia. Dado el carácter de investigación participativa de este trabajo, surge una opción de diagnóstico disponible para productores y comunidad científica que aporta a la detección temprana, y por ende a la prevención de enfermedades fúngicas que constituyen un factor limitante de la producción de ñame en el país.

La presencia de *F. oxysporum* en hojas de ñame no genera ninguna patología, su hallazgo se puede aso-

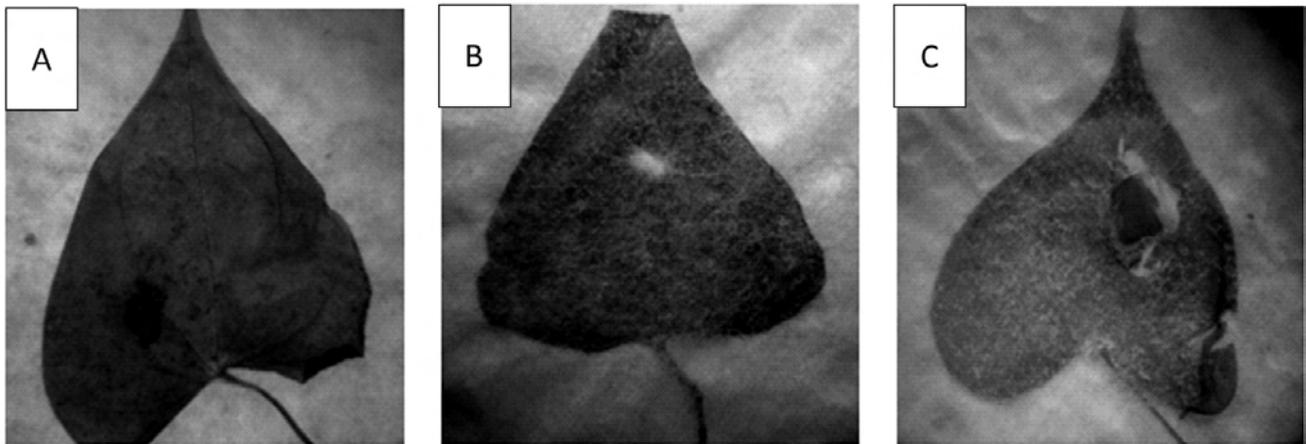


Figura 2: Pruebas de patogenicidad en hojas de ñame criollo: **A.** inoculación con C1, aislamiento de *C. gloeosporioides*; **B.** inoculación con F1, aislamiento de *F. oxysporum*; **C.** B con daño mecánico.

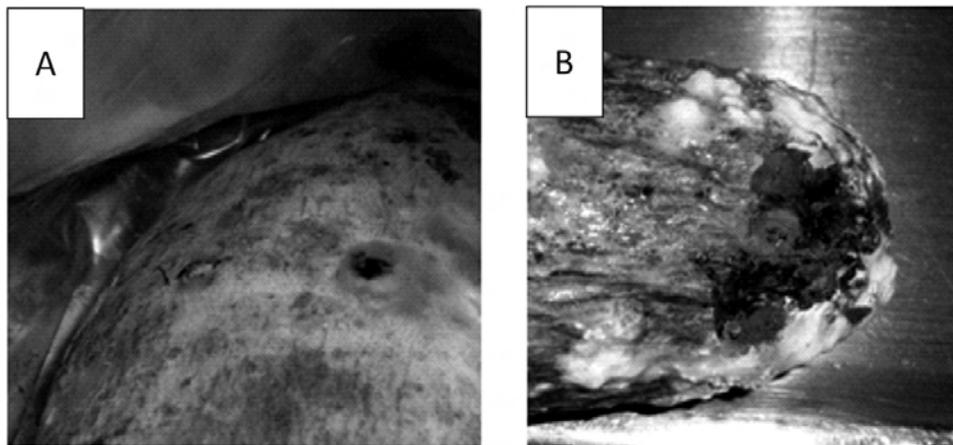


Figura 3: Pruebas de patogenicidad en tubérculos de ñame espino. **A.** inoculación con C1, aislamiento de *C. gloeosporioides* y **B.** inoculación con F1, aislamiento de *F. oxysporum*.

ciar a su fácil y rápida dispersión conidial, a su acentuada incidencia en suelo que es su hábitat natural y en donde es capaz de sobrevivir prolongadamente hasta encontrar ambientes favorables para su propagación.

Las pruebas de patogenicidad confirmaron como agente causal de antracnosis foliar en ñame a *C. gloeosporioides* y de la pudrición del tubérculo al patógeno *F. oxysporum*. Establecer si en un tubérculo asintomático hay presencia del patógeno permite tomar medidas preventivas y de control.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a los productores de ñame de la Costa Atlántica colombiana por el envío de muestras foliares de ñame. Adicional-

mente agradecen la financiación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia.

Referencias Bibliográficas

- Abang, M., Winter, S., Mignouna, H., Green, K. and Asiedu, R. 2003. Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12): 486-496.
- Abang, M. M., Winter, S., Green, K. R., Hoffmann, P., Mignouna, H. D. and Wolf, G. A. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology*. 51: 63-71.
- Abd-El salam, K. A., Aly, I. N., Abdel-Satar, M. A., Khalil, M. S. and Verreet J. A. 2003. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*. 2 (4): 82-85.

- Aboagye-Nuamah, F., Offei S.K., Cornelli, E.W. and Bancroft R.D. 2005. Severity of spoilage rots of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Annals of Applied Biology* 147: 183-190.
- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymond, M. and Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora, y Mango in Colombia and identification of a unique species of the genus. *The American Phytopathological Society*. 93 (5): 579-587.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. U.S.A: Elsevier Academic Press, 5ª Edition, p. 164 y 560.
- Akem, C. N. 1999. Yam die-back and its principal cause in the yam belt of Nigeria. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2 (4): 1106-1109.
- Allen, N., Jevne R., Mirocha, C. and Lee, Y. 1982. The effect of a *Fusarium roseum* culture and diacetoxyscirpenol on reproduction of White Leghorn females. *Poultry Science*. 61 (11): 2172-2175.
- Alves, M., Ramos, B., García-Sánchez, M., Eslava, A. and Díaz-Minguez, J. 2002. A DNA-based procedure for in plant detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*. 92: 237-244.
- Alvis, A., Vélez, C., Villada, H. and Rada-Mendoza, M. 2008. Análisis físico químico y morfológico de almidones de ñame, yuca y papa y determinación de la viscosidad de las pastas. *Información Tecnológica*. 19 (1): 19-28.
- Amirato, P. V. 1984. Yams. In: Ammirato, P.V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada, Y. Handbook of plant cell culture. Vol 3. Crop Species, MacMillan, New York, p. 327-354.
- Amusa, N. A., Adegbite, A. A., Muhammed, S. and Baiyewu, R. A. 2003. Yam diseases and its management in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12): 497-502.
- Baird, R., Abbas, H., Windham, G., Williams, P., Baird, S., Ma, P., Kelley, R., Hawkins, L. and Scruggs, M. 2008. Identification of Select Fumonisin Forming *Fusarium* Species Using PCR Applications of the Polyketide Synthase Gene and its Relationship to Fumonisin Production *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*. 9: 554-570.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of imperfect fungi*. Minnesota, U.S.A: Burgess Publishing Company, 3ª Edition, p 126 y 200.
- Bluhm, B. H., Flaherty J. E., Cousin M. A. and Woloshuk C. P. 2004. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal Food Protection*. 65, 1955-1961.
- Brown, A.E., Sreenivasaprasad, S. and Timmer, L.W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*. 86 (5): 523-527.
- Bustamante, S. y Buitrago, G. 2006. Molecular characterization of Colombian yam germoplasm by "Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci" (SAMPL). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 7(2): 60-66.
- Cano, J. 2004. Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum* Species of Clinical Interest. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (6): 2450-2454.
- Chacón, A. G., Gómez, L., Torres, S. y Saborío, F. 2005. Aclimatización de plántulas de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*D. Alata*) producidas *in Vitro*. *Agronomía Costarricense*. 29 (3): 47-58.
- Freeman, S. and Maymon, M. 2000. Reliable Detection of the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, Causal Agent of Bayoud Disease of Date Palm, Using Molecular Techniques. *Phytoparasitica*. 28(4).
- Geiser, D., Jimenez, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraghavan, N., Ward, T., Zhang, N., Kuldau, G. and O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*. 110, 473-479.
- Green, K. R., Abang, M. M. and Iloba C. 2000. A rapid Bioassay for Screening Yam Germplasm for Response to Anthracnose. *Tropical Science*. 40 (3): 132-138.
- Guzmán, M. y Buitrago, G. 2000. Ñame: producción de semillas por Biotecnología. Santafé de Bogotá D.C, Colombia: Unibiblos. p 17-19.
- Haware, M. P., Nene, Y. L., Natarajan, M. 1996. The survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in the soil in the absence of chickpea. *Phytopathologia Mediterranea*. 35(1): 9-12.
- Hibbett, D.S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the Mycological Society*. 33: 533-556.
- ICA Informa. 2009. Exportadores de ñame de la mano del ICA. Noticias área Agrícola.
- Kim, Y., Hutmacher, R. and Davis, R. 2005. Characterization of California Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Plant Disease*. 89 (4).
- Lee, Y. M., Choi, Y. K. and Min, B. R. 2000. PCR-RFLP and Sequence Analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. *The Journal of Microbiology*. 38 (2): 66-73.
- Li, S., Lu, A., Wang, Y. and Li, Y. 2003. Suppressive effects of a Chinese herbal medicine qing-luo-yin extract on the angiogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *The American Journal of Chinese Medicine*. 31 (5) : 713-20.
- Martínez-Hormazábal, J. 2006. Función e Importancia de la Biotecnología en el Desarrollo de las Ciencias, Especialmente en Biotecnología y Medicina Molecular. *Ciencia & Trabajo*. 8 (22): 159-163.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. and Brown, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 98: 137-144.
- Miranda, E. y Sandoval, I. 2000. Desarrollo de un método rápido y sencillo para el aislamiento de ADN de especies fúngicas que afectan el arroz y el tabaco. *Fitosanidad*. 4 (1-2): 107-108.
- Montes, E., Salcedo, J., Zapata, J., Carmona, J. y Paternina, S. 2008. Evaluación de las propiedades modificadas por vía enzimática del almidón de ñame (*D. Trifida*) utilizando α -amilasa (termamyl® 120 I, tipo I). *Vitae, revista de la facultad de química*.

- Morse, S., Acholo, M., McNamara, N. and Oliver, R. 2000. Control of storage insects as a means of limiting yam tuber fungal rots. *Journal of Stored Products Research*. 36, 37-45.
- Moricca, S., Ragazzi, A., Kasuga, T. and Mitchelson, K. 1998. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton tissue by polymerase chain reaction. *Plant Pathology*. 47: 486-494.
- Nagao, K., Ota, T., Tanikawa, A., Takae, Y., Mori, T., Udagawa, S. and Nishikawa, T. 2005. Genetic identification and detection of human pathogenic *rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. *Dermatological Science*. 39: 23-31.
- Norman, M., Pearson, C. and Searle, P. 1984. The ecology of tropical food crops. London, Cambridge University Press. p 369.
- O'Donnell, K., Kistler, C., Cigelnik, E. and Plötz, R. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 95: 2044-2049.
- O'Hair, S. K. 1990. *Tropical Root and Tuber Crops*. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, OR. p 424-428.
- Osorio, J. y Ramírez, B. 1989. Principales enfermedades de ñame en la región Caribe colombiana. *ICA informa*. 23 (1): 13-19.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J. and Green, J. R. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27 (2-3): 186-198.
- Patino, B., Mirete, S., Gonzalez-Jaen, T., Mule, G., Rodriguez, T. M. and Vazquez, C. 2004. PCR detection assay of Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. *J. Food Protection*. 6: 1278-1283.
- Pérez, J., Albert, D., Rosete, S., Sotolongo, L., Fernández, M., Delprete, P. y Raz, L. 2005. Consideraciones etnobotánicas sobre el género *Dioscorea* (Dioscoreaceae) en Cuba. *Ecosistemas*. 14(2).
- Pérez-Vera, O. A., Yáñez-Morales, M. J., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D. y García-Díaz, S. 2005. Hongos asociados a eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid. *Agrociencia*. 39:311-318.
- Pinzón, Y., Bustamante, S. y Buitrago, G. 2009. Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11 (2): 8-18.
- Pinzón, Y. A.; Bustamante, S. L.; Buitrago, G. 2011. Diagnóstico diferencial de patógenos fúngicos implicados en el desarrollo de enfermedades limitantes de los cultivos de ñame en el Caribe colombiano. *Fitopatología Colombiana*. 35 (1): 67.
- Proctor, R. H., Busman, M., Seo, J-A., Lee, Y. W. and Plattner, R. D. A fumonisin biosynthetic gene cluster *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genetics and Biology*. 45(6): 1016-1026.
- Purseglove, J.W. 1972. *Tropical Crops; Monocotyledons*. London, Longmans. p. 607.
- Reina, Y. C. 2012. El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. *Banco de la república: Documentos de trabajo sobre economía regional*, (168).
- Rodríguez-Tudela, J., Cuesta, I., Gómez-López, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martínez, L. y Cuenca-Estrella M. 2008. Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 26 (13): 47-53.
- Rodríguez, W. 2000. Botánica, Domesticación y Fisiología del Cultivo de Ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*. 11 (2): 133-152.
- Sautour, M., Mitaine-Offer, A. C., Miyamoto, T., Dongmo, A. and Lacaille-Dubois, M. A. 2004. Antifungal steroid saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Planta Médica*. 70 (1): 90-92.
- Sreenivasa, M. Y, Dass, R. S., Charith-Raj, A. P. and Janardhana, G. R. 2008. PCR method for the detection of genus *fusarium* and fumonisin-producing isolates from freshly harvested sorghum grains grown in Karnataka, India. *Journal of Food Safety*. 28: 23-247.
- Tanabe, Y., Saikawa, M., Watanabe, M. and Sugiyama, J. 2004. Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1a and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 30 (2): 438-449.
- Virtudazo, E. V., Nakamura, H. and Kakishima, M. 2001. Ribosomal DNA-ITS sequence polymorphism in the sugarcane rust, *Puccinia kuehni*. *Mycoscience*. 42: 447-453.
- White, T. J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols (innis, M. Am, Gelfrand, D. H., Sninsky, J. J. and White, J., eds.). Academic Press, San Diego, California. p. 315-322.
- Winch, J.E., Newhook, F.J., Jackson, G.V.H. and Cole, J.S. 1984. Studies of *Colletotrichum gloeosporioides* of yam, *Dioscorea alata* in Solomon Islands. *Plant Pathology*. 33: 467-477.